

00562

8

15



Universidad Nacional Autónoma
de México

FACULTAD DE QUIMICA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

BIOSINTESIS Y CONTENIDO DE COLAGENA EN TEJIDOS
UTERINOS DE LA RATA DURANTE EL EMBARAZO Y EL
POSPARTO

T E S I S

Que para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS QUIMICAS
(BIOQUIMICA)

p r e s e n t a

HORTENSIA SOTO TREJO

México, D. F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1986



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

RESUMEN	1
1. Español	1
2. Inglés	4
I. INTRODUCCION	8
1. Generalidades del Tejido Conjuntivo	8
2. Elastina	8
3. Proteinglicanos	9
4. Fibronectina	12
5. Colágena	13
a) Características Estructurales de la Colágena	13
b) Tipos Genéticos de Colágena	15
c) Características Estructurales de la Procolágena	18
d) Genes Estructurales para Procolágena	20
e) Regulación de la Biosíntesis de Colágena	22
f) Pasos en la Biosíntesis de la Colágena	28
g) Degradación de la Colágena	35
II. ANTECEDENTES QUE APOYAN LA HIPOTESIS DEL TRABAJO	45
III. HIPOTESIS DE TRABAJO	52
IV. OBJETIVOS DEL TRABAJO	54
V. MATERIALES	55
VI. METODOS	56
I Protocolo de Embarazo en Ratas	56
II Obtención de Tejidos Uterinos	56
III Cuantificación de Colágena	58
IV Cuantificación de Prolina	58
V Biosíntesis de Proteínas en Explantes de Tejido	59

VI	Determinación de la Radiactividad Total Incorporada	60
VII	Determinación de la Radiactividad Incorporada a Proteínas Colagénicas	60
VIII	Determinación de ADN	61
IX	Determinación de las Proporciones Relativas de Colágenas I y III por Análisis Densitométrico	62
X	Determinación de Azúcares Simples	63
VII.	RESULTADOS	65
	PARAMETROS EVALUADOS DURANTE EL EMBARAZO Y POSPARTO	
1.	Cambios en el Peso del Utero	65
2.	Cambios en la Concentración de Colágena	66
3.	Cambios en la Relación de Proteínas Totales y Colagénicas	70
4.	Variaciones en la Concentración de ADN en los Tejidos Uterinos	70
5.	Variaciones en la Relación Colágena/ADN en los Tejidos Uterinos	78
6.	Variaciones en la Biosíntesis de Proteínas Totales y Colagénicas	78
7.	Quantificación de las Proporciones Relativas de las Colágenas I y III por Análisis Densitométrico	87
8.	Determinación de Azúcares Simples	96
VIII.	DISCUSION	102
IX.	CONCLUSIONES	119
X.	BIBLIOGRAFIA	123

RESUMEN

La colágena es una proteína extracelular del tejido conjuntivo, que se caracteriza por tener una tasa de recambio muy lenta en la mayoría de los tejidos adultos normales. Sin embargo, existen condiciones fisiológicas en las que el recambio está incrementado como son: morfogénesis, metamorfosis e involución uterina.

Los primeros estudios referentes al metabolismo de colágena uterina fueron realizados por Harkness y col. (75). Los resultados de este trabajo y otros presentes en la literatura, demostraron que el útero sufre cambios en el peso, tamaño y contenido total de colágena durante el embarazo, retornando a valores normales después del parto. Sin embargo, no se observó una relación directa entre el incremento en el peso y el contenido de colágena uterina, lo que sugería la participación de otros componentes matriciales como responsables del aumento en el peso del útero.

Por otra parte, Kao y col. (89) demostraron que el útero normal humano poseía colágenas tipo I y III en proporciones de 80% y 20% respectivamente. Sin embargo, no se han realizado estudios para evaluar la capacidad biosintética de los tejidos uterinos, así como determinaciones en las proporciones relativas de las colágenas I y III a lo largo del embarazo y durante el posparto. Los cambios fisiológicos en el útero durante este período sugieren que existen modificaciones en la biosíntesis de la colágena con respecto a otras proteínas, así como posibles cambios en las proporciones de las colágenas I y III.

En el presente estudio se utilizó el embarazo en la rata como un modelo experimental para determinar los posibles cambios en la relación de la colágena con respecto a otras protefmas matriciales en distintas zonas del tejido uterino. Se estudió la relación ADN/colágena, se realizaron estudios de biosíntesis de protefmas en explantes de tejido y se determinó la proporción de las colágenas intersticiales (tipos I y III), así como la concentración y contenido de glicoproteinas totales.

Los resultados mostraron que:

- 1.- El incremento en peso y colágena durante el embarazo no fue paralelo.
- 2.- La concentración de colágena disminuyó a un 40%, 20% y 30% con respecto a valores normales en la zona de implante (tejido predominante), explante y vagina respectivamente, durante el embarazo.
- 3.- Después del parto se observó una recuperación en la concentración de colágena en las zonas de explante y vagina. La zona de implante mostró un valor que correspondió al 47% comparado con el valor normal, siete días después del parto.
- 4.- La relación de protefmas no colagénicas/colágena expresada como relación Pro/HO-Pro incrementó en el implante de 1.96 ± 0.04 a 3.23 ± 0.19 durante el embarazo, como respuesta a una disminución en la concentración de colágena y un incremento en protefmas no colagénicas.
- 5.- La concentración de ADN disminuyó durante el embarazo debido a un aumento de matriz extracelular, e incrementó después del parto a consecuencia de la participación de células de la respuesta inflamatoria en la involución uterina.

- 6.- La relación ADN/colágena permaneció constante durante el embarazo para las tres zonas, pero no así en el parto.
- 7.- La biosíntesis de colágena disminuyó durante el embarazo, de un valor inicial de $8.45\% \pm 0.37$ a $3.28\% \pm 0.38$ al día 15 en la zona de implante, recuperándose el valor al día 21. Después del parto el porcentaje de biosíntesis aumentó los días 2, 3 y 5, obteniéndose el día 3 el valor más alto ($13.41\% \pm 0.05$). Dicho aumento se presentó como una respuesta a la remodelación que sufre el tejido.
- 8.- Las proporciones de los tipos de colágenas I y III permanecieron constantes, 80% y 20% respectivamente, durante el embarazo y el parto.
- 9.- Se observó una disminución en los componentes beta y gamma durante el embarazo, debido a la presencia de colágena joven. Dichos componentes se recuperaron paulatinamente después del parto.
- 10.- La concentración de glicoproteínas totales incrementó en la zona de implante de 7.14 ± 0.44 mg/gth a 13.97 ± 1.11 al día 18 del embarazo. En la zona de explante no se observaron cambios. Lo anterior apoya la participación de otros componentes matriciales en el aumento del tamaño uterino durante el embarazo.

Finalmente, es posible que un mejor conocimiento de los cambios fisiológicos que ocurren en el útero durante el embarazo y el parto, permitirán el diseño de estrategias adecuadas para identificar y eventualmente caracterizar los eventos que conducen a un estado patológico de estos tejidos.

SUMMARY

Collagen is an extracellular protein of the connective tissue, characterized by presenting a very low turnover rate in most of the normal adult tissues. However, there are some physiological conditions in which this turnover is increased such as morphogenesis, metamorphosis and uterine involution.

The first study concerning collagen metabolism was performed by Harkness et al (75). The results obtained in this work, as well as others reported in the literature, demonstrated that the uterus undergoes remarkable changes in weight, size and total collagen content during pregnancy. All these parameters returned to normal values several days after delivery. Nevertheless, a direct correlation between the increase in weight and uterine collagen content was not observed. Furthermore, another study by Kao et al (89) demonstrated that human normal uterus contained two major types of genetically different collagens (Types I and III), in proportions of 80% and 20% respectively. However, studies on collagen biosynthesis, as well as determinations of the relative proportions of Type I and III collagens during and after pregnancy, have not been carried out. The physiological changes observed in uterine tissues during this period, suggested that possible modifications in collagen synthesis compared with that of total or non-collagenous proteins could be apparent, as well as possible variations in the proportions of Type I and III collagens during pregnancy and postpartum.

In this study, the pregnancy and uterine involution in Wistar rats, was used as an experimental model to study the variations in collagen/total proteins ratio in different zones of the uterus. Changes in DNA/collagen ratio were also evaluated and collagen synthesis was measured in organ culture conditions. Also, variations in the proportions of Type I and III collagens were determined, as well as content and concentration of total glycoproteins. For this purpose, the uterus was divided in implant, explant and vaginal sections.

The results obtained in the present study can be summarized as follows:

- 1.- The observed increase in weight was not proportional to total collagen content in the uterus during pregnancy.
- 2.- Uterine collagen concentration decreased to 40%, 20% and 30% of the normal values in implant (predominant tissue), explant and vaginal sections respectively.
- 3.- During postpartum, a recovery in collagen concentration for explant and vaginal sections was observed, whereas in implant sections, collagen concentration values were equivalent to 47% of the normal concentration, even seven days after delivery.
- 4.- The values for non-collagenous proteins/collagen ratio, expressed as proline/hydroxyproline ratio increased in explant sections from 1.96 ± 0.04 to 3.23 ± 0.19 during pregnancy. This augment was due to a decrease in collagen concentration together with an increase in non-collagenous proteins.

- 5.- The values obtained for DNA concentration decreased during pregnancy due to an augmented extracellular matrix. It increased during postpartum due to the influx of cells of the inflammatory response, characteristic of the uterine involution.
- 6.- The values for DNA/collagen ratio remained constant through pregnancy for the three studied sections. The same did not occur during postpartum.
- 7.- Collagen biosynthesis decreased during pregnancy, from an initial value of $8.45 \pm 0.37\%$ to $3.28 \pm 0.38\%$ at day 15 in implant sections, returning to normal values at day 21. After delivery, the percentage of collagen biosynthesis increased at days 2, 3 and 5, reaching its highest value at day 3 ($13.41\% \pm 0.05$). This increase represented the normal response of the tissue to the remodeling processes occurring during uterine involution.
- 8.- The proportions of Type I and III collagens remained constant (80% and 20% respectively), during pregnancy and postpartum.
- 9.- A decrease in beta and gamma components during pregnancy was observed, mainly due to the presence of newly synthesized collagen. These components returned to normal levels during uterine involution.
- 10.- During pregnancy, the concentration of total glycoproteins increased in the implant section from 7.14 ± 0.44 mg/gww to a value of 13.97 ± 1.11 at day 18. No changes were observed in the explant section.

The above mentioned results support the hypothesis of the influences of other matrix components in the increase of uterus size during pregnancy. Finally, it is possible that a better understanding of the physiological chan-

ges that take place in the uterus throughout pregnancy and postpartum will allow us to approach, identify and even characterize the events leading to a pathological stage of these tissues.

Other aspects relevant to this project that have not been covered in this study, are related to the regulation and/or control of the expression of genes coding for the different proteins composing the extracellular matrix of the connective tissue of the uterus. To get an insight in these regulatory processes, a better approach could be the use of Molecular Biology, as well as Recombinant DNA techniques.

I. INTRODUCCION

1. GENERALIDADES DEL TEJIDO CONJUNTIVO

El tejido conjuntivo proporciona la matriz de soporte a casi todos los órganos del cuerpo. Está constituido de una población característica de células, rodeadas por fibras y material amorfo o sustancia basal. Las fibras están formadas por colágena y elastina y la sustancia basal consiste primordialmente de proteinglicanos. Las células del tejido conjuntivo pueden dividirse en dos grandes poblaciones: las células residentes y las células inmigrantes. Las primeras son células derivadas del mesénquima, diferenciadas para la síntesis y secreción de proteínas fibrosas y proteinglicanos y entre las que podemos mencionar: fibroblastos, condroblastos, osteoblastos, odontoblastos y células reticulares. También existen células adiposas, macrófagos fagocíticos y células cebadas. Las células inmigrantes, las cuales aparecen de manera transitoria en el tejido conjuntivo son: neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfocitos y monocitos (1).

2. ELASTINA

La elastina es el componente principal de las fibras elásticas y se encuentra en todos los órganos del cuerpo, siendo particularmente abundante en los tejidos elásticos. La elastina es sintetizada como un precursor soluble de 70,000 a 75,000 daltones (tropoelastina), formada de una sola cadena polipeptídica de aproximadamente 800 residuos. Se caracteriza por estar constituida de un alto porcentaje de aminoácidos no polares como glicina, proli

na, alanina, valina, fenilalanina, isoleucina y leucina. La tropoelastina es sintetizada por la traducción del ARN mensajero correspondiente en los ribosomas del retículo endoplásmico rugoso. La cadena naciente posee una secuencia "líder", la cual transfiere a la proteína naciente a través de la membrana del retículo endoplásmico rugoso al lumen de éste, de donde es conducida a elementos transitorios y posteriormente a vesículas periféricas del complejo de Golgi. La elastina sufre modificaciones postraduccionales antes de abandonar la célula como son: eliminación de la secuencia "líder" e hidroxilación de algunos residuos de prolina. Posteriormente las vacuolas secretoras descargan su contenido al espacio extracelular por fusión con la membrana plasmática. En el espacio extracelular la tropoelastina se estructura en forma de fibras a través de su interacción con glicoproteínas microfibrilares y otros componentes de la matriz extracelular. La enzima lisil oxidasa cataliza la formación de enlaces covalentes entrecruzados por la desaminación oxidativa de ciertos residuos de lisina en la molécula de elastina. Entre estas uniones cruzadas destacan la lisina-norleucina derivada de la unión de dos lisinas, la isodesmosina y la desmosina derivadas de tres y cuatro lisinas respectivamente, siendo estas dos últimas exclusivas de la elastina (2,3).

3. PROTEINGLICANOS

Los componentes fibroso y celular del tejido conjuntivo están ro

deados de substancia basal, de la que los proteinglicanos son el principal componente. Los proteinglicanos son polisacáridos unidos covalentemente a una proteína central y presentan características de polianiones por lo que se tifen con colorantes basófilos convencionales. Las cinco principales clases de proteinglicanos se presentan en la Tabla I. Con respecto a la fracción proteica de los proteinglicanos, se piensa que las cadenas de polisacáridos se extienden lateralmente a partir de su punto de unión con una proteína central y que más de una clase de polisacárido puede estar unido a esta proteína. El análisis estructural de los proteinglicanos ha sido difícil debido a la heterogeneidad de estas moléculas. Rosenberg y colaboradores (4) propusieron un modelo para ilustrar la organización compleja de los proteinglicanos en el cartilago articular. La unidad fundamental estructural es denominada subunidad del proteinglicano, el cual consiste de una proteína central de longitud variable, a la cual están unidas covalentemente cadenas de condroitin y queratan sulfato, la longitud de la proteína central determina el número de cadenas de polisacárido que se unen. Las subunidades de proteinglicanos se unen por interacciones de tipo no covalentes a una cadena de ácido hialurónico para dar origen a un agregado de proteinglicano. Las subunidades se asocian con el ácido hialurónico a través de una región constante de la proteína central y con la participación de una proteína adicional de unión.

Los proteinglicanos son generalmente sintetizados y secretados -

TABLA I

COMPOSICION Y LOCALIZACION DE LOS DISTINTOS PROTEINGLICANOS

POLISACARIDO	COMPONENTES: HEXOSAS	LOCALIZACION
Acido Hialurónico	Acido Glucurónico, N-Acetil-D-Glucosamina	Humor vítreo, fluido sinovial cartilago, vasos sanguíneos, piel y cordón umbilical.
Condroitin	Acido Glucurónico, N-Acetil-D-Galactosamina	Córnea
Condroitin Sulfato	Acido Glucurónico, N-Acetil-D-Galactosamina 4 6 6 sulfato	Cartilago, hueso, vasos sanguíneos, piel y córnea.
Dermatan Sulfato	Acido Idurónico, N-Acetil-D-Galactosamina-4-Sulfato	Piel, vasos sanguíneos, válvulas cardiacas, tendón y pulmón.
Heparan Sulfato	Glucosamina 6 Sulfato, Acido Glucurónico-2-Sulfato, Acido Idurónico	Aorta, hígado y pulmón.

por células derivadas del mesénquima y tienen una tasa de recambio más elevada que otras proteínas matriciales, tanto durante el crecimiento como en la etapa adulta. Con respecto a su función, se ha descrito que los proteoglicanos interactúan electrostáticamente con una gran variedad de moléculas catiónicas y a través de tal interacción participan en el transporte de electrolitos y agua, así como ayudan a mantener las propiedades homeostáticas ambientales para las células y los elementos fibrosos de los tejidos (1).

4. FIBRONECTINA

La fibronectina es una proteína presente en la matriz intersticial, en la membrana basal, en el plasma y en otros fluidos del cuerpo. La molécula de fibronectina es un heterodímero con subunidades de un peso molecular de 210,000 y 240,000 daltones unidas cerca del extremo carboxilo terminal por enlaces disulfuro. La fibronectina purificada se caracteriza por su capacidad de establecer múltiples interacciones, su tendencia a polimerizarse y su sensibilidad a la proteólisis. La fibronectina promueve la adhesión de muchos tipos de células a diferentes sustratos in vitro; v.gr.: gelatina, por lo que se considera que in vivo promueve la adhesión de células a colágena. La fibronectina interviene también en la adhesión de algunas células a fibrina ya que puede unirse covalentemente al coágulo con la participación de la transaminasa glutámica plasmática (5).

5. COLAGENA

a) Características estructurales de la colágena

La colágena es la proteína más abundante de los tejidos conjuntivos y participa en una gran variedad de funciones mecánicas y estructurales. Los huesos y la piel deben sus principales cualidades mecánicas a esta proteína. De la colágena total en vertebrados posiblemente del 40-60% se encuentra en piel, del 10-20% en hueso, dentina y cartilago; en vasos y arterias se tiene menos del 7-8%. Los tejidos con mayor contenido de colágena son el tendón, el hueso y la piel mientras que los órganos internos y el músculo poseen menor cantidad de colágena (6).

La colágena es una proteína constituida por tres cadenas polipeptídicas denominadas cadenas α , cada una de éstas cadenas adopta una estructura helicoidal que gira hacia la izquierda con aproximadamente tres aminoácidos por vuelta. A su vez, las tres cadenas helicoidales giran hacia la derecha dando origen a una estructura super-helicoidal más compleja. La unión de las tres cadenas forma una molécula parecida a un rodillo con aproximadamente 1.4 nm de diámetro. Cada cadena α contiene aproximadamente 1050 aminoácidos, con un peso molecular aproximado de 100,000 daltones y una longitud de 300 nm. A ambos lados de la molécula existen secuencias terminales denominadas telopeptidos en los que no se encuentra glicina cada

tres residuos y no se presenta la estructura de triple hélice (7).

Se ha demostrado ampliamente que la secuencia de aminoácidos de una cadena polipeptídica está determinada genéticamente y que ésta es responsable de la estructura tridimensional que adopte la proteína, la cual a su vez es esencial para la actividad biológica de la misma. La característica más sobresaliente de la estructura primaria de la colágena es la secuencia repetitiva $(\text{Gli-X-Y})_n$ lo que permite que la glicina constituya aproximadamente el 33% del contenido total de aminoácidos en la molécula. La presencia de glicina cada tres posiciones permite el acercamiento de las tres cadenas polipeptídicas ya que su cadena lateral consiste de un átomo de hidrógeno. La conformación trihelicoidal depende también de la presencia de prolina e hidroxiprolina, aminoácidos que en su conjunto constituyen aproximadamente el 25% del total de los residuos de aminoácidos y ocupan respectivamente las posiciones X y Y de la secuencia antes mencionada. Debido a que ambos iminoácidos son cíclicos, limitan la rotación de la cadena polipeptídica y así contribuyen a la conformación de la triple hélice. Se ha observado que moléculas de colágena deficientes en hidroxiprolina, pueden adoptar una conformación trihelicoidal a baja temperatura, pero que la triple hélice formada no es estable a temperatura corporal. Por otra parte la colágena posee otro aminoácido hidroxilado que es poco frecuente en otras proteínas: la hidroxilisina, quien junto con la lisina juega un papel crucial en el establecimiento de

de colágena involucra un poco menos de un cuarto de la longitud del monómero, se origina un espacio entre el final de una triple hélice y el inicio de la siguiente. Este espacio provee un sitio de depósito adecuado para los cristales de hidroxapatita en la formación del tejido óseo (12).

b) Tipos genéticos de colágena

La heterogeneidad de las moléculas de colágena ha sido bien establecida en la actualidad. En base al análisis químico de la proteína se han descrito por lo menos cinco tipos genéticamente diferentes de colágena en humanos (7, 8, 13, 14) y otros tejidos de mamíferos (6) (ver Tabla II). Los isotipos difieren tanto en su estructura primaria ya que son productos de genes distintos (15), como en su distribución y proporción en los diferentes tejidos.

Los distintos tipos de colágena podrían ser divididos en dos grupos de acuerdo a su localización y función: el primero está constituido por las colágenas intersticiales I, II y III y el segundo por las colágenas de membranas basales IV y V. De las colágenas intersticiales la más estudiada es la tipo I que es una molécula híbrida formada por la asociación de dos cadenas $\alpha 1(I)$ y una cadena $\alpha 2$ con una fórmula estructural $[\alpha 1(I)]_2\alpha 2$. Esta estructura difiere con la observada para la mayoría de los otros tipos en los que se observa una asociación de tres cadenas α idénticas. El tipo I constituye aproximadamente el 70% de la colágena del cuerpo y es predominante en piel, hueso y tendón. Se ha asociado su presencia en tejidos que requieren de mayor fuerza tensil.

TABLA II

HETEROGENEIDAD GENETICA DE LA COLAGENA

TIPO	COMPOSICION DE LAS CADENAS	DISTRIBUCION	CARACTERISTICAS SOBRESALIENTES
Colágenas Intersticiales			
I	$[\alpha 1(I)]_{2\alpha-2}$	Piel, hueso, dentina, tendón, córnea, órganos internos.	Bajo contenido de hidroxilisina pocos sitios de glicosilación
Trímero $\alpha 1(I)$	$[\alpha 1(I)]_3$	Tejidos embrionarios e inflamación	
II	$[\alpha 1(II)]_3$	Cartilago, cuerpo vítreo	Alto contenido de hidroxilisina altamente glicosilada
III	$[\alpha 1(III)]_3$	Piel, útero, vasos sanguíneos	Alto contenido de hidroxiprolina bajo contenido de hidroxilisina baja glicosilación, enlaces disulfuro intercadena.
Colágenas de Membrana Basal			
IV	$[\alpha 1(IV)]_3$ $[\alpha 2(IV)]_3$	Membranas basales	Alto contenido de hidroxilisina, casi completamente glicosilada. Rica en 3-hidroxiprolina, retiene extensiones de procolágena.
V	$\alpha A(\alpha B)_2$ $(\alpha A)_3$ $(\alpha B)_3$	Asociada con estructuras membranosas, exoesqueleto de fibroblastos y otras células mesenquimatosas.	Alto contenido de hidroxilisina, altamente glicosilada.

La colágena tipo II, $[\alpha 1(\text{II})]_3$, se encuentra fundamentalmente en cartilago y consiste de tres cadenas polipeptídicas idénticas $\alpha 1(\text{II})$ (16). También está presente en discos intervertebrales, en el cuerpo vítreo - - del ojo, epitelio corneal (17), tráquea y cartilago bronquial (14).

La colágena tipo III, $[\alpha 1(\text{III})]_3$, constituye aproximadamente el 10% de la colágena en piel adulta, 50% en piel fetal y del 10 al 50% de la colágena en vasos sanguíneos, membrana sinovial, útero, pulmón, bazo y tejido conjuntivo reticular en general.

La colágena tipo IV, $[\alpha 1(\text{IV})]_3$, ha sido localizada en membranas basales, cápsulas de cristalino y membranas de Descemet. Las cadenas $\alpha 1(\text{IV})$ contienen dominios globulares que no son eliminados durante el procesamiento extracelular de la protefna.

