



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MEXICO

CAMPUS IZTACALA

BC1263/96

ej.1

"ACTIVIDAD DE PEROXIDASA EN EL UTERO  
DURANTE EL INICIO DE LA PREÑEZ EN LA RATA"

**T E S I S**

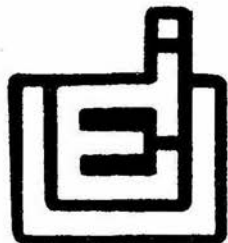
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

**B I O L O G O**

**P R E S E N T A**

**MARTHA MANINA FLORES SANCHEZ**

DIRECTOR DE TESIS: DR. LUIS ARTURO BAIZA GUTMAN



LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MEXICO

1996



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.

El presente trabajo se realizó en la Unidad de Bioquímica de la Subjefatura de Investigación Biomédica del Hospital de Especialidades del Centro Médico Siglo X X I con la colaboración del Dr. Juan José Hicks Gómez y en el Laboratorio de Biología del Desarrollo de la Unidad de Morfología y Función de la Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala de la U N A M, bajo la dirección del Dr. Luis Arturo Baiza Gutman.

## DEDICATORIAS

A mi familia por su apoyo durante la realización de mis estudios profesionales:

Sra. Fanny Sánchez García  
M. C. José Luis Flores Vázquez  
Srita. Kenya Miroslava Flores Sánchez

A la UNAM, en particular a mi *Alma mater*, la ENEP-Iztacala, a la que agradezco la oportunidad de superarme personal y académicamente y de la que guardaré recuerdos únicos y gratos.

A la Ing. Libia Verónica Valdéz Zamudio por su invaluable amistad.

A la Dra. María del Carmen Chim Keb, por su apoyo incondicional en momentos difíciles para mí.

A mí, por el empeño que puse en la realización de mi carrera y de esta tesis y que sé que tendré en posteriores trabajos.

A mi mascota "Coqueta" por la compañía y el cariño leal que me brindó durante diez años de mi vida.

## AGRADECIMIENTOS

Expreso mi más profundo agradecimiento al Dr. Juan José Hicks Gómez, por facilitarme la realización de este trabajo en su laboratorio.

A los sinodales que formaron parte de la comisión dictaminadora :

Biol. Martín Martínez Torres  
M. en C. Martín Palomar  
Dra. Leticia Moreno Fierros  
M. en C. Guadalupe Martínez  
Dr. Luis Arturo Baiza Gutman

Por la revisión crítica, su comprensión y las valiosas sugerencias hechas a este trabajo.

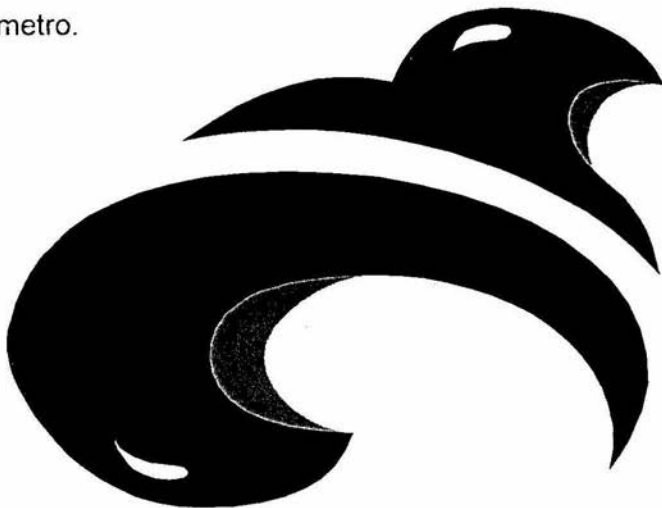
A la Q. F. B. Margarita Flores Díaz por su compañerismo y leal amistad.

Finalmente agradezco con admiración, respeto y afecto al Dr. Luis Arturo Baiza Gutman, por el tiempo, paciencia, comprensión y apoyo que me brindó durante la realización de esta tesis.



Si la tierra tuviera sólo unos cuantos metros de diámetro y estuviera en algún campo cercano, la gente acudiría de todas partes para maravillarse ante ella. Las personas se admirarían de sus grandes charcos, pequeños pozos y del agua que fluye entre ellos. Se asombrarían de sus montículos y depresiones y de la leve capa de gas que la rodea.

El globo sería la maravilla más grande conocida y las multitudes irían a orarle, a ser sanadas, a buscar sabiduría y admirarse de cómo podrían ser. Los pueblos lo adorarían, lo defenderían con su propia vida, porque sabrían de alguna manera que su existencia sería nada sin él. Si la Tierra tuviera sólo unos cuantos metros de diámetro.

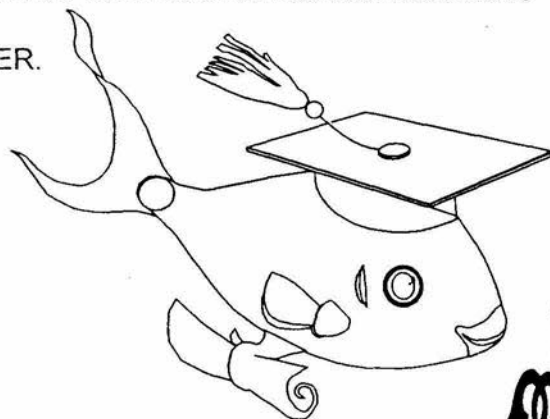


"No se que opine el mundo de mi, pero a mi parecer sólo he sido como un niño que juega en la playa y se regocija al encontrar de vez en cuando un guijarro más pulido o una concha más bonita de lo normal, mientras ante sus ojos se extiende, todavía ignoto, el inmerso mar de la verdad". ISAAC NEWTON.

Dijo la Cumbre al Abismo : "Desde mi altura, contemplo la total extensión del planeta y la excelsa infinitud del firmamento, y tú, ¿Qué haces allá abajo?"  
Respondió el Abismo: "Te sostengo".  
ENRIQUE SOLARI SWAYNE

"Cuando se cierra una puerta a la felicidad, otra se abre, pero con frecuencia nos quedamos tanto tiempo mirando la puerta cerrada, que no vemos la que se abrió".

"La magnífica riqueza de la experiencia humana perdería parte de su encanto si no hubiera limitaciones que superar.  
HELLEN KELLER.



# BIOLOGIA





## CONTENIDO

Lista de Figuras.

Lista de Tablas.

