

1990 - B

CODIGO: 83436832

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



NIVELES DE GLICOSAMINOGLICANOS EN ORINA, SU
CARACTERIZACION QUIMICA Y EL COMPORTAMIENTO
DURANTE EL EMBARAZO

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

LICENCIADO EN BIOLOGIA

P R E S E N T A

CECILIA GARCIA GARCIA

GUADALAJARA, JALISCO. 1992



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Sección
Expediente
Número 0642/91.....

C. SRITA. CECILIA GARCIA GARCIA
P R E S E N T E . -

Manifestamos a usted que con esta fecha ha sido aprobado el tema de Tesis "NIVELES DE GLICOSAMINOGLICANOS EN ORINA, SU CARACTERIZACION QUIMICA Y EL COMPORTAMIENTO DURANTE EL EMBARAZO" para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptato como Director de dicha Tesis al C. QUIM. ARMANDO O. CARRANCO LOPEZ.

A T E N T A M E N T E
"PIENSA Y TRAPAJA"
Guadalajara Jal., 22 de Agosto de 19991.

EL DIRECTOR

M. EN C. CARLOS PEAS ZARATE

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

EL DIRECTOR

M. EN C. MARTIN P. TENA MEZA

- c.c.p.- el Quim. Armando O. Carranco López, Driector de Tesis Pte.-
- c.c.p.- el expediente del alumno.

CBZ/MPTH/cglr.

Al contestar este oficio cite fecha y número

Guadalajara, Jal., Febrero 6, 1992.

M. en C. Carlos Beas Zárate
Director de la Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Guadalajara.

Por éste conducto comunico a usted que la Srita. CECILIA GARCIA GARCIA, pasante de la Lic. en Biología, ha concluido satisfactoriamente el trabajo de Tesis titulado:
"NIVELES DE GLICOSAMINOGLICANOS EN ORINA, SU CARACTERIZACION QUIMICA Y EL COMPORTAMIENTO DURANTE EL EMBARAZO". Realizado en la Unidad de Investigación Biomédica de Occidente IMSS.

Así mismo le informo que he revisado el manuscrito de dicha Tesis y considero que cumple con los requisitos establecidos.

Sin mas por el momento, aprovecho para enviarle un cordial saludo.

Atentamente,



QUIM. ARMANDO CARRANCO LOPEZ
DIRECTOR DE TESIS

PARA ALGUIEN ESPECIAL

"Me parece verlo y oirlo todavía
preparandome para ésta vida
por él aprendí, por él crecí
por él existe la verdad que hoy llevo en mí

El grabó en mí nobleza y humildad
él siempre creyó en mí
y su confianza me hizo fuerte
para estar parada hoy aquí

El me enseñó a respetar y amar
él supo darme libertad
y se que se sentirá orgulloso
de seguir viviendo dentro de mí."

GRACIAS PAPA.

A MARTHA, mi madre por todo su amor y fe en el trabajo, por su cariño comprensión y paciencia.

A mis Hermanos: MARTHA, CARLOS, JAVIER y LOURDES, por su apoyo incondicional en todo momento.

A ISMAEL, por apoyarme en todas mis decisiones, por motivarme siempre a superarme y por su amor.

A la Universidad de Guadalajara, la Facultad de Ciencias Biológicas y a mis Maestros por darme su tiempo y dedicación para lograr mi realización como profesionista.

A la UNIDAD DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS
DE OCCIDENTE, I.M.S.S., por su apoyo y
colaboración en la realización de mi
trabajo.

Muy especialmente al Director de mi tesis,
al C. QUIM. ARMANDO O. CARRANCO LOPEZ por
todo lo que me ha enseñado, por darme su
amistad, su apoyo y sobre todo por creer
en mí.

NIVELES DE GLUCOSAMINGLICANOS EN ORINA, SU CARACTERIZACION
QUIMICA Y EL COMPORTAMIENTO DURANTE EL EMBARAZO.

AUTOR: CECILIA GARCIA GARCIA.

DIVISION DE BIOLOGIA DEL DESARROLLO
UNIDAD DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS DE OCCIDENTE
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

DIRECTOR: QUIM. ARMANDO O. CARRANCO LOPEZ
JEFE DEL LAB. DE ESTEROIDES.

INDICE.

1.	INTRODUCCION.	10
2.	ANTECEDENTES.	15
3.	HIPOTESIS.	22
4.	OBJETIVOS.	24
5.	MATERIAL Y METODOS.	26
6.	RESULTADOS.	47
7.	DISCUSION.	51
8.	CONCLUSIONES.	55
9.	FIGURAS.	58
10.	TABLAS.	67
11.	BIBLIOGRAFIA.	72

INTRODUCCION.

Una de las áreas de investigación que han tomado gran importancia en el campo de la biología del desarrollo, lo constituye el estudio de los factores que condicionan la morfogénesis de los sistemas biológicos, dentro de los cuales, las matrices extracelulares tienen un papel preponderante, ya que la serie de procesos celulares que ocurren en condiciones normales, se ven moduladas por las condiciones del microambiente extracelular.

La cualidad más importante de las matrices extracelulares, es que las macromoléculas que las constituyen, presentan la capacidad de asociarse entre sí formando grandes agregados.

Las diferencias cuantitativas y cualitativas, de sus componentes, le confieren diferentes propiedades físicas, fisicoquímicas, bioquímicas y biológicas al medio extracelular (1,2), y cualquier cambio en estos parámetros puede alterar dramáticamente las propiedades funcionales de un tejido (3,4).

Las macromoléculas que constituyen las matrices se caracterizan por su escasa variedad, y son principalmente glicosaminoglicanos (5,6), proteoglicanos y proteínas (1,2).

Los glicosaminoglicanos (GAGs) o también llamados mucopolisacáridos, son polímeros lineales aniónicos que están constituidos por secuencias repetitivas de disacáridos, formados por un ácido urónico y una hexosamina.

Se han encontrado varios tipos de GAGs, los cuales se distinguen

por: El tipo de ácido urónico y hexosamina que los forman; El tipo de enlace entre estos residuos, la localización y el número de grupos sulfato que presenten en su molécula.

CARACTERISTICAS GENERALES DE LOS GLICOSAMINOGLICANOS.

GAGs	Ac. Urónico	Hexosamina
SIMPLES		
Ac. Hialurónico	D-glucurónico	N-acetilglucosamina
COMPLEJOS (Sulfatados).		
Condroitín Sulfato	D-glucurónico	N-acetilgalactosamina
Dermatán Sulfato	L-idurónico o D-glucurónico	N-acetilgalactosamina
Heparán Sulfato	L-idurónico o D-glucurónico	N-acetilglucosamina
Heparina	L-idurónico o D-glucurónico	N-acetilglucosamina
Keratán Sulfato	-----	D-galactosa-N-acetil glucosamina

El ácido Hialurónico es el único de los GAGs que no posee grupos sulfato y el Keratán sulfato a diferencia de los demás no presenta en su molécula ácido urónico (1,7).

En los tejidos los GAGs con excepción del ácido Hialurónico

aparecen como proteoglicanos, que están formados de una o más cadenas de polisacáridos unidas covalentemente a una proteína central que constituye sólo del 5 al 25% del peso de la molécula (1).

Los GAGs se encuentran distribuidos en todo el cuerpo, la piel, córnea, huesos (8), tejido conectivo (9), secreciones de células epiteliales, secreciones mucosas (10), en el líquido folicular y también han sido aislados de la sangre (11), y de orina (12), de cervix uterino, cartilago (13,14), y fibroblastos (5,6).

El contenido y distribución de ácido Hialurónico y de los diferentes proteoglicanos en los tejidos animales sigue un patrón altamente específico, además, guarda una estrecha relación con la etapa del desarrollo y con el estado funcional del tejido (1).

Los GAGs presentes en las matrices extracelulares pueden estar unidos a las superficies celulares como componentes integrales o periféricos de la membrana (15). Estudios realizados en células de Schwann han revelado que proteoglicanos de Heparán sulfato son componentes integrales de las membranas plasmáticas, que están expuestos externamente y que además están anclados al citoesqueleto (16) interactuando posiblemente con los microfilamentos de actina del lado citoplasmático de la membrana y con fibronectina, laminina o fibras de colágeno en el espacio extracelular. Esto indica que pueden interactuar con otros componentes bajo ciertas condiciones fisiológicas, jugando un

papel importante en la organización estructural y función biológica de las matrices (15).

Las interacciones entre los proteoglicanos y colágena tienen gran importancia en la formación y fisiología del tejido conectivo (17), se ha observado por medio de microscopia electrónica que estos proteoglicanos están colocados de manera ordenada a lo largo de las fibras de colágena en una variedad de tejidos incluyendo cartilago, aorta (18) y tendón (19).

En el cervix uterino humano del cual más del 90% lo constituyen fibras de colágena tipo I y III, se han encontrado también ácido Hialurónico, Dermatán sulfato (13), y Heparán sulfato, el cual es localizado más abundantemente en la pared de los vasos sanguíneos cervicales (20).

También se ha visto que la adhesión de glicoproteínas como fibronectina y laminina a la célula, están asociadas con los proteoglicanos de las matrices extracelulares in vivo (21) y en cultivos celulares (15,22,23), ambas glicoproteínas tienen afinidad por los polisacáridos sulfatados (15).

ANTECEDENTES.

Por medio de estudios histoquímicos con colorantes de tipo catiónico se ha demostrado la presencia de GAGs en el moco cervical (24), además se ha observado por medio de

35

autorradiografía utilizando ^{35}S que los GAGs sulfatados presentes en el líquido folicular son producidos por las células de la granulosa (10,25). También los numerosos estudios clínicos y experimentales de varios investigadores han demostrado, que el comportamiento de los GAGs está regulado por hormonas; ya que pueden inhibir o estimular la síntesis de éstas moléculas sobre las superficies celulares y glandulares. Estas reacciones ocurren en todos los tipos de tejidos (26,27,28,29,30) y en menor grado en los tejidos hiperplásicos y malignos (26). La FSH estimula la síntesis y acumulación de ácido Hialurónico y otros proteoglicanos sulfatados en la matrix extracelular del complejo que se forma entre el oocito y el cúmulo de células que lo rodean, aumentando el diámetro de este complejo y participando en la mucificación del mismo (31). También se ha observado que la prostaglandina E_2 incrementa la síntesis de GAGs sulfatados en cultivos de fibroblastos (32).