La colágena tipo V fue inicialmente identificada en extractos de tejido solubilizados con pepsina, los cuales eran ricos en membrana basal - - (18), en los que se encontraron dos tipos de cadenas: $\alpha 1(\text{V})$ y $\alpha 2(\text{V})$ (designadas previamente αB y αA). Este tipo de colágena ha sido localizada en - - otros tejidos, tales como membranas sinoviales (19,20) hueso y cartilago. - - En algunos tejidos la colágena tipo V parece estar enriquecida específicamente en alguna de las cadenas. En cartilago se encontró solo $\alpha 1(\text{V})$, en - - amnion y corion ambas cadenas presentes $\alpha 1(\text{V})$ y $\alpha 2(\text{V})$, una tercera cadena -

denominada $\alpha 3(V)$ fue aislada de membrana sinovial (19) y placenta (21). Estudios de inmunofluorescencia han mostrado que la colágena tipo V se encuentra en regiones pericelulares (22).

Las colágenas tipos IV y V se caracterizan ambas por tener un bajo contenido de residuos de alanina, alto contenido de hidroxilisina y glicosilación. Las observaciones anteriores conjuntamente con los tejidos de donde se aisló inicialmente condujeron a pensar que la colágena tipo V era de membrana basal. Actualmente se asocia al grupo de colágenas intersticiales, ya que comparte muchas de sus propiedades y características (14).

Además, existen reportes acerca de la existencia de un tipo de colágena constituida por tres cadenas idénticas de $\alpha 1(I)$ y que se denominó trímero de $\alpha 1(I)$. Esta colágena fue inicialmente descrita en cultivos de condrocitos tratados con bromodeoxiuridina (23) y de fibroblastos gingivales obtenidos de pacientes con enfermedades parodontales. Esta forma trimérica no es una particularidad de cultivos celulares, puesto que ha sido también descrita en tendones y huesos frontales de embrión de pollo, en dentina de ratas latíricas, piel humana normal (24) y tumores (25).

c) Características estructurales de la procolágena

La colágena se sintetiza inicialmente en forma de un precursor de

nominado procolágena, que contiene extensiones polipeptídicas adicionales en las regiones amino y carboxilo terminales de la molécula. Los polipéptidos de la procolágena son denominados cadenas pro α . En el caso de la procolágena tipo I, el tamaño de la cadena pro $\alpha 1(I)$ es del orden de 1550 aminoácidos y consiste de una secuencia de cadenas α de aproximadamente 1050 aminoácidos, un extremo amino-terminal de 150-200 aminoácidos y una porción carboxilo-terminal de 300-350 aminoácidos (26). La extensión amino-terminal de la pro $\alpha 1(I)$ tiene un peso molecular aproximado de 20,000 daltones y contiene tres dominios estructurales diferentes: un dominio amino-terminal globular, un dominio central con estructura trihelicoidal y otro dominio globular cercano a la cadena α (27). La cadena pro $\alpha 2$ contiene una secuencia de cadenas α con 1050 residuos, una extensión amino-terminal de aproximadamente 50 aminoácidos y una porción carboxilo terminal de 300-350 aminoácidos, dando un total de aproximadamente 1400 residuos de aminoácidos. La cadena pro $\alpha 2$ posee una extensión amino terminal con estructura de triple hélice.

El propéptido carboxilo-terminal de ambas cadenas pro α tiene un peso molecular aproximado de 30,000 a 35,000 daltones y una conformación globular (28). Ambos propéptidos de la procolágena tipo I contienen residuos de cisteína. En la porción amino terminal la cisteína forma enlaces intracadena, mientras que en el extremo carboxilo-terminal existen puentes disulfuro intra e intercadena. La porción carboxilo-terminal del propéptido

contiene dos residuos de N-acetil glucosamina y aproximadamente 10 residuos de manosa.

Se han postulado algunas posibles funciones biológicas para los propéptidos, entre las que destacan: prevenir la formación prematura de fibras intracelulares e iniciar la asociación y subsecuente formación de la triple hélice. Además, se ha sugerido que los péptidos derivados de la región amino terminal de la molécula, intervienen en un mecanismo de retroinhibición para explicar la regulación de la síntesis de colágena tisular. (47).

d) Genes estructurales para procolágena

Se ha utilizado la técnica de hibridización de células somáticas para la localización de un gran número de genes en los cromosomas humanos, e involucra la fusión de células humanas y células tumorales de roedores para formar una línea celular híbrida. Esta técnica fue utilizada para localizar el gene estructural de colágena tipo I en cromosomas humanos. Evidencias de un grupo de investigación sugieren que el gene se encuentra en el cromosoma 17 (29) mientras que estudios realizados por otro grupo sugieren que está localizado en el cromosoma 7 (30). Recientemente se demostró que el gene de $\alpha 2(I)$ se localiza en el cromosoma humano número 7 y el gene para $\alpha 1(I)$ en el cromosoma 17, así como el gene para $\alpha 1(IV)$. Estos --

estudios también revelaron que existe una copia única para $\alpha 1(I)$ y para $\alpha 2(I)$ por conjunto de cromosomas haploides (31).

La tecnología de ADN recombinante ha permitido el aislamiento y análisis estructural de varios genes eucarióticos. Con excepción de los genes que codifican para interferón, todos los genes en vertebrados estudiados hasta el momento, presentan secuencias codificadoras (exones) las cuales se encuentran interrumpidas por secuencias no codificadoras (intrones). El número de intrones es variable y puede ser desde un solo intrón, como en el caso de la insulina, un gran número de intrones como en el caso del gene para vitelogenina el cual tiene 33 (32).

Estudios preliminares realizados por Wozney, acerca de la estructura para los genes de procolágena por $\alpha 1(I)$ y pro $\alpha 2(I)$ de pollo, demostraron que ambos genes contenían un gran número de intrones (32). Estos estudios fueron confirmados en oveja y en pollo para el gene de pro $\alpha 2(I)$ utilizando técnicas de microscopía electrónica. Ohkubo determinó cuarenta intrones con un tamaño variable de 100 a 2,000 pares de bases, analizando clonas que contenían el gene completo para $\alpha 2(I)$ (33). De manera similar se identificaron 17 intrones en clonas que contenían aproximadamente el 60% del gene (34).

Wozney ha reportado el análisis de la secuencia de 7 exones en la región helicoidal, el tamaño de estos varía de 45 a 108 pares de bases,

todos son múltiplos de 9 pares de bases, codificando para la secuencia repetitiva de colágena Gli-X-Y, cada uno inicia con el triplete que codifica para Gli y termina con el codón para el residuo Y. Puesto que la estructura del propéptido carboxi - terminal es diferente, se encontraron 4 exones mucho más largos con un tamaño aproximado de 189-444 pares de bases (32). Los genes para colágena de $\alpha 2(I)$ y $\alpha 1(III)$ fueron estudiados por Ohkubo y Yamada respectivamente y ambos genes presentaron una longitud de 36 a 38 kilobases con 50 a 52 exones separados por intrones que varían de 200 a 2,000 pares de bases en longitud (31).

e) Regulación de la biosíntesis de colágena

La biosíntesis de la colágena puede ser regulada a nivel transcripcional, traduccional o en algún paso subsecuente a la biosíntesis de la molécula. Durante el desarrollo y diferenciación existen cambios en los tipos genéticos de colágena (35). Además, se sabe que una misma célula puede producir más de un tipo genético de colágena dependiendo del estado fisiológico de la misma. Esto involucra probablemente una selección específica de genes para su transcripción.

Alteraciones a nivel transcripcional dan lugar a manifestaciones patológicas como en el caso de osteogénesis imperfecta tipo I en la que se detectó una disminución en la producción de ARNm para procolágena $\alpha 1(I)$. Rowe y Shapiro reportaron que los fibroblastos de pacientes con esta enfermedad poseen una producción deficiente de colágena tipo I pero presentan

una relación normal de las cadenas $\alpha 1(I)$ y $\alpha 2(I)$ (31). Por otra parte Barsh y colaboradores sugirieron que el defecto podría ser el resultado de una delección en un alelo para $\alpha 1(I)$, ya que la relación intracelular de las cadenas $\alpha 1(I)/\alpha 2(I)$ fue de uno, mientras que la relación extracelular fue de dos (36). Se cree que la delección de un gene da origen a una biosíntesis no balanceada de las cadenas alfa con una degradación -- del exceso de las cadenas $\alpha 2$ para secretar las cadenas α en proporciones normales.

En osteogénesis imperfecta tipo II existe una delección parcial - del gene que codifica para la cadena $\alpha 1(I)$, ya que se ha observado que la cadena de procolágena $\alpha 1(I)$ es más corta. Además, se ha demostrado la -- existencia de dos clases de RNA mensajero para $\alpha 1(I)$. Uno de ellos es -- más corto debido a una delección de bases que codifican para 80 a 100 ami noácidos, que corresponden a las posiciones 300 a 400 del dominio heli-- cooidal de la molécula (31).

Recientemente, Nicholls y col. (37) reportaron la existencia de una variante de osteogénesis imperfecta que de acuerdo a las manifestacio nes clínicas (clasificación de Sillence) corresponde al tipo I. Esta va-- riente involucra cadenas $\alpha 1(I)$ anormales, las cuales poseen cisteína.

Un defecto a nivel transcripcional o traduccional del ARNm para - procolágena tipo III da origen a una variante del síndrome Ehlers-Danlos,

conocida como tipo IV. Los pacientes que presentan esta enfermedad mueren frecuentemente por ruptura del intestino o de grandes vasos. El defecto molecular en este síndrome se debe a una disminución en la biosíntesis de colágena tipo III como consecuencia de la expresión reducida del gene correspondiente (32).

Para la regulación de la biosíntesis de colágena a nivel traduccional podemos mencionar dos mecanismos:

- a) La estabilización de una secuencia de ARNm para colágena.
- b) La retroinhibición de la expresión de secuencias particulares de ARNm.

Existen evidencias en la literatura que sugieren la estabilización de ARN mensajeros específicos para la regulación del patrón de proteínas en el hueso frontal de embrión de pollo. De esta fuente, Breitkreutz y col. (39) aislaron los ARN mensajeros para procolágena tipo I a diferentes etapas del desarrollo y encontraron que estos mensajeros se acumularon más en el día 13 y disminuyeron hacia el día 16. De acuerdo al reporte de Diegelman (40) la biosíntesis de colágena en el hueso frontal de embrión de pollo fue máxima al día 17 y la mayor producción de ARN mensajero hacia el día 13 (39). Estas observaciones sugirieron la estabilización de los mensajeros de procolágena para mantener la traducción y producción de esta proteína.

Las células sintetizan a la colágena como un precursor denominado procolágena. Este precursor es convertido a colágena por la eliminación - de los péptidos de procolágena de las porciones amino y carboxilo terminal de la molécula mediante enzimas específicas. Krieg y colaboradores -- (41) observaron que la adición de péptidos de la porción NH_2 -terminal obtenidos por digestión con colagenasa de cadenas pro $\alpha_1(\text{I})$ o pro $\alpha_1(\text{III})$, inhibían la síntesis de colágena en cultivos de fibroblastos derivados de piel bovina y humana. La adición de estos péptidos al medio de cultivo de fibroblastos derivados de piel de biopsias de pacientes con escleroderma, normalizaron la síntesis de colágena sin afectar la síntesis de otras -- proteínas. Estas observaciones sugieren que la porción NH_2 -terminal de la procolágena podría regular la biosíntesis de colágena a través de un mecanismo de retroinhibición.

Con base en los resultados anteriores se estudió el efecto del péptido NH_2 -terminal sobre la síntesis de procolágena en un sistema libre de células derivado de reticulocitos de conejo (42). Se determinó el efecto de los péptidos sobre la traducción de ARN mensajero que codifica para procolágena tipo I, así como sobre mensajeros para otras proteínas no colagénicas. Los resultados demostraron que la biosíntesis de procolágena tipo I de ARN mensajeros extraídos del hueso frontal de embrión de pollo fue inhibida por estos péptidos. La síntesis de otras proteínas codificadas por -- mensajeros de la misma fuente no se afectó.

Posteriormente Paglia y colaboradores (43) aislaron ARNm para procolágena tipo II de esternón de pollo y de células de condrosarcoma de rata y los tradujeron en un sistema libre de células. La adición de la porción NH_2 -terminal de procolágena tipo I al sistema de traducción inhibió la biosíntesis de colágena tipo II, pero cuando los péptidos fueron adicionados al medio de cultivo de condrocitos fetales bovinos, de esternón de pollo y fibroblastos de tendón de pollo, no se observó inhibición de la biosíntesis de colágena. Estos resultados sugieren que existen factores adicionales en las células, no presentes en el sistema de traducción, que determinan la actividad de los péptidos.

La biosíntesis de procolágena tipo I debe involucrar una expresión coordinada de dos genes, los que codifican para las cadenas $\alpha 1(I)$ y $\alpha 2(I)$ que constituyen la molécula. Vuust (44) mostró que los ARNs total, citoplasmático y polisomal extraídos del hueso frontal de embrión de pollo y traducidos en un sistema libre de células sintetizaban a las cadenas pro $\alpha 1(I)$ y pro $\alpha 2(I)$ en proporción 2:1 lo que sugería que los ARNm traducibles presentes en la célula, se encontraban en la misma proporción. Esto no distingue si existen diferentes velocidades de formación o de degradación de los ARN mensajeros correspondientes.

Alteraciones en la incorporación o producción de las cadenas $\alpha 2(I)$ pueden dar origen a la aparición de la forma trimérica de $\alpha 1(I)$. Pawlowski (45) analizó la proporción de la síntesis de las cadenas que constituyen la

colágena tipo I en cultivos celulares bajo condiciones que reducen la iniciación de la síntesis de proteínas (bloqueo hipertónico de la iniciación). Los resultados mostraron que la síntesis de la cadena $\alpha 2(I)$ fue más susceptible al bloqueo de la iniciación que la cadena $\alpha 1(I)$. Esta sensibilidad parece depender de la cantidad de colágena sintetizada por la célula, ya que las células del hueso frontal de embrión de pollo no presentaron cambios en la proporción de las cadenas, mientras que cultivos de fibroblastos sintetizaron menor cantidad de la cadena $\alpha 2(I)$ en las mismas condiciones. La disminución en la síntesis da origen a un exceso de cadenas $\alpha 1(I)$ que podrían ser secretadas al espacio extracelular como trímero de $\alpha 1(I)$.

Una variante de osteogénesis imperfecta, que corresponde al tipo IV, involucra cambios en la producción de la cadena $\alpha 2(I)$. Nichols y colaboradores estudiaron la biosíntesis de colágena en biopsias de un paciente que presentó esta variante y observaron una disminución en la cadena $\alpha 2(I)$ y presencia del trímero de $\alpha 1(I)$. Se aislaron los ARNm que codifican para la cadena $\alpha 2(I)$ y se tradujeron normalmente en un sistema libre de células, lo que sugiere que el defecto reside en la inhabilidad de la célula para ensamblar la cadena $\alpha 2(I)$ (31).

Otra forma posible de controlar la síntesis de una proteína es a través de alteraciones en el procesamiento normal y/o en la degradación de la misma durante o después de su síntesis. Esta posibilidad se discutirá examinando los diferentes pasos involucrados en la biosíntesis de la molé-

cula de colágena, así como cambios en la actividad de la colagenasa.

f) Biosíntesis de la colágena

La biosíntesis de la colágena se caracteriza por la presencia de un gran número de modificaciones postraduccionales de la cadena polipeptídica. El procesamiento postraduccional se lleva a cabo en dos etapas:

1) las modificaciones intracelulares, junto con la síntesis de la cadena polipeptídica, dan origen a la formación de la molécula trihelicoidal de procolágena y 2) el procesamiento extracelular convierte esta molécula - a colágena y su posterior incorporación en las fibras despositadas en la matriz extracelular.

Las modificaciones intracelulares consisten en:

- a) Eliminación de la secuencia "líder" involucrada en la secreción.
- b) Hidroxilación de residuos apropiados de prolina y lisina para dar origen a 4-hidroxiprolina, 3-hidroxiprolina e hidroxilisina.
- c) Glicosilación de determinados residuos de hidroxilisina para formar galactosil-hidroxilisina y glucosil-galactosilhidroxilisina.
- d) Glicosilación de ciertos residuos de asparagina en la región carboxilo-terminal de las cadenas pro- α .

- e) Formación de puentes disulfuro intra e intercadena.
- f) Formación de la triple hélice.

Las modificaciones extracelulares involucran:

- g) La conversión de las procolágenas intersticiales a colágenas. Los tipos I, II, III y V sufren la eliminación de péptidos de las porciones amino y carboxilo-terminal por proteinasas específicas.
- h) Desaminación oxidativa de grupos ξ -amino de residuos específicos de lisina e hidroxilisina para la formación de los enlaces entrecruzados de la colágena.

Las protefnas son sintetizadas con una información estructural específica que determina su topología. Basado en evidencias experimentales y en condiciones teóricas, Blobel propuso que podfan distinguirse cuatro grupos de secuencias protéicas que son determinantes para la topología de una protefna (46). Estas son: la secuencia "líder" o "señal", la secuencia que detiene la transferencia, la secuencia de inserción y la secuencia clasificadora. La secuencia "señal" posee la información para la transferencia de las protefnas a través de distintas membranas celulares, dicha secuencia tiene características hidrofóbicas y está constituida de 15 a 30 residuos. Puede localizarse en la porción amino terminal o en

porciones internas, puede o no ser eliminada por una peptidasa asociada a la membrana durante el transporte. Existen dos mecanismos distintos por los cuales la secuencia señal afecta la transferencia. En uno de -- los mecanismos denominado como transferencia cotraduccional, la transferencia de la cadena polipeptídica está acoplada a la traducción y es mediada por una unión ribosoma-membrana y la cadena polipeptídica naciente entra al lumen del retículo endoplásmico mediante la formación de un tunnel. En el segundo mecanismo, denominado como transferencia postraducional, la transferencia de la cadena polipeptídica es independiente de la síntesis de proteínas, se lleva a cabo después de la traducción y no es - mediada por la unión ribosoma-membrana (47).

Estudios realizados por Palmiter (48), demostraron que la cadena de pro α (I) es sintetizada como un precursor con un peso molecular mayor al cual denominaron pre-pro α (I) y la porción adicional de este precursor corresponde a la secuencia "leader", la cual presentó un peso molecular - - aproximado de 5,500 daltones. Tiene residuos hidrofílicos cerca de la porción amino-terminal, pero contiene un segmento de aminoácidos altamente hidrofóbicos en la porción central de su secuencia. El grupo de Prockop (49) reportó también que las cadenas de procolágena tipo I son sintetizadas como cadenas pre-pro α y que la pre-pro α (I) es aproximadamente 100 residuos más grande que la porción amino-terminal de la pro α (I).

La primera modificación postraduccional que sufre la colágena es -

la hidroxilación de residuos de prolina y lisina, mediante la participación de tres enzimas: la prolil-4-hidroxilasa, la prolil-3-hidroxilasa y la lisil-hidroxilasa. Las tres enzimas se caracterizan por requerir como cofactores: oxígeno molecular, α -cetoglutarato, ácido ascórbico y iones ferrosos (Fe^{2+}). Estas enzimas catalizan la descarboxilación del α -cetoglutarato, un átomo del oxígeno molecular es incorporado al succinato, mientras que el otro es incorporado al grupo hidroxilo. La prolil-4-hidroxilasa es un tetramero con un peso molecular aproximado de 240,000 daltones, constituido por $\alpha_2\beta_2$ donde cada subunidad presenta un peso molecular de 64,000 y 60,000 daltones respectivamente y ambas son cadenas polipeptídicas glicosiladas. La prolil-hidroxilasa ha sido localizada en la cisterna del retículo endoplásmico rugoso por métodos inmunohistoquímicos y parece estar unida fácilmente a la membrana interna del retículo endoplásmico, ya que se solubiliza fácilmente después del tratamiento con detergentes o ruptura de membranas microsomales. La prolil-hidroxilasa, es altamente específica y la secuencia requerida para que actúe es el triplete -X-Pro-Gli-. La hidroxilación se lleva a cabo en cadenas nacientes pero no en cadenas pro- α que han formado triple hélice (50). La lisil hidroxilasa ha sido purificada por cromatografía de afinidad en columnas de agarosa-concanavalina A, lo que sugiere que la enzima es una glicoproteína, con un peso molecular aproximado de 200,000 daltones. Por electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de lauril sulfato de sodio se observa un monómero de peso molecular aproximado de 85,000 daltones lo que sugiere que la enzima es un dímero constituido de un solo tipo de subunidad (51).

La siguiente modificación postraduccionaI involucra la glicosilación de algunos residuos de hidroxilisina con galactosa para formar O- β galactosil hidroxilisina, los cuales pueden posteriormente ser glicosilados para -- dar origen a 2-O- α glucosil -O- β -galactosilhidroxilisina. Las enzimas que ca talizan estas reacciones son la glucosil y galactosil-transferasas; ambas en zimas utilizan azúcar en forma de UDP-glucosilado y requieren de Mn^{2+} como co factor, el cual puede ser parcialmente reemplazado por otros cationes diva-- lentes. La glicosilación de la colágena se lleva a cabo en cadenas polipeptf idicas nacientes y no ocurre en cadenas pro α que han formado triple hélice - (52). La glucosil-transferasa ha sido purificada de músculo esquelético de embrión de pollo como una proteína homogénea con un peso molecular aproxima-- do de 72,000 a 78,000 daltones. (53).

La porción carboxilo-terminal de las cadenas pro- α es también gli-- cosilada en el retículo endoplásmico rugoso. Esta glicosilación es diferen-- te de la que ocurre en la región colagénica de las cadenas pro α ya que los azúcares que intervienen son N-glucosamina y manosa, los cuales se unen a as paragina a través de un enlace N-glucosídico. El mecanismo de adición de es-- tos dos azúcares también es diferente, ya que esta glicosilación es bloquea-- da por tunicamicina y no se afecta por defectos en la hidroxilación de lisi-- na. La función de los carbohidratos en esta región parece estar relacionada con la regulación de la conversión de procolágena a colágena (54).

La siguiente modificación postraduccional es la formación de enlaces disulfuro intra e intercadena que ocurren en las porciones amino y carboxilo-terminales de la molécula. Existen estudios que sugieren que los puentes disulfuro intercadena son formados después de que la traducción ha terminado y posiblemente después de que la cadena ha sido liberada de los ribosomas.

La formación de la triple hélice se lleva a cabo en el lumen del retículo endoplásmico rugoso y este proceso se inicia cuando se forman los enlaces disulfuro entre las porciones carboxilo-terminal de las tres cadenas pro α . Una vez que se forma la triple hélice la procolágena es transportada del retículo endoplásmico rugoso al complejo de Golgi. Las vacuolas secretoras conteniendo moléculas de procolágena son conducidas a la superficie celular donde la procolágena es secretada por un proceso de exocitosis. Existen evidencias que involucran a los microtúbulos en la secreción de la procolágena, ya que este proceso es inhibido mediante la utilización de drogas tales como colchicina y vinblastina, las cuales impiden la polimerización de tubulina y formación de microtúbulos (55).

La conversión de procolágena a colágena requiere de por lo menos dos enzimas, una procolágena aminoproteasa que elimina los aminopropéptidos y una procolágena carboxiproteasa que elimina los carboxipropéptidos. Ambas proteasas han sido identificadas, purificadas y caracterizadas parcialmente de distintas fuentes. Las dos enzimas requieren de metales diva-

valentes, tales como Ca^{2+} para su actividad. No se ha determinado con exactitud su localización en los tejidos ya que los sitios de fibrogénesis, - distintos para cada tipo de colágena, implican localizaciones diferentes - para las procolágena peptidasas. Por ejemplo, la colágena Tipo I es depositada cerca de la superficie de los fibroblastos, mientras que la colágena Tipo II en la matriz del cartilago. Por otra parte, la procolágena Tipo IV no es convertida a colágena, la cual se deposita en la membrana basal y se une a glicoproteínas constitutivas a través de puentes disulfuro (8,52).