Lista de Abreviaturas.

I. <b>RESUMEN</b> .....	1
II. <b>INTRODUCCION</b> .....	3
<b>A. ASPECTOS GENERALES</b> .....	3
1.- El Ciclo Estral.....	3
2.- Periodo de Preimplantación.....	9
3.- Respuesta del Utero a los Estímulos del Blastocisto.....	16
4.- Periodo de Implantación.....	18
<b>B. ANTECEDENTES</b> .....	25
1.-La Peroxidasa y su Importancia en la Implantación.....	25
<b>C. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	30
<b>D. HIPOTESIS</b> .....	30
III. <b>OBJETIVOS</b> .....	31
<b>A. Objetivo General</b> .....	31
<b>B. Objetivos Particulares</b> .....	31
IV. <b>MATERIALES Y METODOS</b> .....	32
<b>A. MEDICION DE LA ACTIVIDAD DE PEROXIDASA</b> .....	34
1.- Procesamiento del Tejido.....	34
2.- Medición de la Actividad Enzimática.....	34

3.- Método.....	34
<b>B. MEDICION DE PROTEINAS, DNA Y PESO SECO.....</b>	<b>37</b>
<b>C. ANALISIS ESTADISTICO.....</b>	<b>39</b>
<b>V. <u>RESULTADOS</u>.....</b>	<b>40</b>
<b>A. CAMBIOS EN LA ACTIVIDAD DE PEROXIDASA DURANTE LA PREÑEZ EN LA RATA.....</b>	<b>40</b>
1.- Actividad de Peroxidasa Extraible.....	40
2.- Actividad de Peroxidasa Soluble.....	41
3.- Comparación Entre La Actividad de Peroxidasa Extraible y Soluble. ....	41
<b>B. ACTIVIDAD DE PEROXIDASA DURANTE LA FASE DE ESTRO EN LA RATA.....</b>	<b>49</b>
<b>C. CAMBIOS EN LAS CONCENTRACIONES DE PROTEINAS, PESO SECO Y DNA DURANTE LA PREÑEZ EN LA RATA.....</b>	<b>49</b>
<b>D. RELACIONES BIOQUIMICAS DE MASA FUNCIONAL Y CONTENIDO DE HUMEDAD DURANTE LA PREÑEZ EN LA RATA.....</b>	<b>50</b>
<b>V I. <u>DISCUSION</u>.....</b>	<b>57</b>
<b>A. CAMBIOS BIOQUIMICOS DURANTE LA ADQUISICION DE LA RECEPTIVIDAD UTERINA (DIA 3 A 5).....</b>	<b>57</b>
1.-Actividad de Peroxidasa.....	57
2.-Composición Macromolecular del Utero.....	59
<b>B. CAMBIOS BIOQUIMICOS DEL UTERO DURANTE SU RESPUESTA AL BLASTOSISTO.....</b>	<b>61</b>
1.-Actividad de Peroxidasa.....	61

2.-Parámetros Bioquímicos.....	68
<b>C. ACTIVIDAD DE PEROXIDASA DURANTE EL ESTRO EN LA RATA.....</b>	<b>69</b>
<b>D. ANALISIS DE LAS HIPOTESIS PLANTEADAS EN EL PRESENTE TRABAJO.....</b>	<b>70</b>
<b>E. POSIBLE PARTICIPACION DE LA PEROXIDASA EN LA IMPLANTACION DE LA RATA.....</b>	<b>71</b>
<b>F. PERSPECTIVAS DEL PRESENTE TRABAJO.....</b>	<b>74</b>
<b>VII. <u>CONCLUSIONES</u>.....</b>	<b>75</b>
<b>VIII. <u>APENDICES</u>.....</b>	<b>76</b>
<b>A. DETERMINACIONES BIOQUIMICAS.....</b>	<b>76</b>
1.-Determinación de Proteínas por el Método de Lowry (1951).....	76
2.-Determinación de DNA por el Método de Giles y Myres (1965).....	78
3.-Determinación de Peso Seco por el Método de Bernal (1981).....	78
<b>IX. <u>BIBLIOGRAFIA</u>.....</b>	<b>81</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.-</b> Representación Esquemática del Ciclo Estral en la Rata.....	6
<b>Figura 2.-</b> Características Vaginales y Conductuales Del Ciclo Estral de la Rata.....	7
<b>Figura 3.-</b> Cambios Mitóticos en el Endometrio Durante los Primeros Días de Preñez en la Rata.....	11
<b>Figura 4.-</b> Síntesis de DNA en el Utero de Rata Preñada y Seudopreñada.....	14
<b>Figura 5.-</b> Detección Macroscópica de las Zonas de Implantación.....	17
<b>Figura 6.-</b> El Estímulo Decidual.....	19
<b>Figura 7.-</b> Etapas de la Implantación.....	22
<b>Figura 8.-</b> Esquema Metodológico General.....	33
<b>Figura 9.-</b> Procesamiento del Tejido para la Medición de la Actividad de Peroxidasa.....	35
<b>Figura 10.-</b> Medición de la Actividad de Peroxidasa.....	36
<b>Figura 11.-</b> Procesamiento del Tejido para la Determinación de Proteínas y DNA.....	38
<b>Figura 12.-</b> Actividad de Peroxidasa Durante la Preñez en la Rata. (U/mg de Proteínas).....	43
<b>Figura 13.-</b> Actividad de Peroxidasa Durante la Preñez en la Rata. (U/ mg de Peso Seco).....	45
<b>Figura 14.-</b> Actividad de Peroxidasa Durante la Preñez en la Rata. (U/ mg de DNA).....	47
<b>Figura 15.-</b> Peso Seco y Concentración de Proteínas y DNA Durante la Preñez en la Rata (mg/ g de tejido).....	53
<b>Figura 16.-</b> Modelo de Andrés Tchernitchin Acerca de la Migración de Eosinófilos al Endometrio.....	66
<b>Figura 17.-</b> Posible Participación de la Peroxidasa en la Implantación de la Rata.....	72

