



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
IZTACALA

ACTIVIDAD DE CATEPSINA D EN EL LIQUIDO
UTERINO DURANTE EL PERIODO PERI-
IMPLANTACIONAL EN LA RATA.

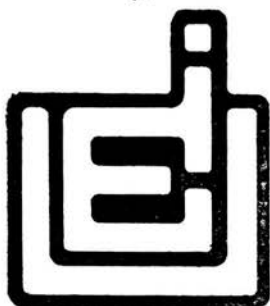
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A I

ROBERTO DE ARO HERNANDEZ





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 esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

A mis padres

Roberto De Haro Jiménez y Obdulia Hernández González,
por haber unido sus genes mediante leyes biológicas
para formar el cuarto sistema termodinámico de
muy baja entropía; por no permitir que dicho sistema
alcanzara el equilibrio con el universo; y por dirigirlo
de la mejor manera posible a lo largo de su vida.

A mis hermanos

Leopoldo y M. Eugenia De Haro Hernández, por comprar
mis sueños y hacer suyas mis ilusiones.

A mi hermano Ignacio y a mis tíos Pedro Ramos y M. Matilde Haro

Por el gran entusiasmo con que siempre me impulsaron
hacia adelante.

A mis compañeros y amigos de la UMF:

A los biólogos Martín Martínez Torres, Martín Palomar Morales, Guadalupe Martínez Hernández , y especialmente a la bióloga Carmen Álvarez Rodríguez por su eficiente y desinteresada ayuda.

A mi asesor y director de tesis:

M. en C. Luis Arturo Baiza Gutman, por haber influido mucho en mi formación como biólogo, por la paciencia que siempre me tuvo , y por enseñarme que en los momentos más difíciles siempre hay por lo menos dos opciones que nos permiten seguir adelante.

A todos ustedes. gracias por...todo.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología del Desarrollo, de la Unidad de Morfología y Función . de la Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala, de la UNAM, bajo la dirección del M. en C. Luis Arturo Baiza Gutman.

CONTENIDO

RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
Fertilización, inicio del desarrollo y transporte a través del oviducto	2
Preparación del endometrio previo a la implantación	3
Implantación del blastocisto	4
El líquido uterino	6
Enzimas lisosomales durante el periodo peri-implantacional	7
OBJETIVO	10
MATERIALES Y METODOLOGIA	11
Reactivos	11
Colección del líquido uterino	11
Determinación de la actividad de catepsina D	12
Preparación del sustrato	12
Incubación del sustrato con la enzima	13

Determinación de aminoácidos	14
Determinación de proteínas	15
Tratamiento de la muestra	15
Análisis estadístico	15
RESULTADOS	16
DISCUSION	22
CONCLUSIONES	27
APENDICE A. Determinación de catepsina D por el Método de Turk y col.	30
APENDICE B. Determinación de proteínas por el método de Lowry	33
REFERENCIAS	36

RESUMEN

La preñez suele dividirse en dos fases, una de preimplantación y otra de postimplantación. La implantación es el evento crucial en el proceso reproductivo de los mamíferos y es la transición entre las dos fases de la preñez. La implantación se refiere a la adhesión y fijación del embrión al endometrio y dicho proceso está regulado hormonalmente.

El ambiente intraluminal uterino es importante porque presenta las condiciones apropiadas que permiten que el embrión sobreviva y se implante. La implantación requiere de un intercambio de información entre el embrión y el endometrio y hasta la fecha no se conoce la naturaleza de la supuesta señal embrionaria.

Se han encontrado enzimas lisosomales en el líquido uterino de diversas especies, pero a la mayoría no se les ha atribuido una función específica en él. La catepsina D, una enzima lisosomal, se ha encontrado en el lumen uterino del cerdo, mientras que en la rata se ha localizado en el epitelio luminal uterino.

En el presente trabajo se determinó la actividad de la catepsina D en el líquido uterino durante el periodo peri-implantacional de la rata (días 3 a 7 de preñez), mediante el empleo del método de Turk y col. modificado (1984). La catepsina D se encuentra en el líquido uterino los días 4 y 5 de preñez y no fue posible detectarla los días 3, 6 y 7. Creemos que la catepsina D es secretada por el epitelio luminal mediante la acción de la hormona progesterona y posiblemente juegue un papel importante en el proceso de implantación, el cual podría ser el proporcionar nutrientes al embrión mediante la degradación de otras proteínas o por servir como sustrato para otras proteasas, además podría favorecer la ruptura de la zona pelúcida. Por otra parte, la actividad de la enzima en el líquido uterino podría ser un reflejo de la cantidad de enzima presente en el epitelio uterino y esta desempeñar su función en el mismo, y quizás estar vinculada con la muerte localizada del epitelio luminal (apoptosis), o bien, participar en la transducción de la señal embrionaria para provocar una respuesta en el estroma.

INTRODUCCION

Durante la preñez en los mamíferos pueden distinguirse dos fases: una fase de progestación, en la cual el óvulo es fecundado, inicia su desarrollo, permanece libre en el líquido oviductal y uterino; y otra, de gestación, en que el embrión se fija al endometrio y de esta manera continúa su desarrollo. Dichas fases suelen ser llamadas también periodos preimplantacional y postimplantacional, respectivamente (Dickman, 1969). La implantación del embrión es considerada como la fase de transición entre los dos principales periodos de la preñez (Dickman, 1969), y actualmente se considera que la implantación es el evento crucial en el proceso reproductivo de los mamíferos (Flamigni y col., 1991).

La implantación puede definirse como el proceso mediante el cual el embrión adquiere una posición fija y establece contacto físico con los tejidos maternos, normalmente con el endometrio (McLaren, 1975; Parr y Parr, 1990). Existen diferencias notables en la preparación para y durante dicho proceso en diferentes especies (Amoroso, 1952; Schlafke y Enders, 1975). Sin embargo, en las especies estudiadas hasta ahora, hay evidencias suficientes para pensar que para que la implantación se lleve a cabo, se requiere de una interacción coordinada entre el embrión y el útero (Kennedy, 1983; Weitlauf, 1988). El embrión debe haber alcanzado el estado de blastocisto y en el útero deben de haber ocurrido cambios dependientes de hormonas que lleven al desarrollo de un endometrio receptivo al embrión (Psychoyos, 1973, 1986; Weitlauf, 1977).

Fertilización, inicio del desarrollo y transporte a través del oviducto.

La fertilización del ovocito en la rata, como en muchos mamíferos, se lleva a cabo en el ampulla del oviducto (McLaren, 1975). Una vez fecundado el ovocito, su metabolismo se reactiva, se reinicia la meiosis, se funden los pronúcleos masculino y femenino, originando el cigoto y se inicia el desarrollo, mientras

tanto es transportado por las acciones ciliar y contráctil del oviducto hacia el útero (Shelesnyak, 1960; Psychoyos 1973; McLaren, 1975).

En la rata, los embriones normalmente llegan a los cuernos uterinos en la tarde del día 4 de preñez (alrededor de 90 horas después de la ovulación), en el estado de 9 a 16 células (Psychoyos, 1967). Presumiblemente entran en grupo y son rápidamente distribuidos a lo largo de los cuernos uterinos (McLaren, 1975)

Los blastocistos retienen la zona pelúcida hasta las 14 horas del día 5. Cuando se lavan los cuernos uterinos en la tarde de este día, se les recupera libres de zona pelúcida y muestran una marcada disminución en su volumen (Dickman y Noyes 1961). El porcentaje de blastocistos libres de zona pelúcida incrementa de 4% a las 2 p.m. a 77 % a las 6 p.m. (Noyes, Dickman, Doyle y Gates, 1963; Dickman, 1969)

Preparación del endometrio previo a la implantación.

Mientras el embrión es transportado por el oviducto, en el endometrio ocurren cambios morfofisiológicos que conducen a un estado receptivo, en el que es sensible a estímulos embrionarios, el epitelio se vuelve adhesivo en su porción apical y el estroma puede responder a estos estímulos con la formación de células deciduales. En la rata, varios estudios han demostrado que la preparación del endometrio, implica entre otros cambios, la supresión de las mitosis epiteliales y la inducción de la división de las células del estroma de grado y distribución limitada (Tachi, Tachi y Lindner, 1972; Marcus, 1974; Tachi y Tachi, 1974). Las células del endometrio que experimentan mitosis en los primeros dos días de preñez se localizan tanto en el epitelio luminal como en el glandular; en el tercer día ocurre un cambio y las células en mitosis predominan en el estroma, mientras que en el epitelio alcanza un nivel muy bajo. En el quinto día, si la implantación se lleva a cabo, las células estromales continuarán dividiéndose; de no ser así, el número de células en mitosis disminuirá en las siguientes horas (Tachi y Tachi, 1974). Estos

datos pueden correlacionarse con los niveles hormonales propios de la preñez. En la tarde del segundo día de preñez, el ovario comienza a secretar progesterona (Psychoyos, 1973a,b) y al parecer esta hormona ocasiona un aumento en el número de receptores a estrógenos en las células del estroma y una disminución de los mismos en el epitelio (Martel y Psychoyos, 1978; 1982).