Una vez que las moléculas de procolágena son convertidas a moléculas de colágena, se precipitan espontáneamente y se ensamblan para formar fibrillas. Las fibras inmaduras no poseen fuerza tensil y los enlaces intermoleculares covalentes que se establecen entre los monómeros se consideran esenciales para proveer a la fibra de fuerza tensil, la cual es la principal propiedad funcional de la colágena estructural en el organismo. El establecimiento de enlaces entrecruzados se lleva a cabo en varias etapas: el primer paso se inicia con la desaminación oxidativa de residuos - específicos de lisina e hidroxilisina, localizados en las regiones aminoterminal extra-helicoidal y en la carboxi-terminal de la molécula de colágena. Esta reacción da origen a aldehidos reactivos (aliscina o hidroxialiscina). Los cuales pueden reaccionar para formar dos principales clases de enlaces entrecruzados: intramoleculares e intermoleculares. Los enlaces intramoleculares se forman por la unión de dos aldehidos reactivos de cadenas vecinas de una misma molécula por medio de una condensación aldólica -

que da origen a un β -hidroxialdehido que facilmente se deshidrata para formar el aldol. Los enlaces intermoleculares se forman por medio de la reacci3n del aldol con el grupo ξ -amino de una lisina o hidroxilisina de la regi3n helicoidal de una mol3cula adyacente, para formar bases de Schiff que son intermediarios inestables y que posteriormente forman enlaces intermoleculares estables por reducci3n (6,7,8). Tambi3n se pueden formar enlaces intermoleculares por reacci3n de dos aldehidos de cadenas vecinas.

La desaminaci3n oxidativa de lisina e hidroxilisina es catalizada por la enzima lisil-oxidasa, la cual requiere como cofactores Cu^{2+} y oxigeno molecular. El proceso de formaci3n de enlaces entrecruzados puede ser inhibido por: 1) Una deficiencia en lisil-oxidasa, 2) deficiencia en cobre, 3) substancias tales como β -aminopropionitrilo, el cual se une irreversiblemente a la enzima lisil-oxidasa, 4) hipoxia tisular o 5) drogas tales como penicilamina que se une a los aldehidos reactivos (52).

g) Degradaci3n de la col3gena

Por mucho tiempo y debido principalmente a la gran estabilidad de la col3gena, se desconocieron los mecanismos involucrados en la degradaci3n fisiol3gica de esta prote3na. En 1962 Gross y Lapiere (56) demos-

traron por primera vez la existencia de una actividad colagenolítica animal en la cola de renacuajo por medio de la técnica de explantes de tejido y a partir de este trabajo numerosos grupos se han abocado al aislamiento, purificación y caracterización de colagenasas de distintas fuentes.

Las colagenasas son enzimas que se localizan en el espacio extracelular, como lo indican los estudios inmunohistoquímicos de Reddik y col. en piel humana (57), de Montfort y col. en tejido de rata normal (58) y en el útero de la rata durante la involución (59). Estas enzimas se han aislado de homogenados de una gran variedad de tejidos como son: cápsula sinovial en artritis reumatoide, tumores, tejido corneal, tejido parodontal, tracto intestinal, granulomas, útero, piel y de medios de cultivo de algunos tipos celulares entre los que se incluyen: leucocitos polimorfonucleares, macrófagos, fibroblastos, células endoteliales y células de melanoma.

Aparentemente todas las colagenasas de vertebrados presentan propiedades semejantes: actúan a un pH y temperatura fisiológicas, requieren de iones Ca^{2+} para su actividad catalítica y adicionalmente manifiestan preferencia por iones Zn^{2+} , por lo que pueden ser inhibidas por agentes quelantes tales como EDTA y O-fenantrolina. Además, compuestos que reaccionan con grupos sulfhidrilo como cisteína, ditiotretol y D-penicilamina inhiben la actividad colagenolítica. Existen factores presentes en el suero como: la $\alpha 2$ -macroglobulina ($\alpha 2$ -M) y la β_1 -anticolagenasa (β_1 -AC) que -

también son inhibidores específicos (60). Aunque se han reportado pesos moleculares para las colagenasas animales que varían de 24,000 daltones para la colagenasa de fluido sinovial reumatoide humano (61) a 150,000 daltones para la colagenasa de córnea de conejo, actualmente se considera que el P.M. promedio de las colagenasas animales varía entre 25,000 y 60,000 daltones (62).

Las colagenasas de vertebrados rompen la porción helicoidal de la molécula de colágena nativa en un solo punto, con una especificidad de secuencia GII-Ile, para dar origen a dos fragmentos; el mayor representa el 75% de la longitud total de la molécula y contiene la porción amino-terminal, el otro fragmento el 25% restante y posee la porción carboxilo-terminal. Se piensa que esta ruptura conduce a la rápida desnaturalización de los fragmentos a temperatura fisiológica y a su posterior degradación por otras enzimas proteolíticas (62).

Se ha demostrado que los distintos tipos de colágenas presentan -- susceptibilidades variables a la degradación por las colagenasas, dependiendo de la fuente de origen de éstas. Las colagenasas de fibroblastos de piel humana y de macrófagos tienen aproximadamente la misma velocidad de degradación sobre las colágenas I y III, mientras que la colagenasa extraída de leucocitos polimorfonucleares hidroliza a la colágena tipo I aproximadamente 15 veces más que a la colágena tipo III (63). Las colágenas tipos IV y V son resistentes a la degradación por las colagenasas de vertebrados y aparentemente son susceptibles a colagenasas específicas. Liotta y col. repor-

taron en 1979 la existencia de una colagenasa presente en un fibrosarcoma de ratón, específica para la colágena tipo IV. En 1981 los mismos autores describieron una actividad colagenolítica específica para colágena tipo V producida por células tumorales (64,65).

La regulación de la actividad colagenolítica está directamente relacionada con el metabolismo del tejido conjuntivo. Las colagenasas pueden ser localizadas en el espacio extracelular en forma activa, como zimógenos, unidas a un inhibidor o unidas a su sustrato. Existen trabajos que señalan la existencia de colagenasas en forma de zimógenos y una gran mayoría de las procolagenasas descritas en la literatura pueden ser activadas por una hidrólisis parcial, como es la colagenasa de hueso de ratón (66), la cual se activa con tripsina, quimotripsina, calicreina o plasmina. Otras colagenasas requieren de factores específicos como sucede con la de leucocitos humanos, la cual es activada por un factor presente en el líquido sinovial de sujetos con artritis reumatoide (66); la colagenasa de hueso de ratón (62) se activa por un factor endógeno presente en el medio de cultivo. También se ha descrito la activación de colagenasa en tejido uterino por una proteinasa sérica (67).

La forma latente de las colagenasas, es decir, el complejo enzima-inhibidor puede ser activada con agentes que reaccionan con grupos tiol (acetato de 4-aminofenil-mercúrico y 4-cloromercuribenzoato), así como agentes caotrópicos (yoduro de sodio y tiocianato de sodio); se ha propuesto que estos compuestos disocian al complejo colagenasa-inhibidor. La α 2-

macroglobulina es el principal inhibidor plasmático de las colagenasas e interacciona estequiométricamente con casi todas las proteinasas conocidas. Werb y col. (68) estudiaron el establecimiento del complejo $\alpha 2$ -M y distintas colagenasas (de medio de cultivo, de tejido sinovial humano, de fluido sinovial humano y de granulocitos humanos) y obtuvieron un complejo que no fue disociado por filtración en gel. Sin embargo, se recuperó actividad parcial de las colagenasas por el tratamiento de los complejos con NaSCN 3.0M. La $\beta 1$ -anticolagenasa es otro inhibidor presente en el suero y fue inicialmente descrito por Wooley (60) e inactiva a las colagenasas de piel, fluido sinovial reumatoide, mucosa gástrica y granulocitos. La interacción de las colagenasas con $\beta 1$ -AC ocurre aparentemente por un intercambio tiol-disulfuro entre el inhibidor y la enzima, para dar un disulfuro mixto. Este complejo inactivo puede reactivarse con glutatión oxidado y oxidantes derivados de mieloperoxidasa, generando enzima activa e inhibidor inactivo. La $\beta 1$ -AC es una proteína monomérica con un peso molecular de 30,000-33,000 daltones. Se ha postulado que su bajo peso molecular facilitaría su difusión a través de los tejidos y la inhibición de las colagenasas (60).

Gross y Lapiere fueron los primeros en sugerir que la colagenasa se encontraba unida fuertemente a la colágena extracelular de los tejidos normales, esto fue confirmado por las observaciones de Ryan y Woessner, quienes incubaron homogenados de útero de rata a 37° por 24 horas o más y detectaron productos de degradación de colágena en el sobrenadante. Se sabe que soluciones de colágena purificadas y almacenadas por tiempos pro--

longados a pH neutro y en frío presentan degradación parcial; este fenómeno fue atribuido a la presencia de colagenasa activa unida a colágena (69). - Un trabajo posterior demostró el aislamiento y la purificación de colagenasa a partir de preparaciones de colágena soluble (70).

Los resultados obtenidos en diferentes sistemas tanto normales como patológicos, así como inducidos experimentalmente sugieren los siguientes posibles modelos de regulación de la actividad de la colagenasa:

- 1) Regulación a nivel de la síntesis de la enzima (62).
- 2) Regulación que involucra la activación de un zimógeno (66).
- 3) Regulación de la activación proteolítica de un complejo enzima-inhibidor, por desactivación del inhibidor (68).
- 4) Regulación de la síntesis de un inhibidor específico, siendo la enzima producida en forma activa (71).
- 5) Regulación mediada por la susceptibilidad del sustrato a ser degradado. Esta susceptibilidad varía según las condiciones fisiológicas presentes en el medio (62).

6. ANATOMIA Y FISILOGIA DEL UTERO

El útero humano adulto es un órgano periforme, situado en la cavidad pélvica entre la vejiga y el recto. Sus dimensiones promedio son: longitud 6.3 cm, ancho 4.5 cm y espesor 2.5 cm. La porción más ancha se denomina cuerpo y la parte caudal, por la que se une a la vagina, el cérvix. El canal cervical pasa de la cavidad uterina a través del cérvix y abre hacia la vagina la parte superior del cuerpo uterino se denomina fondo, a partir del cual se extienden los oviductos. La pared del útero está constituida de una capa interna: endometrio (mucosa), una capa intermedia: miometrio (muscularis) y una capa externa: perimetrio (serosa).

El endometrio consiste de un epitelio columnar y un estroma endometrial, el cual está unido fuertemente al miometrio y contiene una gran cantidad de glándulas tubulares. Existe una membrana basal por debajo del epitelio de las glándulas y la superficie epitelial. El endometrio se divide en dos grandes zonas: 1) La lámina basal que está directamente unida al miometrio y cuyo estroma es más celular y fibroso que el de la capa funcional, sirve principalmente como una fuente de tejido para la regeneración de la capa funcional durante el ciclo menstrual. 2) La capa funcional asciende de la capa basal hacia el lumen del útero y es el sitio que presenta los principales cambios fisiológicos del endometrio. Estos cambios están directamente relacionados con la secreción de hormonas ováricas, se presentan a partir de la pubertad y continúan hasta la menopausia. Durante el ciclo mens-

trual el endometrio pasa a través de varias etapas sucesivas determinadas por la actividad funcional del ovario: la fase proliferativa o folicular, la fase secretoria o luteal y la fase menstrual. El evento terminal de ca da ciclo es la destrucción parcial de una porción del endometrio, acompañada de extravasación sanguínea.

El miometrio forma una túnica delgada que está constituida por tres capas musculares, las cuales son fácilmente discernibles en el cuerpo del útero. En general, las células de la porción central de la musculatura están dispuestas circularmente, mientras que a los lados tienden a estar dirigidas oblicua y longitudinalmente, la región media posee una gran cantidad de vasos sanguíneos y linfáticos. El perimetrio rodea al útero constituyendo la serosa y forma un ligamento a través del cual los vasos sanguíneos y linfáticos, así como los nervios alcanzan al útero.

El cérvix uterino que incluye el canal cervical, está constituido por el endocérnix y el miometrio. El endocérnix difiere del endometrio del cuerpo uterino tanto en su epitelio como en su estroma, es altamente complejo y posee surcos y grietas pronunciadas llamadas pligae palmitae, que corren en dirección longitudinal, transversal y oblicua. El epitelio consiste de una sola capa de células alargadas secretoras de moco y algunas células epiteliales son ciliadas. El tejido subepitelial del cérvix humano está constituido predominantemente de tejido conjuntivo denso. El miometrio está perfectamente definido, existe una capa interna (longitu-

dinal) y las fibras elásticas son abundantes en la capa externa (72).

La vagina está constituida de una mucosa y una capa muscular. La mucosa presenta un gran número de involuciones transversales, posee un epitelio escamoso estratificado que descansa sobre una membrana basal, las células de las capas externas están aplanadas y contienen una gran cantidad de gránulos queratohialinos. La vagina es lubricada con el moco que se produce en el cérvix, ya que no existen glándulas en la mucosa de la vagina humana. En la lámina propia subyacente al epitelio vaginal existe una gran cantidad de tejido conjuntivo denso el cual continúa periféricamente con una capa de tejido conjuntivo laxo, el cual es rico en vasos sanguíneos. La capa muscular de la vagina está constituida de una capa interna y una capa externa, en la capa externa existen haces longitudinales de células de músculo liso. La vagina tiene una cubierta externa constituida de una firme capa interna bien estructurada con fibras de tejido elástico y una capa externa de tejido conjuntivo, el cual se une a los órganos circundantes (73).

También se ha observado que el tejido conjuntivo del cérvix es más denso que el del cuerpo uterino. Histológicamente existe poca colágena entre las células musculares, pero si una gran cantidad de septos de colágena entre las capas de músculo. La colágena endometrial, en contraste con la miometral, sufre alteraciones considerables durante el ciclo menstrual. En la fase proliferativa la capa basal presenta una malla de fibras

delgadas, especialmente rodeando a los vasos y glándulas. En la capa funcional esta malla es más fina, pero se incrementa gradualmente durante la fase proliferativa. En la fase secretoria la capa basal presenta pequeños cambios, pero la funcional muestra un marcado incremento en las fibras argéntoflicas. Rimmer (74) estudió los cambios en el contenido y concentración de colágena en el cérvix uterino de la rata durante el ciclo estral y encontró que durante el estro (etapa de recepción del macho) se tenía la menor concentración de colágena, pero mayor contenido total de ésta.

II. ANTECEDENTES QUE APOYAN LA HIPOTESIS DE TRABAJO

A pesar de que la colágena es una proteína relativamente estable en la mayoría de los tejidos, ésta sufre recambio acelerado en algunos casos como: morfogénesis, metamorfosis, involución uterina y cicatrización; situaciones que han sido utilizadas como modelos para estudiar la biosíntesis y/o degradación de la colágena. El útero es un órgano, que debido principalmente a variaciones hormonales, presenta cambios metabólicos que se reflejan en modificaciones en los patrones de síntesis de proteínas. Estos cambios pueden ser cíclicos, como en el caso del ciclo menstrual; otros pueden ser más profundos e importantes desde el punto de vista de la regulación en la biosíntesis de ciertas proteínas, como es el caso del embarazo y la involución uterina.

En 1954 Harkness y Harkness(75) observaron un aumento progresivo en el contenido total de colágena en el útero de la rata durante el embarazo, de 475% por encima del valor normal. Dicho aumento disminuyó rápidamente después del parto, de tal manera que durante este tiempo la colágena tenía una vida media de 24 horas. El contenido de colágena, al séptimo día después del parto, llegó a valores por debajo del normal.

Posteriormente, en 1961 Monfort y Pérez-Tamayo (76) realizaron estudios durante el embarazo y después del parto, tanto en útero de rata como de humano. En el útero de rata se observó un aumento en el pe-

so total de 8.66 veces con respecto al valor normal al final del embarazo, el cual disminuye después del parto, llegando a valores normales al día siete. El contenido total de colágena se incrementó progresivamente, obteniéndose un valor de 446% con respecto al valor normal siendo de 75% al día siete. En el útero humano el incremento en peso y colágena fue de 16.46 y 8.1 veces respectivamente, a los 9 meses de gestación. Después del parto el valor descendió a 2.47 y 1.38 veces con respecto al valor normal a los 22 días.

En 1961 Morrione y Seifter (77) trabajando con úteros humanos reportaron un incremento en el contenido de colágena durante el embarazo de 8 veces con respecto a los niveles normales, mientras que el aumento en el peso del útero fue de 10 veces. Después del parto el contenido de colágena disminuyó a un 28% con respecto a la colágena determinada al término del embarazo. Woessner (78) realizó estudios semejantes también en útero humano y encontró un incremento de 11 veces en peso húmedo y de 7 veces en colágena durante el embarazo.

Recientemente Susan Wray (79) estudió los cambios en el peso y contenido de colágena del miometrio en el útero de la rata antes y después del parto y encontró un aumento progresivo en el peso llegando al día 21 aproximadamente a 6.5 veces de incremento, el cual disminuyó después del parto. El contenido total de colágena también aumentó 3.5 veces con respecto al normal, regresando a valores basales después del parto.

Todos los trabajos mencionados anteriormente reportan un incremento en peso y colágena durante el embarazo. Sin embargo, estos dos parámetros no varían de una manera paralela o proporcional, lo que sugiere la participación de otros componentes matriciales en el aumento del tamaño uterino. A partir de estas observaciones surgieron las siguientes preguntas:

- ¿Cuál es la relación que guarda la colágena con respecto a otras proteínas de la matriz uterina?
- ¿Aumenta la concentración de colágena disminuye o se mantiene constante a lo largo del embarazo y el posparto?
- ¿Cuál es la concentración de proteínas no colagénicas durante el embarazo y el posparto?
- ¿Es uniforme, la relación de colágena y proteínas totales, en distintas zonas del tejido uterino?

Por otra parte se ha mencionado (76) que el útero durante el embarazo, así como en otras circunstancias de hipertrofia, existe un incremento en el tamaño de las células musculares, sin un aumento significativo en su número. El incremento en la colágena uterina es acompañado por un aumento ligeramente mayor en proteínas no colagénicas, las cuales son denominadas proteínas musculares, de tal forma que la relación entre el músculo liso/colágena en el útero grávido permanece casi constante. Esta relación, que ha sido denominada relación parénquima/estroma, no presenta cambios en la reabsorción uterina. A partir de los conceptos arriba men-

cionados, se plantearon las siguientes interrogantes:

¿Es válido relacionar a las células presentes en el tejido uterino con una determinación de proteínas totales?

¿Cuál es la celularidad de los tejidos uterinos durante el embarazo y el posparto?

¿Se mantiene constante la relación ADN/colágena en el embarazo y el posparto. Es un parámetro confiable para determinar variaciones en la relación parénquima/estroma?

Los estudios "in vivo" sobre el metabolismo de la colágena, son difíciles de realizar, debido a que la mayoría de los tejidos conjuntivos presentan bajas velocidades de recambio. El incremento de colágena durante el embarazo y su rápida degradación en el posparto constituyen una situación fisiológica en la que se modifica notablemente el recambio de esta proteína. Por lo que el útero es un tejido apropiado para realizar estudios "in vivo" o "in vitro" sobre la biosíntesis de la colágena.

La degradación controlada de colágena juega un papel muy importante en remodelaciones fisiológicas de tejidos animales durante el crecimiento y el desarrollo, así como también en estadios patológicos y de reparación. Jeffrey y col. (80) aislaron y caracterizaron una colagenasa de útero de rata, la cual se incrementa en la involución uterina que se caracteriza por una degradación acelerada de la colágena, siendo la vida media de la proteína bajo estas condiciones de 30 horas. Utilizando distintas-

técnicas se ha observado que los fibroblastos, histiocitos y macrófagos son las células responsables de la degradación de la colágena durante la involución uterina (81, 82).

La producción de colagenasa es regulada hormonalmente como lo demostraron los estudios realizados por Jeffrey y col. (83), en donde se observó disminución en la producción de colagenasa en explantes de útero posparto en presencia de progesterona. Estos datos se correlacionaron con los reportados previamente por Goodal (84) quien demostró que la progesterona administrada "in vivo" inhibe la involución uterina en conejo. Por otra parte los estudios realizados por Tansey y col. (85) indicaron que la progesterona puede inhibir la conversión de monocitos a macrófagos durante la involución uterina en la rata y que cultivos de macrófagos en presencia de progesterona (5×10^{-6} M) disminuyen considerablemente la producción de colagenasa (86). Estos estudios sugieren que los macrófagos uterinos pueden ser un elemento clave en la producción de colagenasa en el útero.

Se ha reportado que el estradiol tiene efectos sobre la colágena uterina, ya que la hormona estimula el aumento de esta proteína en úteros adultos normales. La ovariectomía en ratas produce pérdida de colágena uterina; si las ratas son ovariectomizadas en el momento del parto, existe una hiperinvolución uterina que se acompaña de una excesiva pérdida de colágena (87). Woessner encontró que el estradiol inhibe la degradación de colágena durante la involución uterina en la rata (87). Posteriormente Ryan y col. (88) estudiaron el efecto de 17β -estradiol sobre la actividad de

colagenasa durante la involución uterina y demostraron que existe muy poca actividad colagenolítica en el útero normal y en el útero un día antes del parto. La colagenasa se incrementa después del parto, siendo su concentración máxima entre los días 2 y 3 y la involución es casi completa hacia el 4o. día. En el momento del parto existe un nivel apreciable de actividad colagenolítica, pero casi no se observa degradación de colágena durante las primeras 24 horas. Tansey y Padykula (85) estudiaron los tipos celulares durante la involución uterina y observaron que inmediatamente después del parto existe una infiltración transitoria al estroma uterino de heterófilos, eosinófilos, monocitos, macrófagos, linfocitos y células plasmáticas, células generalmente asociadas con la respuesta inflamatoria. También observaron que el estradiol, a concentraciones que inhiben la degradación de colágena, inhibe la afluencia de macrófagos, heterófilos y eosinófilos. Debido a que los macrófagos y los eosinófilos producen colagenasa, podría sugerirse que la inhibición de la degradación de la colágena uterina se debe a la inhibición de la migración de estos tipos celulares al útero.

Existen numerosos trabajos en la literatura que han estudiado la degradación de la colágena durante la involución uterina. Sin embargo no se han realizado estudios acerca de la biosíntesis de esta proteína durante el embarazo y el posparto. Por lo que se plantearon las siguientes preguntas:

¿Cuál es la capacidad biosintética de los tejidos uterinos para colágena y proteínas no colagénicas durante el embarazo y el parto?

¿Es dicha capacidad directamente proporcional a la concentración de colágena y uniforme para todo el órgano?

Por otra parte se sabe que la distribución de los distintos tipos de colágena en un tejido son determinantes para su funcionalidad. En este sentido una característica de los tejidos uterinos es su alto contenido de colágena que comprende aproximadamente al 30% de las proteínas totales. Este porcentaje está constituido fundamentalmente por las colágenas intersticiales I y III en proporción 80 y 20% respectivamente. En base a lo anterior se plantearon las siguientes preguntas:

¿Esta proporción de colágenas I y III se mantiene constante o se modifica de algún modo en los tejidos uterinos durante el embarazo y el parto?

¿Guarda alguna relación la proporción de colágenas intersticiales con la cantidad y/o calidad de la colágena total uterina?

III. HIPOTESIS DE TRABAJO

Los antecedentes señalados en la sección previa y las interrogantes surgidas, permitieron establecer las siguientes hipótesis.