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.-</b> Metabolitos y Macromoléculas que Aumentan en el sitio de implantación .....	24
<b>Tabla 2.-</b> Actividad de Peroxidasa Durante la Preñez Temprana en la Rata.....	42
<b>Tabla 3.-</b> Actividad de Peroxidasa Uterina Durante el Estro en la Rata.....	52
<b>Tabla 4.-</b> Peso Seco y Concentraciones de Proteínas y DNA en el Utero Durante la Preñez en la Rata.....	52
<b>Tabla 5.-</b> Porcentaje de Humedad Uterina en la Rata Preñada.....	55
<b>Tabla 6.-</b> Relaciones Bioquímicas de Masa Funcional Durante la Preñez en la Rata.....	56
<b>Tabla 7.-</b> Determinación de Proteínas.....	77
<b>Tabla 8.-</b> Determinación de DNA.....	80
<b>Tabla 9.-</b> Determinación de Peso Seco.....	80

## LISTA DE ABREVIATURAS

Acido Desoxirribonucleico	DNA
Adenosina 3', 5' Monofosfato ciclico	AMPC
Adenosina 5' Trifosfato	ATP
Acido Ribonucleico	RNA
Analisis de Varianza	ANOVA
Antes Meridiano	a. m.
Catecolestrógenos	CEs
Desviación Estándar	D. E
Dióxido de Carbono	CO <sub>2</sub>
Epitelio Glandular	Epit. Gland
Epitelio Luminal	Epit. Lum
17 $\beta$ -Estradiol	E <sub>2</sub>
Factor Quimotáctico Para EasinoFilos del Utero	ECF-U
Fracción Extraíble	F. Ext
Fracción Soluble	F. Sol
Fuerza de Gravedad	g
Grados Centígrados	°C
Gramos	g
Horas	h
Hormona Folículo Estimulante	FSH
Hormona Liberadora de Gonadotropinas	GnRH
Hormona Luteinizante	HL

Microgramos	μg
Microlitros	μl
Miligramos	mg
Mililitros	ml
Milimolar	mM
Molar	M
Nanómetros	nm
Normal	N
Peso Seco	P. S
Prolactina	LTH
Prcteínas	prot.
Revoluciones por Minuto	r. p. m
Unidades	U
Ultravioleta	U. V
Zonas de Implantación Embrionaria	Z. I
Zonas de Interimplantación	I. Z

## **I. Resumen**

En los mamíferos euterios, durante los primeros días de la preñez, el útero adquiere una fase de receptividad en la que es capaz de responder a los estímulos del blastocisto y permitir la implantación embrionaria. La adquisición de esta fase depende de la acción de progesterona y/o estrógenos.

La respuesta uterina a los estímulos embrionarios involucra un aumento en la permeabilidad vascular, lo que ocasiona que las zonas de implantación (Z I) puedan identificarse mediante colorantes de alto peso molecular (azul de tripano, azul de evans, etc) que se extravasan unidos a la albúmina sérica y acumulan en estas zonas cuando se administran intravascularmente.

La acción de los estrógenos y los cambios en la permeabilidad inducidos por ellos en el útero se han asociado a la actividad de la peroxidasa. Para explicar que células producen esta enzima, cuando es inducida por estas hormonas, existen dos opiniones: una la atribuye a la fracción soluble de los eosinófilos que invaden al útero por estimulación estrogénica; otra considera que proviene de las partículas microsomales de células residentes del endometrio.

Muchas evidencias indican que la mayor parte de actividad de peroxidasa inducida por estrógenos es de tipo eosinofílico y se ha sugerido que la atracción y/o migración de estas células hacia el útero es mediada por un factor quimotáctico dependiente de estrógenos (el ECF-U).

Los eosinófilos influenciados por los estrógenos degranulan y se cree que ello cause el aumento de permeabilidad vascular. La peroxidasa también se ha involucrado con la vasodilatación uterina mediante la formación de catecolestrógenos, los cuales se consideran esenciales en la respuesta vascular temprana a estrógenos.

En este trabajo se analizó la actividad de la peroxidasa en las fracciones soluble y microsomal en úteros de rata de los días 3 al 6 de preñez. Se empleó



como sustratos peróxido de hidrógeno y o-fenilendiamina. Durante el día 6 de preñez se dividieron los úteros en las zonas con respuesta vascular, (donde ocurre la implantación,(Z I) y el resto del útero (I Z).

El comportamiento de ambas fracciones fue semejante pero la actividad de la peroxidasa soluble siempre fue mayor a la microsomal. Las actividades de ambos tipos de peroxidases aumentaron progresivamente de los días 3 al 5 de preñez y en este último alcanzaron una actividad más alta respecto a los otros días ( $2.1 \pm 0.2$  y  $5 \pm 0.5$  U/mg de proteínas para las fracciones microsomal y soluble respectivamente), ello coincide con la fase de receptividad uterina. Un día después, cuando la respuesta vascular ya se ha establecido, la actividad de la enzima soluble disminuye tanto en las Z I como en las I Z, mientras que la enzima microsomal sólo lo hace en las Z I.

Los resultados obtenidos, apoyan la hipótesis de la posible participación de la peroxidasa de los eosinófilos y la enzima microsomal endógena en el proceso de implantación embrionaria, ya que la fase de sensibilidad uterina, es inducida por estrógenos, estas hormonas podrían causar una elevada actividad de peroxidasa al día 5 de preñez . Este aumento podría provenir de la migración de eosinófilos, mediada posiblemente por un factor quimotáctico. Entre el día 5 y 6 por efectos del blastocisto ocurriría la migración de los eosinófilos hacia las Z I con una consecuente degranulación, esto provocaría la edematización característica de la Z I, lo que explicaría la disminución de actividad de peroxidasa en el día 6, respecto al día 5, tanto en las Z I como en las I Z.

La liberación de peroxidasa eosinofílica y la actividad de la enzima microsomal podrían intervenir en la formación de sustancias vasoactivas como los catecolestrogonos, ambas pueden estar relacionadas con los cambios vasculares uterinos característicos de la respuesta del endometrio durante la implantación embrionaria (aumento en la permeabilidad vascular de la Z I).

## **II. INTRODUCCION.**

### **A.- ASPECTOS GENERALES.**

La preñez en los mamíferos euterios es un proceso complejo que involucra la sincronización de una serie de eventos interdependientes, necesarios para la fecundación, implantación y el desarrollo embrionario; para favorecer lo anterior, las distintas especies cuentan con una amplia variedad de mecanismos reproductivos, que están íntimamente relacionados con sus ciclos sexuales.

Los ciclos sexuales se dividen en estrales y menstruales, los primeros se caracterizan por un periodo corto de conducta reproductiva y de receptividad sexual intensa (estro); los segundos por la formación de arterias espirales en el endometrio y el desprendimiento posterior de este último acompañado de sangrado (menstruación).