El ácido Hialurónico ha sido estudiado en un gran número de sistemas de desarrollo, y en todos los casos ha sido aparente que éste, es sintetizado y llega a ser un componente prominente de la matrix extracelular durante estados de proliferación celular y migración, y después tiende a ser removido para la diferenciación celular (33).

Entre las secreciones uterinas existen muchas proteínas y otras sustancias que son sintetizadas en el endometrio por influencia de la progesterona, y que tienen un papel importante en la nutrición del embrión así como su crecimiento y desarrollo (34).

El patrón de fluctuaciones en los mucopolisacáridos uterinos es complejo, sin embargo pueden estar correlacionados los niveles de hormonas circulantes con el contenido de GAGs durante el ciclo estral en los ovinos (34,35,36).

Se ha observado que la secreción de ácido Hialurónico en el endometrio porcino es inducida por la Progesterona. Durante el embarazo los niveles de ácido Hialurónico incrementan progresivamente a medida que aumentan los niveles de Progesterona, y se ha descubierto que están involucrados en la vascularización de la placenta (37,38).

Durante el embarazo el Heparán sulfato es abundante en el ístmus y el estroma del cuerpo uterino, esto se ha relacionado con el gran contenido de vasos sanguíneos y células musculares (39).

Entre los cambios que caracterizan los estados de pre y peri-implantación del embarazo en el útero, son alteraciones en la composición de las estructuras de carbohidratos de las superficies celulares (40), los cuales ocurren bajo condiciones hormonales originando un estado receptivo en el útero, en el cual tiene lugar la implantación del embrión (41).

Esta misma influencia hormonal parece preparar al útero para apoyar otras respuestas fisiológicas que acompañan al embarazo, como son la respuesta decidual en el estroma uterino (42), la cual está asociada con un incremento en la producción de componentes de matrices extracelulares por las células endometriales (43).

El incremento en la síntesis del hialuronato observado durante el embarazo se ha relacionado con esta respuesta del útero, ya que durante ésta el hialuronato incrementa del 20% (en úteros sin respuesta decidual) al 40% (44). También se ha propuesto que éste incremento facilita la retención del fluido uterino característico del estado de implantación (41).

La distribución del ácido hialurónico durante el desarrollo de la placenta (detectada por anticuerpos) está presente rodeando la rápida proliferación citotrofoblástica de las células que migran hacia el útero materno (33).

Además se ha descubierto que junto con el hialuronato otros componentes de matrices extracelulares como fibronectina y laminina apoyan la adhesión del embrión y su crecimiento, facilitando la introducción dentro del tejido estromal (44,45).

En estudios realizados en ovejas se ha observado una relación significativa entre el contenido total de hexosaminas (GAGs) de placentomas y los días de gestación; en los primeros días de

gestación los niveles de hexosaminas fueron similares a los de no embarazo, sin embargo casi al término del embarazo aumentaron 3 veces su concentración. Después de aislar selectivamente los grupos de GAGs, el incremento en el total de hexosaminas fue atribuido específicamente en el ácido Hialurónico (37).

En el humano se ha determinado la composición de los GAGs en placentas jóvenes y maduras, ambas contienen ácido Hialurónico, Condroitín sulfato 6 y 4, Dermatan sulfato y Heparán sulfato, pero en diferentes proporciones (46). Los GAGs sulfatados componen el 56% del total de los GAGs en las placentas jóvenes y el 74% en las placentas maduras a causa del incremento en las concentraciones de Dermatan sulfato y Heparán sulfato, ya que ambas muestran cantidades similares de ácido Hialurónico (37).

Los niveles de GAGs cervicales de humanos han sido comparables con los de las ratas; en el cervix maduro el ácido Hialurónico es 2.5 veces más alto que en los primeros días del embarazo, y el Dermatan sulfato es 2 veces más bajo. Se observa una disminución proporcional durante la maduración cervical de las concentraciones de Dermatan sulfato y Condroitín sulfato coincidiendo con el incremento en los niveles enzimáticos de proteinasas durante el embarazo provocados por la elevación de la relación de Estrógenos/Progesterona (47). Las concentraciones de ácido Hialurónico cervical incrementan del 6% (no embarazo) al 33% al término del embarazo (14,48).

También se ha encontrado que las concentraciones de GAGs sulfatados y de ácido Hialurónico son mucho más bajas en las muestras de cervix de mujeres después del parto, que las obtenidas de mujeres no embarazadas (48).

Los conocimientos adquiridos acerca de la fisiología de los ovarios, particularmente lo que se refiere a la composición del líquido folicular, así como la detección de la ovulación por medio de la determinación urinaria de GAGs (49), han abierto grandes perspectivas para investigar su comportamiento en el organismo femenino y su posible relación con los procesos que se llevan a cabo durante el ciclo menstrual, ciclos anovulatorios con endometrio secretor (50), ovarios poliquísticos (51) y el papel de los GAGs en la formación de los quistes ováricos (52), así como el papel que desempeñan en los cambios del tejido conectivo durante el embarazo.

El embarazo es el período o estado funcional en el que se encuentra la mujer mientras se desarrolla en ella el óvulo fecundado; se extiende desde el acto sexual en que tuvo lugar la fecundación hasta el parto.

Hormonalmente en el embarazo se distinguen dos etapas. Durante los primeros meses el cuerpo amarillo del ovario es el que produce las hormonas necesarias que preparan al endometrio para la implantación y nutrición del embrión y posteriormente a finales del segundo mes aproximadamente, la placenta desempeña un

papel preponderante; ésta, aunque es un órgano transitorio y endocrinológicamente incompleto, es capaz de sintetizar desde estadios muy tempranos de la gestación algunas hormonas como Gonadotropina Coriónica, Estrógenos, Progesteróna y Hormona Lactógeno-placentária (53,54,55).

He aquí el interés de observar el comportamiento de los GAGs urinarios durante el embarazo ya que como hemos mencionado estos polímeros son regulados hormonalmente.

HIPOTESIS.

En base a que la síntesis de GAGs está modulada por hormonas, entre las que sobresalen la FSH, los Estrógenos, la LH y la Progesterona, y tomando en cuenta que durante el embarazo hay gran cantidad de éstas además de otras hormonas, se espera encontrar una modificación significativa en los niveles de GAGs urinarios durante todo el desarrollo del embarazo.

OBJETIVOS.

1. Investigar los niveles urinarios de GAGs durante la evolución del embarazo.
 - 1.1 Comparar las concentraciones de los GAGs de las mujeres con ciclos ovulatorios y las embarazadas.
 - 1.2 Caracterizar en los dos grupos sometidos al estudio, los diferentes Glicosaminoglicanos urinarios por electroforésis.
 - 1.3 Observar el comportamiento de las concentraciones de Glicosaminoglicanos durante el embarazo.

MATERIAL Y METODOS.

El estudio se realizó en muestras de orina, con las que se formaron dos grupos. El grupo I consta de muestras de mujeres con ciclos ovulatorios (24 ciclos menstruales) que fueron adiestradas para tomarse la Temperatura Basal Corporal (TBC) y se registró la longitud de los ciclos (L.C.) así como su edad. La valoración de la ovulación se hizo por la TBC (56), la Determinación de LH y Progesterona por los métodos de RIA (57), y la determinación de GAGs (49). Las muestras se colectaron de la primera orina del día a partir del último día de sangrado hasta el inicio del nuevo ciclo menstrual. El grupo II esta formado por muestras procedentes de donadoras embarazadas, (8 donadoras), las cuales se agruparon por trimestres de acuerdo al estado de desarrollo en que se encontraba su embarazo. Las muestras que fueron sometidas al estudio (280), se recolectaron de la primera orina del día durante todo el embarazo. Todas las muestras de orina fueron centrifugadas a 2500 rpm. y el sobrenadante separado, congelado y almacenado a -20°C sin ningún conservador. Las concentraciones de los GAGs se determinaron de acuerdo a los métodos de Whiteman y Fallstron (58,59). El contenido de GAGs urinario fué determinado por referencia a una curva estándar y los resultados estan expresados en $\mu\text{g/ml}$. para verificar la presencia de grupos aminos y ácidos Hexurónicos.

Se hicieron las determinaciones de Acido Urónico según Bitter y Muir (60) y de Hexosaminas siguiendo el método de Smith (61).

La obtención de Glicosaminoglicanos para su caracterización se realizó basándose en la metodología seguida por Kettelhut (62) y la aplicación posterior de una electroforésis en Poliacetato de Celulosa de acuerdo a Whiteman (58).

Los resultados obtenidos de las concentraciones de GAGs de las muestras de orina, se organizaron de tal forma que se calculó la media y desviación estándar en cada uno de los grupos.

La evaluación de los promedios en los dos grupos estudiados, se llevó a cabo mediante la prueba de "t" no pareada y un análisis de varianza para la evaluación de la concentración de los GAGs en los diferentes trimestres durante el desarrollo del embarazo.

DETERMINACION DE ACIDO URONICO.
(A. U.)

I. EQUIPO.

1. Espectrofotómetro ZEISS Mod. PMQ3.
2. Baño María ajustado a 92° Dubnoff Metabolico Shaking incubator.
3. Vortex Super Mixer.

II. REACTIVOS.

1. Curva estándar de Acido Urónico.

Pesar 0.01 g. de Ac. Glucurónico, disolver y aforar en 10 ml. de agua desionizada. De ésta, tomar los volúmenes de 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 ml. y aforar cada uno a 10 ml. de agua desionizada, para tener una concentración final de 5, 10, 15, 20, y 25 µg/0.1 ml.

2. Solución de Carbazol al 0.1% en Etanol (w/v).

Pesar 0.01 g. de Carbazol, disolver y aforar a 10 ml. con etanol absoluto.

3. Ac. Sulfúrico con Tetraborato de Sodio al 0.025 M.

Pesar 0.53425 g. de Tetraborato de Sodio, disolver y aforarlo en 1000 ml. de Ac. Sulfúrico Q.P.

III. METODO.

Fundamento.

Este método está basado en la formación de un cromóforo del tipo furfural entre el Carbazol y el Ac. Urónico en condiciones ácidas, produciendo un color rosa el cual es proporcional a la concentración del Ac. Urónico.

IV. PROCEDIMIENTO.

	Problema (ml.)	Patrón (ml.)	Blanco (ml.)
Muestra	0.1		
Estandar		0.1	
Agua			0.1
Agua desionizada	0.4	0.4	0.4
Carbazol	0.1	0.1	0.1

Enfriar en hielo 5 min.