- 1) Si el útero es un órgano que aumenta de tamaño durante el embarazo e incrementa también su contenido de colágena, pero no lo hace de manera paralela podríamos asumir que la concentración de colágena disminuye o permanece constante en el tejido uterino, ya que un aumento en la concentración (característica de los procesos fibrosantes) interferiría con las propiedades elásticas del tejido y le restaría la distensibilidad necesaria para permitir un desarrollo adecuado del embarazo.
- 2) Si la concentración de colágena disminuye, esto implica la participación de otros componentes matriciales como responsables en el aumento del tamaño uterino.
- 3) Es posible considerar que debido a la complejidad estructural del útero, los cambios no se presenten uniformemente en distintas regiones del tejido uterino.
- 4) Como respuesta a los cambios hormonales que se presentan durante la evolución del embarazo y la involución que ocurre en el posparto, podrían existir modificaciones en el patrón de síntesis de proteínas

que en cierta forma se podrían reflejar en la calidad y cantidad de las proteínas extracelulares. La capacidad biosintética de los tejidos uterinos para colágena y otras proteínas durante el embarazo debería correlacionar con las proporciones de colágena y proteínas no colagénicas, ya que se sabe que durante este período la actividad de la colagenasa es inhibida por progesterona. Después del parto, existe un aumento en la actividad colagenolítica, así como una hiperinvolución lo que implicaría un aumento en la biosíntesis de la colágena, como respuesta a los procesos de remodelación del tejido.

- 5) Por otra parte pudieran presentarse cambios en las proporciones relativas de los distintos tipos de colágenas intersticiales (I y III) presentes en el útero (89), sin que necesariamente se modifique la concentración de colágena. Puesto que la colágena tipo III se ha asociado con tejidos que requieren distensibilidad, podría plantearse que la proporción de colágena tipo III con respecto a la tipo I aumenta durante el embarazo.

IV. OBJETIVOS DEL TRABAJO

Con el objeto de evaluar las consideraciones planteadas anteriormente y determinar los cambios que ocurren en diferentes regiones del útero durante el embarazo y el posparto, se utilizó el embarazo en la rata como modelo experimental en el que se valoraron los siguientes parámetros:

- 1) Cambios en el contenido total de colágena en el útero, vagina y ramas uterinas.
- 2) Variaciones en la concentración de colágena en las distintas zonas estudiadas: de implantación, de explante y vagina.
- 3) Determinación de la relación entre protefnas totales y colágena.
- 4) Posibles cambios en la celularidad tisular por determinación de la concentración de ADN en las distintas zonas.
- 5) Evaluación de la capacidad biosintética de los tejidos para protefnas totales y colagénicas, utilizando cultivos de explantes de tejidos.
- 6) Cuantificación de las proporciones relativas de colágenas I y III por análisis densitométrico.
- 7) Determinación de la concentración y contenido total de glicoprotefnas.

V. MATERIALES

Todos los reactivos empleados se obtuvieron de diferentes fuentes comerciales y del mejor grado de pureza existente. La Pro¹⁴C (uniformemente marcada) con una actividad específica de 286.0 mCi/mM de New England Nuclear Corp.; el β -aminopropionitrilo (BAPN), el ácido ascórbico, la L-prolina, L-hidroxiprolina y la pepsina de Sigma Chem. Corp.; la cloramina T, el p-dimetil amino benzaldehido, la ninhidrina y el ADN de Merck; la difenilamina de Eastman Organic Chemicals; el 2,5-difenil oxazol (PPO) de Packard Instruments Company; la acrilamida, el dodecil sulfato de sodio, el persulfato de amonio, el azul brillante de Coomasie, el Temed, el 2-mercaptoetanol, y la N-N'-metilen-bis acrilamida se obtuvieron de Bio-Rad Laboratories. Los animales utilizados para el protocolo de embarazo fueron ratas hembras de la cepa Wistar.

VI. METODOS

I Protocolo de Embarazo en Ratas

Grupos de cinco ratas hembras, de la cepa Wistar, fueron apareadas con dos machos; diariamente se realizó un lavado vaginal a las ratas con el objeto de detectar la presencia de espermatozoides, los cuales fueron observados a microscopio de luz. Las ratas positivas fueron separadas y a partir de ese momento se les contó día cero para el desarrollo del embarazo. Las ratas negativas fueron colocadas nuevamente con los machos y se repitieron los lavados hasta que fueron positivas.

Se formaron grupos de cinco ratas las cuales fueron sacrificadas a distintos tiempos del desarrollo del embarazo siendo estos a: 3, 6, 9, 12, 15, 18 y 21 días; otros grupos de ratas fueron sacrificadas después del parto a: 1, 2, 3, 5 y 7 días. Se utilizaron también grupos controles de ratas no embarazadas.

II Obtención de Tejidos Uterinos

Los animales se sacrificaron y se disecaron los tejidos uterinos a los que se les eliminó el mesenterio, los fetos y las placentas. Se lavaron con solución salina y se dividieron en tres secciones denominadas:

Zona de implante

Zona de explante

Zona vaginal

La zona de implante comprendió la zona de implantación placentaria, así como el tejido uterino en contacto con el embrión. Se consideró como zona de explante al tejido que no estaba en contacto con el feto y la zona vaginal contenía el cérvix y la vagina. Las muestras de tejido obtenidas - de 3-5 ratas fueron colocados en cajas de petri que contenían medio de cultivo Dulbecco (DMEM) y se fragmentaron finamente para tener una muestra representativa de las distintas secciones. Posteriormente se tomaron diferentes fragmentos tisulares para la realización de los estudios bioquímicos, que comprendieron:

- a) Cuantificación de colágena por determinación de hidroxiprolina (OH-Pro)
- b) Cuantificación de prolina (Pro)
- c) Biosíntesis de proteínas totales y colagénicas
- d) Determinación de ADN (índice de celularidad)
- e) Determinación de las proporciones relativas de las colágenas I y III en los tejidos (análisis densitométrico)

III Cuantificación de Colágena

Fragments de tejido húmedo, entre 50 y 100 mg., fueron deshidratados en un horno a 100°C y llevados a peso constante. Posteriormente fueron transferidos a ampollitas de vidrio para su hidrólisis la cual se realizó en HCl 6N a 100°C por 48 horas. Los hidrolizados ácidos se filtraron para eliminar todo el material particulado y se evaporaron con el objeto de eliminar el exceso de HCl. El residuo obtenido se resuspendió en agua destilada y se neutralizó con NaOH 10N. Se tomaron distintas alícuotas para la determinación de hidroxiprolina por los métodos de Woessner y Rojkind (90,91). La concentración de colágena se obtuvo multiplicando el valor obtenido para hidroxiprolina por 7.42. Este factor se calculó asumiendo que la colágena posee 13.47% de éste iminoácido. Los resultados se expresaron como mg de colágena por g de tejido seco.

IV Cuantificación de Prolina

La determinación colorimétrica de prolina se realizó por el método de Troll y Lindsley (92) y se expresó como mg de prolina/g de tejido seco.

V Biosíntesis de Proteínas en Explantes de Tejido

Las condiciones para la síntesis de proteínas fueron semejantes a las descritas por Beikreutz y col. (39). Se procedió inicialmente a establecer las condiciones óptimas de incubación de los tejidos, para lo cual se realizó una cinética de incorporación de prolina radiactiva en tejidos uterinos normales. Estos se dividieron en dos secciones: las trompas, a las cuales denominamos útero y la zona vaginal. Fragmentos de cada una de las secciones, de aproximadamente 100 mg de tejido húmedo, se colocaron en 4 ml de medio Dulbecco que contenía 50 µg/ml de ácido ascórbico, 50 µg/ml de B-aminopropionitrilo (BAPN) y 20 µCi de Pro-¹⁴C - - (uniformemente marcada) con una actividad específica de 286.0 mCi/mM. Las muestras se incubaron a 37°C por diferentes períodos (2, 4 y 6 horas), en un incubador Napco bajo una atmósfera de aire-bióxido de carbono (95-5%) con una agitación constante de 100 rpm. Las incubaciones se terminaron enfriando las muestras a 4°C y se adicionaron 2 ml de ácido acético para obtener una concentración final de 0.5 M. Los explantes de tejido en un volumen final de 6 ml fueron homogeneizados con un politrón Brinkman (3 x 15 sec) y los homogenados obtenidos se dividieron en varias alcuotas para las siguientes determinaciones:

- a) Determinación de radiactividad total incorporada (proteínas totales)

- b) Determinación de radiactividad incorporada a proteínas colagénicas
- c) Determinación de ADN.

VI Determinación de Radiactividad Total Incorporada

Se tomaron alícuotas de 200 μ l de los homogenados y se ajustaron a un volumen de 1.0 ml con agua destilada. Se adicionó ácido tricloroacético hasta una concentración de 10% y las muestras se incubaron a 4°C por 20 minutos con el objeto de precipitar las proteínas totales. Las muestras se filtraron con vacío sobre membranas de fibra de vidrio y se lavaron con ácido tricloroacético al 8%. Las membranas fueron transferidas a viales que contenían 10 ml de líquido de centelleo (Bray) y 0.5 ml de agua destilada. La radiactividad en cada una de las muestras se determinó en un espectrofotómetro de centelleo líquido Packard Tri-Carb. Con cada lote de muestras se contaron estándares internos de aminoácidos- C^{14} , con el objeto de corregir las cuentas obtenidas por el apagamiento producido por el agua, así como para determinar la eficiencia del aparato. Los resultados se expresaron como desintegraciones por minuto (dpm) por mg de ADN.

VII Determinación de Radiactividad Incorporada a Proteínas Colagénicas

Del homogenado original se tomaron alícuotas de 1 ml las cuales --

fueron incubadas con pepsina (100 $\mu\text{g/ml}$) a 4°C por 72 horas. Después de la incubación se tomaron alícuotas de 200 μl de las muestras pepsinizadas y se precipitaron con ácido tricloroacético, como ya se describió anteriormente con el objeto de determinar la radioactividad resistente a pepsina, la cual se consideró como incorporación a proteínas colagénicas. Los resultados al igual que para proteínas totales, se expresaron como desintegraciones por minuto (dpm) por mg de ADN. También se calcularon los porcentajes de biosíntesis de colágena con respecto a proteínas totales de acuerdo con la fórmula de Diegelmann y Peterkofsky (40).

$$\text{Colágena sintetizada \%} = \frac{\text{dpm en colágena}}{5 (\text{dpm totales} - \text{dpm en colágena}) + \text{dpm en colágena}} \times 100$$

VIII Determinación de ADN

La determinación de ADN se realizó por el método de la difenilamina (93). Se tomaron alícuotas de 400 μl del homogenado y se llevaron a 0.5 ml de volumen con ácido perclórico para obtener una concentración final de 0.5 M. Posteriormente las muestras se hidrolizaron a 70°C por 20 minutos, se les adicionó 1 ml de reactivo de difenilamina y se incubaron a 30°C por 17 horas. Se determinó la absorbancia a 600 nm y los valores de ADN para las muestras se calcularon de una solución tipo de ADN (0-100 $\mu\text{g/ml}$) que se desarrolló para cada lote de muestras.

IX Determinación de las Proporciones Relativas de Colágenas I y III por Análisis Densitométrico

a) Análisis densitométrico.- Para este estudio se utilizó colágena de piel de rata tipo I purificada por el método de Gross (94). Se preparó una solución a partir de colágena liofilizada en ácido acético 0.5 M a una concentración aproximada de 4 mg/ml, se dializó contra ácido acético 0.5 M (3 cambios) y finalmente se centrifugó a 39,000 rpm. El sobrenadante se guardó a 4°C y se tomaron alícuotas para determinar la concentración final de colágena por el método de Woessner. Una fracción del sobrenadante se dializó contra ácido acético 0.005 M y se utilizó para correr electroforesis en geles de poliacrilamida.

Se tomaron alícuotas de colágena en ácido acético 0.005M de 5, 10, 15, 20 y 25 μ l las cuales fueron ajustadas a un volumen final de 50 μ l con agua destilada y amortiguador de Tris-HCl 0.1 M, pH 6.8 que contenía: urea - 1 M, SDS al 2%, glicerol al 20% y azul de bromofenol al 0.05%. Las muestras fueron desnaturalizadas a ebullición por 15 minutos y sometidas a electroforesis. Los geles fueron teñidos con azul brillante de Coomassie R al 0.06% toda la noche, y desteñidos en una solución de ácido acético-metanol (7.5% - 5%). La relación de las cadenas $\alpha 1(I)/\alpha 2(I)$ fue determinada por análisis densitométrico a 600 nm en un espectrofotómetro Gylfort.

b) Determinación de la relación de colágenas I y III.- Aproximadamente 50 mg de tejido húmedo fueron homogenizados en 5 ml de ácido acético 0.5 M. Alícuotas de 1 ml del homogenado se digirieron con pepsina a una concentración final de 200 $\mu\text{g/ml}$, las muestras se incubaron a 4°C por 72 horas, posteriormente fueron dializadas contra ácido acético 0.5 M a 4°C por tres horas (3 cambios) y finalmente liofilizadas. El material liofilizado, correspondiente aproximadamente a 10 mg de tejido húmedo fue disuelto en 1 ml de amortiguador de Tris-HCl 0.1 M, pH 6.8 que contenía: - urea 1 M y SDS al 2% y se desnaturalizó a ebullición por 15 minutos a 15,000 rpm y del sobrenadante se tomaron alícuotas de 100 μl , las que se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia y ausencia de ditiotreitól (DTT). Las proporciones de los tipos de colágenas I y III fueron calculadas por análisis densitométrico, a partir de los valores obtenidos de las áreas de las bandas $\alpha\text{l(I)}$ y $\alpha\text{l(III)}$ en geles teñidos con azul brillante de Coomasie R y comparando las muestras reducidas y sin reducir.

X Determinación de Azúcares Simples.

Se empleó la técnica de Dubois (95) para determinar los carbohidratos presentes en glicoproteínas en las ramas del útero de la rata durante el embarazo y el posparto. Se utilizaron alícuotas de 200 a 400 μl de homogenados de tejido a una concentración de 10 mg/ml, en ácido 0.5 M.

Las muestras se aforaron a 2 ml con agua destilada, se les adicionaron 50 μ l de fenol al 80% e inmediatamente después 5 ml de ácido sulfúrico concentrado, las muestras se incubaron a temperatura ambiente por 30 minutos y se determinó la absorbancia a 490 nm. Se desarrolló una curva estándar de glucosa (10 - 70 μ g) con cada lote de muestras y se compararon los valores obtenidos de estas contra la curva.

VII. RESULTADOS

1. CAMBIOS EN EL PESO DEL UTERO

Como se mencionó con anterioridad, inicialmente Harkness y posteriormente Montfort y Pérez-Tamayo demostraron un incremento en el peso y contenido total de colágena en el útero durante el embarazo y disminución de estos dos parámetros después del parto. Estas observaciones fueron corroboradas por nosotros (datos no mostrados); sin embargo, al determinar la relación peso total/colágena se observó que en la segunda mi tad del embarazo el incremento en peso fue superior al aumento del conte nido total de colágena. En base a estos resultados se decidió hacer un análisis de las variaciones en la relación peso total del útero (no incluyendo la vagina)/colágena, así como peso total de la vagina/colágena. Se observó un incremento en la relación para el útero a partir del segun do tercio del embarazo. El valor de la relación disminuyó bruscamente ha cia el día 21, permaneció en valores normales las primeras 48 horas y ascendió aproximadamente siete veces entre los 3 y 7 días después del par to. Lo anterior sugería que la contribución del componente colagénico no era uniforme a lo largo del embarazo y durante el posparto por lo que se decidió determinar la concentración de colágena en diferentes zonas del útero.

2. CAMBIOS EN LA CONCENTRACION DE COLAGENA (ver Tablas I y II y Figura 1).

Como ya se mencionó, el tejido uterino fue dividido en tres secciones para su estudio que comprendieron la zona de implante, explante y vagina. Los valores normales para concentración de colágena en la zona de implante y explante fueron de 245.35 mg/g de tejido seco (± 9.10) y para la zona que denominamos sección vaginal y que incluyó el cérvix uterino, fue de 378.44 mg/g de tejido seco (± 18.88). La cuantificación de la concentración de colágena en cada una de las zonas a diferentes intervalos tanto durante el embarazo como después del parto mostró lo siguiente: En la zona de implante se observó una disminución gradual de la concentración de colágena a lo largo del embarazo obteniéndose el valor mínimo hacia el día 21 que fue de $143.88 \pm (44.73)$. Este valor mostró un ligero aumento los días uno y dos después del parto, pero a partir del día tres volvió a disminuir, siendo el valor hacia el día 7 de $114.36 \pm (6.47)$. La zona de explante mostró un incremento en la concentración de colágena hacia el día 9 del embarazo que fue de $362.87 \pm (18.31)$, la cual disminuyó ligeramente por debajo de los valores normales hacia el día 18 (206.73 ± 16.23). Después del parto la concentración de colágena en esta zona permaneció constante y dentro de los valores normales. Por otra parte, la concentración de colágena en la sección vaginal, mostró un ligero incremento hacia el día nueve del embarazo que fue de 19% con respecto al valor normal, disminuyó gradualmente a valores por debajo del normal hacia

TABLA I

VARIACIONES DE LA CONCENTRACION DE COLAGENA TOTAL EN LOS
TEJIDOS UTERINOS DE LA RATA DURANTE EL EMBARAZO^{a)}

Grupo	Colágena Total (mg/g de tejido seco)		
	Implante	Explante	Vagina
Control	245.35 \pm (9.10)	245.35 \pm (9.10)	378.44 \pm (18.88)
Embarazo (días)			
3	_____ b)	294.52 \pm (15.86)	378.44 \pm (18.88)
6	214.94 \pm (11.02)	275.36 \pm (17.08)	449.75 \pm (21.69)
9	223.06 \pm (13.56)	362.87 \pm (18.31)	463.75 \pm (13.55)
12	193.37 \pm (9.67)	292.85 \pm (94.56)	413.07 \pm (27.54)
15	147.58 \pm (9.85)	267.30 \pm (49.07)	313.90 \pm (21.51)
18	123.26 \pm (38.18)	206.73 \pm (16.23)	275.38 \pm (21.49)
21	143.88 \pm (44.73)	_____ c)	348.28 \pm (43.70)

a) Los valores representan los resultados obtenidos de 3 experimentos, utilizando 4-6 ratas por experimento. Los números en paréntesis representan la desviación estándar.

b) No se determinó por ser muy poco el tejido de implante.

c) No se determinó por no existir tejido de explante en el día 21.

TABLA II

VARIACION DE LA CONCENTRACION DE COLAGENA TOTAL EN LOS TEJIDOS
UTERINOS DE LA RATA DESPUES DEL PARTO^{a)}

Grupo	Colágena Total (mg/g de tejido seco)		
	Implante	Explante	Vagina
Control	245.35 \pm (9.10)	291.35 \pm (9.10)	378.44 \pm (18.88)
21 DE ^{b)}	143.88 \pm (44.73)	— ^{c)}	348.28 \pm (43.70)
Posparto (días)			
1	192.99 \pm (4.79)	236.97 \pm (27.83)	338.23 \pm (55.46)
2	208.61 \pm (24.13)	269.20 \pm (58.65)	379.83 \pm (62.28)
3	183.71 \pm (17.84)	278.41 \pm (59.93)	342.99 \pm (57.93)
5	143.62 \pm (32.63)	268.37 \pm (59.37)	354.98 \pm (63.36)
7	114.36 \pm (6.47)	291.84 \pm (30.91)	366.97 \pm (68.79)

a) Los valores representan los resultados obtenidos de 3 experimentos, utilizando de 4-6 ratas por experimento. Los números en paréntesis representan la desviación - estándar.

b) Datos correspondientes a 21 días de embarazo (21 DE).

c) No se determinó por no existir tejido de explante en el día 21.

CAMBIOS EN LA CONCENTRACION DE COLAGENA EN EL UTERO DE LA RATA DURANTE EL EMBARAZO Y EL POSPARTO

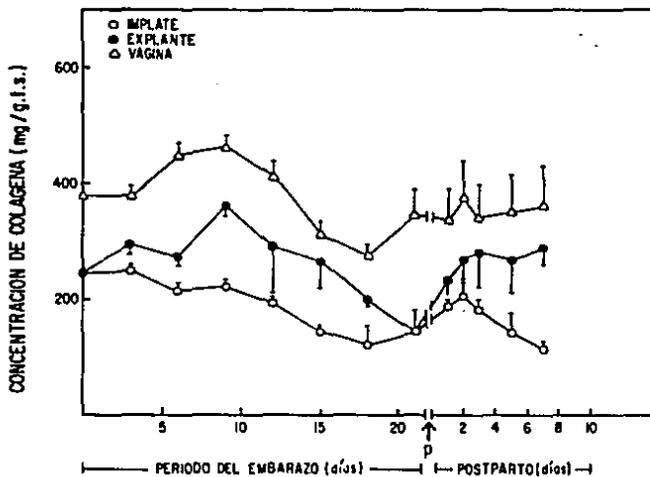


Figura 1.- Cambios en la concentración de colágena en el útero de la rata durante el embarazo y el posparto. La concentración de colágena se expresó como: mg/g de tejido seco. (o) Zona de implante, (●) zona de explante y (Δ) sección vaginal.

el día 18 y se mantuvo dentro del valor normal durante el posparto.

3. CAMBIOS EN LA RELACION DE PROTEINAS TOTALES Y COLAGENICAS (ver Tablas III y IV y Figura 2).

La evaluación de los cambios en la relación de proteínas totales y colagénicas, se realizó mediante la determinación colorimétrica de prolina e hidroxiprolina en hidrolizados ácidos de tejido. El valor control para las zonas de implante y explante fue de $1.96 \pm (0.04)$ y para la zona de vagina de $1.59 \pm (0.16)$. La zona de implante mostró un incremento gradual durante el embarazo en la relación Pro/OH-Pro, correspondiendo el valor máximo al día 21: $3.23 \pm (0.19)$. Este valor disminuyó rápidamente en el momento del parto y permaneció constante y dentro de valores normales durante la involución uterina. El valor de la relación para la zona de explante permaneció relativamente constante a lo largo del embarazo, con un pequeño incremento al día 18 que fue de $2.19 \pm (0.18)$. Después del parto, se observó una pequeña disminución a los días dos y tres, misma que alcanzó valores normales al día cuatro. La sección vaginal no presentó variaciones en la relación tanto a lo largo del embarazo, así como durante el posparto.

4. VARIACIONES EN LA CONCENTRACION DE ADN EN LOS TEJIDOS UTERINOS (ver Tablas V y VI y Figura 3).

La concentración de ADN para el tejido uterino normal fue de 19.56

TABLA III

CAMBIOS EN LA RELACION PRO/OH-PRO EN PROTEINAS TOTALES EN LOS
TEJIDOS UTERINOS DE LA RATA DURANTE EL EMBARAZO^a

Grupo	Implante	Explante	Vagina
Control	1.96 \pm (0.04)	1.96 \pm (0.04)	1.59 \pm (0.16)
Embarazo (días)			
3	— ^b	2.08 \pm (0.11)	1.59 \pm (0.16)
6	2.24 \pm (0.21)	1.73 \pm (0.18)	1.57 \pm (0.14)
9	2.52 \pm (0.28)	1.85 \pm (0.17)	1.83 \pm (0.12)
12	2.85 \pm (0.18)	1.89 \pm (0.01)	1.68 \pm (0.19)
15	2.94 \pm (0.11)	1.80 \pm (0.04)	1.39 \pm (0.26)
18	3.10 \pm (0.25)	2.19 \pm (0.18)	1.73 \pm (0.39)
21	3.23 \pm (0.19)	— ^c	1.61 \pm (0.10)

^a Los valores representan el promedio de tres experimentos utilizando de 4-6 ratas por experimento. Los números en paréntesis representan la desviación estándar.

^b No se determinó por no ser suficiente el tejido de implante a los 3 días.

^c No se determinó por no existir tejido de explante al día 21.

