

300627
8
24



UNIVERSIDAD LA SALLE

**Escuela de Química
Incorporada a la U.N.A.M.**

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA ESTROGENO
SULFOTRANSFERASA Y ESTROGENO SULFATASA
EN UTERO DE RATA DURANTE EL
PROCESO DE IMPLANTACION

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO
P R E S E N T A :
NORMA ANGELICA GONZALEZ JUAREZ



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

RESUMEN

Los esteroides sulfoconjugados han sido considerados actualmente como importantes intermediarios en la biosíntesis de hormonas activas en diversos tejidos endócrinos. El metabolismo de los estrógenos sulfatos ha sido demostrado en el útero de diferentes especies por la interconversión de la estrona sulfato (E_1S) y del estradiol sulfato (E_2S) en estrógenos libres. En el útero E_1S y E_2S se convierten en estrógenos libres, biológicamente activos a través de la acción de la estrógeno sulfatasa. Por otra parte, la sulfatación de los estrógenos depende de la actividad de la estrógeno sulfotransferasa, enzima responsable de la conversión de los estrógenos libres a los sulfoconjugados. Esta enzima está presente en diversos tejidos endócrinos y en órganos blancos tales como el oviducto, la vagina y el útero. Los procesos de implantación y desarrollo fetal son regulados por los niveles plasmáticos y tisulares de las hormonas ováricas. Dado que durante el período de implantación es muy importante la concentración de los estrógenos libres en el sitio de la implantación (SI) y ya que la concentración de los estrógenos está determinada, entre otros factores, por la acción enzimática de la estrógeno sulfatasa y la estrógeno sulfotransferasa, se realizó un estudio comparativo de la actividad de estas enzimas en el útero de la rata en el día de la implantación, para determinar, como afecta cada una de ellas en la concentración local de estrógenos tanto en el sitio de implantación como en el tejido adyacente.

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la presencia simultánea de la estrógeno sulfotransferasa y sulfatasa puede representar un mecanismo de regulación de las concentraciones locales de estrógenos libres en el útero durante el proceso de implantación de la rata, influenciando el establecimiento y continuación del embarazo.

I N D I C E

	Pág.
OBJETIVO.....	1
INTRODUCCION.....	2
MATERIAL Y METODOS.....	29
RESULTADOS.....	49
DISCUSION DE RESULTADOS.....	60
ANEXO.....	66
BIBLIOGRAFIA.....	72

OBJETIVO

Ya que en el microambiente uterino que circunda al blastocisto son muy importantes las concentraciones de los estrógenos activos y esas concentraciones están reguladas, entre otros factores, por la acción enzimática de la estrógeno sulfatasa y la estrógeno sulfotransferasa, el objetivo del presente estudio fue medir la actividad de la estrógeno sulfotransferasa tanto en el sitio de la implantación, como en el tejido no implantado del útero de rata en el quinto día de embarazo y hacer una comparación con la actividad de la estrógeno sulfatasa en las mismas condiciones, para saber si existe una diferencia significativa entre ambos tejidos durante los procesos de implantación y de esta forma conocer si el sistema enzimático sulfatasa-sulfotransferasa pudiera constituir un medio de regulación de las concentraciones locales de estrógenos activos que influenciarán el mantenimiento del embarazo.

INTRODUCCION

En la actualidad, el incremento tan notable que se presenta en el índice de la natalidad humana ha conducido a un estudio de los procesos bioquímicos que involucran los fenómenos de la reproducción, con el fin de descubrir nuevos métodos anticonceptivos que controlen en forma efectiva tal incremento, así como el posible tratamiento de los problemas de infertilidad, por ello, se ha dado mayor atención a los eventos que tienen lugar en el tracto genital femenino después de la fecundación y que conducen al embarazo.

La rata, entre otros animales, ha sido utilizada como modelo experimental en los estudios sobre diferentes aspectos de la reproducción, debido a su fácil manejo.

Dentro de los procesos que forman parte de la reproducción, es importante el establecimiento y la continuación del embarazo, procesos que son dependientes de los niveles circulantes de los esteroides, compuestos que son sintetizados en las gónadas y en otros tejidos.

Las hormonas son sustancias que inducen alteraciones de las actividades metabólicas de las células de tejidos sensibles a ellas, denominados "órganos blanco."

Los ovarios y los testículos además de la función de producir óvulos y espermatozoides, y las glándulas

suprarrenales, secretan sustancias químicas de carácter hormonal que regulan el proceso sexual y las características sexuales secundarias, estas hormonas comprenden un amplio grupo de moléculas que tienen como núcleo fundamental al ciclopentano perhidro-fenantreno.

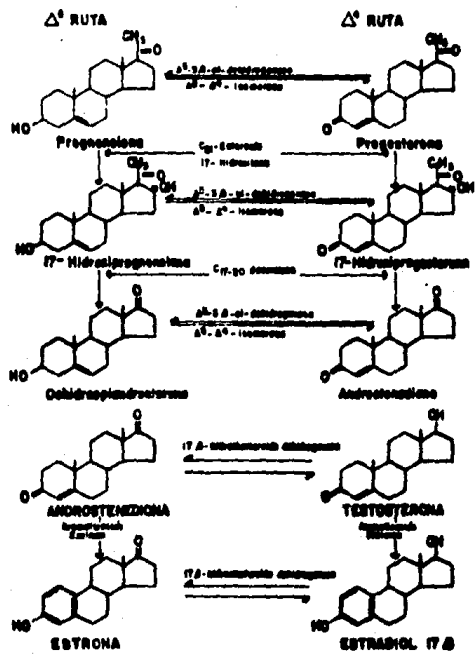
El precursor común de estas hormonas en muchos tejidos corporales es el colesterol, el cual se biosintetiza a partir de la acetil-CoA. La conversión de colesterol a pregnenolona es el primer paso en la biosíntesis de la mayoría de las hormonas esteroides, las cuales gobiernan el ciclo reproductor así como el crecimiento y desarrollo de los órganos reproductores accesorios (Fig.1).

El ovario secreta dos tipos de hormonas femeninas: las hormonas foliculares o estrogénicas, producidas por las células del folículo de Graff en desarrollo y las progesteronales, producidas por las células del cuerpo lúteo que se forma en el ovario después de la ruptura del folículo en la ovulación.

El estrógeno principal que se encuentra en circulación es el 17β -estradiol (E_2), el cual es la forma más activa de los estrógenos. El estradiol se encuentra en equilibrio con la estrona (E_1) menos activa.

La progesterona se forma a partir de su precursor inmediato, la pregnenolona, y es la hormona del cuerpo lúteo que se desarrolla en los folículos ováricos que se han roto. También se sintetiza en la placenta durante la última parte del embarazo.

FIGURA 1 BIOSINTESIS DE ESTROGENOS



Rutas metabólicas demostradas en el ovario y en la corteza adrenal, para la síntesis de los estrógenos (1).

La progesterona se forma también en las suprarrenales, como precursora de los corticosteroides que tienen 21 átomos de carbono.

Las hormonas secretadas pasan a la circulación para ser transportadas hasta el órgano blanco, así su concentración en la sangre indica la actividad de la glándula endócrina.

Las hembras adultas de casi todas las especies de mamíferos presentan variaciones sexuales rítmicas o cíclicas. Durante dichos ciclos se presentan cambios ováricos, uterinos, vaginales y conductuales periódicos, ocasionados por una variación en la concentración de las hormonas. Este control biológico asegura que las condiciones para la fertilización, la nidación y el desarrollo del óvulo fecundado, sean óptimas.

Los ciclos sexuales, en general, están caracterizados por cuatro etapas principales:

- 1a) En la primera etapa de preparación se observa en el ovario una maduración folicular que va a culminar posteriormente en la ovulación, también se observa una proliferación de las células endometriales.
- 2a) Este período, que se inicia con la ovulación, se presenta con la máxima capacidad reproductiva y con una conducta de apareo en diversas especies.

- 3a) Existe un período de preparación del útero, que tiene como finalidad la aceptación del óvulo fecundado.









- 4a) En el caso de que no se realice el embarazo, se lleva a cabo una regresión de las estructuras diferenciadas del cuerpo lúteo ovárico y del endometrio para iniciar un nuevo ciclo.

En los mamíferos, dependiendo de la especie, los ciclos sexuales se dividen en estrales y menstruales (2). Los primeros, se caracterizan por un período corto de conducta sexual intensa en el cual se manifiesta la conducta de apareo y los segundos, por la aparición de un sangrado, ocasionado por el desprendimiento de la capa funcional del endometrio.

La rata presenta un ciclo estral con duración de 4 a 5 días con cuatro fases sucesivas, de duración variable, que pueden distinguirse por el examen al microscopio de las células de descamación vaginal (3) (Fig.2). Estas fases son, en orden cronológico, el proestro, el estro, el metaestro y el diestro.

Cada una se caracteriza por una citología diferente, producto de la diferenciación celular, así como por una respuesta precisa a la monta del macho. Es en el estro cuando ocurre la ovulación (4) y la hembra es receptiva al macho. De esta manera, la especie asegura la presencia de ambos gametos para que la fecundación se lleve a cabo.

FIG. 2 CARACTERISTICAS CITOLOGICAS Y CONDUCTUALES DURANTE EL CICLO ESTRAL DE LA RATA. (3)

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

La sucesión de fases en el ciclo estral, es consecuencia de la producción cíclica y alternada de estrógenos y progestinas del ovario, cuyo órgano blanco principal es el útero (5,6,7). Es importante agregar, que la regulación de la producción de hormonas por el ovario está dada por la secreción de gonadotrofinas hipofisiarias y por el hipotálamo a través de sus factores liberadores (8) (Fig.3).

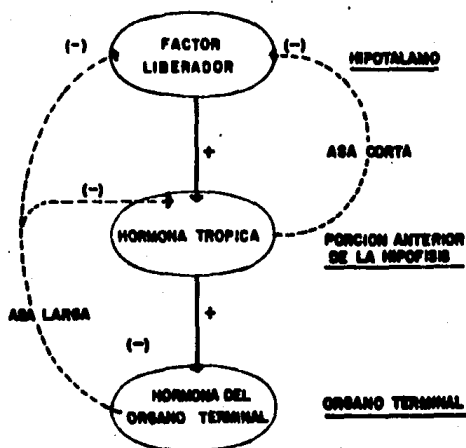
Actualmente, la regulación del ciclo sexual de la rata es uno de los fenómenos endocrinológicos mejor estudiados. Se sabe que los estrógenos, cuya acción es de proliferación y diferenciación de tejidos (9), tienen un alza en su concentración durante el proestro, lo cual provoca el estro. Por otra parte, la progesterona que se encarga de la proliferación glandular del estroma preparatorio para un posible embarazo (10), presenta máximos al fin del metaestro y del proestro (Fig.4).

Ovulación, Fertilización y Preimplantación.

La ovulación está caracterizada por el desprendimiento de uno o más óvulos (según la especie) del folículo de Graff del ovario (2,11). A partir de este momento el folículo da lugar a la formación del cuerpo lúteo, cuya función primordial es la de producir progesterona y estrógenos (2,11,12).

Una vez expulsado el óvulo, éste pasa al oviducto en donde al encontrarse presentes los espermatozoides se produce la fertilización. El óvulo fecundado o huevo es

FIG.3 INTEGRACION DEL EJE HIPOTALAMO-HIPOFISIS-GONADA



Control general por retroacción de los sistemas endócrinos que involucra el hipotálamo, la hipófisis anterior y el órgano terminal (80).