Por otra parte, en ratas ovariectomizadas en la tarde del cuarto día de preñez, la sola administración de progesterona inducirá a los blastocistos a implantarse, mientras que si la ovariectomía se practica por la mañana del mismo día, también se requerirá de una pequeña dosis de estrógenos (citado por Psychoyos, 1967). Shelesnyak (1960) propuso que en la rata ocurre una oleada estrogénica en la tarde del cuarto día de preñez, justo cuando el nivel de estrógenos se incrementa en dichos animales, en caso de no haber quedado preñados.

Implantación del blastocisto.

En la rata la implantación se inicia el día 5 de preñez (Psychoyos, 1966, 1986), cuando se considera como día 1 el día en que se encuentran espermatozoides en el lavado vaginal. Durante este proceso, el blastocisto permanece pequeño, se adhiere al epitelio uterino en la región antimesometrial, ocurriendo primero la interdigitación de microvelocidades entre el trofoblasto y las células epiteliales lumbinales, posteriormente, el trofoblasto emite prolongaciones y fagocita células del epitelio (Psychoyos, 1973a,b; Finn, 1977). Mientras esto ocurre, las células estromales adyacentes cercanas al blastocisto experimentan el proceso de decidualización. Finalmente, el blastocisto se alojará en el estroma decidualizado, el cual junto con el trofoblasto dará origen a la placenta.

Se sabe también que el periodo de receptividad uterina al embrión es menor de 24 horas, ya que temprano en el día 6 el endometrio se vuelve indiferente y el ambiente uterino resulta hostil a los blastocistos no implantados (Lejeune, 1986; Psychoyos, 1986).

La primera manifestación macroscópica de que el proceso de implantación ha comenzado, es el incremento en permeabilidad vascular endometrial en áreas adyacentes al blastocisto (Psychoyos, 1973), y se da antes de que exista contacto físico entre el embrión y el endometrio (Kennedy, 1983), seguida de cambios en las células estromales que llevan a la formación del nido o decidua (Psychoyos, 1973; Weitlauf, 1977). Este cambio en permeabilidad permite identificar las regiones uterinas en que la implantación ocurre (sitios de implantación) de las regiones adyacentes (sitios de interimplantación) y estudiar los cambios propios de ellas.

Ahora se sabe que el embrión participa activamente en los eventos tempranos asociados con el establecimiento de la preñez, pero los mecanismos involucrados por el embrión y por la madre no han sido del todo identificados (Garret, et al., 1988). Se han publicado numerosos trabajos en los que se plantea la liberación de una señal embrionaria; por ejemplo, histamina: (Shelesnyak, 1952, 1958), estrógenos: (Dickman et al., 1976; Dickman, 1979), prostaglandinas: (Kennedy y Lukash 1982; Kennedy, 1983). Sin embargo, el que una de estas sustancias favorezca la implantación, no excluye a las demás de tener un papel igualmente importante en dicho proceso (Kennedy, 1983; Weitlauf, 1988). O bien puede ser que la supuesta señal sea otra sustancia aún desconocida.

Se cree que lo que ocurre entre el blastocisto y el útero en el momento que se inicia la implantación, es un intercambio de información entre ellos, con poca o ninguna influencia de macromoléculas u otras sustancias provenientes del suero sanguíneo (McRae, 1984), ya que el epitelio uterino constituye una verdadera barrera hemato-lumen uterino (McRae y Kennedy 1979; McRae, 1984), debida esta a uniones celulares estrechas entre las células epiteliales (Fin y porter, 1975; McRae, 1988).

Por otra parte, posiblemente el epitelio luminal uterino funcione como un transductor de la señal embrionaria (Lejeune y col., 1981; Moulton y Koenig, 1986), pues si se desprende dicho epitelio *in vivo* y se estimula el estroma, tal estimulación no provocará la reacción decidual que se obtendría si el epitelio

estuviera presente (Lejeune y col., 1981).

La transmisión del mensaje por el epitelio luminal al estroma parece requerir la acción de estrógenos (Moulton y Koenig, 1986). En ratas pseudopreñadas, con ovariectomía bilateral, tratadas sólo con progesterona, el inicio de la reacción decidual requiere de un estímulo traumatizante, tal como rasgar o triturar el epitelio luminal (Yochim y De Feo, 1963). Si el tratamiento con progesterona es seguido por estrógenos, entonces, estímulos no traumatizantes, como por ejemplo, la inyección intraluminal de aceite, iniciarán la reacción decidual.

El líquido uterino.

Bajo condiciones normales, el líquido luminal uterino está presente en cantidades significativas solo durante las fases de proestro y estro del ciclo estral en la rata (Hisaw, 1958), el resto del ciclo el volumen del líquido en el lumen uterino es muy pequeño (O'Shea, 1972).

Las secreciones uterinas cumplen varias funciones. Permiten el ascenso de los espermatozoides al sitio de fertilización dentro del oviducto; proporcionan una nutrición adecuada al embrión durante su desarrollo, desde su llegada al lumen uterino hasta que se ha llevado a cabo la implantación, mantienen un ambiente apropiado para conservar la integridad física y bioquímica de las estructuras del blastocisto; y satisfacen requerimientos inmunológicos específicos, los que son de mayor importancia durante la fase de preimplantación (Beier et al., 1991)

El líquido luminal uterino ha llamado la atención en el estudio de la implantación, en parte debido a que cualquiera que sea la naturaleza de la supuesta señal embrionaria, esta debe pasar del embrión al endometrio por un medio líquido (Weitlauf, 1988). La especie más estudiada al respecto, y de la que mejor se conoce la composición de este líquido es el cerdo (Heap, 1980; Simmen et al., 1986), en esta especie se han caracterizado varias macromoléculas de naturaleza proteica (Roberts y Bazer, 1988), y ha sido muy estudiada debido a que en

ella la implantación es superficial y tardía, y las secreciones uterinas desempeñan una importante función nutritiva en gran parte de la preñez.

Enzimas lisosomales durante el periodo peri-implantacional.

Las enzimas lisosomales han sido estudiadas en el endometrio y en el útero completo durante el periodo peri-implantacional y su actividad se ha relacionado principalmente con la evidencia de que el epitelio luminal uterino sufre autólisis antes de ser fagocitado por el trofoblasto embrionario (ver Hinchliffe y El-Shershaby, 1975). Sin embargo, una vez demostrado que las células epiteliales uterinas que rodean al blastocisto durante la implantación mueren por apoptosis o muerte celular programada y no por necrosis, es decir, sin rompimiento de organelos celulares tales como mitocondrias y lisosomas (Parr y Parr, 1986), quedaron datos importantes y siguen generandose otros nuevos acerca de las enzimas lisosomales en el útero, durante el periodo peri-implantacional.

Trabajando con uteros de ratas pseudopreñadas, Wood (1969) encontró que la actividad de catepsina D incrementa a un máximo en el día 5, para caer al día 7 cae hasta una concentración inferior que la observada en el día 4. Moulton (1974) determinó la actividad de β -glucuronidasa y catepsina D en sitios de implantación y en sitios de no implantación (sitios de interimplantación) en úteros de ratas encontrando una disminución muy notable en la actividad de catepsina D en los sitios de implantación en los días 6 a 8 con respecto a los sitios de interimplantación, no encontrando cambios en la actividad de β -glucuronidasa. En otro experimento (Moulton et al., 1978), se reportó un incremento en la actividad de aril sulfatasa A y fosfatasa ácida y ningún cambio en la actividad de catepsina B (todas ellas enzimas lisosomales) en sitios de implantación con respecto a sitios de interimplantación. En un trabajo posterior (Moulton e Ingle, 1981), se demostró inmunohistoquímicamente que en ratas preñadas la catepsina D se encuentra en las células epiteliales glandulares y lumbinales del endometrio, siendo el

epitelio luminal donde se encuentra en mayor cantidad.

Además, Elangovan y Moulton (1980) encontraron que en ratas con ovariectomía bilateral, la síntesis de catepsina D se incrementa en relación directa a la administración de estrógenos y progesterona, siendo más efectiva la progesterona. Antes de estos estudios, Leonard y Knobil (1950) habían demostrado que en úteros de ratas, la actividad enzimática de β -glucuronidasa decreció significativamente entre los días 8 a 12 de realizada la ovariectomía bilateral, y que en ratas ovariectomizadas por 20 días, una dosis única de estradiol incrementó significativamente la actividad de esta enzima a las 72 horas de su aplicación. Estos resultados parecen indicar que las hormonas esteroides juegan un papel fisiológico en el mantenimiento de la función lisosomal en el útero.