Acido Sulfúrico 3 ml. a cada tubo.

Incubar en baño María a 92°C por 20 min.

Enfriar a temperatura ambiente.

Leer en el Espectrofotómetro a 530 nm.

Trazar la curva estándar.

DETERMINACION DE HEXOSAMINAS.
(HEXO)

I. EQUIPO.

1. Espectrofotómetro ZEISS Mod. PMQ3.
2. Baño María ajustado a 37°C y a 110°C. Dobnoff Metabólico Shaking.
3. Vortex Super Mixer.

II. REACTIVOS.

1. Curva estandar de Hexosaminas.

Pesar 0.010 g. de N-Acetil-D-Glucosamina, disolver y aforar en 10 ml. con agua desionizada.

De esta solución tomar los volúmenes de 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, y 2.0 ml. y aforar cada una a 10 ml. con agua desionizada para tener la concentración final de 2, 4, 6, 8 y 10 µg/0.05 ml.

2. Solución de Acido Clorhídrico 0.67 M.

Medir 5.5 ml. de Acido Clorhídrico al 37% con densidad de 1.19 g/ml. y aforar en 100 ml. con agua desionizada.

3. Solución de Nitrito de Sodio al 2.5% (w/v).

Pesar 2.5 g. de Nitrito de Sodio, disolver y aforar a 100 ml. con agua desionizada.

4. Solución de Sulfamato de Amonio al 12.5% (w/v).

Pesar 12.5 g. de Sulfamato de Amonio, disolver y aforar en 100 ml. con agua desionizada.

5. Solución de Clorhidrato de 3-Metil-2-Benzotiazolona (MBTH) al 0.25% (w/v).

Pesar 0.0125 g. de MBTH, disolver y aforar en 5 ml. con agua desionizada.

6. Solución de Cloruro Férrico al 0.5% (w/v).

Pesar 0.415 g. de Cloruro Férrico, disolver y aforar a 50 ml. con agua desionizada.

NOTA: Las soluciones de MBTH y Cloruro Férrico caducan después de 24 hs.

III. METODO

Fundamento.

Este método está basado en que las 2,5 anhídro hexosaminas producidas por la desaminación de las hexosaminas, con Nitrito de Sodio reaccionan con el MBTH en condiciones ligeramente ácidas, produciendo un color azul intenso el cual es proporcional al contenido de Hexosaminas.

IV. PROCEDIMIENTO.

	Problema (ml.)	Patrón (ml.)	Blanco (ml.)
Muestra	0.1		
Estándar		0.1	
Agua			0.1
Ac. Clorhídrico	0.3	0.3	0.3
Incubar a 110°C por 2 hs.			
Enfriar a temperatura ambiente.			
Nitríto de Sodio	0.8	0.8	0.8
Incubar a temperatura ambiente por 15 min.			
Sulfamato de Amonio	0.4	0.4	0.4
Incubar a temperatura ambiente por 5 min.			
MBTH	0.4	0.4	0.4
Incubar a 37 °C por 30 min.			
Cloruro Férrico	0.4	0.4	0.4

Incubar a 37°C por 5 min.

Enfriar a temperatura ambiente.

Leer en el Espectrofotómetro a 650 nm.

Trazar la curva estándar.

EXTRACCION DE GLICOSAMINOGLICANOS
(GAGs)

I. EQUIPO.

1. Centrifuga DAMON Mod. IEC PR-J.
2. Vortex Super Mixer.

II. REACTIVOS.

1. Cloruro de Cetil Piridinium (CPC) al 5% (w/v).

Pesar 5 g. de CPC, disolver y aforar en 100 ml. con agua desionizada.

2. Acetato de Sodio al 0.75% en Etanol (w/v).

Pesar 0.75 g. de Acetato de Sodio, disolver y aforar en 100 ml. de etanol.

3. Eter Etílico Anhidro.

III. METODO.

Fundamento.

Este método se basa en la precipitación de los GAGs con un surfactante catiónico (CPC).

IV. PROCEDIMIENTO.

1. Tomar 4 ml. de muestra de orina.
2. Añadir 1 ml. de CPC agitar e incubar a temperatura ambiente durante 18 hs.
3. Centrifugar a 2000 rpm por 15 minutos.
4. Lavar con 1 ml. de agua desionizada y agitar.
5. Centrifugar a 2000 rpm por 15 minutos.
6. Disolver en 1 ml. de Acetato de Sodio, agitar e incubar a -20°C por 18 hs.
7. Centrifugar a 2000 rpm por 15 minutos.
8. Adicionar Eter Etilico Anhidro, agitar y centrifugar a 2000 rpm por 10 minutos.
9. Secar el precipitado al vacío.
10. Disolver los GAGs en 0.1 ml. de agua desionizada (para electroforesis).

ELECTROFORESIS.

I. EQUIPO.

1. Equipo de electroforésis Beckman DUOSTAT.
2. Membranas de Poliacetato de celulosa de 5.7 x 14.4 cm.
3. Potenciómetro COMPENSATOR E-388.

II. REACTIVOS.

1. Solución amortiguadora de Acetato de Bario 0.1 M.
Pesar 7.6635 g. de Acetato de Bario, disolver y aforar a 300 ml. con agua desionizada. Ajustar el pH a 5.8.
2. Solución amortiguadora de Acetato de Sodio 0.05 M con Cloruro de Magnesio 0.05 M.
Pesar 6.804 g. de Acetato de Sodio, 10.166 g. de Cloruro de Magnesio, disolver y aforar en 1000 ml. con agua desionizada. Ajustar el pH a 5.8.
3. Solución de Azul de Alciano 8 GX al 0.25% (w/v).
Pesar 0.125 g. de Azul de Alciano 8 GX, disolver y aforar en 50 ml. de Amortiguador de Acetato de Sodio 0.05 M.
4. Soluciones estandar de Condroitín sulfato A y C, Dermatán, Heparán y Keratán sulfato, Heparina y Ac. Hialurónico.

Pesar 0.001 g. de cada uno de los estandares y disolverlo en 1 ml. con agua desionizada.

III. METODO.

Fundamento.

Este método se basa en el desplazamiento de las moléculas de GAGs sometidas en un campo eléctrico, através de una membrana de poliacetato de celulosa, aprovechando las propiedades Fisico-Químicas de las diferentes estructuras químicas de los polisacáridos, para lograr una separación de ellos.

IV. PROCEDIMIENTO.

1. Humedecer la membrana en el amortiguador de Acetato de Sodio.
2. Colocar la membrana en la cámara de electroforesis que contiene el Amortiguador de Acetato de Bario.
3. Aplicar 2 μ l. de cada uno de los estándares y 4 μ l de las muestras a determinar.
4. Aplicar una intensidad constante de 10 mA. durante 3 hs. y un voltaje de 0-300 v.
5. Suspender el suministro de corriente y proceder a teñir la membrana con la solución de Azul de Alciano por espacio de 1 hora.
6. Lavar la membrana con una solución que contiene Amortiguador de Acetato de Sodio Etanol 1:1.

DETERMINACION DE GLICOSAMINOGLICANOS
(GAGs)

I. EQUIPO.

1. Espectrofotómetro ZEISS Mod. PMQS.
2. Vortex Super Mixer.
3. Centrifuga DAMÓN Mod. IEC PR-J.
4. Potenciómetro COMPENSATOR E-388.

II. REACTIVOS.

1. Curva estándar de GAGs.

Pesar 5 mg. de Condroitín sulfato tipo III, disolver y aforar en 10 ml. de agua desionizada. Tomar 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 y 2.5 ml. y aforar a 10 ml. de agua desionizada para obtener las concentraciones de 5, 10, 15, 20 y 25 $\mu\text{g}/0.2$ ml.

2. Solución amortiguadora de Acetato de Sodio 0.05 M con Cloruro de Magnesio 0.05 M.

Pesar 6.804 g. de Acetato de Sodio, 10.166 g. de Cloruro de Magnesio, disolver y aforar a 1000 ml. con agua desionizada. Ajustar el pH a 5.8.

3. Solución de Azul de Alciano 8 GX al 0.06% (w/v).

Pesar 0.06 g. de Azul de Alciano, disolver y aforar en 100 ml. de amortiguador de Acetato de Sodio.

III. METODO.

Fundamento.

Este método esta basado en la formación de un complejo entre el Azul de Alciano y los GAGs el cual es proporcional a la concentración de los GAGs.

IV. PROCEDIMIENTO.

	Problema (ml.)	Patrón (ml.)	Blanco (ml.)
Muestra	0.2		
Estándar		0.2	
Agua			0.2
Azul de Alciano	2.4	2.4	2.4

Incubar a temperatura ambiente 2 hs.

Centrifugar a 2000 rpm por 10 minutos.

Lavar el precipitado con 2 ml. de Etanol (2 veces).

Centrifugar a 2000 rpm por 10 minutos.

Disolver el precipitado en 2 ml. de SDS a 7.5% (w/v).

Leer en el espectrofotómetro a 620 nm.

DETERMINACION DE PROGESTERONA.

I. EQUIPO.

1. Espectrofotómetro Packard Mod. 3390.
2. Vortex Super Mixer.
3. Centrifuga DAMON Mod. IEC PR-J.
4. Baño María Dubnoff Metabólico Shaking.

II. REACTIVOS.

1. Suero Anti-Progesterona.
2. Curva estándar de Progesterona.
Partiendo de una solución madre de 2.5 nmol/l. de Progesterona suspendida en amortiguador, preparar soluciones con las siguientes concentraciones: 39, 78, 156, 313, 625 y 1250 fmol. en 5 ml.
3. Suspensión de Carbón-Dextrán.
Pesar 0.625 g. de Carbón vegetal activado y 0.0625 g. de Dextrán y suspender en 100 ml. de amortiguador.
4. Gelatina comercial.
5. Trazador de ³ Progesterona (A.E.:85-110 Ci/nmol).
Preparar una solución de trabajo que contenga 10,000 cpm en 100 µl.

5. Solución de Centelleo.

Pesar 4 g. de PFO, 0.050 g. de PBPOP, y medir 21 ml. de ET-OH, disolver y aforar a 1 l. con Toluéno.