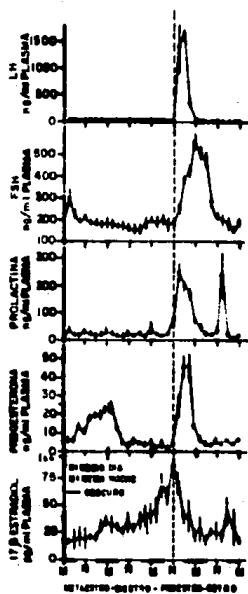


FIG. 4 Variación de las concentraciones de las hormonas ováricas y gonadotrofinas hipofisiarias a lo largo del ciclo sexual de la rata (81).

transportado a lo largo del oviducto, experimentando varias divisiones celulares hasta el estado de mórula durante los primeros 3 ó 4 días después de la fertilización. Al entrar la mórula al útero, se forma la cavidad del blastocele y hay diferenciación de su masa celular en el macizo interno y el trofoblasto. En esta forma, los blastocistos se distribuyen a lo largo de la cavidad uterina, por un mecanismo de contracción del útero, iniciándose una serie de interacciones blastocisto-útero que culminan con la implantación.

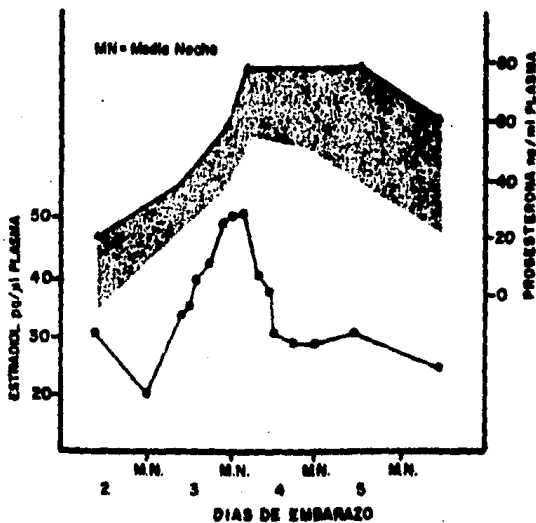
Cuando el óvulo es fecundado, el ciclo sexual se detiene en el diestro debido a una concentración alta y constante de progesterona que será mantenida hasta los últimos días del embarazo (13). Sin embargo, para que la implantación ocurra, se requiere de una alza en los niveles de estrógenos 24 horas antes (6) (Fig.5).

El tiempo que transcurre, desde la ovulación hasta el momento inmediato anterior en que el blastocisto establece contacto con el endometrio, recibe el nombre de período de preimplantación (14).

Entre las condiciones previas que son necesarias para que se verifique la implantación, destacan los cambios endometriales tanto morfológicos como funcionales, los cuales están regulados por factores hormonales (7) y locales, como son la presencia del espermatozoide en el tracto genital de la hembra (15) o del huevo después de la fertilización (16).

Los cambios endometriales son variables, según la

FIGURA 5 NIVELES PLASMATICOS DE 17β ESTRADIOL (\blacklozenge) Y PROGESTERONA (\blacktriangle) DURANTE LOS PRIMEROS DIAS DE EMBARAZO EN LA RATA (5,6)



especie y dependen del período que el blastocisto permanece libre en el útero antes de implantarse (16) (Cuadro I).

En la mayoría de los mamíferos, el transporte del huevo a través del oviducto dura de tres a cuatro días.

Concomitante con los cambios endometriales debidos a la influencia hormonal, el blastocisto también permanece varios días en el tracto genital de la hembra antes de su implantación, lo que le permitirá posteriormente interaccionar con la pared de las células del endometrio (17).

Se ha demostrado en animales de laboratorio (conejos, ratas, hamsters y ratones), que no todo el endometrio es capaz de recibir al huevo, y que existen sitios especializados de implantación (18), requiriendo estas zonas una maduración metabólica.

Durante la maduración, las microvellosidades del epitelio luminal disminuyen en algunas zonas, considerándose que esta modificación facilita la interacción con el huevo (9), ya que al aumentar la superficie endometrial, se incrementa la superficie de adhesión. Se sabe que este hecho se debe fundamentalmente a la influencia de la progesterona (19).

También se presentan variaciones en la concentración y composición de las secreciones endometriales excretadas hacia la luz uterina que influyen tanto en el transporte de gametos como en la fertilización y que fa-

CUADRO 1.- TIEMPO DE TRANSPORTE DEL CIGOTO A TRAVES DEL OVIDUCTO E IMPLANTACION

ESPECIE ESTUDIADA	TRANSPORTE EN EL OVIDUCTO* (DIAS)	IMPLANTACION (DIAS)
Marsupiales	1	Inmediata
Insectívoros	1 - 2	?
Quirópteros (murciélagos)	12 - 16	10-16
Primates	4 - 5	8-9
Hombr	3 - 4	6-7
Roedores		
conejo	3 - 4	6-7
ratón	3 - 4	5-6
rata	4	5-6
hamster	3 - 4	4
cuyo	3 - 4	6
Camívoros		
perro	4 - 5	11-12
gato	6 - 7	13-14
Ungulados		
caballo	?	49-63
cerdo	2 - 3	11-20
oveja	2 - 3	15-17
vaca	4	40

* Tiempo necesario para que se verifiquen los cambios morfológicos y funcionales del endometrio (fase de preimplantación). (14,16)

cilitan el desarrollo del huevo e influyen en algunos aspectos de la diferenciación endometrial (20). Estas secreciones representan una fuente de metabolitos que van a nutrir al blastocisto, además de permitir su desplazamiento en la proximidad del tejido endometrial.

Durante el período de preimplantación en los mamíferos, hay una dependencia del blastocisto por los sustratos maternos producidos y excretados por el oviducto y el útero, siendo esta correlación regulada hormonalmente (21).

Las hormonas pueden también producir cambios en el patrón de proteínas del útero (22,23).

En 1955 Lutwak-Mann (24) aportó evidencias experimentales que permitieron considerar la importancia de las enzimas endometriales en los procesos reproductores así como el considerar la dependencia hormonal de ellas.

Además de los cambios cualitativos y cuantitativos que se observan en el patrón de las proteínas relacionadas con la implantación (23) y el considerar las actividades enzimáticas del endometrio en la etapa de preimplantación (25), existen otros factores que son necesarios para que se lleve a cabo la implantación:

- a) En la rata, así como en otras especies de mamíferos, durante la fase final de la preimplantación, se presenta un incremento en la permeabilidad vascular en los sitios de implantación del endometrio (6,7) entre 20 y 24 horas antes

de la implantación. Este incremento está regulado hormonalmente y se considera un prerrequisito para que pueda efectuarse la diferenciación decidual de las células estromales.

- b) Se ha mencionado que los estrógenos tienen una acción reguladora sobre diversas enzimas uterinas; entre las que destaca la adenilatociclasa que cataliza la formación del adenil monofosfato cíclico (AMPc) el cual tiene un efecto similar al efecto anabólico del estradiol en el útero de la rata, ya que estimula la síntesis del ácido ribonucléico y de las proteínas, lo cual produce un aumento de la actividad de algunas enzimas lo que facilita tanto la gluconeogénesis como la lipogénesis, de acuerdo a la información colectada por Hicks y col. (14).
- c) También, regulado por esteroides sexuales, se encuentra la síntesis del ácido N-acetil neuramínico o ácido siálico, responsable en gran parte de la carga de la superficie de las membranas celulares, lo que permite hacer la consideración de que el ácido siálico juega un papel muy importante en la interacción entre el blastocisto y el endometrio (26,27).

Reacción Decidual.

El blastocisto, al encontrarse frente al endometrio, lleva a cabo una serie de interacciones con él, ocasionando un estímulo decidualizante.

Actualmente se acepta que la reacción decidual es un proceso de diferenciación celular del estroma endometrial en células cúbicas llamadas células deciduales las cuales intervienen en la nutrición embrionaria.

Se ha considerado la importancia que tienen las hormonas ováricas circulantes en la inducción de la respuesta decidual: la progesterona tiene como objetivo desviar el efecto mitogénico que producen los estrógenos en las células epiteliales.

El proceso de decidualización se realiza en varias etapas:

1.- Efecto de la presencia del blastocisto. Se cree que el estímulo es ocasionado por la presión que ejerce el blastocisto sobre el epitelio luminal adyacente a él (29). También se ha sugerido, que éste es ocasionado por la secreción del blastocisto de sustancias inductoras como son los estrógenos y el dióxido de carbono (CO_2) que se forma durante la respiración celular.

El estímulo dado por el blastocisto induce un cambio físicoquímico en la superficie del epitelio luminal, que se traduce en una serie de cambios metabólicos de

las células epiteliales, esta respuesta se presenta antes del inicio de la transformación de las células estromales a deciduales (Fig.6). Este proceso es hormonodependiente (28).

Las respuestas endometriales, características de la decidualización pueden cambiar considerablemente de especie a especie, siendo un común denominador la respuesta vascular. Dickman y col (30) sugirieron que los estrógenos provenientes del blastocisto, son los responsables del aumento en la permeabilidad vascular endometrial en las áreas adyacentes a él.

2.- Transformación. El desarrollo completo de la respuesta decidual que requiere varios días, da como resultado una organización celular de una estructura altamente especializada, la cual rodea al embrión que está próximo a implantarse.

3.- Regresión. La progesterona es esencial para mantener la decidua y en ausencia de dicha hormona se inicia una degeneración de las células deciduales.

4.- Función. La aparición de la célula decidual parece tener dos posibles objetivos funcionales: 1) la nutrición del embrión y 2) la protección del útero de la invasión del trofoblasto (28).

Implantación.

Uno de los eventos críticos en el embarazo es la

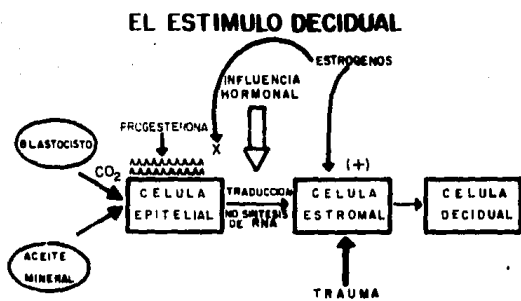


FIG. 6 La reacción decidual (31).

fijación del blastocisto al endometrio para iniciar en ese momento los procesos de implantación. Se define la implantación como la etapa donde el blastocisto adopta una posición fija en el endometrio.

El inicio del período de implantación (31) se considera el momento en el cual es posible detectar una diferencia morfológica y funcional entre las áreas del útero receptivas al blastocisto (sitios de implantación) (32,33) y el resto del tejido endometrial.

Se distinguen varias etapas en la secuencia de eventos que permitirán la posición fija del huevo (34) (Fig. 7).

1.- Orientación. Involucra la localización por el blastocisto de los sitios de implante que parecen ser de terminados por el mismo endometrio. La vascularización es un factor importante en la elección del sitio de implantación (35,36).

2.- Contacto. El contacto del blastocisto al endometrio es una condición necesaria para que se lleve a cabo la implantación. Se ha sugerido la existencia de varios procesos consecuentes al contacto, entre los que se incluyen dependiendo de la especie: el envolvimiento del blastocisto por el útero, expansión del blastocisto o contracción del mismo (18,31,37). Durante el envolvimiento se presenta un edema endometrial, causado por el incremento en la permeabilidad de los vasos, lo cual facilita la extravasación de proteínas (31,32) y otras ma-

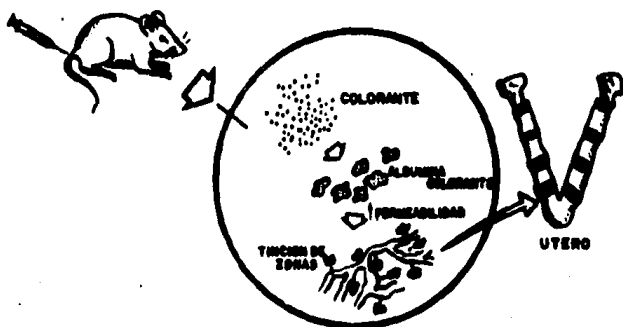
cromoléculas como es el caso de colorantes de alto peso molecular: azul de pontamina, azul de Giegy o azul de tripan (31,38,39,40) utilizados como marcadores de los sitios de implantación, siendo visibles macroscópicamente al presentarse en forma de bandas azules colocadas transversalmente en el útero (Fig.8).