Por otra parte, se sabe que en el periodo peri-implantacional hay liberación de proteínas por el endometrio (Surani, 1975, 1976; Gore-Langton y Surani, 1976; Nieder y Macon, 1987; Weitlauf y Suda Hartman, 1988), así como también por el blastocisto (Surani, 1980; Nieder et al., 1987; Nieder, 1990).

Es posible, entonces, que en la rata, la catepsina D se libere al lumen uterino en el periodo peri-implantacional, las evidencias indirectas con que se cuenta son:

- a) La disminución de la actividad en los sitios de implantación (Moulton, 1974).
- b) En segmentos uterinos de rata cultivados en presencia de dietilestilbestrol o estradiol $17-\beta$ se libera una enzima lisosomal, la catepsina B, al medio de incubación (Pietras y Szego, 1975).
- c) Weiguo y col. (1991) han demostrado la presencia de catepsina B en el líquido uterino en el día en que la implantación embrionaria ocurre, en la gata.
- d) La inyección de progesterona a hembras ovariectomizadas incrementa la actividad de 10 enzimas lisosomales en el líquido uterino, entre ellas la catepsina D (Hansen et al., 1985), en el cerdo.

Estas evidencias indican que las enzimas lisosomales pueden ser liberadas al lumen uterino, que su liberación puede, al menos en parte, estar gobernada por hormonas esteroideas y su concentración en el líquido uterino puede variar durante el periodo peri-implantacional.

OBJETIVO

Determinar la actividad de catepsina D del líquido uterino en la rata, en el periodo peri-implantacional, de los días 3 a 7 de preñez

MATERIALES Y METODOLOGIA

Reactivos.

Los reactivos hemoglobina, pepstatina, PMSF y el reactivo de Folin-Ciocalteu fueron de Sigma Chemical Co. (St. Louis MO.). Los demás fueron de la mejor calidad disponible, generalmente Merk o Baker.

Se utilizaron ratas Wistar, hembras, vírgenes, de 175 a 225 gramos de peso. Estas se colocaron durante una semana a fotoperiodo de 14 horas luz (7:00 a.m. a 9:00 p.m.) por 10 horas de oscuridad, con fines de adaptación, antes de utilizarse. Este fotoperiodo se mantuvo durante todo el experimento. Transcurrida la semana se les permitió aparearse, lo cual se hizo por el método de trio (2 hembras/macho/jaula). Se les tomaron lavados vaginales diariamente entre 9 y 10 de la mañana, con aproximadamente 0.4 ml de NaCl 0.15 M. La muestra se colocó en un porta objetos y se observó al microscopio óptico (Carl Zeiss) a 10X y 40X. Las hembras que resultaron preñadas (considerando día 1 de preñez aquel en el que el lavado vaginal presentó espermatozoides) fueron separadas de los machos.

Con las ratas preñadas se formaron, al azar, cinco grupos (I, II, III, IV y V) de 36 animales cada uno. Las ratas del grupo I fueron sacrificadas el tercer día de preñez, las del grupo II el cuarto día, y así consecutivamente hasta que las del grupo V fueron sacrificadas en el séptimo día.

Colección del líquido uterino.

Cada uno de los animales fue sacrificado por dislocación cervical (entre las 11 y las 14 horas) y se perfundió durante 3 a 5 minutos con NaCl 0.15 M (aproximadamente 50 ml) por la aorta, a nivel de la cavidad torácica (por sobre el músculo diafragmático), para minimizar la contaminación de las muestras uterinas con sangre. Se abrió la cavidad abdominal, se localizó el útero y cada cuerno uterino se limpió de tejido conectivo adyacente. Se tomó 0.1 ml de solución salina amortiguada con

fosfatos (PBS), pH 7.2, conteniendo p -metilsulfonilfluoruro (PMSF) a 0.1 mM., a 0°C con una jeringa de 1 ml, de la cual se introdujo cuidadosamente la aguja en la luz del extremo oviductal del cuerno uterino, se cortó transversalmente el extremo opuesto (cervico-vaginal) con tijeras muy filosas (para evitar daño tisular y posible contaminación de la muestra), cuidando no perder líquido uterino. Luego se oprimió suavemente el émbolo de la jeringa, y el contenido intraluminal se recogió en tubos Eppendorf a 0°C. Las muestras obtenidas de 6 ratas se mezclaron, se centrifugaron a 12000 rpm durante 5 min en una centrífuga Eppendorf (BRINKMAN 5412), y el sobrenadante se congeló a -20 C para ser empleado antes de 48 horas.

Determinación de la actividad de catepsina D.

La determinación de la actividad de la catepsina D en el líquido luminal uterino de ratas preñadas se implementó con ratas en el quinto día de preñez, pues es cuando se ha encontrado presente en el epitelio luminal uterino por métodos inmunohistoquímicos (Elangovan y Moulton, 1980; Moulton e Ingle, 1981).

Inicialmente se aplicó el método de Turk y col. (1984) al líquido uterino, y al no ser posible su detección, se tuvo que modificar. A continuación se describe el método de Turk y col. (1984) modificado, que nos permitió determinar la actividad de catepsina D en el líquido luminal uterino. Las modificaciones introducidas más importantes son la disolución de hemoglobina (Hb) en agua y su desnaturalización con urea, a diferencia del método de Turk y col. donde utilizan amortiguador de acetatos como disolvente; la adición de pepstatina al blanco; un mayor tiempo de incubación, y aumento del volumen de la muestra enzimática (líquido uterino).

Preparación del sustrato.

1.- Se pesaron 0.44 g de Hb y se molieron en un mortero con aproximadamente 1.6 ml de agua. Se transfirió la hemoglobina solubilizada a un matraz de 50 ml con una pipeta Pasteur. Se

repitió el proceso 6 o 7 veces hasta que esta se solubilizó por completo.

2.- Se llevó el volumen a 14.4 ml con agua y se agitó con un agitador magnético a temperatura ambiente por 30 min.

3.- Se adicionaron 7.2 g de urea (se deshicieron los grumos antes de adicionarla) y se mezcló con ayuda de un agitador magnético.

4.- Se adicionaron 1.6 ml de NaOH 1 M y se mezcló bien.

5.- Se adicionaron 2 ml de agua y se continuó agitando.

6.- Se dejó la mezcla en agitación a temperatura ambiente por 45 min.

7.- Se agregaron 0.8 g de urea libre de grumos y se mezcló bien con el agitador magnético.

8.- Se reguló el pH de la mezcla a 3.8 con ácido cítrico 1 M y citrato de sodio 1 M (2.56 y 0.04 ml respectivamente).

Incubación del sustrato con la enzima.

1.- En una gradilla, por cada determinación, se colocaron dos tubos de ensaye, uno de ellos sirvió como blanco y el otro fue el experimental.

2.- Al experimental se virtió 0.1 ml de agua y al que fue el blanco se virtió 0.1 ml de pepstatina 5 μ M en agua.

3.- A ambos tubos se les agregaron 0.3 ml de líquido uterino. se agitaron y se dejaron reposar durante 15 min a temperatura ambiente.

4.- A ambos tubos se les agregó 1 ml de sustrato, se agitaron vigorosamente y se incubaron en un baño maría con agitación constante. a 37°C durante una hora exactamente.

5.- Después de la incubación, a ambos tubos se les agregó 2 ml de ácido tricloroacético 0.3 M, se agitaron y se dejaron reposar a temperatura ambiente por 30 min exactamente.

6.- Se centrifugaron por 10 min a 5000 rpm, se desechó el sedimento y se volvió a centrifugar el sobrenadante.

7.- Del sobrenadante resultante se tomó 1 ml y se vertió en otro tubo de ensaye, en el cual se determinó la cantidad de aminoácidos.

Determinación de aminoácidos.

1.- Se preparó una curva patrón que va de 0.02 a 0.2 ml de solución estándar de tirosina 1 mM (181.2 µg/ml) en HCl 0.2 M llevando el volumen a 1 ml con HCl 0.2 M.

2.- Se adicionaron 2 ml de NaOH 0.5 M.

3.- Se agregaron 0.6 ml del reactivo de Folin-Ciocalteu al 33 % v/v en agua, preparado al momento de usar.

4.- Se agitó y pasados 5 min se midió la absorbancia a 750 nm.