TABLA IV

CAMBIOS EN LA RELACION PRO/OH-PRO EN PROTEINAS TOTALES EN LOS
TEJIDOS UTERINOS DE LA RATA DURANTE EL POSPARTO^a

Grupo	Implante	Explante	Vagina
Control	1.96 ± (0.04)	1.96 ± (0.04)	1.59 ± (0.16)
21 DE ^b	3.23 ± (0.19)	— ^c	1.64 ± (0.10)
Posparto (días)			
1	2.22 ± (0.03)	1.93 ± (0.10)	1.77 ± (0.12)
2	2.17 ± (0.14)	1.70 ± (0.09)	1.67 ± (0.03)
3	2.28 ± (0.12)	1.71 ± (0.18)	1.64 ± (0.06)
5	2.23 ± (0.16)	1.90 ± (0.28)	1.69 ± (0.07)
7	2.20 ± (0.11)	1.97 ± (0.16)	1.60 ± (0.16)

^a Los valores representan el promedio de tres experimentos, utilizando de 4-6 ratas por experimento. Los números en paréntesis representan la desviación estándar.

^b Datos correspondientes a 21 días de embarazo (21 DE)

^c No se determinó por no existir tejido de explante en el día 21.

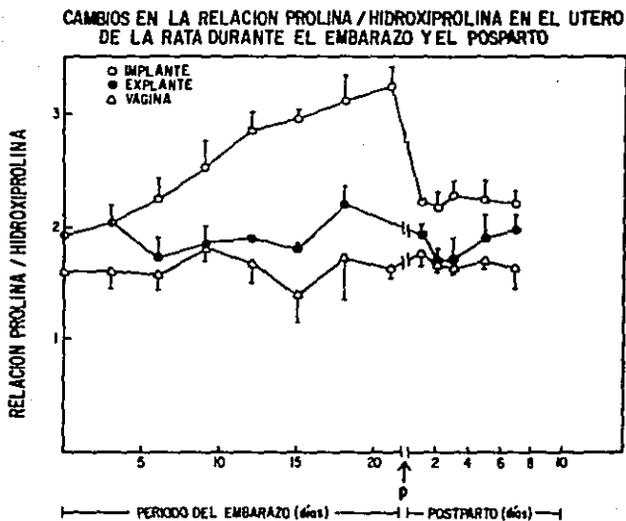


Figura 2.- Cambios en la relación prolina/hidroxi-
 prolina en el útero de la rata durante el embara-
 zo y el posparto. (○) Zona de implante, (●) zona
 de explante y (△) sección vaginal.

mg/g de tejido seco ($+ 1.47$) para las zonas de explante e implante y de $18.76 \pm (1.12)$ para la zona de vagina. En la zona de implante la concentración de ADN mostró una tendencia descendente llegando al día 18 a un valor de $12.78 \pm (1.71)$. El valor para el día 21 fue de 12.94; sin embargo, en este último punto la desviación estándar fue alta ($+ 4.33$). Después del parto la concentración de ADN siguió disminuyendo, obteniéndose valores de $8.38 \pm (1.15)$ y de $8.14 \pm (1.0)$ para los días uno y dos respectivamente. En los siguientes días el valor ascendió gradualmente y rebasó los valores normales, siendo hacia el día siete de $24.13 \pm (4.46)$.

Durante el embarazo, la zona de explante no mostró cambios en la concentración de ADN los primeros 15 días; sin embargo, el día 18 se observó una ligera disminución siendo el valor de $16.45 \pm (3.47)$. Después del parto durante los días 1, 2 y 3 los valores disminuyeron aún más llegando hasta $10.16 \pm (1.52)$ y para el día 5 y 7 los valores aumentaron por arriba del valor normal (20.35 ± 0.77). La concentración de ADN en la zona de vagina permaneció constante durante los días 3, 6 y 9 del embarazo y disminuyó gradualmente en las siguientes fechas siendo el valor al día 21 de $14.98 \pm (3.15)$. Después del parto la concentración de ADN llegó a valores mínimos, $8.03 \pm (0.49)$ al día dos, para después ascender y sobrepasar valores normales al día siete después del parto.

TABLA V

VARIACIONES EN LA CONCENTRACION DE ADN EN LOS TEJIDOS UTERINOS DE
LA RATA DURANTE EL EMBARAZO^a

Grupo	ADN (mg/g de tejido seco)		
	Implante	Explante	Vagina
Control	18.56 ± (1.47)	18.56 ± (1.47)	18.76 ± (1.12)
Embarazo (días)			
3	— ^b	21.14 ± (1.47)	18.63 ± (1.66)
6	19.17 ± (2.98)	20.24 ± (4.03)	18.50 ± (2.21)
9	19.21 ± (2.04)	22.75 ± (3.48)	19.00 ± (2.57)
12	14.23 ± (2.42)	20.53 ± (2.93)	14.83 ± (1.04)
15	12.58 ± (2.44)	22.88 ± (2.45)	14.29 ± (1.82)
18	12.78 ± (1.71)	16.45 ± (3.47)	12.66 ± (1.31)
21	12.94 ± (4.33)	— ^c	14.98 ± (3.15)

^a Los valores representan el promedio de tres experimentos utilizando de 4-6 ratas por experimento. Los números en paréntesis representan la desviación estándar.

^b No se determinó por no ser suficiente el tejido de implante al día 3.

^c No se determinó por no existir tejido de explante al día 21.

TABLA VI

VARIACION EN LA CONCENTRACION DE ADN EN LOS TEJIDOS UTERINOS DE
LA RATA DURANTE EL POSPARTO^a

Grupo	ADN (mg/g de Tejido seco)		
	Implante	Explante	Vagina
Control	18.56 ± (1.47)	18.56 ± (1.47)	18.76 ± (1.12)
21 DE ^b	12.94 ± (4.33)	— ^c	14.98 ± (3.15)
Posparto (días)			
1	8.38 ± (1.15)	10.98 ± (0.71)	9.07 ± (1.80)
2	8.14 ± (1.00)	10.16 ± (1.52)	8.03 ± (0.49)
3	16.66 ± (0.86)	14.16 ± (1.53)	10.79 ± (1.25)
5	22.37 ± (1.42)	20.17 ± (1.66)	14.67 ± (1.87)
7	24.13 ± (4.46)	20.35 ± (0.77)	24.23 ± (1.35)

^a Los valores representan el promedio de tres experimentos, utilizando de 4-6 ratas por experimento. Los números en paréntesis representan la desviación estándar.

^b Datos correspondientes a 21 días de embarazo (21 DE).

^c No se determinó por no existir tejido de explante al día 21.

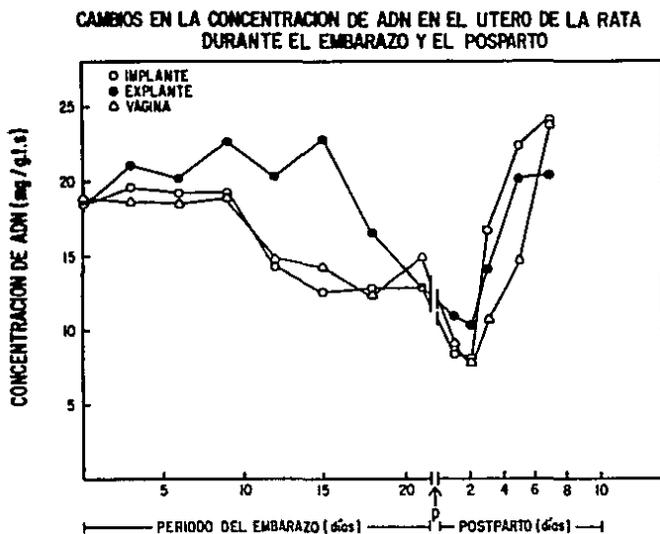


Figura 3.- Cambios en la concentración de ADN en el útero de la rata durante el embarazo y el parto. La concentración de ADN se expresó como: mg/g de tejido seco. (○) Zona de implante, (●) zona de explante y (Δ) sección vaginal.

5. VARIACIONES EN LA RELACION COLAGENA/ADN EN LOS TEJIDOS UTERINOS DURANTE EL EMBARAZO Y DESPUES DEL PARTO (ver Tablas VII y VIII y Figura 4).

Con el objeto de determinar el valor de la relación estroma/parénquima, se expresaron los datos obtenidos en la cuantificación de colágena y ADN, como relación colágena/ADN. Los valores normales fueron de 13.21, 13.21 y - 20.17 para las zonas de implante, explante y vagina respectivamente. Se observó que el valor de las relaciones permaneció constante para las tres zonas - estudiadas a lo largo del embarazo. Después del parto en la zona de implante la relación aumentó casi al doble los días 1 y 2 (23.02 y 25.62 respectivamente), pero disminuyó gradualmente llegando a un valor de 4.37 al día siete. El comportamiento de la relación para la zona de explante mostró también un aumento los días 1 y 2 disminuyendo posteriormente a valores normales (14.34) al día siete. La zona de vagina presentó el mayor incremento en la relación después del parto, siendo de 47.30 para el día dos, sin embargo al día siete - el valor ya era de 15.14.

6. VARIACION EN LA BIOSINTESIS DE PROTEINAS TOTALES Y COLAGENICAS, DURANTE EL EMBARAZO Y DESPUES DEL PARTO (ver Tablas IX y X y Figuras 5 y 6).

Con el objeto de medir la capacidad biosintética de los tejidos, se incubaron explantes de tejido de las zonas correspondientes a útero y vagina en presencia de prolina radiactiva. Inicialmente se establecieron las condiciones óptimas de incubación de los explantes, para lo cual se realizó una -

TABLA VII

VARIACIONES EN LA RELACION COLAGENA/ADN EN LOS TEJIDOS UTERINOS
DE LA RATA DURANTE EL EMBARAZO^{a)}

Grupo	Implante	Explante	Vagina
Control	13.21	13.21	20.17
Embarazo (días)			
3	— ^{b)}	11.80	21.31
6	11.21	13.58	24.31
9	12.08	15.96	24.40
12	13.58	14.40	27.85
15	11.73	11.68	21.96
18	9.62	12.56	21.75
21	11.11	— ^{c)}	23.24

a) Los valores fueron obtenidos tomando los datos de las Tablas I y V.

b) No se determinó por no ser suficiente el tejido de implante al día 3.

c) No se determinó por no existir tejido de explante al día 21.

TABLA VIII

VARIACIONES EN LA RELACION COLAGENA/ADN EN LOS TEJIDOS UTERINOS DE
LA RATA DESPUES DEL PARTO^a

Grupo	Implante	Explante	Vagina
Control	13.21	13.21	20.17
21 DE ^b	11.11	— ^c	23.24
Posparto (días)			
1	25.02	21.58	37.29
2	25.62	26.49	47.30
3	11.02	19.66	31.71
5	6.42	13.29	24.19
7	4.73	14.34	15.14

^a Los valores fueron obtenidos tomando los datos de las Tablas II y VI.

^b Datos correspondientes al día 21 de embarazo (21 DE).

^c No se determinó por no existir tejido de explante al día 21.

CAMBIOS EN LA RELACION COLAGENA/ADN EN EL UTERO DE LA RATA DURANTE EL EMBARAZO Y EL POSPARTO

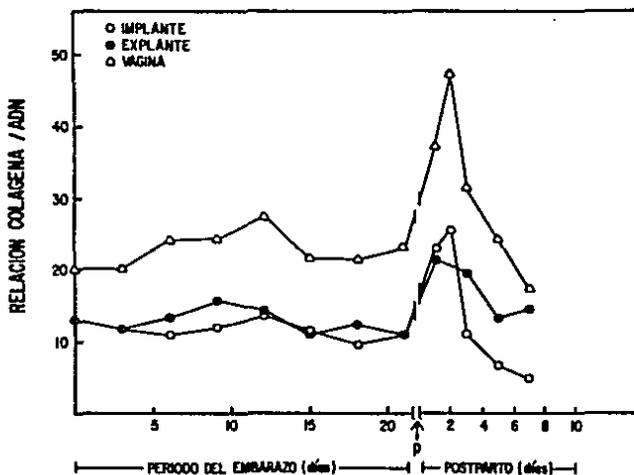


Figura 4.- Cambios en la relación colágena/ADN en el útero de la rata durante el embarazo y el posparto. (○) Zona de implante, (●) zona de explante y (△) sección vaginal.

cinética de incorporación de ^{14}C -Prolina durante 2, 4 y 6 horas de incubación (ver Fig. 5). La incorporación de la radiactividad precipitable con TCA al 10% se incrementó conforme al tiempo de incubación. Sin embargo, la diferencia entre las incorporaciones correspondientes a 4 y 6 horas fue muy poca, por lo que se eligió el tiempo de 4 horas de incubación para determinar la síntesis de proteínas en cada uno de los tejidos durante el embarazo y después del parto. Debido a que se observaron variaciones individuales en la incorporación del isótopo a diferentes tiempos, se decidió expresar los datos en términos de proporción de colágena con respecto a proteínas totales. El porcentaje de la biosíntesis de colágena se determinó utilizando la ecuación de Diepleman y Peterkofsky (40), asumiendo que la radiactividad total determinada mediante la precipitación con ácido tricloroacético al 10%, correspondía a la prolina total presente en proteínas colagénicas y no colagénicas, además de la prolina transformada a hidroxiprolina presente en colágena. La radiactividad presente en colágena fue determinada mediante la incubación de homogenados de tejido en presencia de pepsina y precipitable con ácido tricloroacético al 10% y se consideró correspondiente a la colágena que comprende la prolina e hidroxiprolina radiactivas presentes en la proteína.

El porcentaje de colágena sintetizada durante el embarazo, de un valor normal 8.4 y 8.26 para las ramas uterinas y vagina, disminuyó progresivamente para las tres zonas llegando aproximadamente al 50% con respecto al valor normal en el segundo tercio del embarazo (ver Fig. 6). A partir del día 15, en donde se obtuvieron los valores más bajos, el porcentaje de biosínte

EVALUACION DE LA SINTESIS TOTAL DE PROTEINAS POR INCORPORACION DE ^{14}C -PROLINA EN TEJIDOS UTERINOS DE RATA

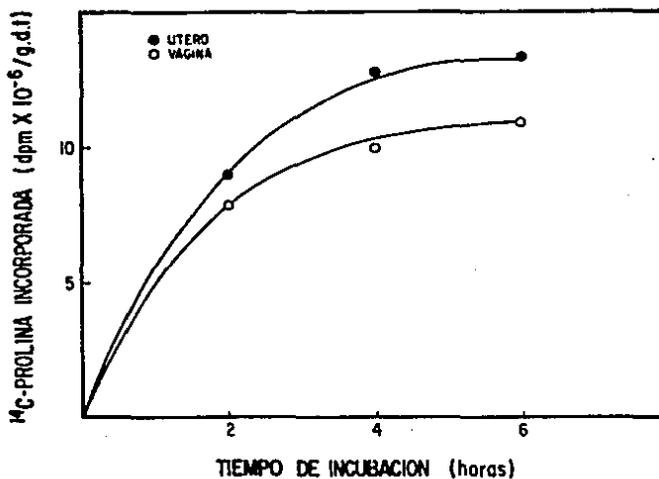


Figura 5.- Síntesis de proteínas totales en tejidos uterinos, determinada por la incorporación de ^{14}C -prolina precipitable con ácido tricloroacético al 10%.
(●) Ramas uterinas y (○) sección vaginal.

TABLA IX

VARIACIONES DE LA BIOSINTESIS DE PROTEINAS TOTALES Y COLAGENICAS
EN LOS TEJIDOS UTERINOS DE LA RATA DURANTE EL EMBARAZO

Tejido	Embarazo (días)	Radioactividad total (dpm x 10 ⁻⁶ /mg ADN)	Radioactividad en colágena (dpm x 10 ⁻⁶ /mg ADN)	Síntesis de colágena (% del Total)
Implante	0	3.71 ± (0.14)	1.17 ± (0.07)	8.45 ± (0.37)
	6	1.61 ± (0.26)	0.42 ± (0.08)	6.71 ± (0.25)
	9	3.94 ± (0.23)	0.85 ± (0.70)	5.23 ± (0.18)
	12	2.63 ± (0.43)	0.55 ± (0.02)	5.26 ± (0.85)
	15	2.71 ± (0.19)	0.38 ± (0.05)	3.28 ± (0.24)
	18	2.42 ± (0.02)	0.50 ± (0.03)	5.03 ± (0.38)
	21	4.36 ± (0.74)	1.44 ± (0.12)	8.96 ± (0.01)
Expiante	0	3.71 ± (0.14)	1.17 ± (0.07)	8.45 ± (0.37)
	6	1.77 ± (0.05)	0.30 ± (0.03)	4.17 ± (0.68)
	9	0.98 ± (0.04)	0.16 ± (0.02)	4.13 ± (0.42)
	12	1.77 ± (0.16)	0.43 ± (0.02)	6.09 ± (0.44)
	15	1.89 ± (0.14)	0.29 ± (0.02)	3.53 ± (0.02)
	18	8.25 ± (0.42)	1.63 ± (0.19)	4.71 ± (0.37)
Vagina	0	2.91 ± (0.72)	0.88 ± (0.13)	8.26 ± (1.09)
	6	2.14 ± (0.13)	0.37 ± (0.03)	4.01 ± (0.13)
	9	1.14 ± (0.05)	0.23 ± (0.01)	4.88 ± (0.07)
	12	2.28 ± (0.05)	0.46 ± (0.01)	4.95 ± (0.27)
	15	5.77 ± (0.35)	1.01 ± (0.01)	4.06 ± (0.32)
	18	4.63 ± (0.10)	1.12 ± (0.01)	5.99 ± (0.04)
	21	7.76 ± (0.94)	2.52 ± (0.19)	8.77 ± (0.51)

TABLA X

CAMBIOS EN LA BIOSINTESIS DE PROTEINAS TOTALES Y
COLAGENICAS EN LOS TEJIDOS UTERINOS DE LA RATA
DESPUES DEL PARTO

Tejido	Post-Parto (días)	Radioactividad total (dpm x 10 ⁻⁶ /mg ADN)	Radioactividad en colágena (dpm x 10 ⁻⁶ /mg ADN)	Síntesis de colágena (% del Total)
Control	---	3.71 ± (0.14)	1.17 ± (0.07)	8.45 ± (0.37)
21 DE	---	4.36 ± (0.74)	1.44 ± (0.20)	8.96 ± (0.37)
Implante	1	11.38 ± (0.16)	6.75 ± (0.05)	8.59 ± (0.30)
	2	12.71 ± (0.58)	4.78 ± (0.21)	11.04 ± (0.80)
	3	3.67 ± (0.20)	1.59 ± (0.01)	13.41 ± (0.05)
	5	3.90 ± (0.16)	1.67 ± (0.19)	13.14 ± (1.50)
	7	4.13 ± (0.22)	1.28 ± (0.03)	8.41 ± (0.97)
Control	---	3.71 ± (0.14)	1.17 ± (0.07)	8.45 ± (0.37)
21 DE	---	4.36 ± (0.74)	1.44 ± (0.20)	8.96 ± (0.01)
Explante	1	9.37 ± (0.37)	4.15 ± (0.24)	13.71 ± (0.39)
	2	16.47 ± (3.42)	4.94 ± (0.13)	8.43 ± (2.00)
	3	8.30 ± (0.24)	2.45 ± (0.25)	7.72 ± (1.06)
	5	4.92 ± (0.75)	1.38 ± (0.05)	7.47 ± (1.07)
	7	6.36 ± (0.11)	2.08 ± (0.43)	9.01 ± (2.29)
Control	---	2.91 ± (0.72)	0.88 ± (0.13)	8.26 ± (1.09)
21 DE	---	7.76 ± (0.94)	2.52 ± (0.19)	8.77 ± (0.51)
Vagina	1	28.44 ± (5.02)	7.89 ± (0.03)	7.55 ± (1.71)
	2	46.47 ± (1.81)	12.73 ± (0.68)	7.01 ± (0.13)
	3	12.23 ± (0.76)	3.43 ± (0.10)	7.27 ± (0.32)
	5	5.96 ± (0.26)	1.64 ± (0.15)	7.10 ± (0.39)
	7	6.97 ± (0.66)	1.62 ± (0.21)	5.70 ± (0.27)

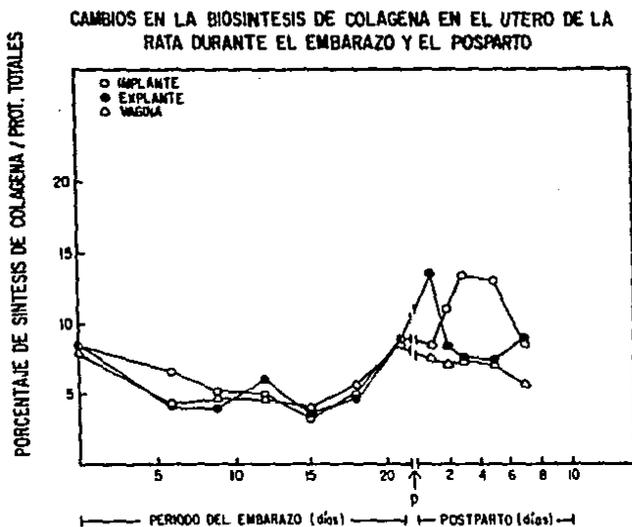


Figura 6.- Cambios en la biosíntesis de colágena en el útero de la rata durante el embarazo y el posparto. Los datos se expresaron como porciento de síntesis de colágena con respecto a proteínas totales. (○) Zona de implante, (●) zona de explante y (△) sección vaginal.

sis de colágena aumentó y llegó a valores normales hacia el día 21. Después del parto el porcentaje de colágena sintetizada aumentó para la zona de implante los días dos, tres y cinco, obteniéndose valores de 11.04, 13.41 y 13.14 respectivamente. Sin embargo, para el día siete el porcentaje de síntesis correspondió al valor normal. La zona de explante únicamente mostró un incremento en el porcentaje de síntesis de colágena en el primer día después del parto (13.71%), pero posteriormente disminuyó y se mantuvo en valores normales. La zona de vagina presentó valores normales después del parto.

7. CUANTIFICACION DE LAS PROPORCIONES RELATIVAS DE LAS COLAGENAS I Y III POR ANALISIS DENSITOMETRICO (ver Tablas XI y XII y Figuras 7 y 8).

La estimación de las proporciones relativas de las colágenas intersticiales uterinas durante el embarazo y el posparto se realizó por análisis densitométrico de las diferentes muestras sometidas a electroforesis en geles de poliacrilamida y teñidas con azul de coomasie. Inicialmente se establecieron las condiciones óptimas para esta metodología y con este objeto se purificó colágena tipo I de piel de rata por el método de Gross (89). Se sometieron diferentes concentraciones a electroforesis y se determinaron: el porcentaje de colágena en las cadenas α así como el valor de las áreas en las cadenas $\alpha 1$ (I) y $\alpha 2$. Los resultados de estas determinaciones se muestran en la Tabla XI, obteniéndose un valor para la relación $\alpha 1/\alpha 2 = 2.06 \pm 0.02$, que está de acuerdo con las proporciones de las cadenas α que constituyen este tipo de coláge-

TABLA XI

DETERMINACION DE LA RELACION $\alpha 1(1)/\alpha 2$ MEDIANTE ANALISIS DENSITOMETRICO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE COLAGENA TIPO I SOMETIDAS A ELECTROFORESIS CON SDS^{a)}.

Colágena Tipo I (μg)	Colágena en Cadenas α (%)	Area en Cadenas $\alpha 1$	Area en Cadenas $\alpha 2$	Relación $\alpha 1/\alpha 2$
6.68	47.87	0.0912 \pm (0.0127)	0.0433 \pm (0.0150)	2.10
13.37	51.54	0.1428 \pm (0.0053)	0.0695 \pm (0.0077)	2.05
20.05	52.45	0.2054 \pm (0.0090)	0.0996 \pm (0.0105)	2.06
26.76	46.80	0.2536 \pm (0.0108)	0.1213 \pm (0.0032)	2.09
33.41	45.40	0.3071 \pm (0.0118)	0.1508 \pm (0.0064)	2.03
	$\bar{X} = 48.81 \pm 2.72$			$\bar{X} = 2.06 \pm 0.02$

a) Los valores expresados representan el promedio de los resultados obtenidos en seis diferentes determinaciones.

na. Además, esta relación permaneció constante y el incremento en las áreas fue proporcional en un intervalo de concentración de 5 a 30 μg de colágena (Fig. 7). Adicionalmente, se cuantificó la hidroxiprolina presente en las bandas correspondientes a las cadenas $\alpha 1(\text{I})$ y $\alpha 2$ después de hidrólisis ácida y determinación colorimétrica del iminoácido (90). Los resultados obtenidos demostraron en todos los casos el doble de concentración de hidroxiprolina en $\alpha 1(\text{I})$ con respecto a $\alpha 2$. El porcentaje estimado de las cadenas α con respecto a los componentes β y γ fue de 48.81%.