3.- Adhesión. Poco se conoce de esta etapa, pero se acepta una relación estrecha con los posibles cambios moleculares de los componentes de superficie (19). Se ha considerado la adición progresiva de materiales en la superficie del trofoblasto que lo hacen más adhesivo y menos polar, simultáneamente el huevo induce la remoción de moléculas superficiales del endometrio como son las glicoproteínas de la membrana, quedando expuestas moléculas con carga apropiada, que permitirán una interacción lo que constituye el foco de adhesión.

4.- Penetración o fusión. En esta etapa el trofoblasto puede ser integrado al epitelio endometrial, por medio del mecanismo llamado " fusión del huevo " con una o más células del epitelio uterino, estableciendo una subsecuente comunicación citoplasmática. En la actualidad solo hay evidencia de fusión en el conejo (37).

Ya que el proceso total de la implantación se encuentra regulado hormonalmente, se requiere una sincronía entre la secreción de la progesterona y los estrógenos y el arribo del blastocisto a la cavidad uterina para que el huevo no encuentre un útero refractario a su invasión.

FIGURA 8 METODO PARA DETERMINAR ZONAS DE IMPLANTACION



Método para determinar zonas de implantación. Los colorantes de alto peso molecular (Azul tripan, Azul de Evans, etc) forman complejos con la albúmina sérica, los cuales atraviesan la pared capilar y se acumulan en zonas de alta permeabilidad; esto nos permite distinguir las zonas de implantación del resto del útero.

En las últimas décadas se ha dado una marcada atención a la función que desempeñan los esteroides sulfato como intermediarios en la biosíntesis de hormonas biológicamente activas.

El metabolismo de los esteroides sulfato se detalla en el anexo.

La función de los estrógenos sulfato como intermediarios potenciales en la biosíntesis de la estrona (E_1) y del 17β -estradiol (E_2) ha sido determinada a través de estudios *in vivo* (42,43,44).

La hidrólisis del estradiol sulfato para formar el estrógeno más potente, el 17β - E_2 , parece estar regulada localmente por acción de la estrógeno sulfatasa (42, 45).

Adessi y col (46) en sus experimentos *in vivo* e *in vitro* utilizando E_1 y E_2 y sus respectivos 3-sulfatos han aislado repetidamente el 17β - E_2 del útero de cuyas embarazadas. La acción de la 17β -hidroxiesteroide-oxidoreductasa, y de la sulfatasa conducen a la síntesis del 17β - E_2 a partir de E_1S y E_2S (42). En los experimentos *in vivo* se ha encontrado que los estrógenos del plasma materno no contribuyen al total de los estrógenos fetales, sino que el feto tiene la capacidad de sintetizarlos.

La sulfatación de los estrógenos ha sido asociada a la desactivación del esteroide. Sin embargo, Perry y col (47) han sugerido que en la cerda los estrógenos de

origen embrionario son sulfatados por el endometrio y transportados al cuerpo lúteo actuando como una señal embrionaria para el reconocimiento materno del embarazo ya que los estrógenos sulfatados ejercen un efecto luteotrófico (48).

Pack y Brooks (49) en su estudio de la actividad de la estrógeno sulfotransferasa, durante el ciclo sexual de la cerda, observaron que las actividades de la 17β -deshidrogenasa y de la estrógeno sulfotransferasa están directamente relacionados con la concentración plasmática de progesterona e inversamente relacionada con la concentración nuclear de estradiol (50).

La influencia de las progestinas en la actividad enzimática de la sulfotransferasa y en los niveles de los receptores nucleares a E_2 en el endometrio humano ha sido observado por otros autores durante el ciclo normal (51-56), por otro lado, Robertson y King (45) observaron que en la cerda en gestación los niveles plasmáticos de la progesterona tienden a declinar a medida que avanza la preñez, decreciendo bruscamente al final de la gestación. La estrona y el 17β -estradiol aparecieron en el plasma alrededor del último tercio del embarazo y de ahí se elevaron hasta alcanzar un nivel máximo justo antes del parto. La aparición de la E_1S plasmática se presenta el día 16 (57,58) alcanzando un máximo entre los días 23 y 30 del embarazo, declinando bruscamente un poco antes de la mitad y de ahí empieza a elevarse lentamente hasta alcanzar el nivel máximo el día anterior al parto. Estos autores han encontrado que la E_1S está presente en concentraciones altas en la vena uterina y en el fluido

alantóico el día 28 de embarazo, sugiriendo que la E_1S presente en el plasma materno en este tiempo proviene del concepto. Una situación similar se presenta en la oveja embarazada, en la que se observa que los estrógenos son sintetizados por el feto antes del día 30, siendo el principal la E_1S (59).

Dwyer y Robertson (60) confirmando los estudios de Pack y col (51) observaron, en el útero de cerda embarazada, que la actividad de la sulfotransferasa permaneció en un nivel elevado entre los días 20 - 30, mientras que por el día 80 cuando la actividad sulfatante declinó y la actividad hidrolítica aumentó, la concentración plasmática de E_1 fue mayor a la de E_1S (49). En contraste, en la oveja (60) antes del día 16 de embarazo se detectaron niveles muy bajos de E_1S en el plasma de la vena del útero (59), lo que puede asociarse con los bajos niveles de síntesis estrogénica durante este tiempo, mientras que en el día 90 la proporción de la concentración de E_1S a E_1 alcanzó entre 20:1 y 100:1. En la oveja (61, 62) al igual que en la cerda (51) se ha visto que existe una relación directa entre el nivel plasmático de la progesterona y un aumento en la actividad de la estrogeno sulfotransferasa endometrial.

Se ha demostrado que el metabolismo del $17\beta - E_2$ en el endometrio humano tiene un cambio cíclico bifásico durante el ciclo menstrual (52,53,63) siendo favorecida la reacción de oxidación de $17\beta - E_2$ a E_1 .

Hung Ching Liu y L. Tseng (64) en su estudio con células epiteliales y células estromales en endometrios

proliferativos y secretores humanos, encontraron que la conversión más alta de E_2 a E_1 se presentó en el endometrio secretor, siendo mayor en las células de las glándulas epiteliales. Sin embargo, la sulfotransferasa que posteriormente metaboliza ambos E_1 y E_2 para formar metabolitos sulfatados, solubles en agua fue sólo activa en las células de las glándulas epiteliales del endometrio secretor. En este estudio, también se observó que la formación de E_1S es competitiva con la de E_1 sólo a bajas concentraciones intracelulares de E_2 o E_1 equivalente al nivel plasmático de E_2 , lo que facilita grandemente la expulsión del estrógeno como E_1S y E_1 de estas células blanco.

Wise y col, encontraron cambios significativos en el metabolismo de estrógenos en el endometrio de coneja embarazada después de la ovulación, observando una disminución en la actividad de la estradiol deshidrogenasa lo que se traduce en una concentración menor de $17\beta-E_2$ y un aumento paralelo en la actividad de la sulfotransferasa. Dichas actividades parecen estar reguladas por hormonas ováricas (65).

Se sabe que el blastocisto puede ser mantenido en el útero por tiempos prolongados, sin implantarse, cuando hay una dominancia de progesterona circulante, y que la implantación puede llevarse a cabo con una inyección de estrógeno (66). La serie de eventos que se llevan a cabo por acción de los estrógenos y el papel de estos mismos en los procesos de implantación han sido hasta la fecha difíciles de determinar.

Dickman y col (30) han propuesto la hipótesis de que la implantación es inducida por los estrógenos sintetizados y secretados por el embrión preimplantado produciendo una acción local sobre el endometrio adyacente. Su hipótesis sugiere que el área del endometrio que rodea al blastocisto estará expuesta a la doble acción de los estrógenos circulantes y de los producidos por el embrión preimplantado.

En los trabajos de Ward (67) se ha descrito que los sitios de implante contienen una mayor concentración de E_2 que el tejido en donde no ocurre la implantación.

Ya que durante el proceso de implantación, la concentración de hormonas es muy importante, fue de nuestro interés estudiar como influyen la estrógeno sulfatasa y la estrógeno sulfotransferasa en los niveles locales de estrógenos activos durante la implantación en el útero de la rata.

MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron 40 ratas hembras vírgenes Long-Evans adultas, de dos a tres meses de edad con un peso de 200 ± 30 gr., las cuales se mantuvieron en condiciones de fotoperíodo y temperatura controlada, alimentadas con purina (rat chow) y agua "ad-libitum".

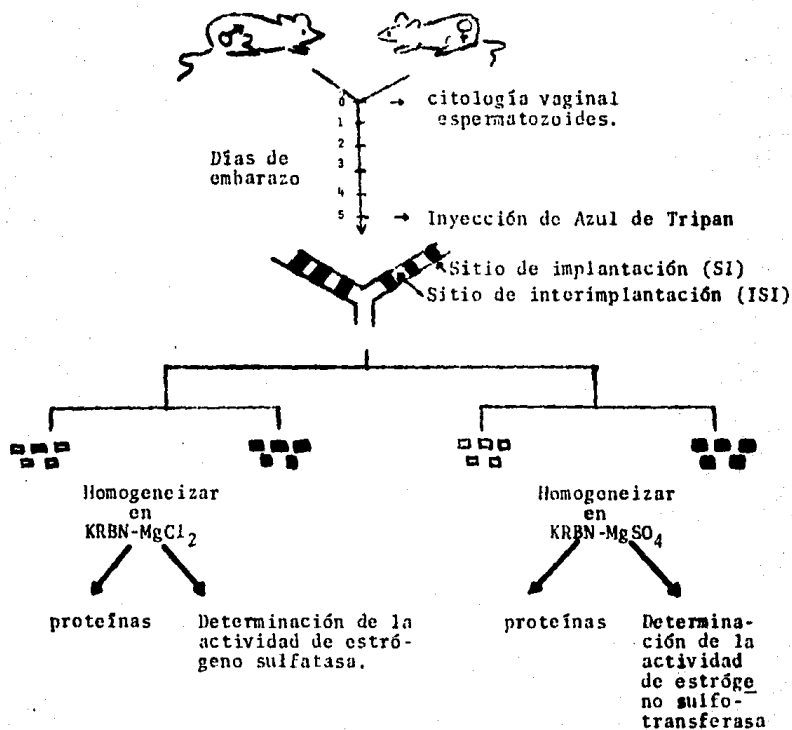
Las ratas fueron apareadas colocando, en cada jaula, dos hembras con un macho. Cada mañana se tomó una muestra del exudado vaginal de las hembras y se observó al microscopio, el día en el que se observaron espermatozoides en los frotis se consideró como día cero de embarazo (Fig 9). Para cada experimento se formaron grupos de 10 ratas cada uno.

Al quinto día de embarazo se les administró por vía intravenosa 1 ml de solución de azul de tripan al 1.5 % en solución de cloruro de sodio al 0.9 %, después de 30 minutos se sacrificaron por dislocación cervical y se perfundieron con la solución fisiológica a través de la arteria aorta. Los siguientes pasos fueron realizados sobre agua con hielo a 4°C.

Inmediatamente después se extrajeron los úteros a los cuales se les eliminó la grasa y el tejido conectivo. Cada útero se abrió por la mitad y se colocó en solución salina al 0.9 % fría, separándose posteriormente las zonas teñidas de azul que corresponden a los sitios de implantación del resto del tejido no implantado denominado intersitio de implantación.

FIG. 9

ESQUEMA METODOLOGICO



Los diferentes tejidos se pesaron y homogeneizaron utilizando un homogeneizador y pistón de vidrio, en el amortiguador Krebs-Ringer-Bicarbonato pH 7.4 (Cuadro III) (el cual contenía nicotinamida 30 mM) (KRBN), en una proporción tal que 0.3 ml del homogenato correspondían a 60 mg. de tejido. El amortiguador utilizado para la determinación de sulfatasa contenía $MgCl_2$ y para la determinación de sulfotransferasa $MgSO_4$.

De los homogeneizados de sitio de implantación (SI) e intersitio de implantación (ISI) se tomaron alícuotas tanto para las determinaciones enzimáticas, como para las de proteínas.