7. Eter Dietílico libre de peróxidos.

8. Solución amortiguadora de fosfatos.

Pesar 2.35 g. de fosfato de Sodio monobásico, 11.6 g. de fosfato de Sodio dibásico, 8.8 g. de Cloruro de Sodio, 0.1 g. de Thiomerosal (Mertiolate) y 1.0 g. de Gelatina, disolver y aforar a 1 l. Ajustar el pH a 7.2-7.4.

III. METODO.

Fundamento.

El método esta basado en la formación del complejo antígeno anticuerpo y la competencia por los sitios de unión entre el antígeno marcado y el no radiactivo.

IV. PROCEDIMIENTO.

	Control 1 (ml.)	Control 2 (ml.)	Patrón (ml.)	Problema (ml.)	Blanco (ml.)
Amortiguador	0.5	0.6			
Trazador de Progesterona	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Antisuero	0.1		0.1	0.1	0.1
Estándar			0.5		
Muestra				0.5	
Agua					0.5

Incubar a 4°C por 18 hr

Carbon-Dextran. 0.2 ml. a todos los tubos excepto al control 2.

Incubar a 4°C por 30 min.

Centrifugar a 2500 rpm. por 15 min. a 4°C.

Agregar liquido de centelleo y contar.

DETERMINACION DE HORMONA LUTEINIZANTE.
(LH)

I. EQUIPO.

1. Vortex Super Mixer.
2. Baño María ajustado a 37°C. Dubnoff Metabólico Shaking.
3. Contador Gamma calibrado para 125-I.

II. REACTIVOS.

1. Tubos cubiertos con Anticuerpo para LH Humana (hLH).

2. Curva estándar de hLH.

De una solución madre de Suero de Caballo con azida de Sodio y sulfamato de Gentamicina, preparar 8 estándares con las siguientes concentraciones: 0, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100 y 200 mIU/ml.

3. Diluyente de Lavado.

Amortiguador salino con Fosfatos que contiene BSA y TWEEN.

4. Controles de hLH.

Dos controles en forma liofilizada que se reconstituyen con 1.0 ml. de agua pura y reposar a temperatura ambiente por 15 minutos antes de usarse.

5. Anti-hLH-125-I.

Anticuerpo monoclonal marcado con 125-I suspendido en amortiguador.

III. METODO.

Fundamento.

El método esta basado en la formación del complejo antígeno anticuerpo y la competencia por los sitios de unión entre el antígeno marcado y el no radiactivo.

IV. PROCEDIMIENTO.

	Problema (ml.)	Patrón (ml.)	Blanco (ml.)
Muestra	0.1		
Estándar		0.1	
Agua			0.1
Anti hLH-125-I	0.2	0.2	0.2

Incubar a 37°C por 30 min.

Lavar con 1.0 ml. de Sol. de lavado 2 veces cada tubo.

Realizar el contéo en un contador gama calibrado para 125-I.

RESULTADOS.

La correlación existente en torno a la concentración de GAGs, A.U., HEXO., contra la densidad óptica (D.O.), muestran una relación lineal entre las variables como se puede apreciar en las FIGs (1,2,3). Las curvas estándar obtenidas para los tres métodos y sus criterios de validación, se muestran en la TABLA 1, y sirvieron para estudiar los niveles urinarios de los GAGs, y A.U., Hexo. De acuerdo a los resultados obtenidos en los dos grupos de pacientes que fueron sometidos al estudio se observó que en el grupo I todos los valores expresados en ug/ml de orina y ordenados de acuerdo al día de la ovulación (DIA CERO), el cual fué validado con la temperatura basal corporal, determinaciones plasmáticas de LH, y Progesterona, así como los glicosaminoglicanos en orina, los niveles de máxima actividad de LH Plasmática, alcanzaron un valor promedio de 118 ± 13.40 mUI/ml de plasma, correspondiendo al día cero del ciclo FIG.(4a). Los valores individuales de Progesterona plasmática, así como la longitud y día del ciclo en que se hizo la determinación hormonal, se muestran en la TABLA 2 y en la que se observa que los niveles del esteroide son superiores a 5 ng/ml de plasma, lo que confirma que los ciclos son ovulatorios. La FIG (4a) muestra la TBC de todos los ciclos menstruales sometidos al estudio y en la que se observa que es de tipo difásico, así como la variación cíclica de la concentración de los GAGs urinarios, de los 24 ciclos menstruales estudiados. El valor promedio de los GAGs contenidos en el día cero es de 106.74 ± 46.16 ug/ml de orina y

corresponde a la concentración mas elevada a lo largo de todo el ciclo. En las fases folicular y secretora, los niveles de GAGs fuerón de 68.5 ± 2.03 ug/ml de orina y 75.41 ± 44.00 ug/ml de orina respectivamente, ver TABLA (3). Los niveles de A.U. y Hexo en los GAGs extraídos de la orina describieron un patrón similar al de los GAGs FIG (5). En todos los casos, el patrón de GAGs, A.U. y Hexo se estudió en las mismas mujeres hasta en 3 ciclos sucesivos en algunos casos. Es útil hacer notar que en esos casos el patrón característico tendió a mantenerse en los ciclos sucesivos.

La interrogante de que GAGs están presentes en la orina durante todo el ciclo menstrual, fué aclarado cuando los GAGs se extrajeron de las muestras por la precipitación con CPC y su posterior aplicación en membranas de Acetato de Celulosa para lograr con ello su caracterización por medio de una electroforésis. La imagen del patrón electroforético obtenido corresponde a la que se muestra en la FIG (6a). En A se muestran los estándares que corresponden al Ac. Hialurónico, Keratán Sulfato y Condroitín Sulfato A; B Heparán Sulfato, Dermatán Sulfato y Condroitín Sulfato C; E Heparina; C, D, E muestras de orina pertenecientes a los días del ciclo 1, 0, -1 y se distingue la presencia del Condroitín Sulfato A y C, Heparán Sulfato, Keratán Sulfato y en menor concentración el Dermatán Sulfato.

En el grupo II, las muestras de los pacientes sometidos al

estudio fueron agrupados en trimestres, de acuerdo al periodo de gestación en que se encontraban. La FIG (7) muestra como el comportamiento de los GAGs, A.U. y Hexo. disminuye durante el primer trimestre del embarazo y su ascenso a medida que el periodo gestacional evoluciona, sin lograr alcanzar los niveles de las no gestantes. Los niveles de GAGs, A.U., y Hexo en los diferentes trimestres de gestación se pueden observar en la TABLA (4). El Patrón electroforético desarrollado por los GAGs en este tipo de muestras corresponde a la FIG (6b). En A se muestran los estandares de Heparán Sulfato, Keratán Sulfato y Condroitín Sulfato; B GAGs urinarios de mujeres no embarazadas; C, D, E GAGs urinarios correspondientes al tercer, segundo y primer trimestre del embarazo respectivamente; E estándares de Heparina y Condroitín Sulfato A; y G estándar de Acido Hialurónico.

DISCUSSION.

Contar con un sistema en el que los GAGs se encuentren en forma libre y no formando complejos macromoleculares, nos hace muy afortunados, puesto que esto, evita el empleo de métodos y técnicas complicadas en la purificación y cuantificación de estas moléculas, de allí que se haya seleccionado para el estudio muestras de orina.

Los resultados de las curvas estándar de los GAGs, A.U. y Hemo, indicaron la existencia de una linealidad, cuando se correlacionaron con la densidad óptica, puesto que los coeficientes respectivos así lo señalan, ver FIGs.(1,2,3). Los criterios de validación obtenidos para los tres métodos, reflejan el grado de reproducibilidad TABLA (1) lo que permite corroborar la veracidad de los resultados.

Debido a la variación en la longitud de los ciclos, los datos del grupo I se analizaron con respecto al día de la ovulación, criterio que fué validado por la obtención de la gráfica de la Temperatura Basal Corporal (TBC) la cual mostró ser difásica. FIG. (4b), el valor promedio máximo de LH plasmática (118 ± 13.40 mUI/ml), y la máxima concentración promedio de GAGs urinarios (106.74 ± 46.16 ug/ml de orina), FIG (4a), indicaron el día exacto de la ovulación, además de confirmar que las muestras empleadas pertenecieron a ciclos ovulatorios, mediante la determinación de Progesterona plasmática, que resultó ser superior a 5 ng/ml en la fase secretora. TABLA (2).

Las concentraciones de los GAGs urinarios en el ciclo menstrual, describen un perfil característico FIG.(4a) en donde el valor máximo coincide con el día de la ovulación, posiblemente ésto se deba al efecto regulador que ejercen las hormonas sobre los GAGs, (63, 64, 65). Las observaciones han sido validadas indirectamente por el hecho que en el desarrollo de los folículos, la producción de GAGs es incrementada bajo la influencia de FSH y la misma relación ocurre en el útero cuando el efecto comunmente conocido como "estrogen-like" incluye un incremento significativo en la producción de GAGs (35). Por lo tanto un paso hacia la clarificación de éste efecto hormonal debe ser la correlación de los niveles hormonales circulantes con el contenido de GAGs urinarios. Por otro lado los valores encontrados de A.U. y Hexo en los GAGs extraídos de la orina, describen un perfil similar al de los GAGs FIGs. (4a,5).

La caracterización de los GAGs hecha por el método electroforético FIG. 6, muestra los diferentes polisacáridos existentes en la orina durante el ciclo menstrual, destacando la presencia de los Condroitines A y C, Keratán Sulfato, Dermatán Sulfato y Heparán Sulfato; así como las diferencias en concentración en los días -1, 0, +1, siendo mayor en el día cero. Este hecho correlaciona con el perfil de los GAGs indicado en la FIG.(4a). Cabe señalar, que el Condroitín Sulfato C es el que se encontró en mayor proporción en cada una de las muestras

analizadas, seguido por el Condroitín Sulfato A, Heparán Sulfato, Keratán Sulfato y en menor concentración el Dermatán Sulfato.

En la FIG. (7) se muestran los valores de GAGs, A.U., y Hexo del grupo de mujeres gestantes, divididos en trimestres de acuerdo al período de gestación, y en donde se aprecia una diferencia significativa entre los niveles de las no embarazadas y las gestantes. La menor de las concentraciones correspondió al primer trimestre de gestación, alcanzando sólo un 36% en relación a los niveles de las no gestantes, e incrementándose en forma lineal ($r=0.99$) a medida que el embarazo progresa, llegando hasta un 77% de la concentración con respecto al grupo I TABLA 4. Lo que parece estar de acuerdo con la evolución del feto, ya que en éste período se requiere de un ambiente hormonal adecuado y por consiguiente de una mayor participación y síntesis de proteínas, y como los GAGs están unidos de alguna manera a proteínas, seguramente éstos están involucrados en alguno de los eventos que se llevan a cabo durante todo el período de gestación, (66).