La actividad de la enzima se reporta como unidades internacionales. Una unidad internacional se define como la cantidad de enzima que hidroliza hemoglobina a tal velocidad inicial bajo condiciones del ensayo que la cantidad de productos de la hidrólisis solubles en ácido tricloroacético formados por minuto dan la misma absorbancia con el reactivo de Folin-Ciocalteu que la causada por 1 µmol de tirosina.

El método de Turk, se describe en el apéndice A.

Determinación de proteínas.

Para la determinación de proteínas en el líquido uterino se utilizó el método de Lowry y col.(1951), como se describe en el apéndice B. El tratamiento previo de la muestra (líquido uterino) se describe a continuación.

Tratamiento de la muestra.

- a) En un tubo de ensaye se adicionaron 0.02 ml de líquido uterino.
- b) Se adicionó 1.8 ml. de agua.
- c) Se adicionó 1 ml de TCA al 15 %.
- d) Se dejó reposar durante 15 minutos.
- e) Se vertió en dos tubos Eppendorf que se centrifugaron durante 15 minutos.
- f) Se decantó.
- g) Se adicionaron 0.02 ml de NaOH 1N a las pastillas.
- h) Se agitó por 30 minutos.
- i) Se trató como a la curva patrón.

Análisis estadístico

Los resultados se evaluaron por el método de análisis de varianza para un diseño experimental con un factor (se emplearon los programas Quattro y Statgraphics)

RESULTADOS

La determinación de la actividad de la enzima lisosomal catepsina D en el líquido luminal uterino de ratas en el quinto día de preñez se intentó llevar a cabo por el método de Turk y col. (1984). Al resultar inefectivo, se optó por modificarlo. Los resultados de las modificaciones se muestran en la tabla 1.

Como se puede observar, no fue posible la detección de la actividad de catepsina D en el líquido uterino de ratas en el quinto día de preñez utilizando el método de Turk y col. (1984). Algunas variaciones hechas al método resultaron también infructuosas, pero cuando se disolvió la hemoglobina en agua y se desnaturalizó con urea, su detección fue posible. Esto se debió a una mejor disolución de la hemoglobina.

Al utilizar un blanco con el mejor inhibidor de catepsina D que se conoce, pepstatina, su actividad aún fue detectable. Por lo tanto, decidimos emplearlo en cada una de las determinaciones. En la mayoría de los trabajos en que se mide la actividad de esta enzima (Wood, 1969; Moulton, 1974) no lo usan, sin embargo, el no emplearlo puede conducir a una sobreestimación de la misma.

La actividad de la enzima en el periodo peri-implantacional se presenta en las tablas 2 y 3. Sólo se encontró actividad los días 4 y 5. En los días 3, 6 y 7 su actividad fue prácticamente indetectable por la metodología empleada. Al reportar la actividad de catepsina D por ml de líquido uterino, no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los días 4 y 5. Sin embargo, cuando se reporta la actividad específica (U.I. D/mg de proteínas) esta es significativamente mayor en el día 4 respecto al día 5 ($P \leq 0.01$). Aquí debemos aclarar que el hecho de que la actividad de una enzima no sea detectable en una muestra en particular, no quiere decir necesariamente que la enzima no está presente, lo cual es posible, sin embargo también puede ser que la técnica empleada no sea lo suficientemente sensible para detectar la actividad si la enzima se encuentra en muy pequeña cantidad.

La concentración de proteínas en el líquido uterino, en los días estudiados, tendió a incrementar con el avance de la preñez

(tabla 4). No encontramos diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.01$) entre los días 3 y 4. Lo mismo ocurrió entre los días 6 y 7. Sin embargo, sí se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar la concentración de proteínas del día 5 con la concentración encontrada los días 3 y 4 y de los días 6 y 7 respecto a los otros días estudiados ($P \leq 0.01$). Además, al realizar un análisis de regresión entre el tiempo de preñez y la concentración de proteínas, encontramos un coeficiente de correlación lineal de 0.94.

TABLA 1
MODIFICACIONES AL METODO DE TURK PARA LA DETERMINACION
DE CATEPSINA D EN EL LIQUIDO UTERINO.

VARIACIONES DEL METODO	ACTIVIDAD DE CATEPSINA D
METODO ORIGINAL	NO DETECTABLE
AUMENTO DEL TIEMPO DE INCUBACION A 60 min.	NO DETECTABLE
AUMENTO DE LA ALICUOTA DE LA MUESTRA PROBLEMA (0.3 Y 0.4 ml)	NO DETECTABLE
DISMINUCION DE LA CONCENTRACION DE LA Hb (40 g / l)	NO DETECTABLE
DISOLUCION DE LA Hb EN AGUA Y SU DESNATURALIZACION CON UREA*	DETECTABLE
ADICION DE PEPSTATINA AL BLANCO *	DETERMINACION MAS ESPECIFICA

Para la obtención de estos datos se empleó líquido uterino obtenido de ratas en el 50. día de preñez.
 * En estos casos se aumentaron también, la alicuota de la muestra (0.3ml) y el tiempo de incubación (60 min.)

TABLA 2
ACTIVIDAD DE CATEPSINA D EN EL LIQUIDO UTERINO DE RATAS
DURANTE EL PERIODO PERI-IMPLANTACIONAL.

DIAS DE PRENEZ	ACTIVIDAD DE CATEPSINA D (10^{-1} UI / ml)
3	NO DETECTABLE
4	4.46 - 0.36
5	4.05 - 0.66
6	NO DETECTABLE
7	NO DETECTABLE

Se representan los valores de la media y la desviación estandar (\bar{X} ± DE) de 6 determinaciones. La actividad de la enzima en los los días 3, 6 y 7 estuvo por abajo de la sensibilidad del metodo.

TABLA 3
ACTIVIDAD DE CATEPSINA D EN EL LIQUIDO UTERINO DE RATAS
DURANTE EL PERIODO PERI-IMPLANTACIONAL*.

DIAS DE PRENEZ	ACTIVIDAD DE CATEPSINA D (10^{-5} UI / μ g DE PROTEINAS)
3	NO DETECTABLE
4	8.39 1.0
5	6.06 0.78
6	NO DETECTABLE
7	NO DETECTABLE

* $\bar{X} \pm DE$ de 6 determinaciones.

TABLA 4
CONCENTRACION DE PROTEINAS EN EL LIQUIDO UTERINO DE RATAS
DURANTE EL PERIODO PERI-IMPLANTACIONAL*.

DIAS DE PRENEZ	PROTEINAS (ug / ml)
3	44.48 ± 2.05 ^a
4	53.59 ± 6.15 ^a
5	68.8 ± 4.07 ^b
6	88.53 ± 4.82 ^c
7	89.93 ± 7.80 ^c

* $\bar{X} \pm D E$ de 6 determinaciones.

Las letras distintas indican diferencias significativas entre sus medias ($P < 0.01$).

DISCUSION

La enzima lisosomal catepsina D se encuentra en el epitelio luminal y el glandular del útero en el quinto día de preñez en la rata (Elangovan y Moulton, 1980). En el presente trabajo se determinó la actividad de catepsina D en el líquido luminal uterino en el periodo peri-implantacional de la rata, lo cual fue imposible aplicando el método de Turk y col. (1984), aun utilizando hemoglobina para sustrato. Sin embargo, cuando se mejoró la solubilidad de esta por desnaturalización con urea, su detección en el líquido uterino fue posible.

El blanco de pepstatina nos asegura una mayor especificidad del método, sin embargo, no puede discriminar la actividad de catepsina D de la actividad de catepsina E. Aunque no se ha reportado la presencia de catepsina E en el endometrio en el periodo peri-implantacional en la rata, no se descarta la posibilidad de que la actividad encontrada sea la suma de las actividades de ambas enzimas lisosomales. Sin embargo, la catepsina E quizás podría influir muy poco en las mediciones, pues su pH óptimo es 2.5 (Greenbaum, 1960), el volumen del líquido recuperado es muy pequeño y se tiene la certeza que el endometrio contiene catepsina D. Por estas razones, en el presente trabajo se utiliza el término actividad de catepsina D cuando se hace referencia a la actividad detectada en el líquido luminal uterino por medio del método de Turk y col. modificado. Además, para discriminar entre la actividad de ambas enzimas se requiere su purificación. A este punto del trabajo no consideramos conveniente dedicarnos a ello por las siguientes razones:

- a) El líquido uterino presenta muy poca actividad de la enzima.
- b) En la mayoría de los trabajos se emplea metodología que no las discrimina, y aun así reportan sus datos como actividad de catepsina D.
- c) La catepsina E puede convertirse en la catepsina D, la cual es más pequeña (Greenbaum, 1960) y posiblemente se trate de la misma enzima.