Se sabe que la colágena tipo III está unida por puentes disulfuro intercadena lo que le permite permanecer en forma de triple hélice en las condiciones de electroforesis, estos puentes disulfuro son reducibles por agentes del tipo de β -mercaptoetanol y ditioneitol. Esta propiedad se aprovechó para estimar las proporciones relativas de colágenas I y III en muestras reducidas y sin reducir. En la Fig. 8 se muestra un ejemplo ilustrado de la aplicación de esta metodología. Es necesario hacer notar que previo a la electroforesis las muestras se sometieron a digestión con pepsina para eliminar las proteínas no colagénicas. Se observó una migración más lenta de las cadenas $\alpha 1(\text{III})$ (ligeramente por arriba de las cadenas $\alpha 1(\text{I})$ en las muestras reducidas) y debido a esto los picos no fueron homogéneos. Por lo que los porcentajes relativos de colágena tipo III se calcularon por las diferencias entre las áreas de las cadenas $\alpha 1$ con y sin reducción.

Cuando muestras de tejidos uterinos normales se sometieron a este -

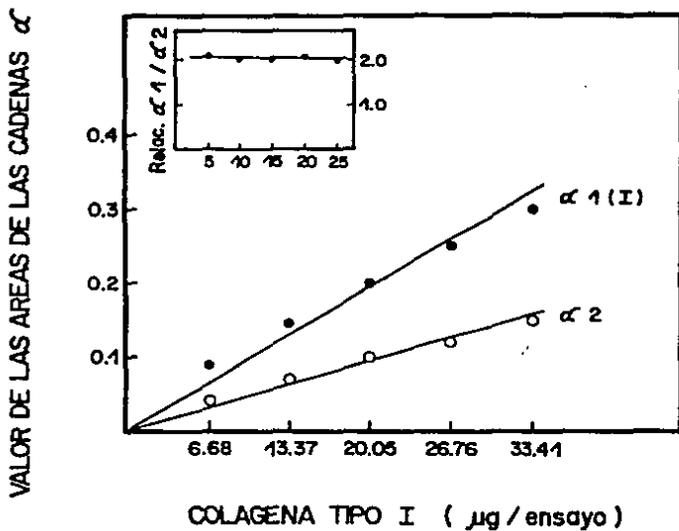


Figura 7.- Curva estándar de diferentes concentraciones de colágena, sometidas a análisis densitométrico. Valor de las áreas de $\alpha 1$ (●) y $\alpha 2$ (○). Recuadro: representación de la relación $\alpha 1/\alpha 2$ a las diferentes concentraciones utilizadas.

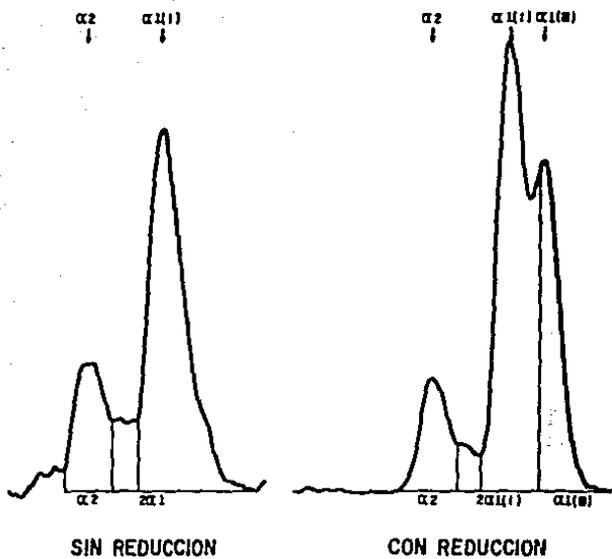


Figura 8.- Trazo densitométrico de la zona de las cadenas de una muestra de tejido uterino sin reducción y con reducción.

mismo procedimiento y dentro de intervalos de concentración de 5 a 30 $\mu\text{g}/$ ensayo para obtener los porcentajes relativos de colágenas intersticiales en el útero normal, de manera consistente se obtuvieron relaciones $\alpha_1/\alpha_2 > 2$. El valor promedio de varias determinaciones fue de 2.28 (± 0.03) y los porcentajes calculados fueron: 62.85 (± 3.43) para colágena tipo I y 25.59 (± 4.05) para colágena tipo III. Existió un 11.25% (± 2.75) que correspondió a un exceso de material colagénico que conigra con la cadena $\alpha_1(I)$ en condiciones no reductoras.

Para el cálculo de los porcentajes arriba mencionados se consideró exclusivamente el material colagénico en el área de las alfas. También se calculó el porcentaje relativo de cadenas α componentes β y γ , colágena tipo V y material colagénico de alto peso molecular no identificado. Los resultados obtenidos al analizar muestras de tejido uterino con y sin reducción se presentan en la Tabla XII. Por consiguiente estos cálculos incluyeron aproximadamente al 70% de la colágena uterina.

Los resultados del análisis densitométrico de los tejidos de la zona de implante durante el embarazo se muestran en la figura 9. Se observó un decremento en los componentes β y γ a partir del día 9 y una disminución gradual de las cadenas α . La determinación de las áreas bajo las curvas para las cadenas α_1 y α_2 de las muestras de tejido con y sin reducción mostraron una proporción constante para colágena tipo I que fue de 79.89 (± 4.29) durante todo el embarazo y para colágena tipo III de 21.17 (± 3.43). La re-

TABLA XII
 PORCENTAJES RELATIVOS DE LOS COMPONENTES COLAGENICOS EN TEJIDOS
 UTERINOS NORMALES DE LA RATA^{a)}.

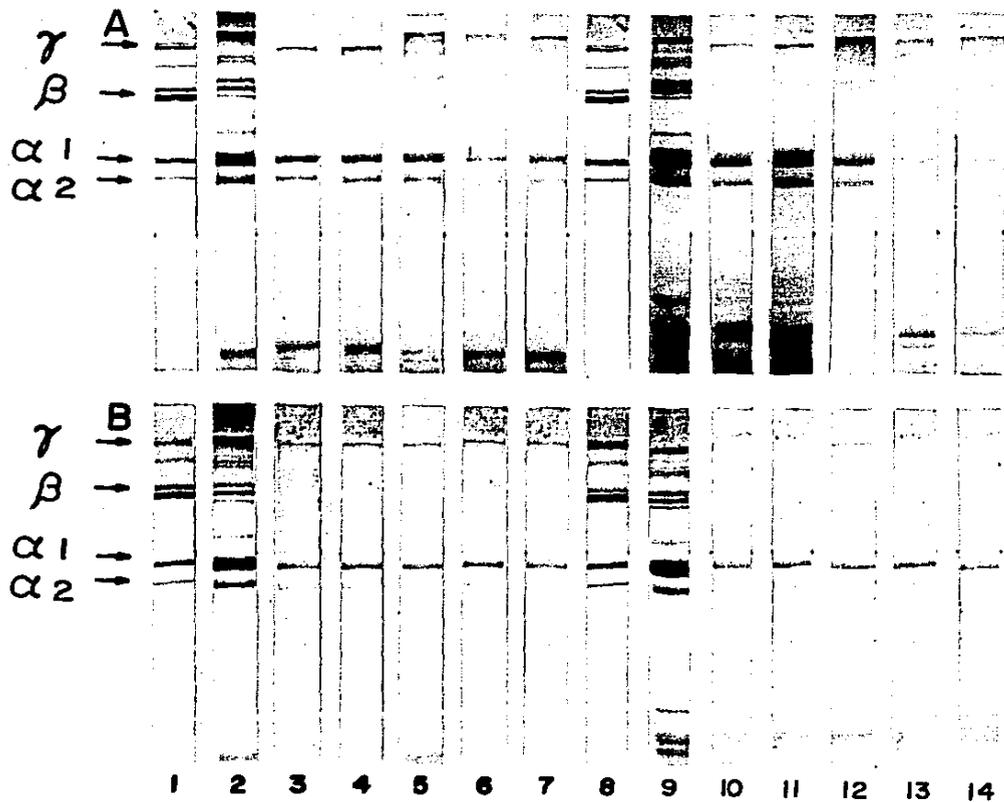
COMPONENTE	SIN REDUCCION (%)	CON REDUCCION (%)
α	48.42 \pm (6.00) ^{c)}	65.73 \pm (7.41)
β	9.43 \pm (1.98)	9.16 \pm (0.32)
γ	37.49 \pm (10.41)	19.78 \pm (0.36)
ν	1.78 \pm (0.60)	0.94 \pm (0.35)
NO IDENTIFICADO ^{b)}	2.88 \pm (0.80)	4.34 \pm (1.20)

- a) Los porcentajes se calcularon por análisis densitométrico de muestras de tejido pepsinizadas y sometidas a electroforesis en geles de poliacrilamida.
- b) El material no identificado correspondió a compuestos colagénicos que migraron entre los componentes β y γ .
- c) Los valores representan el promedio de dos determinaciones y utilizando tres distintas concentraciones de colágeno.

Figura 9.- Electroforesis en geles de poliacrilamida de tejido uterino (zona de implante).

A. Durante el embarazo, del carril 2 al 7 muestras sin reducir, del carril 9 al 14 muestras reducidas. Carriles: (1 y 8) colágena tipo I, (2 y 9) útero normal, (3 y 10) nueve días de embarazo, (4 y 11) 12 días de embarazo, (5 y 12) 15 días de embarazo, (6 y 13) 18 días de embarazo, (7 y 14) 21 días de embarazo.

B.- Durante el posparto, del carril 2 al 7 muestras sin reducir, del carril 9 al 14 muestras reducidas. Carriles: (1 y 8) colágena tipo I, (2 y 9) útero normal, (3 y 10) un día posparto, (4 y 11) dos días posparto, (5 y 12) tres días posparto, (6 y 13) cinco días posparto, (7 y 14) siete días posparto.



lación de las cadenas α_1/α_2 en ausencia de agente reductor fue cercana a 2.0. Durante el posparto el tejido de implante presentó un aumento gradual de los componentes β y γ y las proporciones relativas de las colágenas I y III permanecieron constantes: Tipo I 79.25% (+ 4.37) y Tipo III 20.74% (+ 4.37).

En la figura 10 se muestran los resultados obtenidos al analizar el tejido de la zona de explante. Se observó una disminución de los componentes β y γ a partir del día 15 del embarazo y también un decremento en la concentración de las cadenas α , que sin embargo fue menor al observado para la zona de implante. Los porcentajes relativos para las colágenas tipos I y III, fueron de 84.26% (+ 2.58) y 15.73% (+ 2.57) respectivamente.

Durante el posparto se observó una recuperación inmediata de los componentes β y γ así como poca variación en la concentración de las cadenas α . La determinación cuantitativa de las proporciones de colágenas I y III no mostró cambios en las diferentes fechas estudiadas obteniéndose un valor para tipo I de 83.31% (+ 4.17) y para tipo III de 16.64% (+ 4.19).

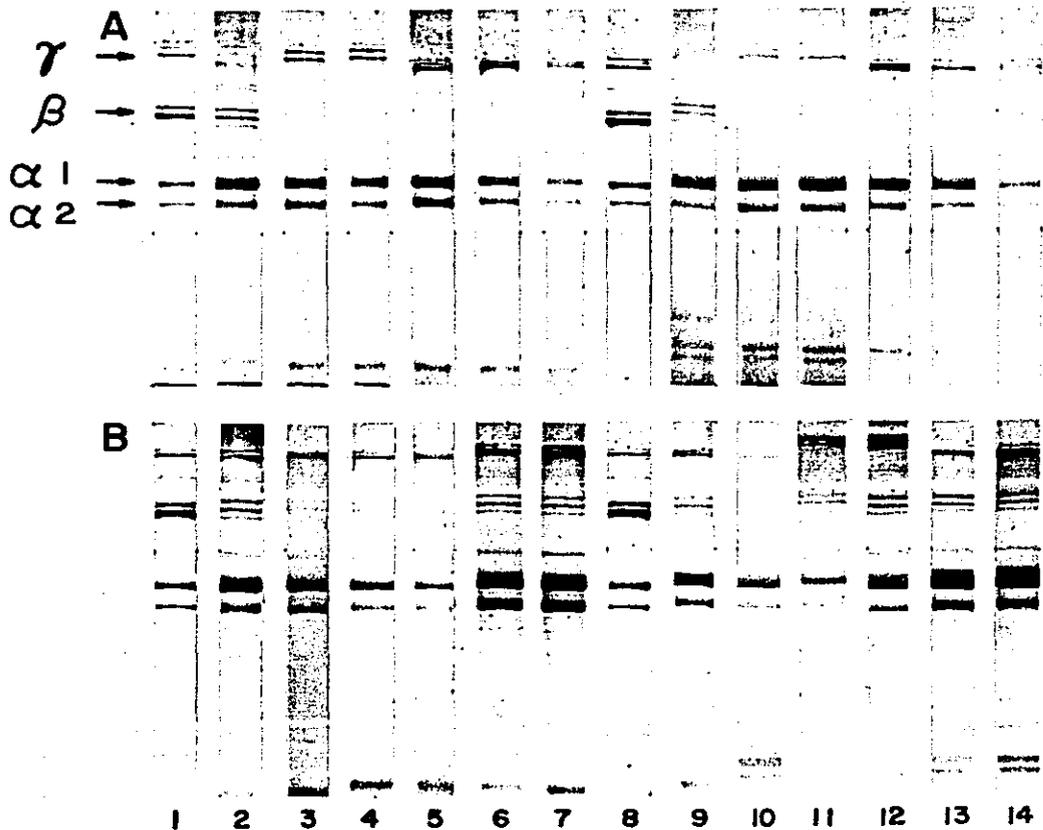
8. DETERMINACION DE AZUCARES SIMPLES. (Ver Figuras 11 y 12)

La concentración de carbohidratos presentes en glicoproteínas se determinó en el tejido de implante y explante (ver fig. 11). El explante

Figura 10.- Electroforesis en geles de poliacrilamida de la zona de explante.

A. Durante el embarazo, carriles 2 al 7 muestras sin reducir, 9 al 14 muestras reducidas. Carriles: (1 y 8) colágena tipo I, (2 y 9) útero normal, (3 y 10) seis días de embarazo, (4 y 11) nueve días de embarazo, (5 y 12) doce días de embarazo, (6 y 13) 15 días de embarazo, (7 y 14) 18 días de embarazo.

B. Durante el posparto, del carril 2 al 7 muestras sin reducir, del carril 9 al 14 muestras reducidas. Carriles: (1 y 8) colágena tipo I, (2 y 9) útero normal, (3 y 10) un día posparto, (4 y 11) dos días posparto, (5 y 12) tres días posparto, (6 y 13) cinco días posparto, (7 y 14) siete días posparto.



CAMBIOS EN LA CONCENTRACION DE AZUCARES SIMPLES EN LAS RAMAS UTERINAS DURANTE EL EMBARAZO Y EL POSPARTO

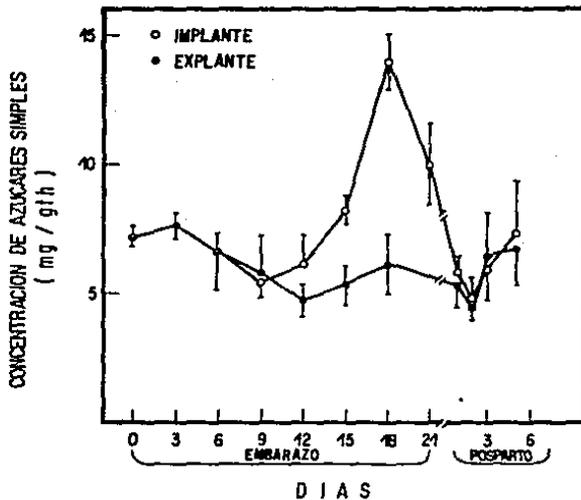


Figura 11.- Cambios en la concentración de azúcares unidos a glicoproteínas en las ramas uterinas durante el embarazo y el parto: implante (○), explante (●)

mantuvo la concentración de azúcares constante durante el embarazo y el posparto. El implante mostró un comportamiento semejante al explante - hasta el día 12; sin embargo, la concentración al día 18 fue de 13.97 mg/gth (\pm 1.11), 1.95 veces mayor que el valor normal 7.14 mg/gth (\pm 0.44). Después del parto la concentración de carbohidratos en el implante disminuyó a valores normales.

Quando los datos fueron expresados como contenido total de carbohidratos en las ramas uterinas, se observó un incremento cuyo valor máximo se obtuvo al día 18 de embarazo, dicho aumento disminuyó a niveles normales después del parto (ver fig. 12).

CAMBIOS EN EL PESO Y CONTENIDO DE AZÚCARES SIMPLES
EN LAS RAMAS UTERINAS DURANTE EL EMBARAZO Y EL
POSPARTO

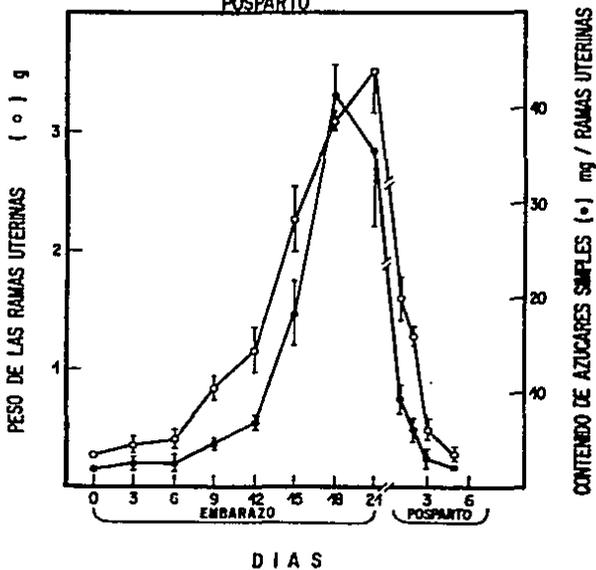


Figura 12.- Cambios en el peso y contenido total de azúcares unidos a glicoproteínas en las ramas uterinas durante el embarazo y el posparto: peso (o), contenido de azúcares (•).

VIII. D I S C U S I O N

El incremento en el tamaño del útero, así como en el contenido total de colágena durante el embarazo ha sido descrito por Harkness y por otros investigadores (75, 76, 77). Es importante hacer notar que todos los reportes coinciden en que el aumento en el peso es mayor que el incremento en el contenido de colágena, por lo que con el objeto de estudiar la relación peso/colágena, se determinaron las variaciones en el peso a lo largo del embarazo, así como durante el posparto para las ramas uterinas y la sección vaginal. Para la sección vaginal la relación peso/colágena permaneció constante durante el embarazo y el posparto. Los cambios en el peso del cérvix uterino de la rata durante el embarazo y el contenido total de colágena fueron también estudiados por Rimmer (96). Ambos parámetros presentaron comportamientos semejantes; sin embargo, la relación peso/colágena presentó una amplia variación en estos estudios.

Las ramas uterinas mostraron una relación constante las primeras tres fechas del embarazo, debido a que los incrementos en peso y colágena fueron paralelos para estas fechas. Sin embargo a partir del noveno día el incremento en peso rebasó considerablemente al aumento de colágena, lo que hizo que la relación se incrementara y permaneciera elevada del día doce al día 21 del embarazo. Después del parto la relación disminuyó a valores normales y permaneció así durante las primeras 48 horas. Esto se debió -

a que el peso del útero disminuyó al 40% a las 24 horas después del parto, con respecto al valor obtenido en el día 21 del embarazo. Posteriormente, - la relación peso/colágena volvió a aumentar debido principalmente a que la disminución en el contenido de colágena fue progresiva y al día siete el - contenido de colágena total en las ramas uterinas correspondió al 50% de los niveles normales.

En virtud de que las ramas uterinas y la sección vaginal mostraron comportamientos diferentes en cuanto a la relación peso/colágena y determi nandose dos regiones distintas en las ramas uterinas: Las zonas de implante y explante, se decidió dividir al tejido en estas tres zonas para realizar los estudios mencionados en los objetivos. La determinación de la concentra ción de colágena mostró tendencias diferentes para las tres zonas. Como se mencionó anteriormente en los resultados, la sección vaginal presentó un in cremento en la concentración, llegando a su valor más alto el día nueve y disminuyendo gradualmente, obteniéndose el valor más bajo al día 18 para -- posteriormente ascender. A pesar de que los estudios se realizaron considerando a la vagina y el cérvix como una unidad (sección vaginal), los resultados obtenidos coinciden con los reportados por Fimmer (96), quien cuantificó la concentración de colágena en cérvix durante el embarazo y encontró que la mayor concentración se presentó al día nueve y el valor mínimo al día 20. Esta dualidad de condiciones nos recuerda el comportamiento que presenta el cérvix durante el ciclo estral con respecto a la colágena (74), donde - - en la etapa del diestro se obtiene la mayor concentración de colágena.

y en el estro (etapa de recepción al macho) la menor concentración.

La disminución en la concentración de colágena en la sección vaginal observada en los últimos días del embarazo, pudiera deberse al incremento en los niveles de la relaxina y otras hormonas ováricas que se sabe aumentan poco antes del parto. Esta situación coincide con el reblandecimiento cervical el cual se presenta 4 a 5 días antes del parto. En efecto, estudios realizados por Danforth (97) demostraron que las fibras de colágeno se observan separadas y dispersas durante la dilatación completa. La de terminación de la concentración de colágena en cérvix ha sido realizada por varios investigadores, ya que la dilatación del canal cervical durante la labor de parto es un fenómeno que sugiere cambios en las propiedades del mismo y de hecho el cérvix uterino de todas las especies sufre remodelación tisular durante el embarazo.

La concentración de colágena en la zona de explante permaneció relativamente constante a lo largo del embarazo, mientras que la zona de implante disminuyó a un 40% del valor normal al día 21 de embarazo. Es importante hacer notar que el tejido de implantación es predominante al final del embarazo. Esto nos sugiere que el incremento en el peso del útero se debe al aumento de otras proteínas no colagénicas que diluyen a la colágena presente, cuando esta se expresa en miligramos por gramo de tejido seco. Sin embargo, el incremento en el contenido total de colágena es real puesto que el útero está aumentando de tamaño.

Después del parto la concentración de colágena en la sección vaginal permaneció constante y en niveles normales, la zona de explante que prácticamente había desaparecido al final del embarazo, aumentó su concentración para permanecer en niveles normales. La zona de implante que desaparece a los siete días del posparto, mostró un ligero aumento los dos primeros días pero después disminuyó.

En virtud de que la concentración de colágena disminuye durante el embarazo y aumenta en el posparto, es necesario enfatizar en dos conceptos - que han sido motivo de frecuente controversia: uno que se refiere al contenido total de colágena, que aumenta durante el embarazo y disminuye en el posparto y el otro que expresa la concentración de esta proteína por gramo de tejido. A pesar de que se ha mencionado (73) que la expresión de la colágena de un tejido en términos de concentración da una impresión totalmente falsa del proceso metabólico de éste, nosotros consideramos que la concentración nos da una idea de la proporción que guarda la colágena con otros componentes matriciales y que posiblemente sean fundamentales en la funcionalidad del tejido. Con respecto a este punto podemos mencionar que el útero con la edad - sufre atrofia y bajo estas condiciones la concentración de colágena se duplica y por consiguiente el útero pierde distensibilidad.