El patrón electroforético de los GAGs obtenido de las muestras del grupo II, es muy semejante al de las no gestantes FIG. (6a), lo que reafirma que los polianiones presentes en ambos estados fisiológicos son los mismos. La única diferencia detectada entre los dos grupos es la referente a la concentración, ya que se hace evidente la disminución de ésta en el grupo de las embarazadas, manteniéndose por debajo de los niveles de las no gestantes durante todo el período de gestación.

CONCLUSIONES.

1. El perfil de los GAGs en orina durante el ciclo menstrual describe un patron característico encontrando, un valor máximo de 105.74 ± 46.16 ug/ml en el día de la ovulación.
2. Al comparar la concentración de los GAGs del día de la ovulación con los encontrados en las fases folicular y secretora, se aprécia una diferencia significativa en todos los casos estudiados.
3. Los niveles promedio de GAGs urinarios en mujeres con ciclos ovulatorios son de 74.04 ± 9.69 ug/ml de orina.
4. Los niveles de Ac. Urónico y Hexosaminas valorados en los GAGs extraídos de las muestras de orina del grupo I, tienen patrón similar al de los GAGs urinarios.
5. Con el método electroforético empleado para la caracterización de los GAGs urinarios en el ciclo menstrual, se logró identificar el tipo de polisacáridos existentes.
6. De acuerdo a los resultados, la caracterización y cuantificación de los GAGs en orina se puede definir como un criterio confiable y preciso para estudiar el ciclo menstrual.
7. Los valores de GAGs urinarios encontrados durante el embarazo en los tres trimestres, son menores a los observados en los ciclos ovulatorios, alcanzando en promedio durante todo el periodo de gestación sólo el 48.39% en relacion a los ciclos

normales, lo que nos confirma la dependencia hormonal de los GAGs.

8. Los niveles de GAGs urinarios alcanzados después de la caída precipitada en el primer trimestre tienen, la tendencia a normalizarse a medida que el período de gestación progresa.

9. El perfil de ácido urónico y Hexosaminas fué similar al de los GAGs, cuando se determinaron directamente en los polisacáridos extraídos de la orina, tanto en el embarazo como en los ciclos ovulatorios.

10. El patrón electroforético de los GAGs urinarios obtenido en las muestras de mujeres gestantes es similar al de las no gestantes, observándose los siguientes GAGs:

Condrotín Sulfato A, C, Dermatán Sulfato, Keratán Sulfato y Heparán Sulfato.

11. Las bajas concentraciones de GAGs obtenidas en la orina de mujeres embarazadas, así como las de A. Urónico y Hexosaminas probablemente es debida al efecto inhibitorio que produce la elevada concentración de Progesterona presente durante todo el embarazo.

FIGURAS.