La rata, entre otros animales ha sido utilizada ampliamente en estudios sobre diferentes aspectos de la reproducción, debido a su gran disponibilidad y facilidad de manejo.

#### **1.- El Ciclo Estral.**

El periodo de tiempo entre el inicio de un estro y el siguiente se denomina ciclo estral y tiene una duración de cuatro a seis días en la rata, (Fox y Lair, 1988; Freeman, 1988).

De acuerdo a los cambios vaginales y conductuales que se presentan, el ciclo estral se puede dividir en 4 fases: proestro, estro, metaestro y diestro, mismas que se describirán a continuación (Fig. 1).

Proestro.- Tiene una duración de 12 h aproximadamente, en él ocurren el crecimiento y la maduración de los folículos bajo la influencia de la FSH (Fox y Lair, 1988). En su fase inicial, la secreción de  $17\beta$ -estradiol por el folículo de Graaf en desarrollo alcanza su elevación máxima teniendo un pico en esta etapa, el que sensibiliza el sistema nervioso central lo que ocasiona que la hipófisis secrete LH. Esta hormona inducirá la ovulación en los folículos que anteriormente hayan sido estimulados por la FSH. Se presenta también un pico preovulatorio de secreción de progesterona que casi coincide con el pico de LH. Esta fase se caracteriza porque en el frotis vaginal se presentan abundantes células epiteliales nucleadas, no cornificadas.

Estro.- En este periodo se presentan dos eventos importantes: el celo o calor y la ovulación. La sincronía entre la ovulación y el estro asegura que el óvulo y el espermatozoide se encuentren en el periodo de máxima eficacia reproductiva cuando se presenta la cópula (Heald, 1976). En esta etapa el endometrio se engruesa, la superficie epitelial se eleva y las glándulas uterinas tienen mayor secreción. La creciente cornificación del epitelio vaginal hace que el frotis presente células queratinizadas anucleadas. La duración de esta fase es aproximadamente de 12 h (Figs 1 y 2). En relación a la conducta, la hembra presenta un cambio de comportamiento para atraer y aceptar al macho. Así, en los roedores como la rata, los cambios comprenden la vibración o aleteo de las orejas y la lordosis o arqueado del lomo como respuesta a la aproximación del macho (Baird, 1972).

Metaestro.- Después de la ovulación la cavidad del folículo se llena de sangre y se forma el cuerpo hemorrágico, este último origina al cuerpo lúteo, el cual secreta progesterona. Al acercarse el diestro se produce una disminución en la secreción de estrógenos en el ovario (Barrington, 1977). Esta etapa tiene una duración de 21 h y en el frotis vaginal aparecen células cornificadas nucleadas y leucocitos neutrófilos (Figs 1 y 2).

Diestro.- Se caracteriza por la involución funcional o lisis de los cuerpos lúteos por lo que disminuye muy notablemente la progesterona circulante en la hembra. Los demás niveles de estrógenos y LH son bajos y empiezan a crecer nuevos folículos. Los cuernos uterinos se observan pequeños y contraídos; tiene una duración de 57 h aproximadamente y se caracteriza por la presencia masiva de leucocitos en los frotis vaginales (Figs 1 y 2). Si no ocurre la preñez, el endometrio se reabsorbe (proceso de regresión) y se inicia un nuevo ciclo (Baird, 1972; Barrington, 1977 y Freeman, 1988).

El ciclo estral depende tanto de factores exógenos como endógenos. Entre los primeros se incluyen estímulos como la temperatura y el fotoperiodo, mientras que en los endógenos se encuentran las secreciones hormonales (Baird, 1972 y Barrington, 1977).

En su regulación participan diversos órganos, endócrinos entre ellos:

El hipotálamo.- El cuál es influido por el ambiente externo e interno y participa en la conexión entre los sistemas nervioso y endocrino produce hormonas que viajan por la sangre hasta la adenohipófisis, en donde inducen o inhiben la liberación de hormonas específicas que actúan a su vez sobre otras glándulas, por ejemplo, la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), que estimula en la hipófisis, la liberación de gonadotropinas (Barrington, 1977).

La hipófisis.- Secreta tres hormonas que influyen sobre las gónadas y que se llaman por esto hormonas gonadotrópicas (Baird, 1972; Barrington, 1977), estas son:

A) La hormona folículo estimulante (FSH) que promueve en el ovario la secreción de estrógenos y el desarrollo de los folículos preparándolos para la acción de la LH.