Con el objeto de determinar las proporciones de la colágena con respecto a otras proteínas durante el embarazo y el posparto se cuantificó la - concentración de prolina total y se expresaron los datos en términos de rela

ción prolina/hidroxiprolina. Como ya se mencionó en los resultados, esta relación permaneció constante para el explante y la vagina, pero aumentó para la zona de implante. Este incremento, que es un índice de la relación proteínas totales/colágena, puede aumentar debido a un incremento en la concentración de proteínas totales, una disminución de colágena o una combinación de ambos eventos.

La disminución en la concentración de colágena en la zona de implante, hace menor su contribución a la concentración de prolina tisular, la cual permaneció constante a lo largo del embarazo. Aún cuando no se realizaron determinaciones específicas para dilucidar la naturaleza de otras proteínas matriciales: proteínpolisacáridos, fibronectina etc., los resultados indican que existe un incremento en proteínas no colagénicas. Sin aceptar la interrelación que existe entre estas dos variables, sería difícil explicar el incremento en el tamaño del útero sin pensar en la participación de otras proteínas matriciales. Estudios realizados por Danforth ('97) en cérvix uterino humano al final del embarazo demostraron una disminución en la relación colágena/proteínas totales en base a la concentración de hidroxiprolina. Esta disminución se debió a un gran aumento en la síntesis y depósito de glicosaminoglicanos en el estroma uterino.

Existen reportes en la literatura que apoyan las observaciones de Danforth y algunos otros que están en contradicción; Kleissl observó - - -

también una marcada disminución en la relación colágena/proteínas totales en el cérvix, poco antes y durante el parto. Por otra parte Maillot y Zimmerman ('98) no encontraron cambios en la relación colágena/proteínas totales, pero si observaron que aumenta notablemente la solubilidad de la colágena durante la dilatación completa del cérvix y que este fenómeno es taba aunado a un incremento en la actividad de colagenasa ('99). Cabrol y col. (100) demostraron que existe una disminución de los glicosaminoglicanos totales presentes en el cérvix uterino humano al término del embarazo: disminuyen el condroitín y dermatán sulfato sin cambios en el ácido hialurónico. Por otra parte, Kitamura y col. (101) no reportaron cambios en los glicosaminoglicanos totales presentes en el cérvix durante el embarazo, debido a que observaron una disminución en el condroitín y dermatán sulfato que se correlacionó con un incremento en el ácido hialurónico. En cuanto a los posibles cambios cualitativos y/o cuantitativos de las proteínas no colágenicas presentes en el cuerpo del útero, no se han realizado estudios hasta el momento.

La cuantificación de ADN, así como de los otros parámetros bioquímicos se realizó tomando explantes de tejido uterino, sin hacer diferencias entre las distintas capas que lo constituyen. La disminución en la concentración de ADN en la zona de implante y sección vaginal a partir del día nueve hasta el día 18 del embarazo podría explicarse en base al posible incremento de proteinglicanos ya descritos para cérvix. Como ya se mencionó en los resultados, la concentración de ADN al día 21 para las zonas de implante y sec

ción vaginal mostraron una desviación estándar amplia que podría explicarse por la afluencia celular que sufre el estroma endometrial a partir del día 16. Se sabe que la presencia de diferentes tipos celulares en el endometrio durante el embarazo está determinada por diferentes factores hormonales.

Estudios realizados por Padykula y Tansey (85) en útero de rata durante el embarazo, mostraron que del día 16 de la gestación al término de la misma se observan en el estroma endometrial, así como en el epitelio luminal monocitos y heterófilos. Los monocitos miométrales se observan en conglomerados paravasculares entre los tabiques musculares. Además, se observa una pequeña población de linfocitos, así como de eosinófilos los cuales se presentan como una respuesta al ascenso de los niveles de estrógenos en sangre periférica.

Una característica importante del estroma uterino preparto es la presencia de macrófagos de manera dispersa y la observación de numerosos monocitos. Los monocitos preparto son observados en sitios que posteriormente serán ocupados por los macrófagos, esto sugiere una preparación celular para la involución uterina antes del nacimiento. De hecho, los niveles sanguíneos de progesterona en la rata, alcanzan un máximo al día 14 del embarazo. Posteriormente estos niveles disminuyen ligeramente y se observa una caída brusca a partir del día 19 al término (102).

Al nacimiento, el infiltrado del estroma endometrial es semejante al -

de los últimos días de embarazo. A las 24 horas posparto los heterófilos son abundantes, así como los macrófagos, los monocitos persisten y los haces de colágena se observan intactos. A las 48 horas existen signos que reflejan claramente la regresión estromal: 1) desorganización histológica de los haces de colágena, 2) abundantes macrófagos estromales, 3) los linfocitos se han vuelto numerosos y los monocitos persisten, así como los heterófilos que después de este día empiezan a disminuir. Al tercer día la característica más sobresaliente es la disolución de los haces de colágena a excepción de la que rodea las glándulas. Al cuarto día persisten los macrófagos, linfocitos, heterófilos y eosinófilos, pero la regresión aún no es completa. De acuerdo a Lobel y Deane (85) el aspecto celular de la regresión persiste por dos semanas, lo que explicaría el incremento observado en la concentración de ADN durante el posparto (Tabla VI).

Por estudios morfométricos realizados en miometrio (72), se ha observado que en el útero humano normal las células musculares son de aproximadamente 0.25 mm de longitud y que durante el embarazo incrementan en número y en tamaño logrando alcanzar una longitud de 5 mm al final de la gestación. Se ha mencionado que esta hipertrofia es acompañada de un ligero incremento en las proteínas no colagénicas, de tal forma que se mantiene la relación parénquima/estroma presente en el útero normal (76). De hecho, cuando nuestros datos fueron expresados como una relación colágena/ADN (estroma/parénquima) se observó un valor constante a lo largo del embarazo (Tabla VII). Sin embargo, haciendo un análisis de la zona de implante, se observa una ma-

yor disminución en la concentración de colágena y ADN a partir del día 12 del embarazo. Lo anterior permite que la relación de estos dos parámetros permanezca constante. Cuando la relación estroma/parénquima se expresó en términos de prolina total/ADN, el valor de la relación aumenta al final del embarazo (datos no mostrados), lo que sugiere un incremento real en las proteínas no colagénicas. Después del parto la relación colágena/ADN para las tres zonas, de un valor inicial elevado (con respecto al normal) disminuye debido principalmente a la degradación de colágena y a la afluencia celular característica del posparto.

El conocimiento actual acerca de los mecanismos de biosíntesis y procesamiento de los diferentes tipos de colágena ha sido derivado en su mayoría de estudios realizados "in vitro". Gran parte de estos estudios han utilizado sistemas de cultivos celulares o explantes de tejido, para examinar aspectos específicos del metabolismo de la colágena. La cuantificación de la biosíntesis de esta proteína también ha sido estudiada utilizando estos sistemas para diferentes tejidos y tipos celulares y en su mayoría han involucrado la utilización de aminoácidos radiactivos principalmente prolina. La manera de cuantificar la colágena sintetizada ha sido mediante la utilización de colagenasa bacteriana, digestión con pepsina o de terminación de la relación prolina/hidroxiprolina radiactivas. En este trabajo la determinación del porcentaje de síntesis de colágena se realizó por la digestión con pepsina, después de la incubación de los tejidos con proli

na radiactiva y se fundamentó en:

- a) La colágena nativa es resistente a la digestión con pepsina, hecho que nos permite descartar cadenas alfa o no ensambladas en forma de triple hélice, cadenas incompletas productos de biosíntesis no terminada o productos de degradación.
- b) Se ha mencionado que la colágena tipo IV es sensible a la acción de la pepsina, dato que no podría ser ignorado si se tra bajara con un tejido rico en membranas basales, como sería el riñón. Por lo que en nuestro estudio, la utilización de pepsi na nos conserva las colágenas intersticiales.

La disminución en el porcentaje de la biosíntesis de colágena ob servada durante la primera mitad del embarazo para la zona de implante -- (ver Tabla X y figura 6), está de acuerdo con los datos obtenidos de dismi nución en la concentración de colágena por gramo de tejido seco. El incremento en la relación proteínas totales/colágena pudiera explicarse por: una disminución en la velocidad de síntesis para colágena, un incremento en la biosíntesis de proteínas no colágenicas o alternativamente a una degrada - ción intracelular de la colágena recién sintetizada. Esta tercera conside - ración podría aplicarse únicamente para la segunda mitad del embarazo, ya que en ésta se observó una recuperación en el porcentaje de biosíntesis de colágena que alcanzó niveles normales al día 21. Sin embargo la concentra - ción de colágena en la zona de implante disminuyó de manera constante du - rante todo el embarazo. Se ha observado que en explantes de parénquima pul

monar de conejo, del 20 al 40% de las cadenas α de la colágena recién sintetizada, son destruidas intracelularmente pocos minutos después de su síntesis. Posiblemente la degradación de colágena recién sintetizada es un proceso normal, independientemente de la actividad de colagenasa o fagocitosis, por medio del cual el tejido modula la cantidad y/o calidad de la colágena que es secretada por una célula (103).

El comportamiento observado en los porcentajes de biosíntesis de colágena para las tres zonas estudiadas podría explicarse por cambios en las actividades hormonales uterinas, ya que durante el embarazo existe una disminución gradual de estrógenos que va acoplada a un incremento en los niveles de progesterona. Al final del embarazo los estrógenos aumentan en la circulación después de un período de baja actividad y los niveles de progesterona disminuyen a niveles normales.

Se ha observado que el estradiol estimula la acumulación de la colágena en úteros de ratas inmaduras y que los úteros de ratas ovariectomizadas presentan pérdida de colágena. Si las ratas son ovariectomizadas en el momento del parto, se observa una hiperinvolución y una excesiva pérdida de colágena. Estos resultados sugieren que el estradiol estimula la síntesis de colágena y disminuye la degradación (73). De hecho, se ha demostrado que explantes de úteros de ratas ovariectomizadas presentan disminución en la biosíntesis de colágena, así como menor actividad de prolil hidroxilasa; estos parámetros retornan a niveles normales si se trata a las ratas con estradiol (73). Además del posible efecto del estradiol sobre la bio -

síntesis de colágena durante el embarazo, (disminución en la primera mitad e incremento en la segunda), cabe mencionar que esta acción del estradiol va aunada a una inhibición de la actividad colagenoifítica por los niveles de progesterona. Se ha reportado que los macrófagos peritoneales de cobayas no embarazadas producen colagenasa después de ser estimulados con una endotoxina y que aquellos obtenidos de animales embarazados no responden al estímulo. Por otra parte, la inyección de estrógenos y progesterona a animales no embarazados en dosis iguales a las que se presentan durante el embarazo, previa a la obtención de los macrófagos, inhibe la estimulación de la producción de colagenasa "in vitro". Adicionalmente la progesterona también inhibe directamente la producción de colagenasa de macrófagos "in vitro" (86).

El porcentaje de biosíntesis durante el posparto aumentó en la zona de implante los días 2, 3 y 5. Relacionando estos datos con el hecho de que esta zona es la que mayores cambios presentó durante el embarazo en lo que respecta a las proporciones de colágena/proteínas totales, posiblemente es la que después del parto sufre mayor remodelación. Esto implicaría una actividad colagenoifítica mayor para esta zona. Por otra parte, la recuperación de los niveles de estrógenos después del parto podría influir en el incremento de la biosíntesis de colágena observado.

El descubrimiento de la colágena tipo II en cartilago inició el establecimiento de toda una familia de proteínas. En la actualidad se sabe que un mismo tejido puede presentar distintos tipos de colágena y que cada

uno de estos tipos se ha asociado a una propiedad determinada para la funcionalidad tisular. Así ya mencionamos, que la colágena tipo I está asociada con tejidos que requieren alta fuerza tensil, la tipo III con aquellos que requieren distensibilidad y la colágena tipo II con tejidos con propiedades resilientes y sometidas a fricciones. Existen cambios en los distintos tipos de colágena durante el desarrollo y bajo varias condiciones patológicas, por lo que recientemente ha sido de interés determinar las proporciones relativas de las colágenas presentes en un tejido. Con este objeto se han desarrollado distintos métodos tales como: precipitación diferencial con sales (NaCl , NH_4SO_4), cromatografía de intercambio iónico y análisis de los péptidos generados de las diferentes cadenas alfa por reacción con bromuro de cianógeno. Todos estos métodos requieren una considerable cantidad de tejido, mientras que en la práctica se trabaja con cantidades limitadas del mismo, por lo que se hace necesario el desarrollo de técnicas que requieran cantidades de tejidos equivalentes a las obtenidas por biopsias (100 a 200 mg).

Por otra parte las técnicas arriba mencionadas han utilizado en combinación, la extracción de la colágena del tejido con pepsina a bajas temperaturas. Sin embargo la pepsina solo solubiliza una pequeña fracción del total de la colágena presente en un tejido. Esta metodología podría ser aceptable en tejidos como piel donde se ha reportado que se solubiliza con pepsina más del 70% de la colágena total (104), pero en tejidos como pulmón se sabe que se solubiliza menos del 35% de la colágena (105). Con el obje-

to de eliminar este problema se han desarrollado métodos en los que se ha digerido al tejido total o extracto crudo con bromuro de cianógeno -- (BrCN) en ácido fórmico, el cual solubiliza una mayor cantidad de colágena (105). Sin embargo, con este procedimiento se obtiene una elevada proporción de contaminantes, lo que hace necesario el utilizar métodos cromatográficos con el fin de eliminarlos.

El método utilizado en este trabajo incluyó la homogeneización del tejido en condiciones ácidas (extracto crudo) el cual fue pepsinizado y dializado, con el objeto de eliminar los productos de degradación y posteriormente liofilizado. El material liofilizado fue resuspendido en buffer de corrida previo a su aplicación en geles de poliacrilamida y en estas condiciones se solubilizó aproximadamente el 90% de la muestra. -- Posteriormente los geles fueron teñidos con Azul Brillante de Coomassie R-250 y analizados por densitometría.

La cuantificación e identificación de los distintos tipos de colágena por análisis densitométrico utilizando Azul Brillante de Coomassie ha sido reportada por varios investigadores (104, 105, 106, 107). Este colorante posee una mayor sensibilidad comparado con otros como: negro de amido, verde rápido o azul brillante de procion RS (108). La principal ventaja del azul de Coomassie R-250 fue la relación lineal que se observó entre la concentración de proteínas (5 a 30 μg de colágena) y el valor del área determinada bajo la curva.

Hayashi y col. (109) reportaron diferencias tintoriales con Azul

de Coomasie entre las cadenas $\alpha 1$ (I) y $\alpha 2$ de colágena tipo I en un sistema amortiguador de Tris-Urea 3.6 M, estas diferencias no se observaron -- cuando se utilizó un sistema amortiguador de fosfatos. En el presente -- trabajo la relación $\alpha 1/\alpha 2$ fue de $2.0 \pm (0.02)$ en un intervalo de concen-- tración de 5 a 30 μg de colágena. Un problema que ha sido común en varios grupos que utilizan azul de coomasie para tefir geles con una misma prote-- fina es el obtener variaciones en la intensidad del tefido. Este problema-- se disminuyó considerablemente utilizando exactamente el mismo método de-- tefido y destefido para todos los geles. Además, en cada gel se incluye-- ron estándares de colágena tipo I y se aseguró que la relación $\alpha 1/\alpha 2$ fue-- ra cercana a 2.0.

La presencia de colágena tipo I y Tipo III en útero humano fue -- descrito por Kao y col. (89), estos investigadores encontraron que la co-- lágena tipo III constituía un 20% y la tipo I un 80% de la colágena total extraída con pepsina. Sin embargo, la colágena solubilizada representaba-- el 50% de la colágena total presente en el tejido. En este estudio se in-- cluyó aproximadamente el 90% de la colágena tisular para la determinación de las proporciones relativas de estas protefinas en el útero normal. El - material que migró a nivel de las alfas constituyó el 70% siendo la pro-- porción para colágena tipo I de 62.85% (± 3.43) y para tipo III de 25.59% (± 4.05). El 11.25% (± 2.75) restante correspondió a la presencia de un - material colagénico que comigra con $\alpha 1$ (I) y que podría ser la forma tri-- mérica de $\alpha 1$ (I), la cual fue inicialmente descrita en cultivos de condro-- citos tratados con 5-bromo-2^o deoxiuridina (23) y algunos otros cultivos-- celulares. Aunque inicialmente se sugirió que la forma trimérica de $\alpha 1$ (I)

podiera ser el resultado de errores en el ensamble de las cadenas polipeptídicas de colágena debido a las condiciones del cultivo, actualmente se ha demostrado que esta forma existe en tejidos adultos normales (24).

Por otra parte, la disminución observada en los componentes γ y β así como la presencia casi exclusiva de cadenas α sin cambio en las proporciones relativas de las colágenas I y III, sugiere que la colágena uterina durante el embarazo es predominantemente colágena joven. Una disminución en la formación de enlaces covalentes intra e intermoleculares podría deberse a una disminución en la actividad de la enzima lisil oxidasa o bien a una interacción u organización diferente de la colágena con otros componentes matriciales. Es probable que los cambios observados en el contenido y proporciones relativas de las proteínas matriciales pudieran explicar el cambio en las propiedades de distensibilidad de los tejidos uterinos que se observan durante el embarazo.

En base a los resultados obtenidos en el presente trabajo, respecto a una disminución en la concentración de colágena e incremento de la relación Pro/HO-Pro en la zona de implante durante el embarazo, se planteó la posibilidad de que el aumento en el peso y tamaño del útero se debiera a un incremento en proteínas no colagénicas, como glicoproteínas o proteoglicanos. Lo anterior ha sido ya confirmado por Danforth (97) mediante estudios realizados en cérvix uterino humano. Con el objeto de apoyar esta proposición se determinó la concentración y contenido de azúcares en glicoproteínas para las ramas uterinas durante el embarazo y el pos

parto. Como se mencionó en la sección de resultados, existe un incremento en la concentración de azúcares en glicoproteínas al día 18 del embarazo. Recientemente, Starcher y col. (110) estudiaron el recambio de elastina - en el útero de la rata, esta proteína presenta un comportamiento en contenido, semejante al observado para colágena durante el embarazo y el posparto. Existe un incremento de elastina total (300%) durante el embarazo con respecto a valores normales y un dato interesante es que la concentración de elastina expresado en $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tejido seco no muestra cambios durante el embarazo.

Se ha demostrado que distintas clases de proteinglicanos interactan específicamente con diferentes moléculas extracelulares, sugiriendo que juegan un papel determinante en la composición de la arquitectura del espacio extracelular (111). Se ha mencionado también, que estas proteínas limitan el diámetro de las fibras de colágena (107). Debido a su complejidad molecular, amplia distribución y carga neta negativa, lo que les permite interaccionar con varias macromoléculas, pensamos que el incremento observado de azúcares en el tejido de implante podría corresponder a proteínglicanos, ya que la técnica utilizada determina ácidos urónicos, componente estructural del disacárido repetitivo presente en los glicosaminoglicanos. Sin embargo, es necesario realizar estudios más específicos para identificar a las glicoproteínas o proteinglicanos presentes en el tejido uterino, así como su variación y recambio durante el embarazo y el parto.

IX. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en las determinaciones de peso y contenido de colágena durante el embarazo y el posparto fueron semejantes a los previamente reportados. La concentración de colágena en la zona de implante mostró un descenso que progresó a lo largo del embarazo (de un valor normal de 245.35 ± 9.10 mg de colágena/gts a 143.88 ± 44.73 al día 21). La zona de explante permaneció constante hasta el día 15, para posteriormente disminuir al día 18 (206.73 ± 16.23). La vagina mostró un comportamiento bimodal, de su valor normal (378 ± 18.88) ascendió al valor más alto el día nueve (463.75 ± 13.55). Después de esta fecha disminuyó y presentó un valor mínimo al día 18 (275.38 ± 21.49). Después del parto la concentración de colágena uterina ascendió y alcanzó valores normales.

La relación de proteínas totales/colágena aumentó en la zona de implante de $1.96 \pm (0.04)$ a $3.23 \pm (0.19)$. El incremento de esta relación y la disminución en la concentración de colágena en esta zona, que es predominante durante el embarazo, apoya la idea inicial de que el peso uterino se incrementaba debido a variaciones en otras proteínas matriciales. Los estudios realizados por Danforth en cérvix uterino humano, demostraron que poco antes del parto existe un incremento en la concentración de los proteinglicanos que le permiten a esta estructura ser

sumamente laxa y facilitar la salida del producto. En un intento preliminar por identificar otras posibles proteínas responsables del incremento en el peso del tejido uterino, se determinó el contenido y concentración de glicoproteínas que alcanzó un valor máximo al día 18 del embarazo de un valor normal de 7.14 (\pm 0.44) a 13.97 (\pm 1.11) y posteriormente disminuyó a valores normales después del parto. Aún cuando la técnica utilizada no es específica para glicosaminoglicanos, si determina ácidos urónicos, lo que sugiere la participación de los glicosaminoglicanos en el aumento del tamaño uterino.

La concentración de ADN disminuyó en la zona de implante a partir del día nueve del embarazo, como consecuencia del incremento observado en la matriz extracelular. Después del parto la concentración de ADN aumentó y rebasó valores normales, debido principalmente a la afluencia de células características de la respuesta inflamatoria, dicho evento ha sido reportado por otros autores (85).

La capacidad biosintética para colágena que fue determinada en explantes de tejido, mostró una disminución en el porcentaje de síntesis durante el embarazo con un valor mínimo al día 15. Dicha disminución correspondió al descenso observado en la concentración de colágena durante esta etapa. Sin embargo, después del día 15 el porcentaje de biosíntesis de colágena se incrementó y alcanzó niveles normales. Si la concentración de colágena en el tejido uterino disminuye durante todo el embarazo y el porcentaje de síntesis tiende a recuperarse después del día 15,

esta disparidad solo podrfa explicarse con la intervenci3n de un proceso degradativo especifico para col3gena al final del embarazo. Este proceso podrfa corresponder a la degradaci3n intracelular de col3gena reci3n sin tetizada que ha sido descrita por Bienkowski (103).

La utilizaci3n del an3lisis densitom3trico de geles de poliacrilamida teñidos con Azul de Coomasie, mostr3 ser confiable y reproducible para preparaciones de col3gena tipo I. Esta t3cnica se utiliz3 para determinar las proporciones relativas de las col3genas tipo I y tipo III durante el embarazo y el posparto en las ramas uterinas. La zona de implante mostr3 que la proporci3n de las col3genas I y III permanece constante durante el embarazo: tipo I ($79.89 \pm 4.29\%$) y tipo III (21.17 ± 3.43) y que durante el posparto las proporciones relativas de estas col3genas permanecieron sin cambio. La zona de explante tampoco mostr3 cambios en las proporciones de col3genas I y III durante el embarazo y el posparto.

Los componentes β y γ disminuyeron durante el embarazo en las dos zonas estudiadas, en la zona de implante la disminuci3n se observ3 a partir del dfa nueve y en la de explante desde el dfa 15. Lo anterior sugiere la presencia de col3gena joven en estos tejidos, debido posiblemente a una disminuci3n de la lisil oxidasa o al aumento de otras protefnas matriciales que al interaccionar con la col3gena limitarfan el di3metro de las fibras, como ha sido sugerido por otros autores (107).