Al aplicar el método de Turk y col. modificado solo se encontró actividad de catepsina D los días 4 y 5 de preñez, no siendo posible siquiera su detección en los días 3, 6 y 7. Es poco probable que la actividad reportada se deba a posibles artificios como por ejemplo, presencia de eritrocitos o células epiteliales en las muestras recogidas, puesto que el líquido uterino obtenido se centrifugó para descartar la presencia de células. Además, el día 6 de preñez es el día en el que el epitelio es más lábil, ya que la muerte programada de este comienza el día 6 de preñez, y aún así no encontramos actividad de la enzima. Asimismo, la perfusión por la aorta a nivel de los pulmones, en la caja torácica, garantiza que se minimizó la contaminación con suero o células sanguíneas durante el desangrado, esto aparte de la función misma de la perfusión, que es la de limpiar de sangre los órganos a utilizar. Se podría pensar que la presión ejercida durante la perfusión podría ocasionar extravasación de líquido que contuviera la enzima o que la acarreará de los tejidos adyacentes a los vasos sanguíneos hacia el lumen uterino, pero puede descartarse dicho planteamiento si consideramos que la catepsina D aún está presente en el epitelio luminal uterino en el día 6, día en el que la permeabilidad es mayor, y aún así la actividad de catepsina D es indetectable en el líquido luminal.

Posiblemente esta sea la proteína de 43000 daltones que Surani (1977) encontró en el líquido luminal uterino el día 5 de preñez en la rata, o la de peso molecular de 44000 daltones que en un estudio similar Mullholland y Ville (1984) señalan en el mismo día de gestación, ya que según Moulton e Ingle (1981) el peso molecular de la catepsina D del endometrio de rata está entre 42000 y 44000 daltones.

La catepsina D en el líquido luminal uterino puede provenir ya sea del blastocisto, o del endometrio. Se sabe que el blastocisto se forma durante la noche del día 4 (Psychoyos, 1973a,b) y que el blastocisto libera proteínas al medio (Nieder, 1990). Sin embargo, por la mañana del día 4 de preñez los embriones aun no llegan al útero y ya se encuentra la catepsina D en el lumen, por lo que su origen sería más bien uterino.

El endometrio es capaz de liberar proteínas (Surani, 1976, 1977) tanto durante la preñez, como durante la pseudopreñez (O'Shea, 1972). Además, se ha encontrado que en el cerdo (Hansen y col., 1985) y en el gato (Weiguo y col., 1991) hay liberación de enzimas lisosomales, entre ellas las catepsinas D y L al lumen uterino durante la preñez, y en rebanadas de útero de rata cultivadas en presencia de dietilestilbestrol y/o estradiol $17-\beta$, se libera catepsina B al medio de incubación (Pietras y Szego, 1975). De lo anterior podemos deducir que la actividad de catepsina D aquí reportada podría deberse a que el endometrio libera catepsina D al lumen en el día 4 y muy probablemente también en el día 5 de preñez. Posiblemente a ello se debe, en parte, la caída en contenido de catepsina D en el epitelio al día 6 de preñez reportada por Moulton (1974).

Al comparar estadísticamente los datos de actividad de la enzima no se encuentran diferencias significativas entre los días 4 y 5 de preñez, cuando esta se reporta como UI de catepsina D/ml de líquido uterino, pero sí cuando se expresa como UI de catepsina D/mg de proteínas. La concentración de proteínas en el líquido uterino es considerablemente mayor en el día 5 de gestación con respecto al día 4, de manera que al obtener el cociente de catepsina D/mg de proteínas, este es menor en el día 5 de preñez. De esta manera se puede deducir fácilmente que la caída de la actividad específica de catepsina D en el día 5 de gestación con respecto al día 4 no se debe a un menor contenido de la enzima, sino a una mayor proporción de otras proteínas en el líquido uterino (tablas 2 y 3) Por lo tanto, si la catepsina D es importante en el proceso de implantación embrionaria, debe serlo en la fase inicial.

El aumento en la cantidad de proteínas en el líquido uterino en forma lineal con el avance de la preñez puede deberse, quizás, a que en los días en que el embrión se implanta existe una mayor demanda de ellas en el lumen. Algunas podrían jugar un papel importante como medio de interacción entre el blastocisto y el endometrio, o en la nutrición del embrión. El aumento en el día 6 de preñez, y el que se conserve sin cambios en el día 7, puede ser el reflejo de una interacción más intensa entre ambos

participantes. De hecho, en el ratón, el blastocisto empieza a secretar glicoproteínas a partir del día 4 de preñez, dicha secreción se incrementa notoriamente en cultivo, en un tiempo equivalente a los días 7 y 8 de gestación (Baiza y Col., 1990).

La regulación de la liberación de catepsina D al lumen uterino en la rata, probablemente es hormonal. En el cerdo, la liberación de catepsina D y otras enzimas lisosomales al lumen uterino por el endometrio se ha vinculado con la acción de la hormona progesterona. Asimismo, antes de que la catepsina L fuera caracterizada en el líquido uterino de gatas preñadas (Li y col., 1991; Thatcher y col., 1991), se había demostrado ya que esta enzima es sintetizada y liberada al lumen uterino de esta especie como respuesta a la acción de la progesterona (Boomsma y Varhage, 1987; Verhage y col., 1989). En la rata, la síntesis de catepsina D es estimulada específicamente por progesterona e inespecíficamente por estradiol-17 β (Elangovan y Moulton, 1980). Sin embargo, en la mañana del día 4, el endometrio se encuentra bajo la influencia predominante de progesterona, así que debido a que la catepsina D se comienza a liberar cuando el metabolismo uterino está gobernado por progesterona, podemos suponer que su liberación depende de esta hormona.

Aunque no podemos atribuir con certeza una función específica a la catepsina D, parece ser que su presencia en el lumen uterino no es casual. El epitelio luminal uterino adyacente al blastocisto permanece intacto durante los días 4 y 5 de preñez y su muerte comienza el día 6 (Finn y Porter, 1975), día en que no encontramos actividad de catepsina D en el líquido uterino; esto nos asegura que la enzima no proviene de muerte celular y nos hace considerar la posibilidad de que sea secretada con la finalidad de jugar un papel importante en el proceso de implantación, aunque bien puede ser que no tenga función alguna y su concentración en el líquido uterino sea sólo un reflejo de su presencia en el epitelio. Si bien el mecanismo de secreción de catepsina D o de cualquier otra enzima lisosomal no se conoce, parece estar claro que cualquiera que pudiera ser, debe estar regulado hormonalmente. Además, existe la posibilidad de que pudiera realizar una función no enzimática.

Cuando Hiroshi Terayama y su equipo estudiaron el efecto de la catepsina D sobre las células hepáticas, encontraron que al administrar los inhibidores de proteasas lisosomales (catepsinas) pepstatina y leupeptina intraperitonealmente a ratas con hepatectomía parcial, se inhibe o se retarda la síntesis de RNA y DNA, así como las mitosis en hepatocitos que se observan en los controles (Miyamoto y col., 1973). En 1984, Morioka y Terayama reportaron que una sola inyección intraperitoneal de catepsina D, pero no de la misma inactivada por calor o albúmina sérica de bovino estimula la síntesis de DNA y la división celular en hígados de ratones intactos. Asimismo, Terayama y col. (1985) reportaron que la catepsina L es tan efectiva como la catepsina D en estimular la síntesis de DNA y causar un incremento del número de células en mitosis en el hígado de ratones. Se encontró también que un factor sérico estimula la liberación de catepsina D de los eritrocitos o de fantasmas de eritrocitos (Takehara y Terayama, 1984), así como de lisosomas aislados de hepatocitos (Miyamoto y Terayama, 1975). Finalmente, Terayama y col. (1985) demostraron que el factor sérico es secretado por la glándula paratiroides y le dieron el nombre de calciferina, refiriéndose a ella como una hormona. Estos trabajos marcan la posibilidad de una función no enzimática de la catepsina D, ya que al aplicarse intraperitonealmente no se encuentra a un pH adecuado para ello, y sin embargo, afecta la función hepática.

Cuando Wood (1969) encontró que la actividad de la catepsina D se incrementa en el endometrio durante el periodo peri-implantacional en la rata, y que cuando en el lumen ha permanecido un hilo su actividad es menor, creyó que la actividad de catepsina D está directamente asociada con la habilidad del endometrio de experimentar la reacción decidual. Moulton (1974) relacionó la presencia de catepsina D en el epitelio endometrial con la muerte que sufren estas células cuando cerca de ellas se encuentra el blastocisto en el inicio de la implantación. Aun cuando han transcurrido casi 25 años desde el trabajo de Wood, la catepsina D ha llamado muy poco la atención de los investigadores, y a la fecha no sabemos si es importante o no en el proceso de implantación. Durante este lapso, no se ha comprobado la

propuesta de Wood, pero consideramos que se ha descartado la de Moulton (vease Parr y col., 1987). Sin embargo, el hecho de que la catepsina D sea liberada al lumen uterino durante los días 4 y 5 de preñez en la rata, nos hace considerar varias posibilidades, las cuales se pueden resumir en una función directa o indirecta de la enzima sobre el blastocisto o el endometrio.