FIG. 1

CURVA ESTANDAR GLICOSAMINOGLICANOS

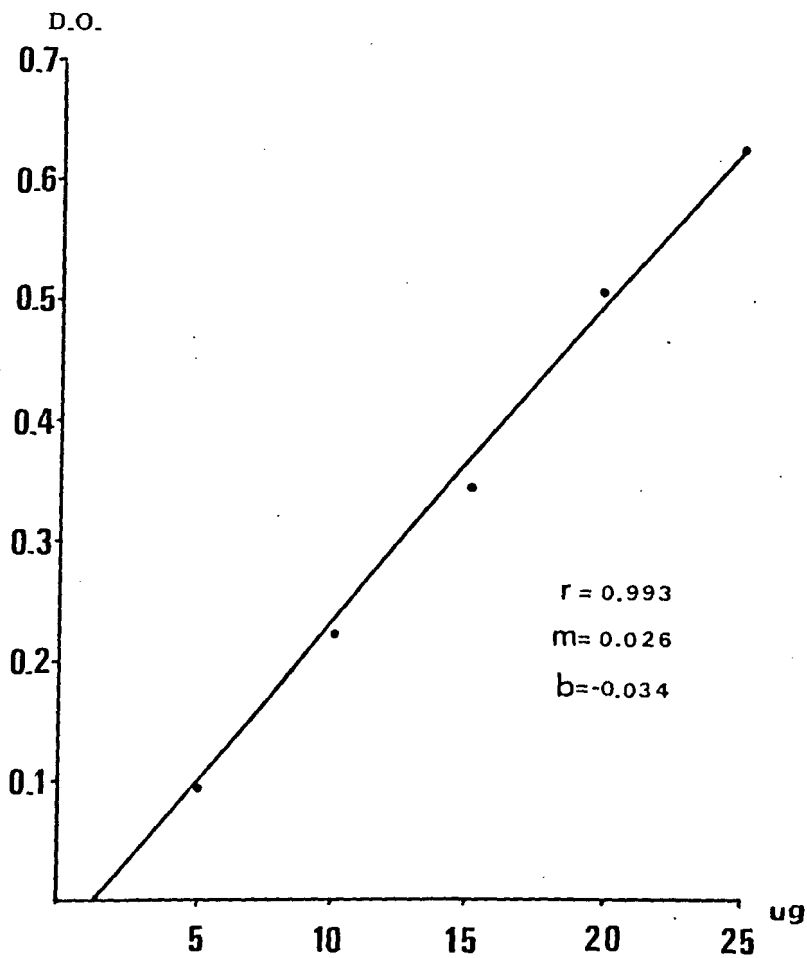


FIG. 2

CURVA ESTANDAR ACIDO URONICO

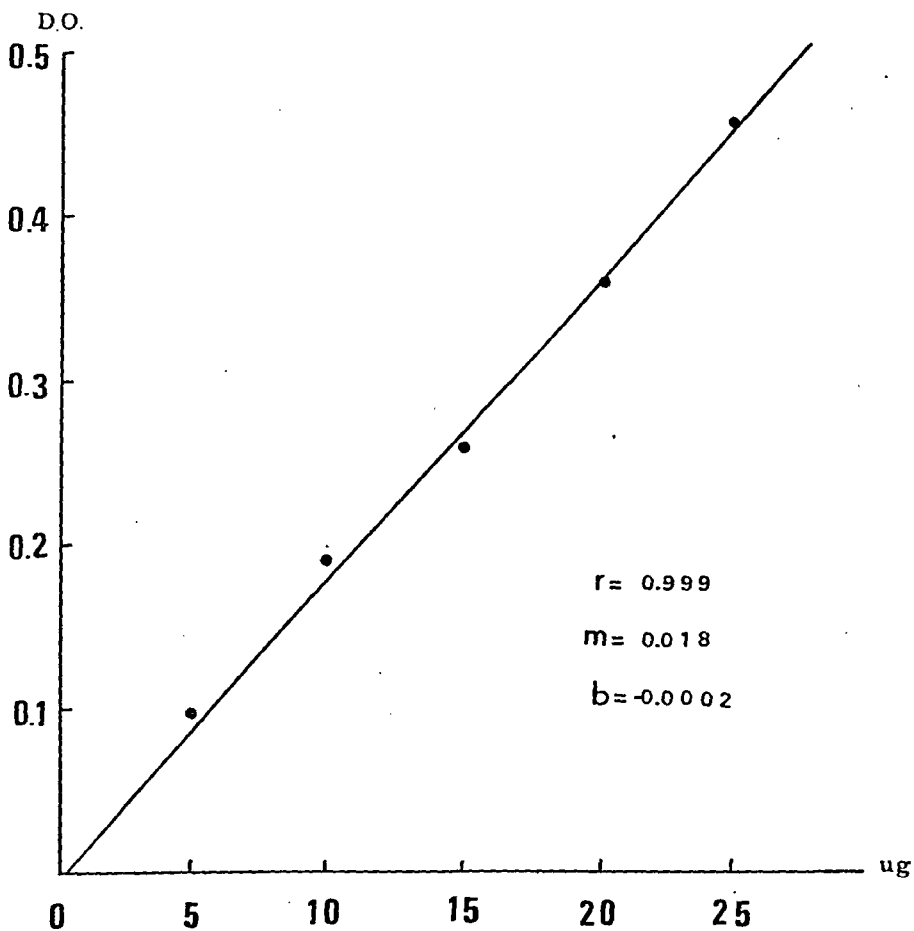


FIG. 3

CURVA ESTANDAR HEXOSAMINAS

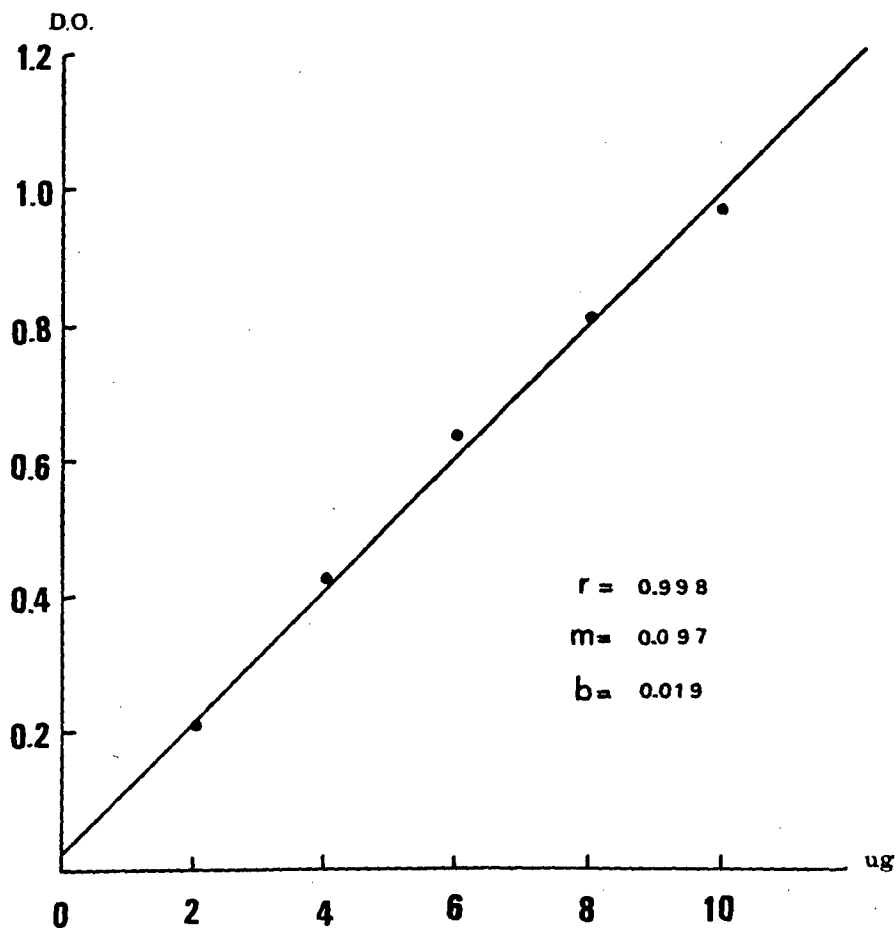


FIG. 4

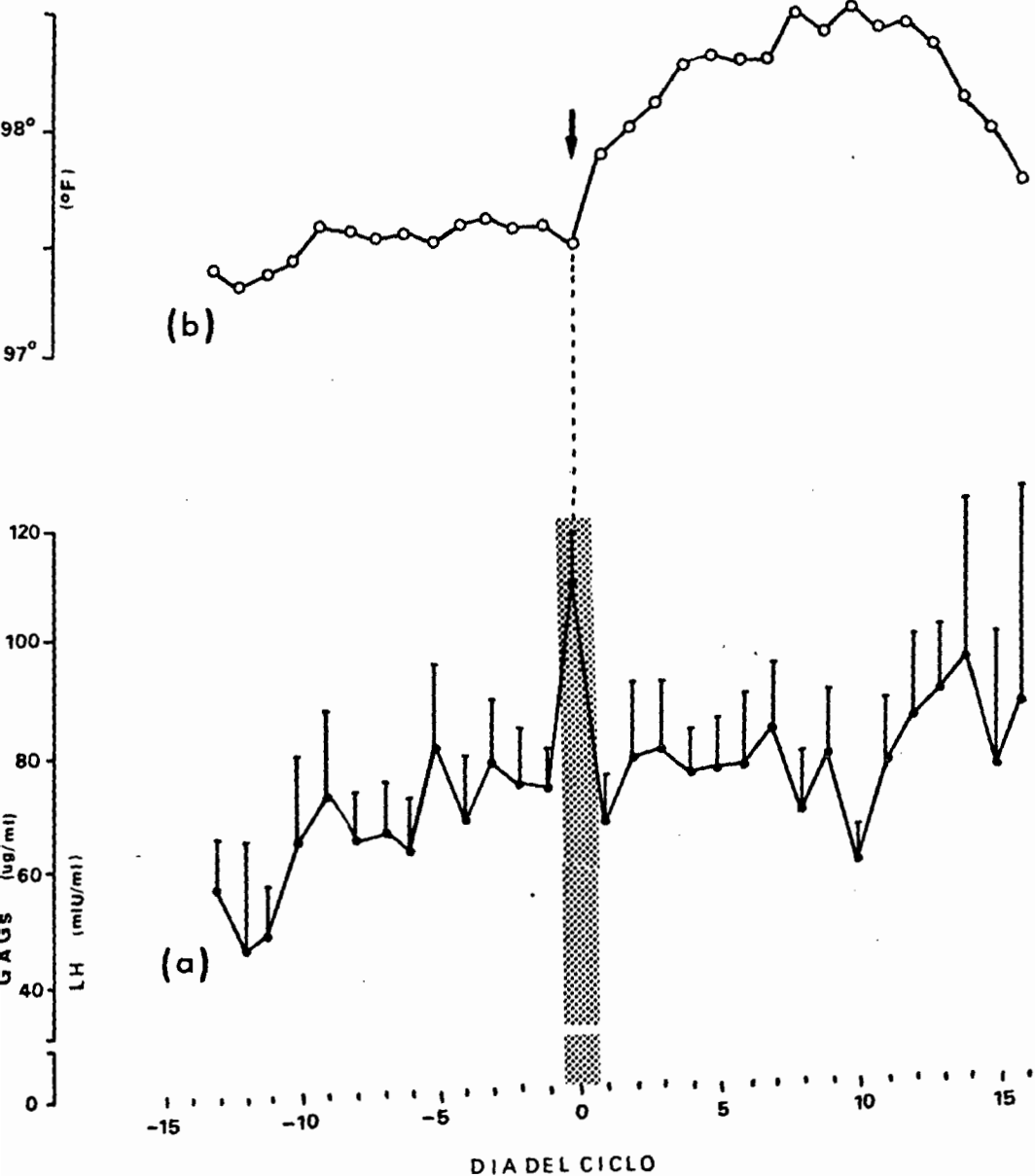


FIG. 5

PERFIL DEL AC. URONICO Y HEXOSAMINAS

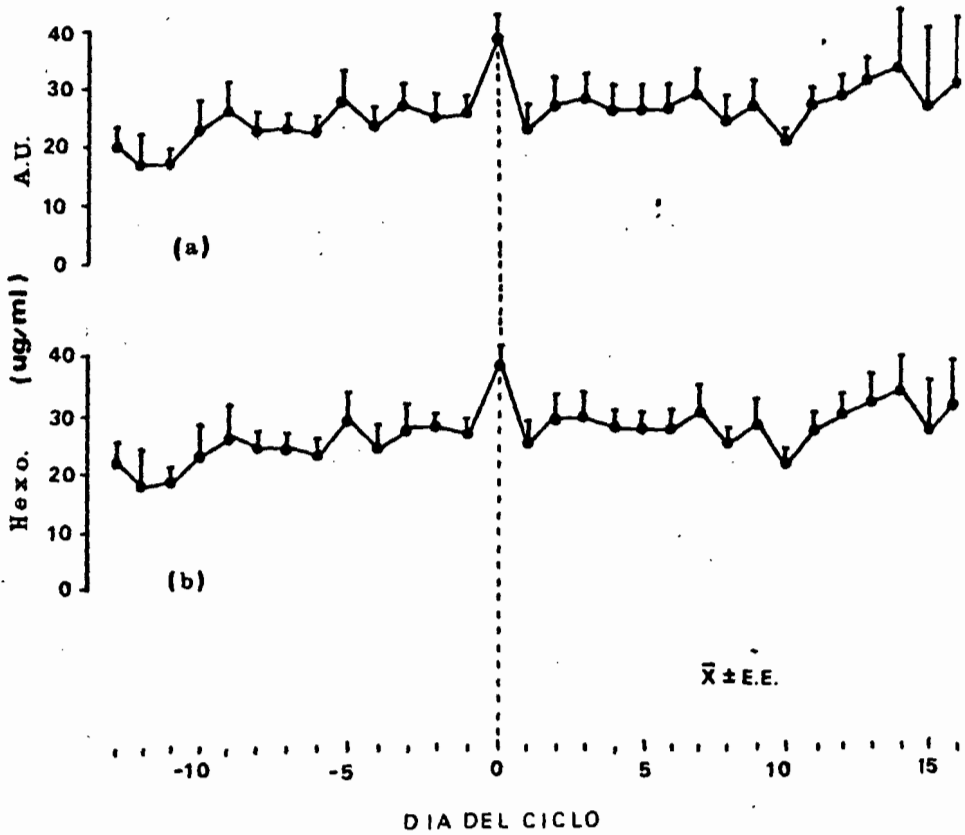


FIG. 6

a

(-)

A

B

C

D

E

F

(+)

- A) Estandares de A. Hialuronico, Keratan sulfato y Condroitin sulfato A.
 B) Estandares de Heparan sulfato, Dermatan sulfato y Condroitin sulfato C.
 C) GAGs urinarios correspondientes al dia +1 del ciclo.
 D) GAGs urinarios correspondientes al dia 0 del ciclo.
 E) GAGs urinarios correspondientes al dia -1 del ciclo.
 F) Estandar de Heparina.

b

(-)

A

B

C

D

E

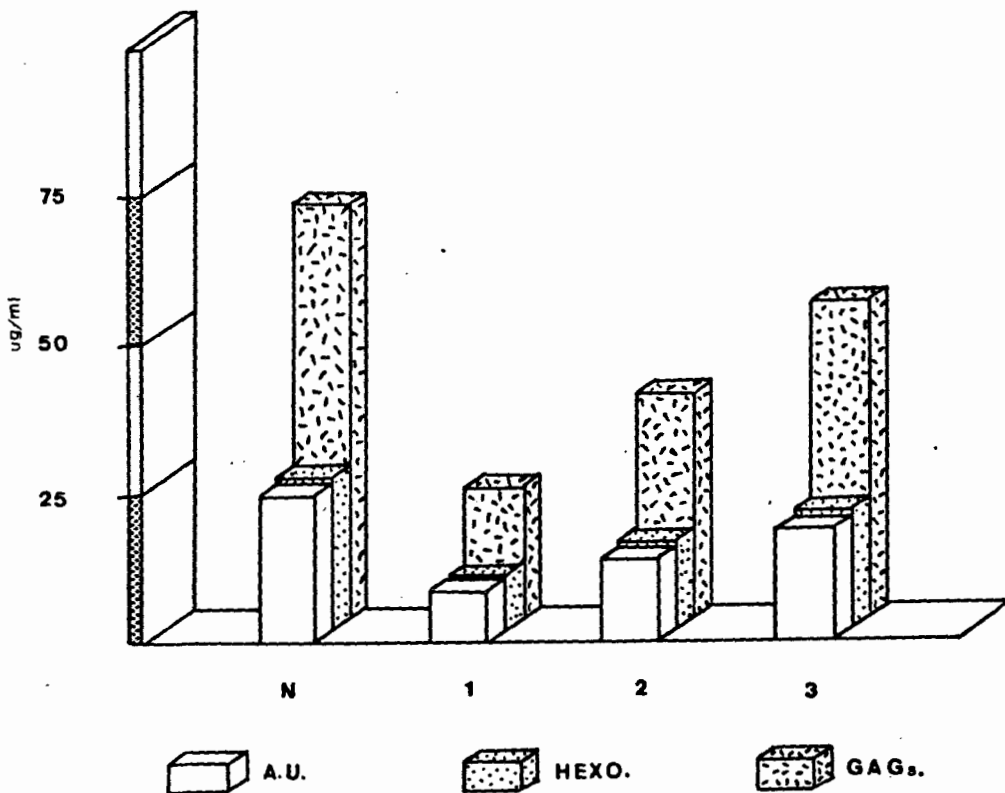
F

G

(+)

- A) Estandares de Heparan sulfato, keratan sulfato y condroitin sulfato C.
 B) GAGs urinarios de mujeres no embarazadas.
 C) GAGs urinarios correspondientes al 3er trimestre del embarazo.
 D) GAGs urinarios correspondientes al 2o trimestre del embarazo.
 E) GAGs urinarios correspondientes al 1er trimestre del embarazo.
 F) Estandares de Heparina y Condroitin sulfato A.
 G) Estandar de A. Hialuronico.