Otros aspectos que son relevantes para este proyecto y que no se abordaron durante el presente estudio, están relacionados con la regulación y/o el control de la expresión de los genes que codifican para las distintas proteínas que componen la matriz extracelular del tejido conjuntivo del útero. Para obtener un mejor conocimiento de estos procesos regulatorios, consideramos que la utilización de técnicas de Biología Molecular, así como de ADN recombinante constituirán un enfoque más adecuado.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Goldberg, B. y Rabinovitch, M. Connective Tissue. En: Histology (Weiss L. and Greep R.O. Eds.) Mc Graw-Hill, New York, pp. 145-178, 1977.
- 2.- Mecham, R.P. Elastin Biosynthesis: A Look at the Current Scene. Conn. Tiss. Res. 8: 155-160, 1981.
- 3.- Sandberg, L.B., Soskel, M.T. y Leslie, J.G. Elastin Structure, Biosynthesis, and Relation to Disease States. N. Engl. J. Med. 304: 556-578, 1981.
- 4.- Rosenberg, L., Margolis, R., Wolfenstein-Todel, C., Pal, S. y Strider, W. Organization of Extracellular Matrix in Bovine Articular Cartilages. En: Extracellular Matrix Influences on Gene Expression (Slavkin, H.C. and Greulich, R.C. Eds.) Academic Press, New York, pp. 415-421, 1975.
- 5.- Vaheri, A. y Alitalo, K. Pericellular Matrix Glycoproteins in Cell Differentiation and in Malignant Transformation. En: Cellular Controls in Differentiation (Lloyd, C.W. and Ress, D.A. Eds.) Academic Press, New York, pp. 11-28, 1981.
- 6.- Woodhead-Galloway, J. Collagen: The Anatomy of a Protein (Arnold, E. Ed.) 1980.
- 7.- Trelstad, R.L. La Colágena. Mundo Científico 1: 284-294, 1982.
- 8.- Prockop, D.J., Kivirikko, K.I., Tuderman L. y Guzmán, N.A, The Biosynthesis of Collagen and its Disorders. N. Engl. J. Med. 301: 13-23, 1979.

- 9.- Kuhn, K. Relationship Between Amino Acid Sequence and Higher Structures of Collagen; *Conn. Tiss. Res.* 10: 5-10, 1982.
- 10.- Trus, J. y Piez, K.A. Molecular Packing of Collagen: Three-dimensional Analysis of Electrostatic Interactions. *J. Mol. Biol.* 108: 705-732, 1976.
- 11.- Hulmes, D.J.S., Miller, A., Parry, D.A.D., Piez, K. y Woodhead-Galloway, J. Analysis of the Primary Structure of Collagen for the Origins of Molecular Packing. *J. Mol. Biol.* 79: 137-148, 1973.
- 12.- White, S.W., Hulmes, J.J.S., Miller, A. et al. Collagen Mineral Axial Relationship in Calcified Turkey Leg Tendon by X-ray and Neutron Diffraction. *Nature* 266: 421-425, 1977.
- 13.- Fessler, J.H. y Fessler, L.I. Biosynthesis of Procollagen. *Ann. Rev. Biochem.* 47: 129-162, 1978.
- 14.- Bornstein, P. Structurally Distinct Collagen Types. *Ann. Rev. Biochem.* 49: 957-1003, 1980.
- 15.- Solomon, E. The Collagen Gene Family. *Nature* 286: 656-657, 1980.
- 16.- Miller, E.J. Isolation and Characterization of a Collagen from Chick Cartilage Containing Three Identical α Chains *Biochemistry* 10: 1652-1659, 1971.
- 17.- Linsermayer, T.F., Smith, G.N. Jr. y Hay, E.D. Synthesis of Two Collagen Types by Embryonic Chick Corneal Epithelium in Vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74: 39-43, 1977.

- 18.- Chung, E., Rhodes, R.K. y Miller, E.J. Isolation of Three Collagenous Components of Probable Basement Membrane Origin from Several Tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71: 1164-1167, 1976.
- 19.- Brown, R.A., Shuttleworth, C.A. y Weiss, J.B. Three New α Chains of Collagen from a Nonbasement Membrane Source. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80: 866-872, 1978.
- 20.- Rhodes, R. y Miller, E.J. Physicochemical Characterization and Molecular Organization of the Collagen A and B Chains. *Biochemistry* 17: 3442-3448, 1978.
- 21.- Sage, H. y Bornstein, P. Characterization of a Novel Collagen Chain in Human Placenta and its Relation to AB Collagen. *Biochemistry* 18: 3815-3222, 1979.
- 22.- Weiss, J.B. y Ayad, S. An Introduction to Collagen. En: *Collagen in Health and Disease*. (Jayson, M.I.V. y Weiss, J., Eds,) Churchill and Livingstone, Edimburgo, Inglaterra, pp. 1-14, 1982.
- 23.- Mayne, R., Vail, M.S., Mayne, P.M. and Miller, E.J. Changes in Type of Collagen Synthesized as Clones of Chick Chondrocytes Grow and Eventually Lose Division Capacity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73: 1674-1678, 1976.
- 24.- Uitto, J. Collagen Polymorphism: Isolation and Partial Characterization of $\alpha 1(I)$ -Trimer Molecules in Normal Human Skin. *Arch. Biochem. Biophys.* 192: 371-379, 1979.
- 25.- Moro, L. y Smith, B.D. Identification of Collagen $\alpha 1(I)$ Trimer and Normal Type I Collagen in a Polyoma Virus-Induced Mouse Tumor. *Arch. Biochem. Biophys.* 182: 33-41, 1977.

- 26.- Tolstoshev, P., Ilaber, R. y Crystal, R.G. Procollagen $\alpha 2$ mRNA is Significantly Different from Procollagen $\alpha 1(I)$ mRNA in Size or Secondary Structure. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 87: 818-826, 1979.
- 27.- Becker, U., Timpl, R., Helle, O. y Prockop, D.J. NH_2 -Terminal Extensions on Skin Collagen from Sheep with a Genetic Defect in Conversion of Procollagen into Collagen. *Biochemistry* 15: 2853-2862, 1976.
- 28.- Olsen, B.R., Guzmán, N.A., Engel, C., Condit, C. y Dese, S. Purification and Characterization of a Peptide from the Carboxiterminal Region of Chick Tendon Procollagen Type I. *Biochemistry* 16: 3030-3036, 1977.
- 29.- Sundar Raj, C.V., Church, R.L., Klobutcher, L.A. y Ruddle, F.H. Genetics of the Connective Tissue Proteins: Assignment of the Gene from Human Type I Procollagen to Chromosome 17 by Analysis of Cell Hybrids and Microcell Hybrids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74: 4444-4448, 1977.
- 30.- Sykes, B. y Solomon, E. Assignment of a Type I Collagen Structural Gene to Human Chromosome 7. *Nature* 272: 548-549, 1978.
- 31.- Shapiro, J.R. y Rowe, D.W. Collagen Genes and Bittle Bones. *Ann. Intern. Med.* 99: 700-704, 1983.
- 32.- Wozney, J., Hanahan, D., Tate, V., Boedtker, H. y Doty, P. Structure of the Pro $\alpha 2(I)$ Collagen Gene. *Nature* 294: 129-135, 1981.
- 33.- Ohkubo, H., Vogeli, G., Mudryj, M., Avvedimento, E., Sullivan, M., Pastan, I. y Crombrughe, B. Isolation and Characterization of Overlapping Genome Clones Covering the Chicken $\alpha 2(I)$ Collagen Gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77: 7059-7063, 1980.

- 34.- Schafer, M., Boyd, C., Tolstoshev, P. y Crystal, R. Structural Organization of the Pro $\alpha 2$ Collagen Gene: Evaluation by R Loop Mapping. *Nucleic Acids Res.* 8: 2241-2253, 1980.
- 35.- Eyre, D.R. Collagen: Molecular Diversity in the Body's Proteins Scaffold. *Science* 207: 1315-1322, 1980.
- 36.- Barsh, G.S., David, K.E. y Byers, P.M.H. Type I Osteogenesis Imperfecta: A Nonfunctional Allele for Pro Alpha-1(I) Chains of Type I Procollagen. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 79: 3838-3842, 1982.
- 37.- Nicholls, A.C. y Pope, F.M. An Abnormal Collagen α Chain Containing Cysteine in Autosomal Dominant Osteogenesis Imperfecta. *Brit. Med. J.* 288: 112-113, 1984.
- 38.- Prockop, D.J., Kivirikko, K.I., Tuderman, L. y Guzmán, N.A. The Biosynthesis of Collagen and its Disorders (Second Part) *N. Engl. J. Med.* 301: 77-85, 1979.
- 39.- Breitreutz, D., Díaz de León, L., Paglia, L., Zeichner, M. Wilczek, J. y Stern, R. The Synthesis of Presumptive Procollagen Ribonucleic Acid in the Calvaria of Developing Chick Embryo. *Biochim. Biophys. Acta* 517: 349-359, 1978.
- 40.- Diegelmann, R.F. y Peterkofsky, B. Collagen Biosynthesis During Connective Tissue Development in Chick Embryo. *Dev. Biol.* 28: 443-453, 1972.
- 41.- Krieg, T., Horlein, D. Wiestner, M. y Muller, P.K. Aminoterminal Extension Peptides from Type I Procollagen Normalize Excessive Collagen Synthesis of Scleroderma Fibroblasts. *Arch. Dermatol. Res.* 263: 171-180, 1978.

- 42.- Paglia, L., Wilczek, J., Díaz de León, L., Martin, G.R., Horlein, D. y Muller, P. Inhibition of Procollagen Cell-Free Synthesis by Amino-terminal Extension Peptides. *Biochemistry* 18: 5030-5034, 1979.
- 43.- Paglia, L.M., Wiestner, M., Duchene, M., Quелlette, L.A., Horlein, D., Martin, G.R. y Muller, P.K. Effects of Procollagen Peptides on the Translation of Type II Collagen Messenger Ribonucleic Acid and Collagen Biosynthesis in Chondrocytes. *Biochemistry* 20: 3523-3527, 1981.
- 44.- Vuust, J., Abildsten, D. y Lund, T. Control of Type I Collagen Synthesis: Evidence for Pretranslation Coordination of Pro $\alpha 1$ (I) and Pro $\alpha 2$ (I) Chain Synthesis in Embryonic Chick Bone. *Conn. Tiss. Res.* 11: 185-191, 1983.
- 45.- Pawlowski, P.J. Differential Effect of Hypertonic Initiation Block on the Synthesis of Collagen Chains by Cultured Chick Embryo Cells. *Biochemistry* 21: 34-38, 1982.
- 46.- Blobel, G. Determinants in Protein Topology. En: *From Gene to Protein* (Russell, T.R., Brew, K., Faber, H. y Schultz, J. Eds.) Academic Press, New York, p.p. 347-360, 1979.
- 47.- Blobel, G. Synthesis and Segregation of Secretory Proteins: The Signal Hypothesis. En: *International Cell Biology 1976-1977*. (Brinkley, B.R. y Porter, K.R., Eds.) The Rockefeller University Press, New York, p.p. 318-325, 1977.
- 48.- Palmiter, R.D., Davidson, J.M., Gagnon, J., Rowe, D.W. y Bornstein, P. NH₂-Terminal Sequence of the Chick Pro $\alpha 1$ (I) Chain Synthesized in the Reticulocyte Lysate System. *J. Biol. Chem.* 254: 1433-1436, 1979.

- 49.- Graves, P.N., Olsen, B.R., Fietzek, P.P., Monson, M.J. y Prockop, D.J. Type I Pre-Procollagen Chains Synthesized in a Messenger RNA Dependent Reticulocyte Lysate. *Fed. Proc.* 38: 620, 1979.
- 50.- Berg, R.A., Kedersha, N.L. y Guzmán, N.A. Purification and Partial Characterization of the two Non-Identical Subunits of Prolyl Hydroxylase. *J. Biol. Chem.* 254: 3111-3118, 1979.
- 51.- Turpeenniemi, T.M., Puistola, V., Anttinen, H. y Kivirikko, K. Affinity Chromatography of Lysyl Hydroxylase on Concanavalin A-Agarose. *Biochim. Biophys. Acta* 483: 215-219, 1977.
- 52.- Minor, R.R. Collagen Metabolism. A Comparison of Diseases of Collagen and Diseases Affecting Collagen. *Am. J. Pathol.* 98: 227-277, 1980.
- 53.- Myllyla, R., Anttinen, H., Risteli, L. et al. Isolation of Collagen Glucosyl-Transferase as a Homogeneous Protein from Chick Embryos. *Biochim. Biophys. Acta.* 480: 113-121, 1977.
- 54.- Duksin, D. y Bornstein, P. Impaired Conversion of Procollagen to Collagen by Fibroblasts and Bone Treated with Tunicamycin, an Inhibitor of Protein Glycosylation. *J. Biol. Chem.* 252: 955-962, 1977.
- 55.- Dehm, P. y Prockop, D.J. Time Lag in the Secretion of Collagen by Matrix-Free Tendon Cells and Inhibition of the Secretory Process by Colchicine and Vinblastine. *Biochim. Biophys. Acta.* 264: 375-382, 1972.
- 56.- Gross, J. y Lapiere, C.M. Collagenolytic Activity in Amphibian Tissues: A Tissue Culture Assay. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 48: 1014-1020, 1962.

- 57.- Reddick, M.E., Bauer, E.A. y Eisen, A.Z. Immunocytochemical Localization of Collagenase in Human Skin and Fibroblasts in Monolayer Culture. *J. Invest. Dermatol.* 62: 361-368, 1974.
- 58.- Montfort, I. y Pérez-Tamayo, R. The Distribution of Collagenase in Normal Rat Tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 23: 910-920, 1975.
- 59.- Montfort, I. y Pérez-Tamayo, R. The Distribution of Collagenase in the Rat Uterus During Post Partum Involution: An Immunohistochemical Study. *Conn. Tiss. Res.* 3: 245-252, 1975.
- 60.- Travis, J. y Salvesen, G.S. Human Plasma Proteinase Inhibitors. *Ann. Rev. Biochem.* 52: 665-709, 1983.
- 61.- Harris, E.D. Jr., Dibona, D.R. y Krane, S.M. Collagenases in Human Synovial Fluid. *J. Clin. Invest.* 48: 2104-2113, 1969.
- 62.- Pérez-Tamayo, R. Pathology of Collagen Degradation. *Am. J. Pathol.* 92: 509-567, 1978.
- 63.- Horowitz, A.L., Hance, A.J. y Crystal, R.G. Granulocyte Collagenase: Selective Digestion of Type I Relative to Type III Collagen. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 74: 897-901, 1977.
- 64.- Liotta, L.A., Abe, S., Robey, P.G. y Martin, G.R. Preferential Digestion of Basement Membrane Collagen by an Enzyme Derived from a Metastatic Murine Tumor. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 76: 2268-2272, 1979.

- 65.- Liotta, L.A., Lanzer, W.L. y Garbisa, S. Identification of Type V. Collagenolytic Enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 98: 184-190, 1981.
- 66.- Harris, E.D. Jr. y Krane, S.M. Collagenases. *New Engl. J. Med.* 291: 557-563, 1974.
- 67.- Wbessner, J.F. A Latent form of Collagenase in the Involuting Rat Uterus and its Activation by a Serine Proteinase. *Biochem. J.* 161: 535-542, 1977.
- 68.- Werb, Z., Burleigh, M.C., Barret, A.J. y Starkey, P.M. The Interaction of α_2 -Macroglobulin with Proteinase. Binding and inhibition of Mammalian Collagenase and Other Metal Proteinases. *Biochem. J.* 139: 359-368, 1974.
- 69.- Pardo, A. y Pérez-Tamayo, R. The Presence of Collagenase in Collagen Preparations *Biochim. Biophys. Acta* 392: 121-130, 1975.
- 70.- Pardo, A., Soto, H., Montfort, I. y Pérez-Tamayo, R. Collagen-Bound Collagenase. *Conn. Tiss. Res.* 7: 253-261, 1980.
- 71.- Simpson, J.W. y Mailman, M.L. Synthesis of a Collagenase Inhibitor by Gingival Fibroblasts in Culture. *Biochim. Biophys. Acta* 673: 279-285, 1981.
- 72.- Blandau, R.J. The Female Reproductive System. En: *Histology* (Weiss, L. y Greep, R.O. Eds.), Mc Graw Hill, New York, p.p. 881-924, 1977.

- 73.- Woessner, J.F. Uterus, Cervix and Ovary. En: Collagen in Health and Disease (Jayson, M.I.V. y Weiss, J. Eds.), Churchill and Livingstone, Edimburgo, Inglaterra, p.p. 506-527, 1982.
- 74.- Rimmer, D.M. Changes in the Collagen of Uterine Cervix of the Mouse During the Oestrus Cycle. *J. Endocr.* 55: 213-214, 1972.
- 75.- Harkness, M.L.R. y Harkness, R.D. The Collagen Content of the Reproductive Tract of the Rat During Pregnancy and Lactation. *J. Physiol.* 123: 492-500, 1954.
- 76.- Montfort, I. y Pérez-Tamayo, R. Studies on Uterine Collagen During Pregnancy and Puerperium. *Lab. Invest.* 10: 1240-1258, 1961.
- 77.- Morrione, T.G. y Seifter, S. Alteration in the Collagen Content of the Human Uterus During Pregnancy and Post-Partum Involution. *J. Exp. Med.* 115: 357-365, 1962.
- 78.- Woessner, J.F. y Brewer, T.H. Formation and Break down of Collagen and Elastin in the Human Uterus During Pregnancy and Post-Partum Involution. *Biochem. J.* 88: 75-82, 1963.
- 79.- Wray, S. Changes in the Weight and Collagen Content of the Mesometrium, Before and After Parturition in the Rat. *J. Physiol.* 322: 11-12, 1981.
- 80.- Jeffrey, J.J. y Gross, J. Collagenase from Rat Uterus Isolation and Partial Characterization. *Biochemistry* 9: 268-273, 1970.

- 81.- Luse, S., y Hutton, R. An Electron Microscopic Study of the Fate of Collagen in the Post-Partum Rat Uterus. *Anat. Rec.* 148: 308, 1964.
- 82.- Parakkal, P.F. Involvement of Macrophages in Collagen Resorption. *J. Cell. Biol.* 41: 345-354, 1969.
- 83.- Jeffrey, J.J., Coffey, R.M. y Eisen, D.Z. Studies on Uterine Collagenase in Tissue Culture II. Effect of Steroid Hormones on Enzyme Production. *Biochim. Biophys. Acta.* 252: 143-150, 1971.
- 84.- Goodall, F.R. Progesterone Retards Post-Partum Involution of the Rabbit Myometrium. *Science* 152: 356-358, 1966.
- 85.- Tansey, T.R. y Padykula, H.A. Cellular Responses to Experimental Inhibition of Collagen Degradation in the Post-Partum Rat Uterus. *Anat. Rec.* 191: 287-309, 1978.
- 86.- Wahl, L.M. Hormonal Regulation of Macrophage Collagenase Activity *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 74: 838-845, 1977.
- 87.- Woessner, J.F. Jr. Collagenase in Uterine Resorption. En: Collagenase in Normal and Pathological Connective Tissues. (Wolley, D.R. y Evanson, J.M. Eds.) John Wiley and Sons Ltd., New York, p.p. 223-240, 1980.
- 88.- Ryan, J.N. y Woessner, J.F. Oestradiol Inhibition of Collagenase Role in Uterine Involution. *Nature* 248: 526-528, 1974.

- 89.- Kao, K.Y.T. y Leslie, J.G. Polymorphism in Human Uterine Collagen
Conn. Tiss. Res. 5 : 127-129, 1977.
- 90.- Woessner, J.F. Jr. The Determination of Hydroxyproline in Tissue
and Protein Samples Containine Small Proportions of this Amino -
Acid. Arch. Biochem. Biophys. 93: 440-456, 1961.
- 91.- Rojkind, M. y González, E. An Improved Method for Determining Spe
cific Radio-Activities of Proline - ^{14}C and Hydroxyproline - ^{14}C
in Collagen and in Noncollagenous Proteins. Anal. Biochem. 57: -
1-7, 1974.
- 92.- Troll, W. and Lindsley, J. A Photometric Method for the Determina
tion of Proline. J. Biol. Chem. 215: 655-660, 1955.
- 93.- Burton, K. Determination of DNA Concentration with Diphenylamine.
En: Methods in Enzymology, Section VII. (Colowick, S.P. y Kaplan,
N.O., Eds.) Academic Press Inc. New York. pp 163-168, 1968.
- 94.- Gross, J. Studies on Formation of Collagen I. Properties and Frag
tation of Neutral Salt Extracts of Normal Guinea Pig Connective
Tissue. J. Exp. Med. 107: 247-263, 1958.
- 95.- Dubois, M., Gilles, A., Hamilton, J.K., Rebers, P. A. y Smith, F.
Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Sustan
ces. Anal. Chem. 28 : 350-356, 1956.
- 96.- Rimmer, D.M. The Effect of Pregnancy on the Collapen of the Uteri
ne Cervix of the Mouse. J. Endocr. 57: 413-418, 1973

- 97.- Danforth, D.N., Veiss, A., Breen, M., Weinstein, H.G., Buckingham, J.C. y Pacita, M. The Effect of Pregnancy and Labor on the Human Cervix: Changes in Collagen, Glycoproteins, and Glycosaminoglycans. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 120: 641-649, 1974.
- 98.- Kleissl, H.P., Van der Rest, M., Naftolin, F., Glorieux, F. H. y De León, A. Collagen Changes in the Human Uterine Cervix at Parturition. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 130: 748-753, 1978.
- 99.- Kitamura, K., Ito, A., Mori, Y. y Hirakawa, S. Changes in the Human Uterine Cervical Collagenase with Special Reference to Cervical Ripening. *Biochem. Med.* 22: 332-338, 1979.
- 100.- Cabrol, D., Breton, M., Berrou, E., Visser, A., Sureau, C. y Picard, J. Variation in the Distribution of Glycosaminoglycans in the Uterine Cervix of Pregnant Women. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. --- Biol.* 10: 281-287, 1980.
- 101.- Kitamura, K., Ito, A., Mori, Y. y Hirakawa, S., Glycosaminoglycans of Uterine Cervix: Heparan Sulphate Increase with Reference to Cervical Ripening. *Biochem. Med.* 23: 159-166, 1980.
- 102.- Egg, D., Zambelis, N. y Loewit, K. Progesterone in Peripheral Plasma and Tissues During Pregnancy in the Rat. *Exp. Path. Bd.* 9: 307-310, 1974.
- 103.- Bienkowski, R.S., Morton, J.C., McDonald, J.A. y Crystal, R.G. Degradation of Newly Synthesized Collagen. *J. Biol. Chem.* 253: 4356-4363, 1978.

- 104.- Sykes, B., Francis, M.J.O. y Smith, R. Altered Relation of two Collagen Types in Osteogenesis Imperfecta. New Engl. J. Med. 296: - 1200-1203, 1977.
- 105.- Reiser, M.K. y Last, J.A. Quantitation of Specific Collagen Types from Lungs of Small Mammals. Anal. Biochem. 104: 87-98, 1980.
- 106.- Laurent, G.J., Cockerill, P., McAnulty, R.J. and Hastings, J.R.B. A Simplified Method for Quantitation of the Relative Amounts of - Type I and type III Collagen in Small Tissue Samples. Anal. Biochem. 113: 301-312, 1981.
- 107.- Tajima, S. y Nagai, Y. Distribution of Macromolecuar Components in Calf Dermal Connective Tissue. Conn. Tiss. Res. 7: 65-71, 1980.
- 108.- Fazekas, S. de St. G., Webster, R.G. y Datyner, A. Two New Staining Procedures for Quantitive Estimation of Proteins on Electrophoretic Strips. Biochim. Biophys. Acta 71: 377-391, 1963.
- 109.- Hayashi, T. y Nagai, Y. Separation of the α Chains of Type I and III Collagens by SDS-polyacrylamide Gel Electrophoresis. J. Biochem. 86: 453-459, 1979.
- 110.- Starcher, B. y Percival, S. Elastin Turnover in the Rat Uterus. Conn. Tiss. Res. 13: 207-215, 1984.
- 111.- Pasquali-Ronchetti, Bressan, G.M., Fornieri, C., Baccarani-Contri, M., Castellani, I. y Volpin, D. Elastin Fiber-Associated Glycosaminglycans in β -Aminopropionitrile-Induced Lathyrism. Exp. Mol. Path. 40: 235-245, 1984.