I) Acción de la catepsina D sobre el blastocisto.

Cuando Ichikawa y col. (1985) estudiaron el efecto de varios inhibidores de proteasas, inyectados intraluminalmente en el útero de ratas a las 14 horas del día 5 de preñez, encontraron que la quimioestatina y la -MAPI, que son inhibidores de serina proteasas semejantes a la quimiotripsina y de tiol proteasas, así como la tiolestatina, un inhibidor de tiol proteasas, redujeron significativamente el crecimiento embrionario; y que la antipapaína y leupeptina, los cuales son inhibidores de proteasas semejantes a la tripsina y tiol proteasas, interrumpieron significativamente la remoción de la zona pelúcida de los blastocistos; mientras que la pepstatina, un inhibidor de algunas proteasas ácidas, entre ellas la catepsina D no tuvo el más mínimo efecto adverso en el crecimiento embrionario o en el desprendimiento de la zona pelúcida. Esto último puede implicar que la catepsina D no es indispensable para la ruptura de la zona pelúcida ni en el crecimiento embrionario. Sin embargo, esta enzima podría coadyuvar en el proceso de implantación de varias maneras:

a) Quizás proporcione nutrientes al blastocisto por degradar otras proteínas presentes en el lumen uterino, siempre y cuando encuentre un microambiente adecuado, o ser sustrato de otras proteasas.

b) Es posible que no sea indispensable para la ruptura de la zona pelúcida, pero podría facilitarla, el microambiente ácido podría ser proporcionado por la enzima anhidrasa carbónica, al convertir anhídrido carbónico y agua en ácido carbónico. Esta última enzima se ha involucrado en la ruptura de la zona pelúcida por facilitar la formación de un ambiente ácido, en el cual la zona pelúcida se disuelve.

c) Podría alterar el metabolismo embrionario mediante la modificación de la superficie de las células del trofoblasto.

II) Acción de la catepsina D sobre el endometrio.

Si la acción de la catepsina D es sobre el endometrio, posiblemente sea mediante un mecanismo autócrino o parácrino. La enzima podría ser liberada e interactuar con la superficie de las células del epitelio luminal y/o del estroma uterino.

Sea cual sea su función en el proceso de implantación, no debemos descartar la posibilidad, sin embargo, de que su presencia sea casual y que en realidad no tenga función alguna, aunque esto parece difícil, pues estamos acostumbrados a pensar como es la tradición en biología, de que si algo ocurre es porque tiene alguna importancia para el individuo en estudio. Además, debe recalcarse que la concentración de la enzima tanto en el epitelio como en el líquido uterino es muy localizada en espacio y tiempo, ya que se encontraron en los días 4 y 5 de preñez, periodo en el que el endometrio adquiere la sensibilidad a las señales embrionarias, en el que la mórula entra al útero, se convierte en blastocisto y empieza a interactuar con el endometrio.

CONCLUSIONES

1.- Se encontró actividad de catepsina D en el líquido uterino los días 4 y 5 de preñez de la rata, mientras que en los días 3,6 y 7 no pudo detectarse con la metodología empleada.

2.- La actividad de catepsina D en el líquido uterino coincide con el periodo en que el endometrio adquiere la capacidad de responder a las señales embrionarias y se inicia la interacción del blastocisto con el endometrio, por lo que su presencia puede no ser fortuita.

3.- La concentración de proteínas en el líquido uterino incrementa del día 3 al 6 de preñez, manteniéndose constante durante los días 6 y 7.

4.- El aumento en concentración de proteínas en el líquido uterino en el periodo estudiado puede deberse a un incremento en la actividad secretoria tanto endometrial como trofoblástica.

APENDICE A

Metodo de Turk y Col. para la determinación de catepsina D.

Reactivos.

1.- Amortiguador de acetatos (1.35 M, pH 3.5; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 20 mM):

Se disolvieron 0.264 g de sulfato de amonio en aproximadamente 50 ml de agua, se adicionaron 7.8 ml de ácido acético glacial, y se llevó a 100 ml con agua, el pH se ajustó con NaOH, 1 M.

2.- Solución sustrato (100 g/l):

Se disolvieron 2 g de hemoglobina en 20 ml de amortiguador de acetatos . El pH final de la solución fue ajustado a 3.5.

3.- Acido tricloroacético (0.3 M):

Se disolvieron 4.9 g de ácido tricloroacético en un volumen pequeño de agua y se llevó a 100 ml con agua.

4.- NaOH (0.5 M):

Se disolvieron 10 g de granulos de NaOH en agua hasta 500 ml.

5.- Reactivo de Folin-Ciocalteau (33 % v/v):

Se diluyó el reactivo disponible comercialmente con dos volúmenes iguales de agua.

6.- Solución estandar de tirosina (1 mM):

Se disolvió 18.12 mg de L-(-)-tirosina en HCl 0.2 M, y se llevó a 100 ml con agua.

Incubación del sustrato con la enzima.

1.- En un baño maría con agitación constante, a 37°C, se colocó, por cada determinación, un tubo de ensaye que sirvió como blanco, y otro que fue el experimental

- 2.- A cada tubo de ensaye se le agregó 1 ml de sustrato (hemoglobina 100 g/l, en amortiguador de acetatos 1.35 M, pH 3.5; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 20 mM) y se esperó a que se equilibrara a 37°C.
- 3.- Al tubo blanco se le agregaron 2 ml de ácido tricloroacético 0.3 M y 0.2 ml de líquido uterino. Al tubo experimental solo se le agregaron 0.2 ml de líquido uterino.
- 4.- Se agitó vigorosamente y se incubó por 10 min exactamente.
- 5.- Después de la incubación, se agregaron 2 ml de ácido tricloroacético 0.3 M al tubo experimental.
- 6.- Ambos tubos se agitaron y se dejaron reposar a temperatura ambiente por 30 minutos exactamente.
- 7.- Se centrifugaron por 10 minutos a 5000 rpm, se desechó el sedimento y se volvió a centrifugar el sobrenadante.
- 8.- Del sobrenadante resultante se tomó 1 ml y se vertió en otro tubo de ensaye, en el cual se determinó la cantidad de aminoácidos aromáticos.

Determinación de aminoácidos aromáticos.

- 1.- Se preparó una curva patrón que va de 0.02 a 0.2 ml de solución estandar de tirosina 1 mM (181 µg/ml) en HCl 0.2 M llevando el volumen a 1 ml con HCl 0.2 M.
- 2.- Se adicionaron 2 ml de NaOH 0.5 M.
- 3.- Se adicionaron 0.6 ml del reactivo de Folin-Ciocalteu al 33 % v/v, preparado al momento de usar.
- 4.- Se agitó y pasados 5 min se midió la absorbancia a 750 nm.

Debido a la poca cantidad de la enzima en el líquido uterino, y para hacerlo más específico tuvimos que probar diversas variaciones del método que aumentaran su sensibilidad, estas fueron:

a) Tiempo de incubación.

Según Turk y col. (1984) la degradación de hemoglobina en ensayos bioquímicos no guarda linealidad con respecto a la cantidad de catepsina D adicionada, sino con respecto al tiempo, así que se incubó el sustrato con el líquido luminal uterino por 30 min.

b) Alicuota de la muestra enzimática.

Se varió también el volumen de líquido uterino utilizado, determinando la actividad enzimática con 0.3 y 0.4 ml en lugar de 0.2 ml.

c) Concentración de hemoglobina.

Utilizando la concentración de hemoglobina que cita el método de Turk y col. tuvimos problemas con la disolución de la hemoglobina. Como la hemoglobina no disuelta puede impedir la interacción física entre la enzima y la hemoglobina disuelta, se optó por disminuir la concentración de hemoglobina en un 60 %, es decir, a 40 g/l. Se decidió hacerlo así porque estimamos a simple vista que aproximadamente el 60 % de la hemoglobina permanecía sin disolverse cuando utilizamos hemoglobina 100 g/l.

d) La forma de preparar el sustrato.

1) Hemoglobina disuelta en agua.

Se intentó disolver 2 g de hemoglobina en agua, se agregó 10 ml del amortiguador de acetatos al doble de concentración y se ajustó el pH a 3.5, teniendo al final Hb 100 g/l.

2) Hemoglobina disuelta en agua y desnaturalizada con urea.

Es el procedimiento por el cual se generaron nuestros datos: se describió en la sección de Material y Metodología.

e) Adición de pepstatina al blanco.