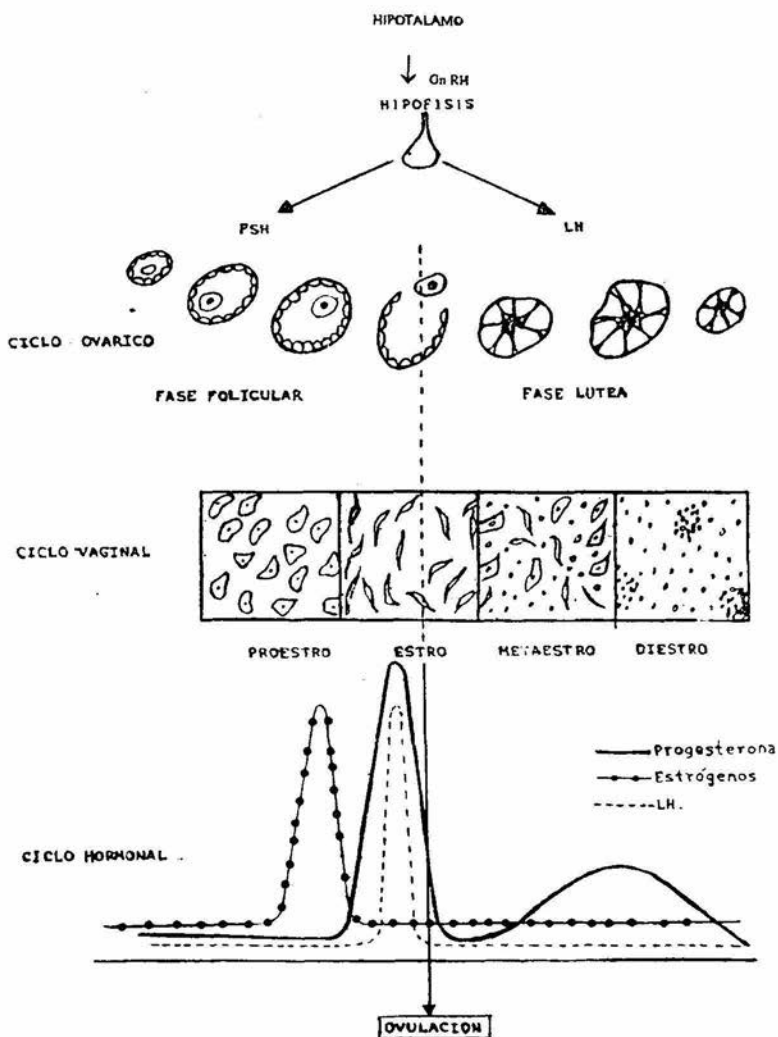


Figura 1. REPRESENTACION ESQUEMATICA DEL CICLO ESTRAL EN LA RATA.- Los procesos que se muestran están íntimamente relacionados (de acuerdo a Sadleir, 1982), si se toman en cuenta los cambios ováricos el ciclo estral puede dividirse en dos fases: la folicular y la lútea. Según los cambios vaginales, conductuales y hormonales en conjunto se divide en cuatro fases: proestro, estró, metaestro y diestro. Los principales eventos de cada fase se describen en el texto.









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

Figura 2. CARACTERISTICAS VAGINALES Y CONDUCTUALES DEL CICLO ESTRAL DE LA RATA.- En la rata, durante el ciclo estral se presentan cambios conductuales y vaginales. El epitelio vaginal experimenta cambios marcados que se manifiestan en las células que se encuentran en el frotis vaginal. En el proestro se encuentran sólo células epiteliales nucleadas; en el estro predominan células cornificadas; durante el metaestro se observan leucocitos y células cornificadas, finalmente en el diestro predominan los leucocitos. Durante el estro, la hembra acepta al macho y presenta conducta de apareo (Tomado de Fox, 1988).

B) La hormona luteinizante (LH) que actúa sinérgicamente con la FSH para promover la secreción de estrógenos por los folículos que sufren maduración y para causar la ovulación, ya que este evento no es un efecto sólo de la LH sino el resultado de la acción de ambas hormonas, induce también la formación de los cuerpos lúteos (luteinización) y favorece la secreción de progesterona (Fox y Lair, 1988).

C) La prolactina (PRL) ú hormona luteotrópica (LTH) que en algunos mamíferos como la rata, el ratón y el criceto favorece el mantenimiento del cuerpo lúteo y la producción de progesterona y en todos estimula la producción láctea (Barrington, 1977).

El ovario.- Secreta fundamentalmente dos tipos de hormonas: los estrógenos producidos por las células del folículo de Graaf y las hormonas progestacionales que derivan principalmente de la actividad del cuerpo lúteo (Baird, 1972).

Los estrógenos son muy importantes para los procesos reproductivos de la hembra, su representante más activo es el  $17 \beta$ -estradiol ( $E_2$ ). Estimulan el crecimiento y desarrollo del útero, vagina y glándulas mamarias, además, preparan al útero para el transporte de los espermatozoides, aumentan la permeabilidad vascular uterina e influyen en el comportamiento sexual de diversas especies de mamíferos (Baird, 1972; Barrington, 1977).

La progesterona favorece el desarrollo del endometrio preparando al útero para la recepción y nutrición del embrión. Esta hormona suprime el estro, la ovulación y la producción de la LH de la hipófisis (Barrington, 1977).

Tanto los estrógenos como la progesterona, actúan a nivel hipotálamo-hipofisario en un mecanismo de retroalimentación: los niveles bajos de estrógenos en la circulación estimulan la liberación de FSH (retroalimentación

positiva). Cuando los folículos han crecido y el nivel de estrógenos es alto se inhibe la liberación de FSH (retroalimentación negativa) y se promueve la de LH, con esto se induce la ovulación. Los folículos preovulatorios secretan poca progesterona y grandes cantidades de estrógenos, la ovulación ocurre mientras los niveles de LH van ascendiendo y además ocurre una caída en los niveles séricos de estrógenos. Después de la ovulación el cuerpo lúteo produce una elevación de progesterona en el plasma, la cual inhibe a su vez la liberación de LH (Fox y Lair, 1988).

## 2.- Periodo de Preimplantación.

El tiempo que transcurre desde la fertilización hasta el momento inmediato anterior a la implantación o nidación recibe el nombre de preimplantación (Boving y Larson, 1973).

El ovocito al ser descargado del folículo de Graaf (ovulación), es transportado al ampulla del oviducto, lugar donde ocurre la fertilización. Entre los factores que intervienen en regular el transporte del ovocito destacan las contracciones musculares y el movimiento ciliar del oviducto los que son influidos por los estrógenos (Barrington, 1977; Psychoyos, 1967 y 1973).

El huevo sigue su viaje por el oviducto y se verifican las primeras etapas del desarrollo embrionario. El huevo se segmenta y llega al estado de mórula (racimo de células) en la tarde del día 4 de preñez (en este trabajo se designa como día 1, cuando se encuentran espermatozoides en los frotis vaginales). En esta etapa entra el útero y en él la mórula se convierte en blastocisto durante la noche de ese día, este último está constituido por una capa de células externas llamada trofotodermo que están destinadas para la formación del corión y un conjunto de células internas a partir de las cuales se formará el embrión (masa celular interna). En el día 5 de preñez, el blastocisto se dirige hacia la superficie antimesometrial



del endometrio. Entre la noche del día 4 y las 4: 00 p.m del día 5, este se libera de la zona pelúcida (Dickmann y col., 1976; Psychoyos, 1976).