Reactivos:

La estrona [$6,7 - ^3H$ (N)] con actividad específica de 208.33 μ ci/ μ m y la estrona sulfato, sal de sodio [$6,7 - ^3H$ (N)] con actividad específica de 147.06 μ ci/ μ g, fueron obtenidos de New England Nuclear Corp. (Boston, MA.).

La estrona (E_1), estradiol (E_2), estrona sulfato (E_1S) y estradiol sulfato (E_2S) no marcados y todos los demás reactivos utilizados, se obtuvieron de Sigma Chemical Co. St. Louis, MO.

Todos los solventes utilizados fueron bidestilados.

CUADRO III. SOLUCION DE KREBS-RINGER-BICARBONATO
CONCENTRADA

COMPUESTO	CONCENTRACION	CONCENTRACION
	gr/100 ml	Molar
NaHCO ₃	5.460	0.650 M
KCl	0.920	0.123 M
NaCl	18.000	3.103 M
CaCl ₂	0.720	0.095 M
* MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.764	0.031 M
**Mg Cl ₂	0.629	0.066 M

Para preparar la solución de trabajo, se tomaron 4 ml de cada solución y se diluyeron con 90 ml de agua bi-distilada, se ajustó el pH a 7.4 y se aforó a 100 ml como volumen final.

- * Se utilizó para la determinación de Estrógeno Sulfo-transferasa.
- ** Se utilizó para la determinación de Estrógeno Sulfatasa.

Para la determinación enzimática, de la estrógeno sulfatasa, se usó el método descrito por Burstein y Dorfman (68), modificado por Domínguez y col (69). El método consiste en incubar a 37°C una alícuota del homogeneizado con una cantidad conocida de la estrona sulfato tritiada que es el sustrato de la enzima. El producto de la reacción enzimática es la estrona libre radiactiva, que se extrae del medio de incubación mediante una partición simple con un líquido de centelleo que consiste en 50 mg de POPOP [1,4 bis 2- (5-fenil oxazolil) benceno] y 4 gr de PPO [2, 5 difenil oxazol] por litro de tolueno bidestilado. El esteroide no hidrolizado permanece en la fase acuosa. Se mide la radiactividad presente en el líquido de centelleo y por diferencia con la cantidad incubada, se calculan los pmoles de producto liberado por acción de la sulfatasa presente en el tejido incubado durante el tiempo de incubación.

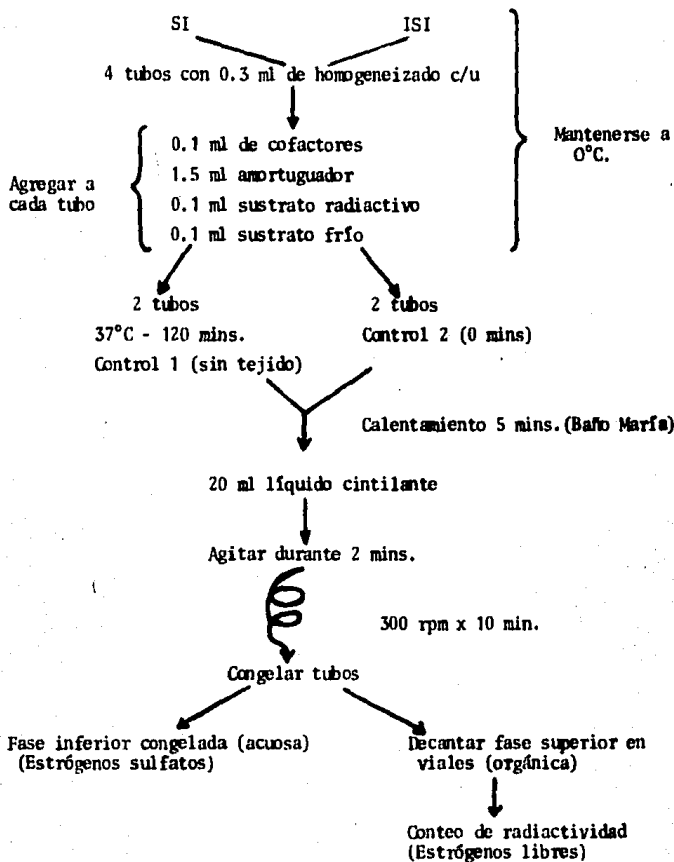
Para la determinación de la actividad de la sulfotransferasa se incubaron alícuotas del homogeneizado a 37°C, utilizando como sustrato una cantidad conocida de estrona libre radiactiva. Para la extracción de los esteroideos libres se utilizó el método descrito anteriormente con líquido de centelleo. En este caso la cantidad de estrógenos libres corresponde al sustrato no transformado. Una vez extraídos los libres del medio se procedió a hacer una extracción con acetato de etilo de la fase acuosa que contenía a los estrógenos sulfatados por la acción de la sulfotransferasa. Se contó la radiactividad presente y en base a ella se calculó la actividad de dicha enzima.

La identificación y cuantificación de los esteroides transformados por cada una de las enzimas estudiadas se realizó mediante cromatografía en capa fina.

Para cada determinación enzimática se utilizaron dos concentraciones de sustrato 30 pmolas (masa caliente) y 80 nmolas (ajustado con masa fría).

En los experimentos correspondientes a la sulfatasa (Fig.10) se colocaron por separado 4 alícuotas de 0.3 ml (60 mg de tejido) de cada homogeneizado (SI e ISI) en tubos de centrifuga, un quinto tubo al cual no se le adicionó tejido se usó como control (los tubos fueron mantenidos sumergidos en agua con hielo). A cada tubo se le adicionaron como cofactores 0.1 ml de ATP (1.6 mM) y 0.1 ml de NAD^+ (3.0 mM). Después se agregaron 1.5 ml de amortiguador KRBN con MgCl_2 . Como sustrato se utilizó 0.1 ml de una solución etanólica de estrona sulfato radiactiva E_1SH^3 con una actividad específica de 147 uci/ μgr . En los casos en que se usaron 80 nmolas de sustrato la masa se ajustó con estrona sulfato fría E_1S contenida en 0.1 ml de etanol. Dos de los cinco tubos de cada homogeneizado y el que no contenía tejido se colocaron en un incubador metabólica Dubnoff a 37°C durante 120 minutos. Al término de este tiempo se detuvo la reacción enzimática por calentamiento de los tubos en baño maría a temperatura de ebullición durante 5 minutos. Los dos tubos no incubados se usaron como segundo control deteniendo la reacción inmediatamente por calentamiento como se indicó anteriormente.

FIG. 10 DETERMINACION DE ESTROGENOS LIBRES



En los experimentos realizados para determinar la actividad de la sulfotransferasa (Fig.10) se colocaron también por separado cuatro alícuotas de 0.3 ml (60 mg de tejido) de cada homogeneizado (SI e ISI) en tubos de centrifuga (mantenidos sobre agua con hielo). En este caso se adicionó como cofactor únicamente 0.1 ml de ATP (1.6 mM) a cada tubo. Como sustrato se utilizó 0.1 ml de una solución etanólica de estrona libre radiactiva E_1H^3 con una actividad específica de 208.33 $\mu\text{ci}/\mu\text{gr}$. Cuando se utilizaron 80 nmolas de sustrato la masa se ajustó con estrona libre fría contenida en 0.1 ml de etanol. Dos de los cuatro tubos de cada homogeneizado se colocaron en el incubador metabólica Dubnoff a 37°C durante 120 minutos, junto con un tercer tubo que no contenía tejido, al cabo de este tiempo la reacción se detuvo en la misma forma que para la sulfatasa, en los dos tubos restantes (no incubados) que sirvieron como controles la reacción se detuvo inmediato a la adición del sustrato.

La extracción de los esteroides libres por el método de Burstein y Dorfman se realizó en la misma forma para ambas determinaciones. Cuando los tubos alcanzaron la temperatura ambiente, el volumen original del medio de incubación 2.2 ml se ajustó a 5 ml con agua desionizada. Posteriormente se añadieron a cada tubo 20 ml de líquido de centelleo, se agitaron en un super mixer durante 2 minutos y se centrifugaron a 3 000 rpm durante 10 minutos, en una centrifuga internacional modelo UV. Al cabo de este tiempo, la fase orgánica o líquido de centelleo se separó completamente de la fase acuosa inferior que contenía a los esteroides sulfatados. Aprovechando los diferentes puntos de congelación de los sol-

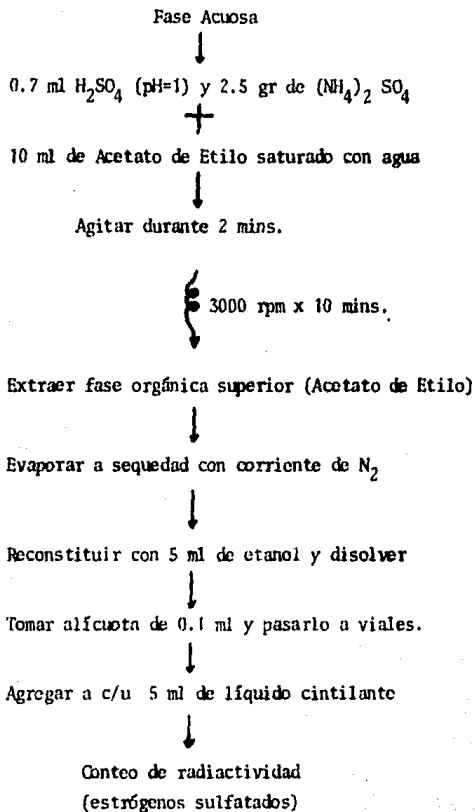
ventes agua y tolueno, se guardaron los tubos en un congelador durante una noche, sólo la fase acuosa se mantuvo congelada, se decantó el líquido de centelleo (fase superior) en el cual se encontraban los esteroides libres. Esto se repitió una vez más para asegurar que todos los estrógenos en forma libre habían sido extraídos. La radiactividad de ambas extracciones se midió en un espectrofotómetro de centelleo líquido (United Technologies Packard, Packard Tri-Carb 460) y en base a ella se calcularon los pmoles de esteroide libre presente.

En el caso de la sulfatasa en base a la radiactividad medida se calculó la cantidad de esteroides libres formados a partir de la E_1SH^3 , que es proporcional a la actividad de la estrógeno sulfatasa uterina.

Para la sulfotransferasa la E_1H^3 presente en el líquido de centelleo representa al sustrato no transformado. El producto de la reacción enzimática, los esteroides sulfatados que se encuentran en la fase acuosa (Fig. 11), se extrajo, después de descongelar los tubos. El pH se ajustó a 1 con 0.7 ml de H_2SO_4 1N y se agregaron 2.5 gr de $(NH_4)_2 SO_4$ (51) para facilitar la transferencia de los esteroides sulfatos al solvente. Se hicieron dos extracciones por partición simple con 10 ml de acetato de etilo saturado con agua, cada una, se agitaron los tubos en un super mixer por 2 minutos, se centrifugaron a 3 000 rpm durante 10 minutos y se extrajo la fase orgánica superior (acetato de etilo saturado con agua). El extracto se evaporó a sequedad con corriente de nitrógeno, colocando los tubos en baño maría (temperatura no mayor a $60^\circ C$), se reconstituyó con 5 ml de etanol, se agitó por 2 minutos en el super mixer, se colocó

FIG. 11

ESQUEMA METODOLOGICO

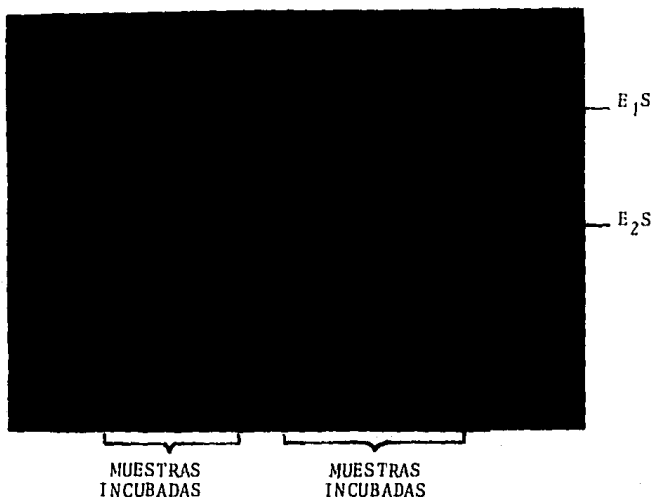


una alícuota de 0.1 ml de cada tubo en viales, a los cuales se adicionaron 5 ml de líquido centilante y se contó la radiactividad presente en un espectrofotómetro de centelleo líquido. En base a la radiactividad medida se calculó la cantidad de esteroides sulfatados a partir de E_1H^3 , la cual es proporcionar a la actividad de la estrógeno sulfattransferasa uterina.