En este caso se adicionó 0.1 ml de pepstatina al blanco del método de Turk y col. modificado como se describió en la sección de Material y Metodología.

APENDICE B

Determinación de proteínas por el método de Lowry.

Reactivos.

a) Solución A: NaOH 0.4 %; NaCO₃ 2 %; tartrato de sodio potasio 0.02 %.

Se pesaron 0.4 g de NaOH, 2 g de NaCO₃ y 0.02 g de tartrato de sodio potasio. Se disolvieron por separado y se adicionaron lentamente en un matraz volumétrico, en el cual se aforó a 100 ml.

b) Solución B: CuSO₄ 0.5 %.

Se disolvió 0.05 g de CuSO₄ en agua y se aforó a 10 ml.

c) Solución C: solución A más solución B.

A 50 ml de la solución A se le adicionó 1 ml de la solución B al momento de usar.

d) BSA 0.1 µg/µl.

Se disolvió 10 mg de BSA (abreviación en inglés de albúmina sérica de bovino) en agua y se aforó a 100 ml.

Nota. Recordemos que cuando no se especifica el solvente en el cual se disuelve cierta sustancia, o con el cual se afora, se sobreentiende que dicho solvente es agua, de preferencia bidestilada.

Tratamiento de la muestra.

Como se describió en Material y Metodología

Determinación de proteínas.

a) Se preparó una curva patrón que va de 0.04 a 0.2 ml de solución estandar de BSA 0.1 µg/µl en agua, llevando el volumen a 0.2 ml con agua y se agitó.

- b) Se agregó 1 ml de la solución C y se agitó.
- c) Se agregaron 0.2 ml de reactivo de Folin-Ciocalteu al 50 % en agua
- d) Se agitó y se dejó reposar durante 45 min.
- e) Se midió la absorbancia a 550 nm.

REFERENCIAS

- 1.- Amoroso, E.C. (1952). Placentation. En: Marshall's Physiology of Reproduction (A.S. Parkes, ed), vol 2, EE. UU., Longmans, pp. 127-186.
- 2.- Baiza, L.A., Mayor, R., Izquierdo, L. (1990). Inhibición de la implantación in vitro y síntesis proteica. Arch. Biol. Med. Exp., 23: L-254.
- 3.- Beier, H.M., Elger, W., Hegele-Harttung, C., Moots, U. y Beier-Hellwig, K. (1991). Dissociation of corpus luteum, endometrium and blastocist in human implantation research. J. Reprod. Fertil., 92: 511-523.
- 4.- Boomsma, R.A. y Verhage, H.G. (1987). Detection of a progesterone-dependent secretory protein synthesized by cat endometrium. Biol. Reprod., 37: 117-126.
- 5.- Boomsma, R.A., Mavrogrianis, P.A., Li, W., Fazleabas, A.T. y Jaffe, R.C. (1989). Immunological characterization and immunocytochemical localization of a progesterone-dependent cat endometrial secretory protein. Biol. Reprod., 41: 347-354.
- 6.- Canivec, R., Laffargue, M. y Mayer, G. (1956). Nidations retardées chez la ratte castrée et injectée de progesterone: influence du moment de la castration sur la chronologie de l'ovoimplantation. C. R. Soc. Biol., 150: 2208-2212.
- 7.- Dickmann, Z. y Noyes, R. W. (1961). The zona pellucida at the time of implantation. Fertil. Steril., 12:310-318.
- 8.- Dickmann, Z. (1969). Shedding of the zona pellucida. En: Advances in Reproductive Physiology (A. McLaren, ed.), volumen 4, EE. UU., Academic Press, pp.188-205.

- 9.- Dickmann, Z., Dey, S. K., Sengupta, J. (1976). A new concept: control of early pregnancy by steroid hormones originating in the preimplantation embryo. *Vitam. Horm.* 34: 215-243.
- 10.- Dickmann, Z. (1979). Systematic versus local hormonal requirements for blastocyst implantation: A hypothesis. *Persp. Biol. Med.*, 22: 390-393.
- 11.- Elangovan, S y Moulton, B. C. (1980). Progesterone and estrogen control of rates of synthesis of uterine cathepsin D. *J. Biol. Chem.*, 255: 7474-7479.
- 12.- Fin, C. A. y Porter, D.G. (1975). *The Uterus*, Publishing Sciences Group, Acton, UK.
- 13.- Flamigni, C., Bulletti, C., Polli, B., Ciotti, P. M., Prefetto, R. A., Galassi, A. y DiCosmo, E. (1991). Factors regulating interaction between trophoblast and human endometrium. En: *The primate endometrium* (C. Bulletti y E. Gurpide, eds.), parte IV, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 513: 176-190.
- 14.- Garret, G. E., Geisert, R. D., Zavy, M. T. y Morgan, G. L. (1988). Evidence for maternal regulation of early conceptus growth and development in the bovine. *J. Reprod. fert.*, 84: 437-446.
- 15.- Gore-Langton, R.E. y Surani, M. A. H. (1976). Uterine luminal proteins of mice. *J. Reprod. Fert.*, 46: 271-274.
- 16.- Greenbaum, L.M. (1960). Cathepsins and kinin-forming and -destroying enzymes. En: *The enzymes* (J.S. Fruton, ed.), 4: 475-483.
- 17.- Hansen, P. J., Bazer, F. W. y Roberts, R. M. (1985). Appearance of β -hexosaminidase and other lysosomal-like enzymes in the uterine lumen of gilts, ewes y mares in response to progesterone and oestrogens. *J. Reprod. Fert.*, 73: 411-424.

- 18.- Heap, R. B. (1980). Implantation. En: Steroid Induced Uterine Proteins (M. Beato, ed.) Países Bajos, North-Holland, pp. 35-46.
- 19.- Hinchliffe, J. R. y El-Shershaby, A. M. (1975). Epithelial cell death in the oil-induced decidual reaction of the pseudopregnant mouse: an ultrastructural study. J. Reprod. Fert., 45: 463-468.
- 20- Ichikawa, S., Shibata, T., Takehara, T., Oda, K. y Murao, S. (1985). Effects of proteinase inhibitors on preimplantation embryos in the rat. J. Reprod.Fert., 73: 385-390.
- 21.- Kennedy, T. G. y Lukash, L.H. (1982). Induction of decidualization in rats by the intrauterine infusion of prostaglandins. Biol. Reprod. 27: 253-260.
- 22.- Kennedy, T. G. (1983). Embryonic signals and the initiation of blastocyst implantation. Aust. J. Biol. Sci., 36: 531-543.
- 23.- Kraicer, P. y Shelesnyak, M. C. (1958). The induction of deciduomata in the pseudopregnant rat by systemic administration of histamine and histamine releasers. J. Endocr., 17: 324-328.
- 24.- Lejeune, B., Hoeck, J. V. y Leroy, F. (1981). Transmitter role of the luminal uterine epithelium in the induction of the decidualization in rats. J. Reprod. Fert. 61: 235-240.
- 25.- Lejeune, B., Dehou, M. F. y Leroy, F. (1986). tentative extrapolation of animal data to human implantation. Ann. N. Y. Acad. Sci. 476:128-143.
- 26.- Leonard, S. L. y Knobil, E. (1950). β -glucuronidase activity in the rat uterus. Endocrinology, 47:331-337.
- 27.- Li, W., Jaffe, R. C., Fazleabas, A. T. y Verhage, H. G. (1991). Progesterone-dependent cathepsin L proteolytic activity in cat uterine flushings. Biol. reprod. 44: 625-631.

- 28.- Lowry, O. L., Rosenbroug, N. J., Farr, A. L. y Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-276.
- 29.- Marcus, G. J. (1974). Mitosis in the rat uterus during the estrous cycle, early pregnancy, and early pseudopregnancy. *Biol. Reprod.* 10: 447-452.
- 30.- Martel, D y Psychoyos, A. (1978). (1978). Progesterone-induced oestrogen receptors in the rat uterus. *J. Endocr.*, 76: 145-154.
- 31.- Martel, D y Psychoyos, A. (1982). Different responses of rat endometrial epithelium and stroma to induction of oestradiol binding sites by progesterone. *J. Reprod. Fert.* 64: 387-389.
- 32.- McLaren, A. (1975) .Fertilization cleavage and implantation. En: reproduction in farm animals (E. S. E. Hafez, ed.), 3a edición. EE. UU., Lea y Febiger, pp. 143-165.
- 33.- McRae, A. C. y Kennedy, T. G. (1979). Evidence for a permeability barrier between blood and uterine luminal fluid in estrogen treated, immature rats. *Biol. Reprod.* 20: 919-923.
- 34.- McRae, A. C. (1984). The blood-uterine lumen barrier and its possible significance in early embryo development. *Oxford Rev. Reprod. Biol.* 6: 129-173.
- 35.- McRae, A.C., (1988). Tha blood uterine lumen barrier and exchange between extracellular fluids. *J. Reprod. Fert.*, 82: 857-873.
- 36.- Morioka, M. y Terayama, H. (1984). Cathepsin D stimulates DNA synthesis and mitosis in mouse liver in vitro. *Exp. Cell. Res.*, 151: 273-276.