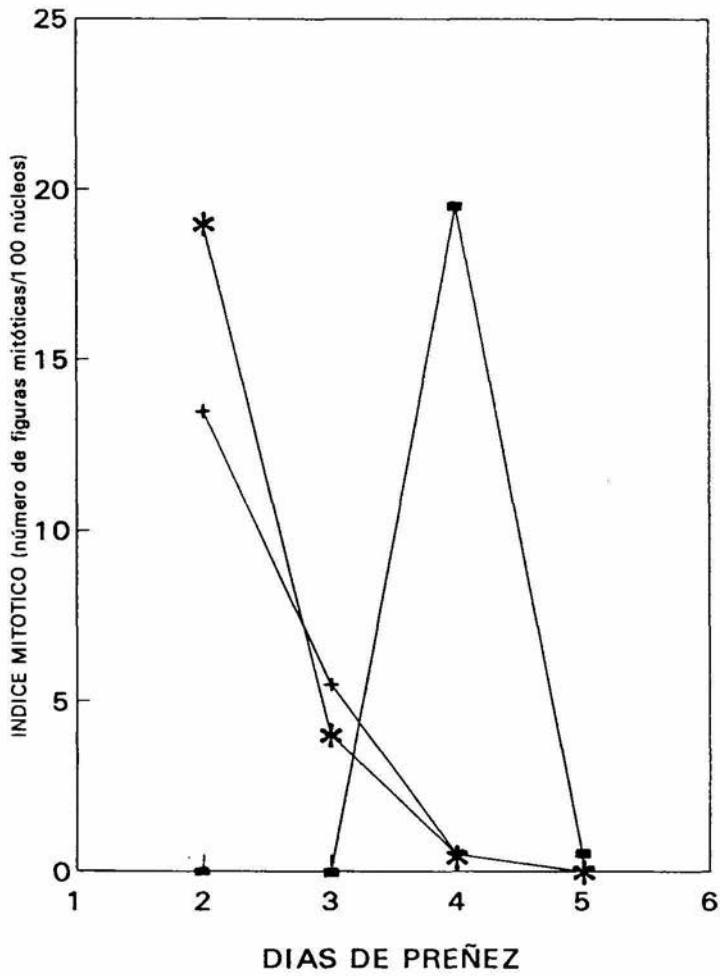
En el endometrio ocurren diversos cambios morfofuncionales que lo preparan para la implantación, dentro de los que se encuentran las variaciones en la proliferación celular.

Las células epiteliales y glandulares experimentan mitosis los primeros 2 días de preñez, posiblemente inducida por los estrógenos preovulatorios (Fig. 3), ya que se ha visto que la inyección de 17  $\beta$ -estradiol a ratas ovariectomizadas induce un aumento marcado en el índice mitótico del epitelio luminal y glandular, además, de que tiene poco efecto en las células estromales (Tachi y col., 1972 y 1974).

Hacia el día 3 de preñez las células epiteliales dejan de dividirse y en contraste proliferan las células del estroma debido a la influencia de progesterona y estrógenos (Fig. 3). Se ha encontrado que en las ratas ovariectomizadas con un tratamiento de 3 a 4 días de progesterona y luego la administración de una pequeña cantidad de estrógenos aumenta la división de las células del estroma y en cambio disminuye la división del epitelio, asimismo se ha visto que el tratamiento de estrógeno o progesterona por separado no causa este efecto (Tachi y col., 1972). Al parecer la progesterona, que a partir del día 2 de preñez empieza a aumentar progresivamente, ocasiona una elevación en el número de receptores a estrógenos en las células del estroma y una disminución de los mismos en el epitelio (Martel y Psychoyos, 1982).

Al día 5, el endometrio alcanza un estado receptivo y por ello se hace sensible a los estímulos del blastocisto. El término de receptividad se conoce como la situación única, exclusiva y breve en que el útero permite que ocurra la implantación.

Figura 3. CAMBIOS MITOTICOS EN EL ENDOMETRIO DURANTE LOS PRIMEROS DIAS DE LA PREÑEZ EN LA RATA.- Se observa que las células epiteliales y glandulares experimentan mitosis los primeros dos días de la preñez. Al cuarto día estas células dejan de dividirse y proliferan las células del estroma. Durante el día 5, en que ocurre la fase de receptividad uterina, la mitosis disminuye pero la síntesis de DNA presenta su elevación más alta en ratas seudopreñadas, esto sugiere que las células estromales se detienen en la etapa de G<sub>2</sub> del ciclo celular (Tomado Heald, 1976 y Tachi, 1974).



ESTROMA.-(■)    EPIT.LUM.-(+)  
 EPIT.GLAND.-(\*)

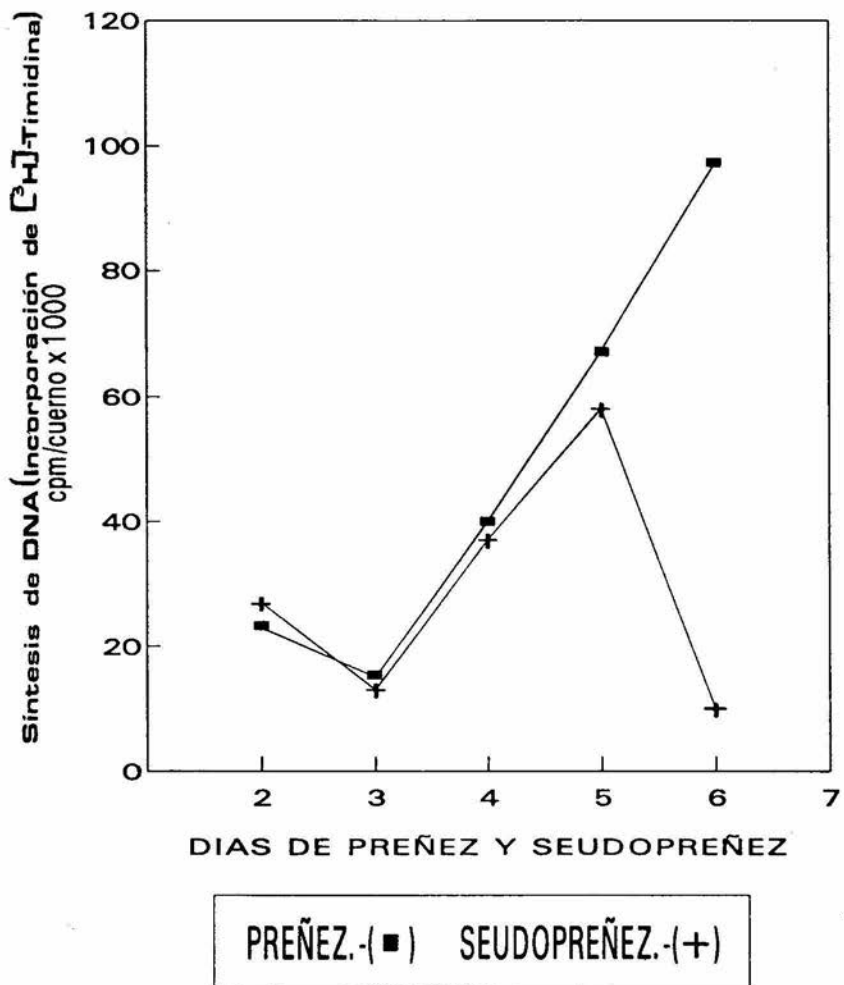
En la rata este periodo es de alrededor de 24 h, ya que se inicia al principio del día 5 de preñez y termina al inicio del día 6, momento en el que el endometrio se vuelve indiferente y el ambiente uterino es hostil a los blastocistos no implantados (Psychoyos, 1986).