FIG. 7



• N - NO EMBARAZO.

• 1, 2, 3. - TRIMESTRE DE GESTACION.

TABLAS.

REPORTE DE ANOMALIAS

CUCBA

A LA TESIS:

LCUCBA00160

Autor:

García García Cecilia

Tipo de Anomalía:

Errores de Origen: Falta Folio No. 67

TABLA 1.

CRITERIOS DE VALIDACION

	N	r	a	b	N	SENSIBILIDAD	EXACTITUD	PRECISION
GAGs	20	0.993	0.026	-0.034	61	96.05 ± 11.4 % < 5 µg	97.6 ± 5.21	96.3 ± 3.3
A.U.	28	0.999	0.018	-0.0002	61	96.71 ± 4.58 % < 5 µg	97.8 ± 7.89	97.8 ± 2.74
HEXO	37	0.998	0.097	0.0192	61	97.75 ± 2.55 % < 2 µg	98.5 ± 6.91	99.9 ± 0.03

TABLA 2.

PACIENTE	EDAD	GTE	TM	LC	P-4
1	29	DIFASICA	25	31	5.99
2	35	DIFASICA	25	29	7.64
3	25	DIFASICA	24	29	8.35
4	36	DIFASICA	24	26	10.70
5	22	DIFASICA	24	26	11.41
6	26	DIFASICA	25	29	16.35
7	24	DIFASICA	22	25	9.76
8	27	DIFASICA	24	28	15.88

27.88 10.76
 ± 2.03 ± 3.73

* P-4 (MEDIA DE TRES VALORES).

* TM (DIA DE MUESTREO).

* LC (LONGITUD DEL CICLO).

TABLA 3.

VALORES DE LOS GAGs, AC. URÓNICO Y HEXOSAMINAS EXTRAIDOS, EN LAS FASE FOLICULAR, FASE SECRETORA Y EN LA OVULACION.

	FASE FOLICULAR N= 169	OVULACION N= 24	FASE SECRETORA N= 229
GAGs	75.41 ± 44.07	106.74 ± 46.15	68.50 ± 42.02
HEXO.	25.09 ± 15.48	39.05 ± 17.14	27.59 ± 16.25
A.U.	24.21 ± 15.22	37.63 ± 17.29	26.57 ± 16.07

TABLA 4.

	TRIMESTRE DE GESTACION	GAGs	A.U.	HEXO.	N
NO GESTANTES		74.04 ± 9.69	25.12 ± 15.99	26.10 ± 16.20	417
	1	26.67 ± 9.69 (36.02)	8.92 ± 2.86 (35.51)	9.25 ± 3.55 (35.44)	58
GESTANTES	2	42.60 ± 13.56 (57.53)	14.24 ± 4.91 (56.58)	14.68 ± 5.23 (56.24)	110
	3	57.46 ± 19.49 (77.60)	19.21 ± 5.74 (76.47)	19.93 ± 6.95 (76.36)	112

Los niveles de GAGs, A.U. y HEXO. estan expresados en µg/ml y representan la $\bar{X} \pm DE$.

Los valores entre parentesis indican el % en relación al ciclo menstrual.

BIBLIOGRAFIA.

1. Servin M, Arguello C. (1986).

LA MATRIZ EXTRACELULAR EN LOS PROCESOS CELULARES DEL
DESARROLLO.

TEMAS SELECTOS DE LA BIOLOGIA CELULAR.

Ed. Cimestaf.

Mexico, D.F.

Pag. 109.

2. Martin D, Mayes P, Rodwell V, Granner D. (1986).

BIOQUIMICA DE HARPER

Decima Ed.

Ed. El Manual Moderno S.A. de C.V.

Mexico, D.F.

Pag. 159.

3. Fosang AJ, Handley CJ, Santer V, Lowther DA, Thorburn GD.
(1984).

PREGNANCY-RELATED CHANGES IN THE CONNECTIVE TISSUE OF THE
OVINE CERVIX.

Biol. Reprod. 30:1223.

4. Oldberg A, Rudslähti E. (1982).

INTERACTIONS BETWEEN CHONDROITIN SULPHATE PROTEOGLYCAN,
FIBRONECTIN AND COLLAGEN.

J. Biol. Chem. 257:4869.

5. Carlstedt I, Coster L, Malmstrom A, Fransson L. (1983).
PROTEOHEPARAN SULFATE FROM HUMAN SKIN FIBROBLASTS.
J. Biol. Chem. 258: 11629.
6. Hronowski L, Anastassiades TP. (1980).
RATES OF GLYCOSAMINOGLYCAN SYNTHESIS AND INCORPORATION OF
RADIOACTIVE PRECURSORS INTO NEWLY SYNTHESIZED
GLYCOSAMINOGLYCAN BY CONFLUENT RAT MUSCLE FIBROBLASTS.
J. Biol. Chem. 255: 9210.
7. Zachariae F. (1959).
ACID MUCOPOLYSACCHARIDES IN THE FEMALE GENITAL SYSTEM AND
THEIR ROLE IN THE MECHANISM OF OVULATION.
Acta Endocr. (Copenh) 33: Supl 47, 11,
8. Meyer K. (1956).
CIBA SYMPOSIUM ON BONE STRUCTURE AND METABOLISM.
Churchill, London.
9. Dorfman RF, Pincus G, Thimann KV. (1955).
THE HORMONES.
Vol. 3
Academic Press
New York
Pag. 611

10. Zachariae F. (1957).
STUDIES ON THE MECHANISM OF OVULATION.
Acta Endocr. (Copenh) 26: 215.
11. Schiller S. (1958).
THE ISOLATION OF CHONDROITIN SULFURIC ACID FROM NORMAL HUMAN PLASMA.
Biochim Biophys Acta. 28: 413.
12. Di Ferrante N, Robbins WC, Rich C. (1957).
URINARY EXCRETION OF ACID MUCOPOLYSACCHARIDES BY PATIENTS WITH LUPUS ERYTHEMATOSUS.
J. Lab. Clin. Med. 50: 897.
13. Uldbjerg N, Malmstrom A, Ekman G, Sheehan J, Ulmsten U, Wingerup L. (1983).
ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF DERMATAN SULFATE PROTEOGLYCAN FROM HUMAN UTERINE CERVIX.
Biochem J. 209: 497.
14. Golichowski MA, King RS, and Mascaro K. (1980).
PREGNANCY-RELATED CHANGES IN RAT CERVICAL GLYCOSAMINOGLYCANS.
Biochem. J. 192: 1.
15. Hook M, Kjellen L, Johansson S, Robinson J. (1984).
CELL-SURFACE GLYCOSAMINOGLYCANS.
Ann. Rev. Biochem. 53: 847.

16. Carey JD, Todd MS. (1986).
A CYTOSKELETON-ASSOCIATED PLASMA MEMBRANE HEPARAN SULFATE
PROTEOGLYCAN IN SCHWANN CELL.
J. Biol. Chem. 261: 7518.
17. Obrink B. (1973).
A STUDY OF THE INTERACTIONS BETWEEN MONOMERIC TROPICOLLAGEN
AND GLYCOSAMINOGLYCANS.
Eur. J. Biochem. 33: 387
18. Hascall VC, Hascall GK. (1981).
IN CELL BIOLOGY OF EXTRACELLULAR MATRIX.
Editor. E.D. Hay.
Ed. Plenum
New York
Pag. 39
19. Scott JE, Orford CR. (1981).
DERMATAN SULFATE-RICH PROTEOGLYCAN ASSOCIATES WITH RAT TAIL
TENDON COLLAGEN AT THE D AND IN THE GAP REGION.
Biochem. J. 197: 213.
20. Kitamura K, Ito A, Mori Y, Hirakawa S. (1980).
GLYCOSAMINOGLYCANS OF HUMAN UTERINE CERVIX: HEPARAN SULPHATE
INCREASE WITH REFERENCE TO CERVICAL RIPENING.
Biochem. Med. 23:159.

21. Laurie GW, Leblond CP, Martin GR. (1983).
LIGHT MICROSCOPIC IMMUNOLocalIZATION OF TYPE IV COLLAGEN
LAMININ, HEPARAN SULFATE PROTEOGLYCAN AND FIBRONECTIN IN THE
BASEMENT MEMBRANES OF A VARIETY OF RAT ORGANS.
Am. J. Anat. 167: 71.
22. LeBaron GR, Esko DJ, Woods A, Johansson S, Hook M. (1988).
ADHESION OF GLYCOSAMINOGLYCANS-DEFICIENT CHINESE HAMSTER
OVARY CELL MUTANTS TO FIBRONECTIN SUBSTRATA.
J. Cell. Biol. 106: 945.
23. Alitalo K, Keski-Oja J, Hedman K, Vaheri A. (1982).
LOSS OF DIFFERENT PERICELLULAR COMPONENTS OF RAT CELLS
TRANSFORMED WITH A T-CLASS TEMPERATURE-SENSITIVE MUTANT OF
ROUS SARCOMA VIRUS.
Virology 119: 347.
24. Singer A, Reid B. (1970).
THE ULTRAESTRUCTURE OF CERVICAL MUCUS.
J. Reprod. Fertil. 21: 377.
25. Edwards RG. (1974).
FOLLICULAR FLUID.
J. Reprod. Fertil. 37: 189.