La identificación y cuantificación de los esteroides formados en ambas reacciones enzimáticas se llevó a cabo mediante el método de cromatografía en capa fina. Las placas de sílica gel utilizadas para la cromatografía fueron de 0.2 mm de espesor, Merck. Los estándares preparados con los compuestos fríos fueron colocados en forma paralela en las orillas y en el centro (Fig.12).

Para los esteroides libres (actividad de sulfatasa) el sistema de solventes utilizado en la cromatografía fue cloroformo-metanol 97:3) En uno de los experimentos de sulfatasa, las extracciones se realizaron con tolueno (solvente del líquido de centelleo) para poder recuperar a los esteroides libres y someterlos a identificación por medio de la cromatografía. El extracto de tolueno se evaporó a sequedad con corriente de nitrógeno, colocando los tubos en baño maría (temperatura no mayor a 60°C), se reconstituyó con 5 ml de etanol, se agitó por 2 minutos en un super mixer y se colocaron alícuotas de 0.1 ml de cada tubo en viales, a los cuales se adicionaron 5 ml de líquido de centelleo y se contó la radiactividad, en base a la cual se calculó la cantidad de esteroides libres formados por acción de la sulfatasa. El resto del contenido de etanol de cada tubo se volvió a evaporar a sequedad siguiendo el método mencionado. Ya

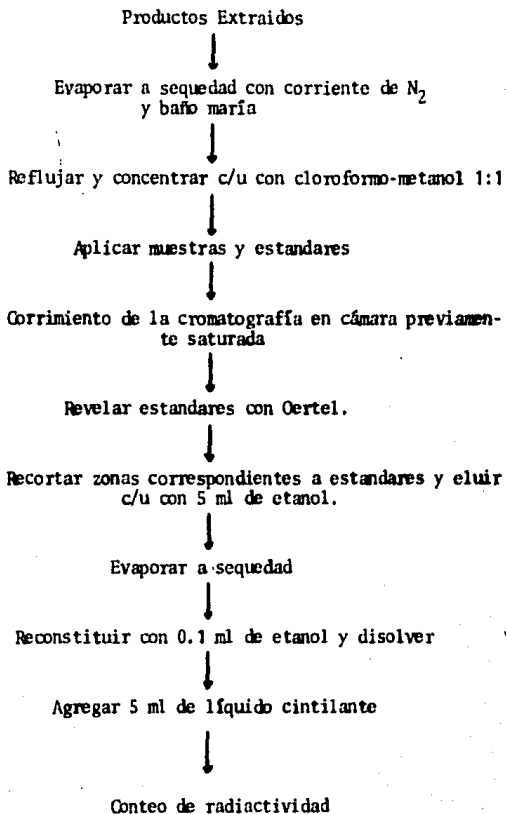
Fig. 12 Separación cromatográfica de los estrógenos sulfatos formados por acción de la sulfotransferasa durante las incubaciones



Sistema de Solvente: cloroformo-acetona-ácido acético
(105:40:6)

secos los tubos, se reflujaaron 3 veces (con 1.5 ml, 0.5 ml y 0.1 ml de cloroformo-metanol 1:1 respectivamente) con objeto de concentrar las muestras en el fondo de cada tubo. La última adición de 0.1 ml de cloroformo-metanol 1:1 sirvió como vehículo para aplicar cuantitativamente las muestras en los espacios correspondientes de la placa. Se contó la radiactividad que quedó en el tubo y la pipeta respectivas para ser restada de la cantidad aplicada. Como estándares se utilizó una mezcla que contenía 20 μ l de una solución etanólica de E_1 (concentración 2 mg/ml) y 20 μ l de una solución etanólica de E_2 (concentración 2 mg/ml). Su pureza fue comparada mediante cromatografía en capa fina con estándares recientemente purificados (Fig.12). Los estándares se aplicaron en las orillas y en el centro de la placa. Una vez aplicados muestras y estándares, la placa se colocó dentro de la cámara de cromatografía que había sido previamente saturada con cloroformo-metanol (97:3) y se dejó desarrollar; las áreas correspondientes a los estándares se revelaron con el reactivo de Oertel-Eiknes (2 volúmenes de H_2SO_4 concentrado con 1 volumen de etanol destilado) cubriendo perfectamente las muestras para evitar su descomposición. Las zonas en donde se localizaron los estándares de las tres columnas se marcaron, se unieron y se cortaron las áreas de las muestras correspondientes a cada estándar, se eluyeron con 5 ml de etanol sobre viales, los cuales se evaporaron a sequedad, se les adicionó 0.1 ml de etanol para disolver la muestra seca y finalmente se agregaron 5 ml de líquido de centelleo a cada uno, se contó la radiactividad de cada vial y en base a ella se calculó la cantidad de E_1 y E_2 encontrada en cada muestra (Fig. 13).

FIG. 13 ESQUEMA METODOLOGICO



Para los esteroides sulfatos el sistema de corrimiento utilizado fue cloroformo-acetona-ácido acético (105:40:6). En este caso los tubos que contenían los esteroides sulfatos se sometieron al mismo tratamiento para ser aplicados que los estrógenos libres. Como estandares se utilizaron 20 μ l de una solución etanólica de E_1S (2 mg/ml) y 80 μ l de una solución etanólica de E_2S (0.5 mg/ml) (Fig.12), por lo que la radiactividad encontrada se relacionó a la estrona y estradiol sulfatados por acción de la estrógeno sulfotransferasa.

Para la identificación de la E_1S obtenida en las cromatografías se tomaron al azar alícuotas de los eluatos de dos tubos correspondientes a E_1S y en la 1a. cristalización, se adicionaron a cada uno 20 mg de estándar de E_1S fría, se disolvieron en etanol destilado, se filtraron, se evaporó el solvente hasta un volumen en donde se observó la formación de microcristales, se dejaron desarrollar éstos durante 1 hora, posteriormente se separaron las aguas madres de los cristales y éstos se secaron a 60°C con vacío. Una muestra de los cristales secos se pesaron, se colocaron en un vial, se agregaron 2 gotas de etanol con objeto de disolver el compuesto, se agregaron 10 ml de líquido centellante y se determinó la radiactividad presente en la muestra.

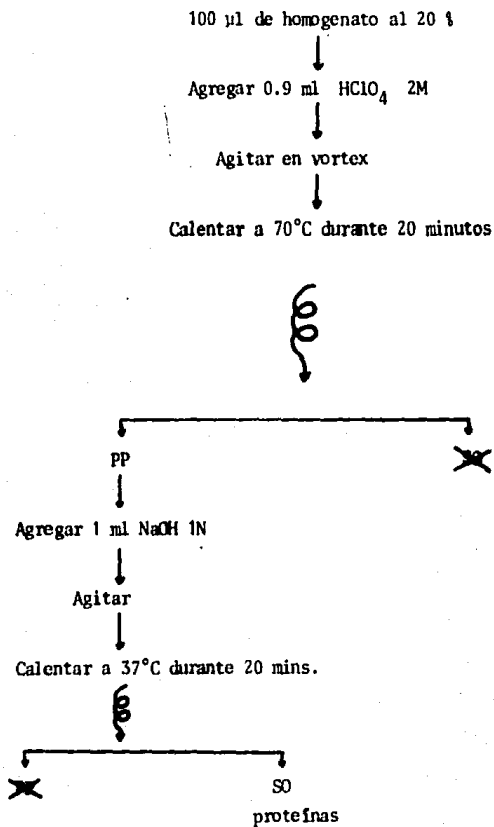
La actividad específica se calculó dividiendo los dpm obtenidos entre los mg de la muestra correspondiente.

Para la segunda cristalización se disolvieron los cristales en etanol y se siguió el procedimiento idéntico al anterior.

La 3a y 4a. cristalizaciones se llevaron a cabo utilizando una mezcla de solventes constituida por cloroformo-metanol en una proporción de 1:1.

Una vez hechas las determinaciones se procedió a cuantificar proteínas en cada tejido (Fig.14).

FIG. 14 ESQUEMA METODOLOGICO PARA DETERMINACION DE PROTEINAS



Determinación de Proteínas.

Para la cuantificación de proteínas se utilizó el método de Lowry (70).

Reactivos:

Solución a: Na_2CO_3 al 2 % y tartrato de sodio al 0.02 % en NaOH 0.1 N.

Solución b: Cu SO_4 al 0.5 % en agua desionizada.

Solución c: (cuproalcalina): Mezclar 50 ml de la solución a con 1 ml de la solución b. Preparar al momento de usarse.

Solución d: Reactivo de Folin Ciocalteau diluido en una relación de 1.1 ml de reactivo con 1.4 ml de agua bidestilada.

Método:

Se tomaron 100 μl de la fracción proteica y se llevaron a un volumen final de 500 μl con agua destilada, adicionándose 2.0 ml del reactivo c. Se dejó reposar 10 minutos, agregando después 0.2 ml de solución d, mezclando y dejando reposar 20 minutos, para después leer la absorción a 550 nm en un espectrofotómetro UV Pye Unicam SP6-500.

Curva Estandar:

Se prepara una solución estandar de albúmina bovina

liofilizada (Sigma) al 30 % en agua destilada a una concentración final de 0.3 mg/ml. Para construir la curva patrón se lee la absorción de seis concentraciones de albúmina bovina por duplicado a 550 nm en un espectrofotómetro UV Pye Unicam SP6-500.

Evaluación Estadística:

Se utilizó la prueba de " t de Student" en un ensayo unilateral para evaluar si existía una diferencia significativa en la actividad de la estrógeno sulfatasa al comparar el sitio de implantación (SI) con el útero no implantado (ISI) tomando como nivel de confianza $P < 0.05$ para 30 pmolas y 80 nmolas de sustrato. La misma comparación se realizó para la estrógeno sulfotransferasa utilizando en este caso un nivel de confianza de $P < 0.005$ para 30 pmolas de sustrato y $P < 0.05$ para 80 nmolas de sustrato.

Los cálculos se realizaron empleando las siguientes fórmulas (78):

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sigma \sqrt{\frac{1}{N_1} + \frac{1}{N_2}}}$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{N_1 s_1^2 + N_2 s_2^2}{N_1 + N_2 - 2}}$$

RESULTADOS

Actividad de la estrógeno sulfatasa en útero de rata en el día de la implantación.

Corroborando los estudios anteriores realizados en este laboratorio por Loza y Hicks, en la mayoría de los experimentos individuales se observó un aumento en la actividad de la estrógeno sulfatasa en el útero no implantado (ISI) con relación al sitio de implante (SI) cuando fueron probadas dos concentraciones diferentes de sustrato (30 pmolas y 80 nmolas de E_1S). El incremento del promedio en la actividad enzimática de la sulfatasa que se obtuvo en ISI con relación al SI fué del 21 % y 19 % para las 2 concentraciones de sustrato estudiadas (Cuadro V). Aunque el análisis estadístico de los resultados mostró que el incremento en la actividad de la enzima en ISI no fué significativamente mayor al SI ($P < 0.05$), esto puede deberse a que tanto en este trabajo como en otros reportados en la literatura por diversos autores (79,64) no existe una constancia en la actividad de la estrógeno sulfatasa.

Actividad de la estrógeno sulfotransferasa en el útero de rata en el día de la implantación.

Los criterios que se emplearon para establecer la identidad de la estrona sulfato (E_1S) formada por acción de la sulfotransferasa fueron:

CUADRO V. ACTIVIDAD DE ESTROGENO SULFATASA EN UTERO DE RATA EN EL DIA DE LA IMPLANTACION.