Durante la fase de receptividad cambia la morfología del endometrio; antes de esta fase posee un epitelio luminal con células cilíndricas ciliadas y glándulas tubulares simples y un estroma con células fusiformes y núcleos ovalados (Weithauf, 1988) pero cuando el endometrio se hace receptivo, el lumen del útero se reduce, el número de lisosomas en el epitelio aumenta, se presenta edema estromal y las células del epitelio adquieren forma cuboidal, además, en la superficie apical se observan unas estructuras llamadas pinópodos involucrados en los procesos de pinocitosis y de endocitosis. Por otra parte la reducción de la negatividad de la superficie epitelial facilita la adhesión del blastocisto (Parr y Parr, 1989; Psychoyos, 1973; Schlafke y Enders, 1975).

En el día 5, en el cual se alcanza la máxima sensibilidad uterina, la síntesis de DNA presenta su elevación máxima en ratas pseudopreñadas (Fig. 4), pero la velocidad mitótica en ratas preñadas y pseudopreñadas disminuye al mismo tiempo, por lo que se ha sugerido que el ciclo de las células del estroma se detiene en G<sub>2</sub> y sólo como consecuencia del estímulo proporcionado por el blastocisto, este se reanuda y la proliferación de estas células aumentará marcadamente (Tachi y col., 1972 y 1974).

Se ha propuesto en la rata ocurre una oleada estrogénica en la tarde del día 4 de preñez indispensable para inducir la implantación, ya que esta se evita si las ratas preñadas se ovariectomizan antes o hasta ese tiempo, sin embargo, si se efectúa después la implantación se realiza (Shelesnyak, 1960 Weitlauf, 1988).

Figura 4. SINTESIS DE DNA EN EL UTERO DE RATA PREÑADA Y SEUDOPREÑADA.- En el día 5, en el cual se alcanza la máxima sensibilidad uterina, la mitosis disminuye, sin embargo, la síntesis de DNA presenta su elevación máxima en ratas seudopreñadas por lo que se ha sugerido que las células estromales se detienen en la etapa de G<sub>2</sub> del ciclo celular (Tomado de Tachi, 1974).



### 3.- Respuesta del Útero a los Estímulos del Blastocisto.

Cuando el útero se encuentra en la fase de receptividad, responde a los estímulos del blastocisto, lo que en la rata ocurre el día 5 de preñez (Psychoyos, 1973 y 1986). Este día el blastocisto manda señales químicas y físicas al endometrio, este estímulo ocasiona que se presenten diversos cambios en el mismo, el más notable macroscópicamente, es el aumento en la permeabilidad vascular en las áreas adyacentes al blastocisto (Psychoyos, 1973), esto se observa en la tarde de este día, aún antes de que exista contacto físico entre el blastocisto y el endometrio. Este aumento en la permeabilidad se acompaña de la producción de edema y la extravasación de proteínas séricas, a esto se debe que cuando se inyectan colorantes de alto peso molecular (azul de tripano, azul de pontamina, azul de Geigy, etc), estos forman complejos con la albúmina sérica, se extravasan y se acumulan sólo en las zonas de alta permeabilidad que corresponden a las futuras zonas de implantación (Z. I), a diferencia de las regiones adyacentes o el resto del útero (I Z). (Fig. 5).

En el endotelio vascular de las Z I en la rata, se han encontrado fenestraciones con lagunas intercelulares, sin embargo, esto no se ha observado en el resto del útero (I Z), con esto se ha sugerido que la permeabilidad vascular podría ser de gran importancia para satisfacer las necesidades metabólicas del endometrio y del embrión en desarrollo (Parr y Parr, 1989).

En la rata y el ratón, el estímulo del blastocisto también induce la muerte programada de las células epiteliales a las que el trofoblasto podría fagocitar o causarles un efecto citotóxico, hay evidencias de que la muerte celular sea mediante un mecanismo llamado apoptosis, que se caracteriza por la fragmentación de las células, la condensación de la cromatina, la disolución del núcleo con la inhibición de la síntesis de RNA y en consecuencia el bloqueo de la síntesis de proteínas (Parr y Parr, 1989).

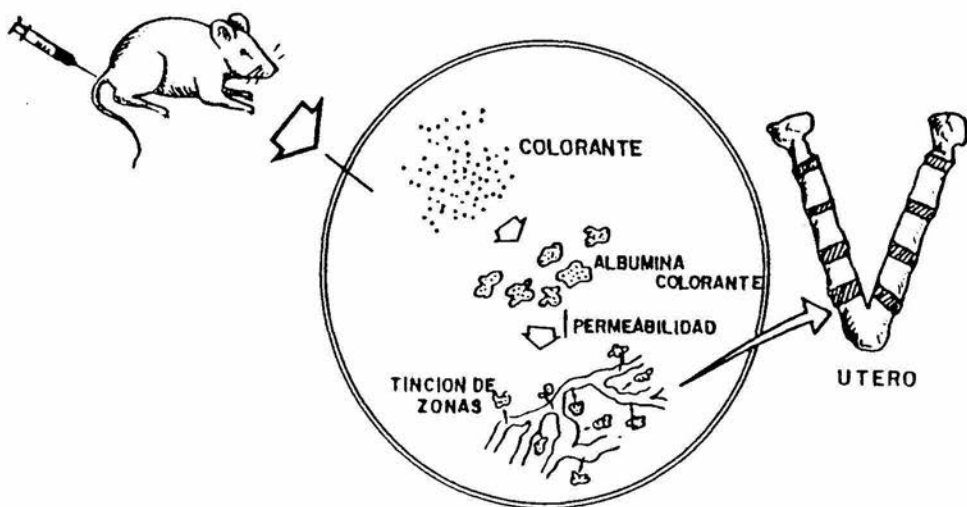


Figura 5. DETECCION MACROSCOPICA DE LAS ZONAS DE IMPLANTACION.- Cuando se administran por via intravenosa diversos colorantes de alto peso molecular (azul de tripano, azul de Evans, etc), forman complejos con la albúmina sérica, los que atraviesan los capilares y se acumulan en las zonas de implantación con respecto al resto del útero (Modificado de Bates, 1976 por Baiza, 1980).