26. Hughes EC, Csermely TV, Jacobs RD, O'Hern FA. (1974).
BIOCHEMICAL PARAMETERS OF ABNORMAL ENDOMETRIUM.
Gynecologic Oncology. 2: 205.
27. Ax RL, Bellin ME, Grimek HJ. (1985).
PROPERTIS AND REGULATION OF SYNTHESIS OF GLYCOSAMINOGLICANS BY
THE OVARY. IN PROCEEDINGS OF THE FIFTH OVARIAN WORKSHOP.
Eds Toft DO, Ryan RJ.
Champaign IL.
Ovarian Workshops.
Pag. 451.
28. Lindner HR, Tsafxiri A, Lieberman ME, Zor V, Koch Y,
Bauminger S, Barnea A. (1974).
GONADOTROPIN ACTION ON CULTURED GRAAFIAN FOLLICLES INDUCTION
OF MATURATION DIVISION OF THE MAMMALIAN OOCYTE AND
DIFERENTIATION OF THE LUTEAL CELL.
Recent. Prog. Horm Res. 30: 79.
29. Gebawer H, Lindner HR, Amsterdam A. (1978).
SYNTHESIS OF HEPARIN-LIKE GLYCOSAMINOGLYCANS IN RAT OVARIAN
SLICES.
Biol. Reprod. 18: 350

30. Cabrol D, Dubois P, Sedbon E, Dallot E, Legagneux J, Amichot G, Cedard L, Sureau C. (1987).
PROSTAGLANDIN E-2 INDUCED CHANGES IN THE DISTRIBUTION OF GLYCOSAMINOGLYCANS IN THE ISOLATED RAT UTERINE CERVIX.
Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. 26: 359.
31. Salustri A, Yanagishita M, Hascall VC. (1989).
SYNTHESIS AND ACCUMULATION OF HYALURONIC ACID AND PROTEOGLYCANS IN THE MOUSE CUMULUS CELL-OOCYTE COMPLEX DURING FOLLICLE-STIMULATING HORMONE INDUCED MUCIFICATION.
J. Biol. Chem. 264: 13840.
32. Karlinsky JB, Goldstein RH. (1989).
REGULATION OF SULFATED GLYCOSAMINOGLYCAN PRODUCTION BY PROSTAGLANDIN E-2 IN CULTURED LUNG FIBROBLASTS.
J. Lab. Clin. Med. 114: 176.
33. Sunderland LA, Bulmer JN, Luscombe M, Redman CWG, Stirrat GM. (1985).
IMMUNOHISTOLOGICAL Y BIOCHEMICAL EVIDENCE FOR A ROLE FOR HYALURONIC ACID IN THE GROWTH AND DEVELOPMENT OF THE PLACENTA.
J. Reprod. Immu. 8:197.
34. Roberts RM, Bazer FW. (1988).
THE FUNCTIONS OF UTERINE SECRETIONS.
J. Reprod. Fert. 82:875.

35. Moore JP and Rosenquist HT. (1979).
SOME EFFECTS OF AN INTRAUTERINE DEVICE ON GLUCOSAMINOGLYCANS
OF THE HAMSTER UTERUS.
Fertil. Steril. 32: 120.
36. Miller JD, Ax LR. (1990).
CARBOHYDRATES AND FERTILIZATION IN ANIMALS.
Mol. Reprod. Dev. 26:184.
37. Greiss FW, Wagner WD. (1983).
GLYCOSAMINOGLYCANS; THEIR DISTRIBUTION AND POTENTIAL
VASOACTIVE ACTION IN THE NONPREGNANT AND PREGNANT OVINE
UTERUS.
Amer. J. Obstet. Gynaecol. 145: 1041.
38. Ashworth CJ, Fliss MFV, Bazer FW. (1990).
EVIDENCE FOR STEROID CONTROL OF A PUTATIVE ANGIOGENIC FACTOR
IN THE PORCINE UTERUS.
J. Endoc. 125: 15.
39. Cabrol D, Dallot E, Cedard L, Sureau C. (1985).
PREGNANCY-RELATED CHANGES IN THE DISTRIBUTION OF
GLYCOSAMINOGLYCANS IN THE CERVIX AND CORPUS OF THE HUMAN
UTERUS.
Europ. J. Obstet. Gynec. Reprod. Biol. 20: 289.

40. Schalafke S, Enders AC. (1975).
CELLULAR BASIS OF INTERACTION BETWEEN TROPHOBLAST AND UTERUS
AT IMPLANTATION.
Biol. Reprod. 12: 41.
41. Psychoyos A. (1973).
HORMONAL CONTROL OF OVUM IMPLANTATION.
Vit. Horm. 31: 201.
42. Glasser SR, McCormack S.A. (1979).
FUNCTIONAL DEVELOPMENT OF RAT TROPHOBLAST AND DECIDUAL CELLS
DURING ESTABLISHMENT OF THE HEMOCHORIAL PLACENTA.
Adv. Biosci. 25: 165.
43. Wewer VW, Weiss J, Faber M, Albrechtsen R, Damjanov I.
(1985).
DECIDUAL CELLS PRODUCE BASEMENT MEMBRANE COMPONENTS.
J. Cell. Biol. 101: 344.
44. Carson DD, Outt A, Tang J-P. (1987).
GLYCOCONJUGATE SYNTHESIS DURING EARLY PREGNANCY: HIALURONATE
SYNTHESIS AND FUNCTION.
Develop. Biol. 120: 228.
45. Armant DR, Kaplan HA, Lennarz WJ. (1984).
FIBRONECTIN AND LAMININ PROMOTE IN VITRO ATTACHMENT AND
OUTGROWTH OF MOUSE BLASTOCYSTS.
Dev. Biol. 116: 519.

46. Lee TY, Jamieson AM, Schafer IA. (1973).
CHANGES IN COMPOSITION AND STRUCTURE OF GLYCOSAMINOGLYCANS IN
THE HUMAN PLACENTA DURING DEVELOPMENT.
Pediatr. Res. 7: 965.
47. Huszar G, Naftolin F. (1984).
THE MIOMETRIUM AND UTERINE CERVIX IN NORMAL AND PRETERM
LABOR.
New. Engl. J. Med. 311: 571.
48. Ulbjerg N, Ekman G, Malmstrom A, Olsson K, Ulmsten U.
(1983).
RIPENING OF THE HUMAN UTERINE CERVIX RELATED TO CHANGES IN
COLLAGEN, GLYCOSAMINOGLYCANS AND COLLAGENOLYTIC ACTIVITY.
Am. J. Obstet. Gynecol. 147: 662.
49. Carranco A, Reyes R, Huacuja L, Guzman A, Delgado NM. (1992).
HUMAN URINARY GLYCOSAMINOGLYCANS AS ACCURATE METHOD FOR
OVULATION DETECTION.
Int. J. Fertil. "EN PRENSA".
50. Williams WW. (1951).
Ann. Ostet. E. Ginec. 7: 830.
51. Jacobsen AKF. (1955).
ON POLYCYSTIC OVARIES.
Soro Amtstidende's Bogtryk
Slagelse, Denmark.

52. Thorsoe H. (1962).
DEVELOPMENT OF POLYCYSTIC OVARIES FOLLOWING THYROIDECTOMY.
ROLE OF ACID MUCOPOLYSACCHARIDES.
Acta Endocr. (Copenh). 40: 161.
53. Guyton AC. (1987).
TRATADO DE FISILOGIA MEDICA
Sexta Edición
Nueva Editorial Interamericana S.A. de C.V.
México, D.F.
54. Goust D.F. (1968).
TU CUERPO Y TU SALUD.
Ed. Daimon.
Barcelona, España
55. Malacara JM, García VM, Valverde RC. (1979).
FUNDAMENTOS DE ENDOCRINOLOGIA CLINICA.
Tercera Edición
Ed. La prensa Médica Mexicana S.A.
México, D.F.
56. Hilgers TW, Saley AJ. (1980).
NATURAL FAMILY PLANNING II. BASAL BODY TEMPERATURE AND
ESTIMATED TIME OF OVULATION.
Obst. Gynecol. 55: 333.

57. Abraham GE, Odell WD, Swerdloff RS, Hopper K. (1972).
SIMULTANEOUS RADIOIMMUNOASSAY. OF PLASMA FSH, LH,
PROGESTERONA, 17-OH PPROGESTERONA Y ESTRADIOL 17- β DURING
THE MENSTRUAL CYCLE.
J. Clin. Endocr. 34: 312.
58. Whiteman P. (1973).
THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF GLYCOSAMINOGLYCANS IN URINE
WITH ALCIAN BLUE 86X.
Biochem. J. 131: 351.
59. Fellstrom B, Danielson BG, Lind E, Ljunghall S, Wikstrom B.
(1986).
ENZIMATIC DETERMINATION OF URINARY CHONDROITIN SULFATE.
APPLICATIONS IN RENAL STONE DISEASE AND ACROMEGALY.
Eur. J. Clin. Invest. 16: 292.
60. Bitter T, Miur HM. (1962).
A MODIFED URONIC ACID CRBAZOLE REACTION.
Anal. Biochem. 4: 330.
61. Smith RL, Gilkerson E. (1979).
QUANTITATION OF GLYCOSAMINOGLYCANS HEXOSAMINE USING 3-METIL-
2-BENZOTIAZOLONE HYDRAZONE HYDROCHLORIDE.
Anal. Biochem. 98: 478.

62. Kettelhut BV, Metcalfe DD. (1988).
QUANTITATION AND CHARACTERIZATION OF URINARY
GLYCOSAMINOGLYCANS IN HEALTHY SUBJECTS AND PATIENTS WITH
MASTOCYTOSIS.
Clin. Chim. Acta 171: 29.
63. Lindner HR. (1977).
INTRAOVARIAN FACTORS IN OVULATION, DETERMINANTS OF FOLLOCLULAR
RESPONSE TO GONADOTROPHINS.
J. Reprod. Fertil. 51: 215.
64. Salomon Y. (1977).
ADENYLATE CYCLASE IN THE IMMATURE RAT OVARY: INTRODUCTION OF
RESPONSIVENESS TO LUTEINIZING HORMONE.
Fed. Eur. Biol. Soc. 45: 299.
65. Salomon Y. (1977).
SYNCHRONOUS GENERATION OF OVARIAN HCG BINDING SITES AND LH
SENSITIVE ADENYLATE CYCLASE IN IMMATURE RATS FOLLOWING
TREATMENT WITH PREGNANT MARE SERUM GONADOTROPIN.
J. Cyclic. Nucleotide. Res. 3: 163.
66. Burton A, Lockhart F, Bosnjak S, Yong S. (1989).
STIMULATION BY 17 α -HYDROXYPROGESTERONE OF GLYCOPROTEIN AND
GLYCOSAMINOGLYCAN SYNTHESIS IN HUMAN PLACENTA IN VITRO.
Biol. Neonate. 55: 151.