E ₁ SH ³ ADICIONADA	E ₁ H ³ liberada (pmolas/mg prot./h)		INCREMENTO
	SI	ISI	
30 pmolas	—	—	
	1.624	1.734	
	1.471	1.987	
	1.315	1.612	
	$\bar{X} = 1.470 \pm 0.154$	$\bar{X} = 1.777 \pm 0.191$	
80 nmolas	3,532	4,583	
	3,177	2,587	
	2,445	2,468	
	1,922	2,306	
	$\bar{X} = 2,519 \pm 706$	$\bar{X} = 2,986 \pm 1070$	

Los valores \bar{X} representan el promedio de 4 experimentos (10 úteros por experimento) \pm D.E.

- 1.- La movilidad que tuvo el compuesto cuando se desarrolló el cromatograma fué idéntica a la del estandar de estrona sulfato fría (E_1S fría), que se corrió dentro de la misma placa en forma paralela (cuadro IX y X).
- 2.- Cristalizaciones sucesivas a actividad específica constante (cuadro XI).

Los resultados obtenidos cuando se midió la actividad de la estrógeno sulfotransferasa en SI e ISI fueron inversos a los encontrados para el caso de la estrógeno sulfatasa, la actividad enzimática de la sulfotransferasa en la mayoría de los casos fué mayor en el SI que en el resto del útero a ambas concentraciones de E_1 utilizadas como sustrato 30 pmolas ($P < 0.005$) y 80 nmolas ($P < 0.05$). El incremento en la actividad de la enzima en los SI con respecto al ISI fué de 42 % y 43 % a las 2 concentraciones estudiadas (cuadro VI).

La actividad de la estrógeno sulfatasa en nuestro estudio siempre fué mayor que la de la estrógeno sulfotransferasa tanto en el sitio de implantación como en el resto del útero (cuadro VII) (Fig. 15), observándose un incremento mayor en el tejido uterino no implantado, lo que se correlaciona con mayor actividad de estrógeno sulfatasa y menor actividad de estrógeno sulfotransferasa en ISI. Una vez más los resultados muestran que con ambas concentraciones de sustrato 30 pmolas y 80 nmolas los valores son similares (cuadros VII y VIII).

CUADRO VI. ACTIVIDAD DE ESTROGENO SULFOTRANSFERASA EN UTERO DE RATA EN EL DIA DE LA IMPLANTACION.

E ₁ H ³ ADICIONADA	E ₁ SH ³ formada (pmolas/mg prot./h)		INCREMENTO
	SI	ISI	
30 pmolas	0.204	0.160	
	0.231	0.190	
	0.181	0.124	
	—	0.104	
	$\bar{X} = 0.205 \pm 0.025^*$	$\bar{X} = 0.144 \pm 0.038$	
80 nmolas	378	281	
	201	207	
	292	154	
	279	156	
	$\bar{X} = 287 \pm 72^{**}$	$\bar{X} = 199 \pm 59$	

Los valores \bar{X} representan el promedio de 4 experimentos (10 úteros por experimento) \pm D.E.

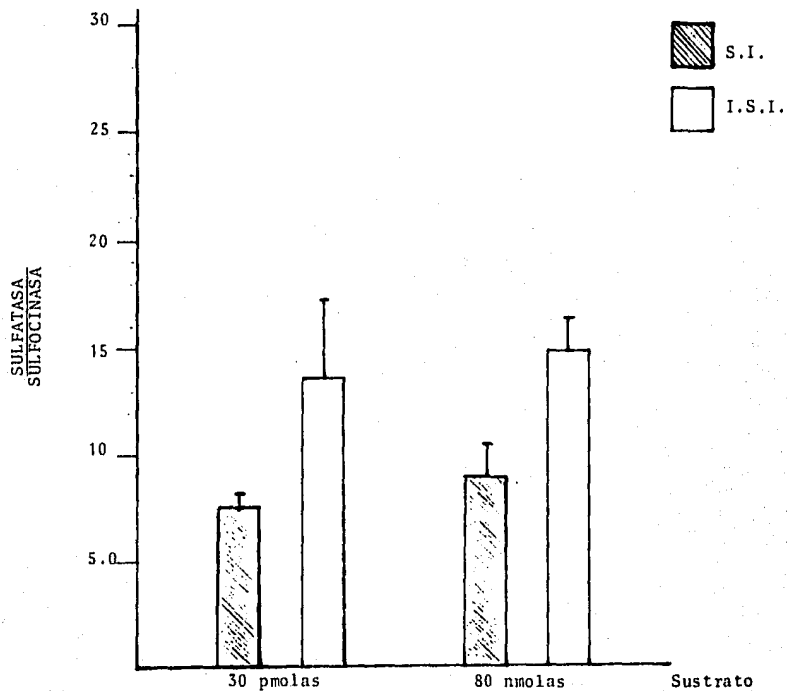
* P < 0.005 cuando se compara con ISI.

** P < 0.05 cuando se compara con ISI.

CUADRO VII. RELACION DE LAS ACTIVIDADES DE ESTROGENO SULFATASA Y ESTROGENO SULFOTRANSFERASA EN LA IMPLANTACION.

Sustrato	Sulfatasa/sulfotransferasa	
	S.I.	I.S.I.
30 pmolas	7.58 \pm 0.775	13.55 \pm 3.84
80 nmolas	8.85 \pm 1.66	14.89 \pm 1.73

FIG. 15. RELACION DE ACTIVIDAD DE LA ESTROGENO SULFATASA Y ESTROGENO SULFOTRANSFERASA EN EL DIA DE LA IMPLANTACION.



CUADRO VIII. RELACION DE ACTIVIDADES DE ESTROGENO SULFATASA Y ESTROGENO SULFOTRANSFERASA EN LA IMPLANTACION DE LA RATA.

SUSTRATO	S.I.			I.S.I.		
	E_1H^3 liberada ^a	E_1SH^3 formada ^b	Sulfatasa Sulfotransferasa	E_1H^3 liberada ^a	E_1SH^3 formada ^b	Sulfatasa Sulfotransferasa
50 pmolas	1.47 ± 0.154	0.205±0.025	7.58±0.775	1.777±0.191	0.144±0.038	13.55± 3.84
80 nmolas	2,519 ± 708	287± 72	8.85 ±1.66	2,986±1071	199± 59	14.89± 1.73

a) Actividad de sulfatasa: E_1H^3 liberada pmolas/mg prot./h.

b) Actividad de sulfotransferasa: E_1SH^3 formada pmolas/mg prot./h.

Los resultados de las cromatografías realizadas en 4 experimentos mostraron que el mayor estrógeno sulfatado tanto en SI como ISI fué la E_1S 82.34 % y 76.85 % respectivamente, en tanto que la concentración de E_2S correspondió a 9.85 % en SI y 8.8 % en ISI (cuadro IX). Como pudimos observar, la relación de E_1S/E_2S es semejante en ambos tejidos (cuadro X).

El cuadro XI muestra los resultados de las cristalizaciones que se realizaron a dos muestras de E_1S obtenidas por cromatografía para comprobar su identidad.

CUADRO IX. DETERMINACION DE LA CANTIDAD DE E₁S Y E₂S FORMADOS POR ACTIVIDAD DE LA ESTROGENO SULFOTRANSFERASA EN UTERO DE RATA EN EL DIA DE LA IMPLANTACION.

	S.I.		I.S.I.	
	E ₂ S (%)	E ₁ S (%)	E ₂ S (%)	E ₁ S (%)
30 nmolas	7.96	82.7	11.43	75.87
80 nmolas	11.75	81.92	6.15	77.76

Los valores representan el promedio de 4 experimentos (10 úteros por experimento).

CUADRO X. RELACION E_1/E_2 FORMADAS DURANTE LA INCUBACION CON
UTERO DE RATA EN EL 5o. DIA DE EMBARAZO.

	S.I.	I.S.I.
$\bar{X} E_1$	82.31 %	76.85 %
$\bar{X} E_2$	9.85 %	8.8 %
E_1 / E_2	8.35	8.73

CUADRO XI. IDENTIFICACION POR CRISTALIZACION DE DOS MUESTRAS CORRESPONDIENTES A ESTRONA SULFATO OBTENIDAS POR CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA.

CRISTALIZACIONES*

MUESTRA	1a. Etanol	2a. Etanol	3a. Cloroformo- metanol	4a. Cloroformo- metanol
Incubación 120min	222.1	149.7	129.0	134.7
Blanco	106.5	86.4	80.2	80.7

* dpm/mg muestra.

DISCUSION DE RESULTADOS

Desde el momento de la fertilización o a pocas horas después, el cigoto es capaz de sintetizar o de inducir la producción, en los tejidos vecinos, de una molécula capaz de funcionar como " la señal temprana de embarazo " e informar al ovario, el cual mantendrá las características hormonales acordes con el incipiente embarazo (71).

La sulfatación de estrógenos ha sido asociada comúnmente con la desactivación del esteroide como un medio de facilitar su excreción o transporte, ya que los sulfatos son solubles en fluidos biológicos. Sin embargo, Perry y col (47) han sugerido que en la cerda, los estrógenos de origen embrionario son sulfatados por el endometrio y transportados al cuerpo lúteo actuando como una señal embrionica para el reconocimiento materno del embarazo debido a que ejercen un efecto luteotrófico.

Otra evidencia de que los estrógenos sulfatos tienen una participación activa en el metabolismo de esteroides fue presentada por Goebelsmann y col(41) quienes en un estudio designado para investigar el metabolismo de estriol-3-sulfato, estriol-3-glucurónido y estriol-16-glucurónido en la mitad del embarazo encontraron que el estriol fue eliminado en mayor cantidad como el 3 y 16 glucurónido, mientras que la excreción del 3-sulfato fue limitada.

La función de los estrógenos sulfatos como intermedios potenciales en la biosíntesis de estrona y 17 β -

estradiol ha sido determinada a través de estudios *in vitro* (42,43,44). Se ha establecido en la actualidad que dichos sulfatos participan en el mecanismo de acción de las hormonas esteroides en órganos blanco con actividad de sulfatasa (42,45).

Pack y Brooks (42) encontraron en homogeneizados del útero de la rata que la presencia de E_1S ayuda a la captación de la E_1 por el tejido. Esta no es una propiedad desconocida ya que se ha demostrado previamente que los estrógenos sulfato pueden incrementar la acumulación celular de aminoácidos (72) y es posible también que ellos puedan afectar la absorción de nutrientes por el embrión en desarrollo.

En estudios realizados en úteros de cerdas preñadas (51) se encontró que el día en que se llevó a cabo la inseminación el grado de sulfatación fue muy bajo (42), posteriormente se elevó alcanzando un nivel máximo el día cinco de embarazo y esta actividad fue mantenida en los restantes 25 días estudiados dentro de los cuales ocurre la implantación.

Comparando el metabolismo del 17β -estradiol (E_2) en el útero de cerdas con ciclos normales (49) y en el útero de cerdas preñadas (51) se pueden observar ciertas relaciones: parece existir una influencia del nivel de progesterona plasmática en la iniciación y persistencia de la actividad de la estrógeno sulfotransferasa uterina que coincide con el nivel bajo continuo del receptor nuclear de estrógeno. Esta influencia ha sido observada en endometrio humano durante el ciclo normal por otros autores (55,56,73). También en coneja la actividad de

la sulfotransferasa está controlada por hormonas ováricas (65).

La sulfatación, junto con el aumento en la actividad de la estradiol-17 β -deshidrogenasa, puede ser el mecanismo por el cual el estrógeno es metabolizado y eliminado de la célula con el fin de prevenir la formación de receptor nuclear a E_2 permitiendo la formación del endometrio secretor, condición relacionada con la implantación (51). Una situación similar se presenta en las células epiteliales del endometrio humano (64).

La síntesis de estrógenos por el blastocisto de cerda (48,74) y oveja (59) en el embarazo temprano y la subsecuente elevación asociada en el nivel de E_1S plasmática materna (44,45,59) puede ser un requisito para iniciar localmente el proceso de implantación en el útero.