- 37.- Moulton, B. C. (1974). Ovum implantation and uterine lysosomal enzyme activity. Biol. Reprod. 10: 543-548.
- 38.- Moulton, B. C., Koenig, B. B. y Borkan, S. C. (1978). Uterine lysosomal enzyme activity during ovum implantation and early decidualization. Biol. Reprod. 19: 167-170.
- 39.- Moulton, B. C. e Ingle, C. B. (1981). uterine lysosomal cathepsin D activity, rate of synthesis, and immunohistochemical localization following initiation of decidualization in pseudopregnant rats. Biol. Reprod., 25: 393-398.
- 40.- Moulton, B. C. y Koenig, B. B. (1986). Biochemical responses of the luminal epithelium and uterine sensitization. Ann. N. Y. Acad. Sci., 476: 95-109.
- 41.- Mullholland, J. y Ville, C.A. (1984). Proteins synthesized by the rat endometrium during early pregnancy. J. Reprod. Fert., 72: 395-400.
- 42.- Miyamoto, M., Terayama, H. y Ohnishi, T. (1973). Effects of pretease inhibitors on liver regeneration. Biochem. Biophys. Res. Commun., 55: 84-90.
- 43.- Miyamoto, M. y Terayama, H. (1975). Serum factors affecting cathepsin D release from lysosomes Biochem. Biophys. Res. Commun., 64: 617-624.
- 44.- Nieder, G. L., Weitlauf, H. M. y Suda-Hartman, M. (1987). Synthesis and secretion of stage-specific proteins by peri-implantation mouse embryo. Biol Reprod., 36: 687-699.
- 45.- Nieder, G. L. y Macon, G. R. (1987). Uterine and oviductal protein secretion during early pregnancy in the mouse. J. Reprod. Fert. 81: 287-294.

- 46.- Nieder, G. L. (1990). Protein secretion by the mouse trophoblast during attachment and outgrowth in vitro. Biol Reprod. 43: 251-259.
- 47.- Noyes, R. W., Dickmann, Z., Doyle, L. L. y Gates, A. H. (1963). Ovum transfer synchronous and asynchronous in the study of implantation. En: Delayed implantation (A. C. Enders, ed.), EE. UU., University Chicago Press, pp. 197-211.
- 48.- O'Shea, J. D. (1972). Uterine fluid and the duration of the pseudopregnancy following transection of the uterus in the rat. J. Reprod. Fert. 29: 57- 64.
- 49.- Parr, E. L., Tung, H. N. y Parr, M. B. (1987). Apoptosis as the mode of uterine epithelial cell death during embryo implantation in mice and rats. Biol. Reprod. 36: 211-225.
- 50.- Parr, M. B. y Parr, E. L. (1990). The implantation reaction. En: Biology of the Uterus (R. M. Wynn y W.P. Jollie, eds.), 2a. edición, EE. UU., Plenum Medical Book Company, pp. 223-227.
- 51.- Pietras, R. J. y Szego, C. M. (1975). Surface modifications evoked by estradiol and diethylstilbestrol in isolated endometrial cells: evidence from lectin probes and extracellular release of lysosomal protease. Endocrinology, 97 1445-1454.
- 52.- Psychoyos, A. (1966). Recent research on egg-implantation. En: Ciba foundation study group on Egg Implantation (Wolstenholme, G.E.W. y O'Connor, M., ed) , Londres, Churchill, p. 4-28.
- 53.- Psychoyos, A. (1967). The hormonal interplay controlling egg implantation in the rat. En: Advances in Reproductive Physiology (A. McLaren, ed.), volumen 2, EE. UU., Academic Press, pp. 257-277.

- 54.- Psychoyos, A (1973a). Endocrine control of egg implantation. En: Handbook of Physiology (R. O. Greep y E. B. Astwood eds.), sección 7: Endocrinology, volumen II, parte 2, EE. UU., American Physiological Society, pp. 187-215.
- 55.- Psychoyos, A (1973b). Hormonal control of ovoimplantation. Vitams. Horm., 31: 201-256.
- 56.- Psychoyos, A. (1886). Uterine receptivity for nidation. Ann. N. Y. Acad. Sci., 476: 36-42.
- 57.- Roberts, R. M. y Bazer, F. W. (1988). The functions of uterine secretions. J. Reprod. Fert., 82: 875-892.
- 58.- Schlafke, S. y Enders, A. C. (1975). Cellular basis of interaction between trophoblast and uterus at implantation. Biol. Reprod., 12: 41-65.
- 59.- Shelesnyak, M. C. (1952). Inhibition of decidual cell formation in the pseudopregnant rat by histamine antagonists. Am. J. Physiol., 170: 522-525.
- 60.- Shelesnyak, M. C. (1960). Nidation of the fertilized ovum. Endeavor, 19: 81-86.
- 61.- Simmen, R. C. M., Wilde, M. H., Pope, W. F. y Simmen, F. A. (1986). Porcine uterine luminal fluid contains epithelial cell growth stimulating factors. J. Cell. Biol., 103: 154a, abstr. 565.
- 62.- Surani, M. A. H. (1975). Hormonal regulation of proteins in the uterine secretion of ovariectomized rats and the implications for implantation and embryonic diapause. J. Reprod. Fert., 43: 411-417.
- 63.- Surani, M. A. H. (1976). Uterine luminal proteins at the time of implantation in rats. J. Reprod. Fert., 48: 141-145.

- 64.- Surani, M.A.H. (1977). Qualitative and quantitative examination of the proteins of rat uterine luminal fluid during proestrous and pregnancy and comparison with those of serum. *J. Reprod. Fert.*, 50: 281-287.
- 65.- Surani, M. A. H. (1979). Glycoprotein synthesis and inhibition of glycosylation by tunicamycin in preimplantation mouse embryos: compactation and trophoblast adhesion. *Cell*, 18: 217-227.
- 66.- Tachi, C, Tachi, S. y Lindner, H. R. (1972). Modification by progesterone of oestradiol-induced cell proliferation, RNA synthesis and oestradiol distribution in the rat uterus. *J. Reprod. fert.*, 31: 59-76.
- 67.- Tachi, C. y Tachi, S. (1974). Cellular aspects of ovum implantation and decidualization in the rat. En: *Physiology and Genetics of Reproduction* (E. M. Coutinho y Fucs, eds.), EE. UU., Plenum Press, 263-286.
- 68.- Takehara, T. y Terayama, H. (1984). A serum factor stimulating cathepsin D-release from erythrocytes or ghosts. *Int. J. Biochem.*, 16: 147-153.
- 69.- Tamada, H., Oda. K. Y Murao, S. (1985). Effects of proteinase inhibitors on preimplantation embryos in the rat. *J. Reprod. Fert.*, 73: 385-390.
- 70.- Terayama, H., Morioka, H. y Koji, T. (1985). Mitogenic effects of certain cathepsins and calciferin on the intact liver in vivo. *Int. J. Bioch.*, 17: 949-955.
- 71.- Thatcher, D.M., Shille, V.M., Fliss, M.F., Bazer, F.W., Sisum, W. y Randal, S. (1991). Characterization of feline conceptus proteins during pregnancy. *Biol. reprod.*, 44: 108-120.

72.- Turk. V., Lah, T. y Kregar, I. (1984). Cathepsin D, cathepsin E. En: *Methods of Enzymatic Analysis* (A. V. Bergmeyer, ed.), 3a. edición, volumen 5, Verlag Chemie. pp. 21-222.

73.- Weitlauf, H. M. (1979). Implantation. En: *Animal models for research on contraception and fertility* (N. J. Alexander, ed.), EE. UU., Harper y Row. pp. 238-252.

74.- Weitlauf, H. M. (1988). Biology of implantation. En: *the physiology of Reproduction* (E. Knobil y J. Neill, eds.), volumen II, EE. UU., Raven Press, pp. 231-262.

75.- Weitlauf, H. M. y Suda-Hartman, M. (1988). Changes in secreted uterine proteins associated with embryo implantation in the mouse. *J. Reprod. Fert.*, 84: 539-549.

76.- Yochim, J. M. y De Feo, V. J. (1963). Hormonal control of the onset, magnitude and duration of uterine sensitivity in the rat by steroid hormones of the ovary. *Endocrinology*, 72: 317-326.