Los resultados del trabajo de Dwyer y Robertson (60) con úteros de cerda y oveja durante el embarazo sugieren que las actividades de la estrógeno sulfotransferasa y estrógeno sulfatasa en el endometrio pueden jugar un papel importante en determinar las concentraciones de los estrógenos no conjugados y sulfoconjugados presentes en los fluidos maternos y quizá en menor grado en los fetales durante el embarazo.

El sistema enzimático endometrial sulfotransferasa-sulfatasa en útero de cerda puede implicarse desde la capacitación espermática ya que la baja actividad de sulfotransferasa que se nota durante el período de estro e inmediatamente después de la ovulación puede permitir altas concentraciones de estrógenos no conjugados las cua-

les facilitan la capacitación espermática en el útero (65). Sin embargo, se ha observado que las altas concentraciones de estrógenos tienen un efecto adverso en la supervivencia fetal en el conejo (75). Así el incremento en la conjugación de estrógenos en el útero conforme el embarazo procede puede proporcionar un mecanismo de protección contra los efectos de una producción excesiva de estrógenos. En coneja, se sabe que la progesterona, estimula la proliferación endometrial alcanzando un máximo el día 7 y esto coincide con el día de la implantación. Los estrógenos, sin embargo, retrasan la proliferación endometrial (76), así que un aumento en la actividad de sulfotransferasa en el endometrio puede ayudar a mantener la dominación de la progesterona necesaria para la implantación y embarazo posterior (77).

La conjugación de estrógenos se ha observado en tejidos del cuerpo lúteo y estromal del ovario de coneja (65) y es posible que la sulfotransferasa y sulfatasa ováricas influencien el mantenimiento de la función lútea en esta especie.

Los resultados del presente estudio parecen indicar que en útero de rata en el día de la implantación la estrógeno sulfotransferasa presenta una actividad mayor en el sitio de implante que en el resto del útero no implantado (ISI). Observándose una tendencia contraria en la actividad de estrógeno sulfatasa, mayor en ISI que en SI. Estos resultados coinciden con los reportados anteriormente por Loza y Hicks en este laboratorio, quienes encontraron que la sulfatasa del sitio de implantación es inhibida por estrógenos secretados posiblemente por

el embrión preimplantado, regulándose así la producción de estrógeno libre, y señalaron la participación de esta enzima en el metabolismo endometrial del sitio de implantación.

El hecho de haber encontrado en este estudio que el área del endometrio correspondiente al tejido implantado muestra una tendencia a tener menor actividad de estrógeno sulfatasa que el tejido no implantado así como una actividad de estrógeno sulfotransferasa mayor en el mismo tejido, sugiere una vez más la importancia de los procesos de sulfatación y desulfatación de los estrógenos en el micro ambiente que circunda al blastocisto en el proceso de su implantación.

Al realizarse la identificación de los estrógenos sulfatos formados se observó que tanto en el sitio de implante como en el resto del útero el mayor estrógeno formado fue la estrona sulfato (79.59%) mientras que la concentración de estradiol sulfato fue baja (9.32%), de lo que se deduce que la enzima tiene mayor afinidad por la estrona, como ya ha sido demostrado anteriormente por otros autores (49,64).

Por otro lado, como se ha demostrado en otras especies (44,45,59), en la rata, la estrona sulfato formada en el sitio de implantación puede significar un requisito para iniciar localmente el proceso de implantación.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos sugieren que debido a la relación inversa existente entre la actividad de la estrógeno sulfatasa y de la estrógeno sulfotransferasa ambas podrían participar en un sistema de regulación de la concentración local de estrógenos biológicamente activos durante el proceso de implantación.

A N E X O

Esteroides Sulfato.

Cuando los esteroides se conjugan con el sulfato inorgánico forman esteroides sulfato. Estos comprenden dos grupos principales:

1) Los alquil sulfatos, compuestos esteroidales con estructura Δ^5 3β -hidroxi, en los que el hidroxilo se encuentra conjugado con un sulfato, entre ellos se encuentran:

Colesterol sulfato (C - S)

Pregnenolona sulfato (P - S)

17 - OH Pregnenolona sulfato (17 - OH P - S)

Dehidro epiandrosterona sulfato (D- S)

2) El segundo grupo está constituido por los aril sulfatos, esteroides que exhiben un grupo fenólico en el anillo A de su estructura. Son representativos de este grupo:

Estrona sulfato (E₁S)

Estradiol sulfato (E₂S)

El grupo sulfato (SO₄) de estos compuestos confiere a la molécula una gran polaridad presentando la característica de ser hidrosolubles, a diferencia de los esteroides libres que son liposolubles.

Biosíntesis de los Esteroides Sulfato.

La ruta metabólica completa, para la formación de los esteroides sulfato, comprende esencialmente dos pasos distintos: primero, la formación del 3' fosfoadenilil sulfato y segundo, la transferencia del grupo sulfato del fosfoadenilil sulfato a un aceptor apropiado por la acción de enzimas específicas de esteroides (41).

Las reacciones involucradas son:



Las dos primeras reacciones representan la activación del sulfato.

1. La formación del 3' Fosfoadenilil Sulfato.- La ecuación (1) representa la producción de adenilil sulfato a partir de ATP y iones SO_4^{-2} por la acción de la enzima ATP sulfurilasa.

Poco se sabe de la distribución y de las propiedades de la ATP sulfurilasa. La enzima es una proteína que requiere iones Mg^{+2} como cofactor, y es una enzima

cuya actividad depende de la presencia de grupos SH, teniendo un pH óptimo que varios han reportado entre 7 y 9.5.

La ecuación (2) involucra a la enzima APS - fosfocinasa. Esta enzima requiere iones Mg^{+2} como cofactor, tiene un pH óptimo entre 8.5 y 9 y es saturada con una concentración 5 μM de adenilil sulfato. Por actuar a bajas concentraciones y por catalizar una reacción irreversible, la APS fosfocinasa consume las pequeñas cantidades de adenilil sulfato producidas por la ATP sulfurilasa y por ello permite la acumulación de cantidades significantes de 3' fosfoadenilil sulfato.

Las dos enzimas mencionadas anteriormente ATP - sulfurilasa y APS - fosfocinasa, constituyen juntas, el sistema activador del sulfato y su acción combinada permite la producción del 3' fosfoadenilil sulfato.

2. La formación del esteroide sulfato.- La transferencia del grupo sulfato del 3' fosfoadenilil sulfato al esteroide, ecuación (3), es catalizada por las esteroides sulfotransferasa. Esta reacción es irreversible.

La existencia de sulfotransferasas específicas, ha sido sugerida por las variaciones de las velocidades relativas de sulfatación de varios esteroides por preparaciones crudas de sulfotransferasas de distintos tejidos de especies diferentes.

La actividad de las esteroides sulfotransferasas en el ovario y testículos humanos es baja.

Por otro lado la estrona sulfotransferasa se presenta en gran concentración en el feto y aparentemente está presente en todos los tejidos, lo que sugiere que esta enzima es de particular importancia durante la vida fetal.

Las esteroides sulfotransferasas, así como las enzimas activadoras del sulfato están presentes en la fracción soluble de la célula.

Existe poca información de la cinética de las esteroides sulfotransferasas, pero parecen ser enzimas cuya actividad depende de la presencia de grupos SH (o por lo menos parecen ser activadas por compuestos que contengan el grupo SH), requieren iones Mg^{+2} como cofactores y tienen pH óptimo en la región de 5.5 a 8.

Hidrólisis Enzimática de Esteroides Sulfato.

Las sulfatasas son específicas al esteroide. La hidrólisis de los diferentes tipos de esteres sulfatos está representada por la reacción irreversible:



Hidrólisis de la estrona sulfato.

La placenta humana contiene cantidades grandes de

la enzima que hidroliza la estrona sulfato. Se ha sugerido que la fracción microsomal es el sitio donde predomina la actividad de la hidrolasa.

La Función de las Esteroides Sulfatasas.

Siguiendo la demostración de las rutas " directas" para la conversión de colesteril sulfato a hormonas esteroides se han descrito funciones definidas para las esteroides sulfatasas de los mamíferos. Por lo menos en teoría y probablemente en la práctica, las esteroides sulfatasas pueden funcionar como mediadoras de la liberación de hormonas esteroides o precursoras de hormonas, a partir de la forma conjugada en que están presentes en la sangre.

Se ha visto que ciertos estrógenos conjugados, que se encuentran en bajas concentraciones en los fluidos del cuerpo y tejidos en el estado de no embarazo, se presentan en cantidades mucho mayores y en proporciones diferentes al final del embarazo, dentro de ellos se encuentran los estrógenos sulfatos.

Se ha encontrado que en los tejidos fetales el patrón de esteroides conjugados está caracterizado por una preponderancia de aril sulfatos.

BIBLIOGRAFIA

1. Abraham, G.E.: En: Progress in Gynecology (Taymor, M.L. y Green, T.H. eds.). Vol. VI, Grune & Stratton, New York, U.S.A., (1975).
2. Fox, R.R. y Laird, C.W.: Sexual Cycles. En: Reproduction and breeding techniques for laboratory animals. (Hafez, E.S.E. ed.). Lea & Febiger, Philadelphia, U.S.A., (1970), pág. 107.
3. Bennett, J.P. y Vickery, B.H.: Rats and mice. En: Reproduction and breeding techniques for laboratory animals. (Hafez, E.S.E. ed.). Lea & Febiger, Philadelphia, U.S.A., (1970), pág. 299.
4. Greep, R.O., Koblinsky, M.A. y Jaffe, P.S.: Reproduction and human welfare. A challenge to research. A Review of the Reproductive Sciences & Contraceptive Development. Mit Press, Cambridge, U.S.A., (1976).
5. Van Der Schoot, P. y De Greef, W.J.: Diestrous progesterone and proestrous LH in four and five days cycle of female rats. Endocrinology 70: 61, (1976).
6. Psychoyos, A.: Hormonal control of ovoimplantation. Vitam. Horm. 31: 201, (1973).
7. Psychoyos, A.: Hormonal control of uterine receptivity for nidation. J. Reprod. Fert. Suppl. 25: 17, (1976).
8. Williams, R.H. (ed.): Textbook of Endocrinology, W.B. Saunders Company, Philadelphia, U.S.A., (1981), pág. 622.
9. Finn, C.A. y Porter, D.G.: Cells and tissues of the endometrium. En: The Uterus. (Finn, C.A. ed.). Elek Science. London, (1975), pág. 18.

10. Surani, M.A.H.: Uterine luminal proteins of the time of implantation in rats. *J. Reprod. Fert.* 48: 141, (1976).
11. Patten, B. y Bruce, C.: *Foundations of embryology.* Mc Graw Hill, Tokio, Japón, (1964), pág. 68.
12. Ganong, W.F.: *Manual de fisiología médica. El Manual Moderno, S.A., México, (1980).*
13. Denker, H.W.: Blastocyst protease and implantation effects of ovariectomy and progesterone substitution in the rabbit. *Act. Endocrinol.* 70: 591, (1972).
14. Collado, M.L., Gil-Recasens, M.E., Castro, G. y Hicks, J.J.: Nuevos conceptos relacionados con la implantación. I. Período de Preimplantación. *Ginec. Obstet. Méx.* 44: 63, (1978).
15. Collado, M.L., Castro Osuna, G. y Hicks, J.J.: Effect of spermatozoa upon carbonic anhidrase activity of rabbit endometrium. *Biol. Reprod.* 20: 747, (1979).
16. Wimsatt, W.A.: Some comparative aspects of implantation. *Biol. Reprod.* 12: 1, (1975).
17. Boving, B.G. y Larsen, J.F.: *Implantation. En: Human reproduction: conception and contraception.* (E.S.E. Hafez ed.). Harper Medical, London, (1973), pág. 133.
18. Enders, A.C.: Anatomical aspects of implantation. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 25: 1, (1976).
19. Finn, C.A. y Porter, D.G.: Implantation of ova. *En: The Uterus.* (Finn, C.A. ed.). Elek Science. London, pág. 57.

20. Hicks, J.J. y Collado, M.L.: Nuevos conceptos relacionados con la implantación. IV. Función del moco cervical y el fluido endometrial. Ginec. Obstet. Méx. 46: 51, (1979).
21. Pratt, H.P.M.: Uterine proteins and the activation of embryos from mice during delayed implantation. J. Reprod. Fertil. 50: 1, (1977).
22. Hicks, J.J.: Regulación metabólica. Bioquímica de la Nutrición. (Díaz del Castillo, E. ed.). Francisco Méndez Oteo, México, (1978), pág. 25.
23. Beier, H.M.: Oviductal and uterine fluids. J. Reprod. Fertil. 37: 221, (1974).
24. Lutwak-Mann, C.: Carbonic anhydrase in the female reproductive tract. Occurrence, distribution and hormonal dependence. J. Endocrinol. 13: 26, (1955).
25. Heald, P.J.: Biochemical aspects of implantation. J. Reprod. Fertil. Suppl. 25: 29, (1976).
26. Hall, K.: Lactic dehydrogenase and other enzymes in the mouse uterus during the pre-implantation period of pregnancy. J. Reprod. Fertil. 34: 79, (1973).
27. Rajalakshmi, M., Sankaran, M.S. y Prasad, R.N.: Changes in uterine sialic acid and glycogen during early pregnancy in the rat. Biol. Reprod. 6: 204, (1972).
28. Finn, C.A. y Porter, D.G.: The decidual cell reaction. En: The Uterus. (Finn, C.A. ed.) Elek Science. London, (1975), pág. 74.
29. Landau, R.J.: Biology of eggs and implantation. En: Sex and internal secretions. (Young, W.C. ed.). Krieger, London, (1961), pág. 797.

30. Dickmann, Z., San, G.J. y Dey, K.S.: Does " Blastocyst estrogen " initiate implantation ? Science 195 : 687, (1977).
31. Gil-Recasens, M.E., Collado, M.L. y Hicks, J.J.: Nuevos conceptos relacionados con la implantación. II. Reacción decidual. Ginec. Obstet. Méx. 44, 211, (1978).
32. Nilsson, O.: The morphology of blastocyst implantation. J. Reprod. Fert. 39: 187, (1974).
33. Dale Buchanan, G.: Asymmetrical distribution of implantation sites in the rat uterus. Biol. Reprod. 11: 611, (1974).
34. Gil-Recasens, M.E., Collado, M.L. y Hicks, J.J.: Nuevos conceptos relacionados con la implantación. III. Características bioquímicas. Ginec. Obstet. Méx. 44: 491, (1978).
35. Nicolls, K.E.: Endometrial vascular transport of protein during implantation in the rat. Anat. Rec. 184: 488, (1976).
36. Bates, C.A. and Matthies, D.L.: Observations on vascular morphology in the region of implantation in the rat uterus. Anat. Rec. 184: 354, (1976).
37. Enders, A.C.: Mechanisms of implantation of the blastocyst. En: Biology of reproduction, basic and clinical studies. (Velardo, J.T. y Kasproy Loyola, B.A. eds.). University of Chicago Press, New Orleans, Louisiana, U.S.A. (1972).
38. Ijungkvist, I. y Nilsson, O.: Blastocyst-endometrial contact and pontamine blue reaction during normal implantation in the rat. J. Endocrinol. 60: 142, (1974).

39. Ward, O.M. y Donovan, B.T.: Implantation and induced decidualization of the uterus in the guinea pig, as indicated by pontamine blue. *Biol. Reprod.* 5: 270, (1971).
40. Sartor, P.: Exogenous hormone uptake and retention in the rat uterus at the time of ovo-implantation. *Act. Endocrinol.* 84: 804, (1977).
41. Bernstein, S. y Salomon, S. (eds.): Chemical and biological aspects of steroid conjugation. Springer Verlag, New York, U.S.A., (1970), págs. 96-103, 106-114, 291-302.
42. Pack, B.A. y Brooks, S.C.: Metabolism of estrogens and their sulfates in rat uterine minces. *Endocrinology* 87: 924, (1970).
43. Rossier, G. y Pierrepont, C.G.: Oestrogen metabolism in sheep myometrium. *J. Reprod. Fert.* 37: 43, (1974).
44. Jenkin, G. y Heap, R.B.: Formation of oestradiol 17 β from oestrone sulphaete by sheep foetal pituitary in vitro. *Nature* 259: 330, (1976).
45. Robertson, H.A. y King, G.J.: Plasma concentrations of progesterone, oestrone, oestradiol-17 β and oestrone sulfate in the pig at implantation, during pregnancy at parturition. *J. Reprod. Fert.* 40: 133, (1974).
46. Adessi, G.L., Tran Quang Nhuan y Vingler, P.: In vivo and in vitro metabolism of estrone and estradiol 17 β and their 3-sulfates in pregnant female guinea-pigs: a plausible prehormone role of estrogen sulfates in the maternal uterus. *J. Steroid Biochem.* 16: 107, (1982).

47. Perry, J.S., Heap, R.B., Burton, R.D. y Gadsby, J.E.: Endocrinology of the blastocyst and its role in the establishment of pregnancy. *J. Reprod. Fertl. Suppl.* 25: 80, (1976).
48. Dhindsa, D.S. y Diusk, P.J.: Effect on pregnancy in the pig after killing embryos or fetuses in one uterine horn in early gestation. *J. Anim. Sci.* 27: 122, (1968).
49. Pack, B.A. y Brooks, S.C.: Cyclic activity of estrogen sulfotransferase in the gilt uterus. *Endocrinology* 95: 1680, (1974).
50. Pack, B.A., Christensen, C., Douraghy, M. y Brooks, S.C.: Nuclear and cytoplasmic estrogen receptor in gilt endometrium throughout the estrous cycle. *Endocrinology* 103: 2129, (1978).
51. Pack, B.A., Broosk, C.L., Dukelow, W.R. y Brooks, S.C.: The metabolism and nuclear migration of estrogen in porcine uterus throughout the implantation process. *Biol. Reprod.* 20: 545, (1979).
52. Tseng, L. y Gurspide, E.: Changes in the in vitro metabolism of estradiol by human endometrium during the menstrual cycle. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 114: 1002, (1972).
53. Gabb, R.G. y Stone, G.M.: Uptake and metabolism of tritiated oestradiol and oestrone by human endometrial and myometrial tissue in vitro. *J. Endocrinol.* 62: 109, (1974).
54. Buirchell, B.J. y Hahnel, R.: Metabolism of estradiol-17 β in human endometrium during the menstrual cycle. *J. Steroid. Biochem.* 6: 1489, (1975).

55. Pack, B.A., Tovar, R., Rooth, E. y Brooks, S.C.: The cyclic relationship of estrogen sulfurylation to the nuclear receptor level in human endometrial curettings. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 48: 420, (1979).
56. Tseng, L. y Gurside, E.: Effects of progestins on estradiol receptor levels in human endometrium. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 41: 402, (1975).
57. Robetson, H.A., King, G.J. y Lyck, G.W.: The appearance of oestrone sulphate in the peripheral plasma of the pig early in pregnancy. *J. Reprod. Fert.* 52: 337, (1978).
58. Hattersley, J.P., Hilary, M.D., Matthews, J.G., Wrathall, A.E. y Saba, N.: Estimation of oestrone sulphate in the serum of pregnant sows. *J. Reprod. Fert.* 58: 7, (1980).
59. Carnegie, J.A. y Robertson, H.A.: Conjugated and unconjugated estrogens in fetal and maternal fluids of the pregnant ewe: a possible role for estrone sulfate during early pregnancy. *Biol. Reprod.* 19: 202, (1978).
60. Iwyer, R.J. y Robertson, H.A.: Oestrogen sulphatase and sulphotransferase activities in the endometrium of the sow and ewe during pregnancy. *J. Reprod. Fert.* 60: 187, (1980).
61. Bassett, J.M., Oxborrow, T.J., Smith, I.D. y Thorburn, G.D.: Concentration of progesterone in the peripheral plasma of the pregnant ewe. *J. Endocrinol.* 45: 449, (1969).
62. Sarda, I.R., Robertson, H.A. y Smeaton, T.C.: Sequential changes in plasma progesterone levels in the ewe during the estrous cycle, and during pregnancy in intact and ovariectomized sheep. *Can. J. Anim. Sci.* 53: 25, (1973).

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

63. Tseng, L., Stolle, A. y Gurpide, E.: Quantitative studies on the uptake and metabolism of estrogens and progesterone by human endometrium. *Endocrinology* 90: 390, (1972).
64. Hung-Ching Liu y Tseng, L.: Estradiol metabolism in isolated human endometrial epithelial glands and stromal cells. *Endocrinology* 104: 1974, (1979).
65. Wise, T., Ackland, N., Fleet, I.R., Heap, R.B. y Walters, D.E.: Oestrogen metabolism in the endometrium, corpus luteum and ovarian residual tissue of the rabbit. *J. Endocrinol.* 96: 201, (1983).
66. Mayer, G.: Delayed nidation in rats: A method of exploring the mechanisms of ovo-implantation. En: *Delayed Implantation.* (Enders, A.C. ed.). University of Chicago Press, Chicago, U.S.A., (1963), pág. 213.
67. Ward, W.F., Frost, A.G. y Ward, O.: Estrogen binding by embryonic and interembryonic segments of the rat uterus prior to implantation. *Biol. Reprod.* 18: 598, (1978).
68. Burstein, S.J. y Dorfman, R.I.: Determination of mammalian steroid sulfatase with $7\alpha\text{H}^3$ -3 β -hidroxi androst-5-en-17-ones-sulfate. *J. Biol. Chem.* 238: 1656, (1963).
69. Domínguez, O.V., Guadarrama, E., Loza, C.A. y Valencia, A.: Reciprocal competitive inhibition between pregnenolone-sulfate and DHEA-sulfate on adrenal steroid sulfatase. *Rev. Invest. Clin.* 25: 100, (1973).
70. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randal, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265, (1951).

71. Hicks, J.J.: Regulación endócrina de la implantación del cigoto de mamífero. *Gac. Méd. Mex.* 117: 510, (1981).
72. Riggs, T.R. y Walker, L.M.: Action of estrogen sulfates on accumulation of aminoacids by Ehrlich Ascites tumor cells in vitro. *Endocrinology* 74: 483, (1964).
73. Tseng, L. y Gurpide, E.: Estradiol and 20 α -dihydroprogesterone dehydrogenase activities in human endometrium during the menstrual cycle. *Endocrinology* 94: 419, (1974).
74. Perry, J.S., Heap, R.B. y Amoroso, E.C.: Steroid hormone production by pig blastocyst. *Nature* 245: 45, (1973).
75. Badawy, S. y Abdul-Karim, R.: Effect of oestrogen on fetal survival in the rabbit. *J. Reprod. Fert.* 53: 237, (1978).
76. Greenward, G.S.: Interruption of early pregnancy in the rabbit by a single injection of oestradiol cyclopentylpropionate. *J. Endocrinol.* 26: 113, (1963).
77. Kopu, H.T., Kokkonen, E.K.T. y Janne, O.A.: Acute antiprogestational action of estradiol in the rabbit uterus. *Endocrinology* 109: 1479, (1981).
78. Spiegel, M.R.: *Estadística*. Mc.Graw-Hill. México, (1979).
79. Townsley, J.D., Rubin, E.J. y Crystle, C.D.: Evaluation of placental steroid 3-sulfatase and aromatase activities as regulators of estrogen production in human pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 117: 3, 345, (1973).

80. Rufz, T.: Posible participación de los estrógenos del blastocisto en el proceso de implantación normal y retardada de la rata. Tesis profesional. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Ciencias. 1983.

81. Kalra, P.S. y Kalra, S.P.: Temporal changes in the hypothalamic and serum luteinizing hormone releasing hormone levels and the circulating ovarian steroid during the rat oestrus cycle. Act. Endocrinol. 85: 449, (1977).