Las células del estroma del endometrio también sufren cambios morfofisiológicos como respuesta a los estímulos del blastocisto y se diferencian a las células deciduales, las que son más activas tanto en la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos, como en el metabolismo energético. Estas células se caracterizan por su forma ovoide y por la acumulación en su citoplasma de glucógeno y lípidos (Finn y Porter, 1975; Gil-Recansens y col., 1965; Parr y Parr, 1989; Winsatt, 1975). La reacción decidual permitirá la nutrición adecuada del embrión y la protección del útero en caso de una posible penetración desorganizada del trofoblasto (Boving y Larson, 1973; Finn y Porter, 1988; Gil-Recansens y col., 1965; Parr y Parr, 1989).

Aún no se ha establecido con certeza la naturaleza del estímulo decidual (Fig. 6), pero se han propuesto varias hipótesis una de ellas es la acción mecánica del blastocisto, ocasionada por ondas sucesivas de contracción y expansión del mismo, las cuales se han observado en el día 5 de preñez; otras teorías involucran la secreción de sustancias inductoras entre las que se han sugerido: el CO<sub>2</sub> producto de la respiración, la histamina, las prostaglandinas y recientemente a los estrógenos (Dickman, 1975, Finn y Porter, 1975; Weitlauf, 1988 y Wimsatt, 1975).

#### 4.-Periodo de Implantación.

Se define la implantación como el establecimiento de una posición fija del blastocisto en el endometrio materno. En la rata el trofoblasto desplaza al epitelio uterino e invade al estroma (Parr y Parr, 1989).

Dependiendo de los tejidos que son erosionados durante la implantación, esta se clasifica como invasiva y no invasiva: en la implantación invasiva (conejo, ratón, rata, cobayo, perro, humano) el blastocisto atraviesa la superficie del epitelio e invade extensivamente al estroma que se encuentra por debajo de este.

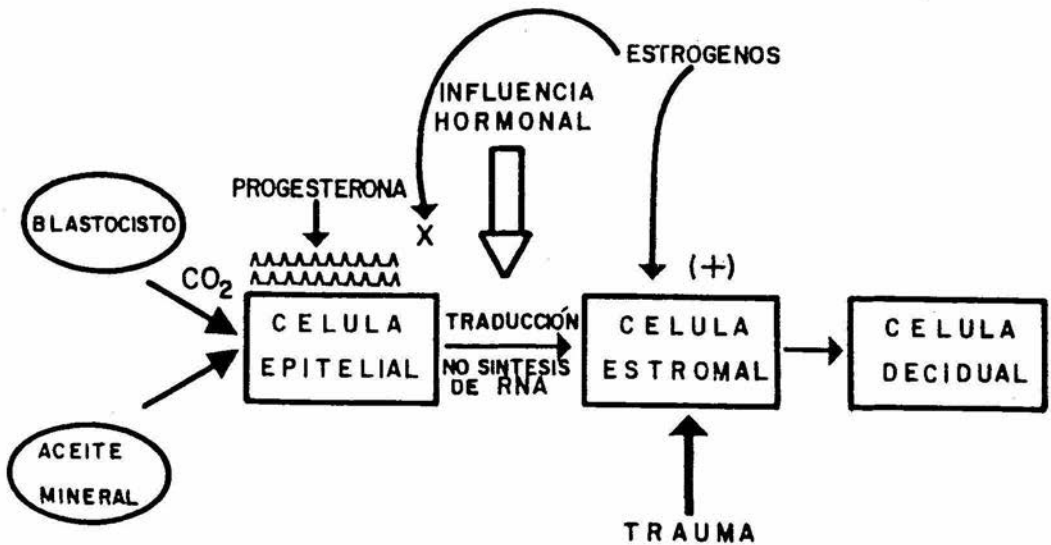


Figura 6. EL ESTIMULO DECIDUAL.- Las células estromales responden al estímulo decidualizante, mandado por el blastocisto y mediado por el epitelio luminal, aumentando su ritmo mitótico y diferenciándose en células decíduales. La progesterona sensibiliza al endometrio uterino desviando el efecto mitogénico de los estrógenos de las células epiteliales a las estromales (De acuerdo a Gil-Recasens, 1985).

Los tejidos del blastocisto pueden erosionar no sólo el epitelio, sino también el tejido conectivo del estroma y en la mujer incluso las paredes de los vasos sanguíneos. En la no invasiva (borrego, cerdo, vaca, caballo), la integridad del epitelio es más o menos conservada, es este tejido y no el estroma el que se encuentra en contacto con el corión y además limita y controla la invasión del blastocisto (Ruiz, 1983).

De acuerdo a la ubicación del blastocisto en el útero, la implantación se clasifica en tres tipos:

Central: El blastocisto permanece en la cavidad uterina, se expande antes de anidarse y en consecuencia se pone en contacto con un área mayor de la superficie del endometrio (perro, conejo, hurón), (Wimsatt, 1975).

Excéntrica: El blastocisto se sitúa en una cripta o receso uterino (ratón, rata, hamster), (Wimsatt, 1975).

Intersticial: El blastocisto permanece pequeño y pasa a través de los intersticios epiteliales para ubicarse finalmente en el tejido conectivo subepitelial (chimpancé y humano), (Wimsatt, 1975).

Durante el proceso de la implantación en la rata (Enders, 1975), se distinguen varias etapas (Fig. 7):

1.-ORIENTACION.- El blastocisto se coloca cerca del extremo antimesometrial del lumen uterino, la secreción uterina de enzimas proteolíticas causa la disolución completa de la zona pelúcida, este hecho se considera como el inicio de la fase receptiva (Psychoyos, 1973). Se origina un cambio de superficie del endometrio que le confiere compatibilidad con el blastocisto. Parece que existen dos factores involucrados en la orientación del blastocisto: uno es la forma del blastocisto y su respuesta a las contracciones del útero, el segundo factor es la adhesividad específica del trofoblasto que se refiere a la posibilidad

que tienen ciertas regiones del blastocisto de ser adhesivas en los primeros estados de implantación. Al final de esta etapa la superficie del trofoblasto queda expuesta directamente al epitelio uterino. En esta etapa también se inicia la reacción decidual (Enders, 1970; Enders y Schlafke, 1969).

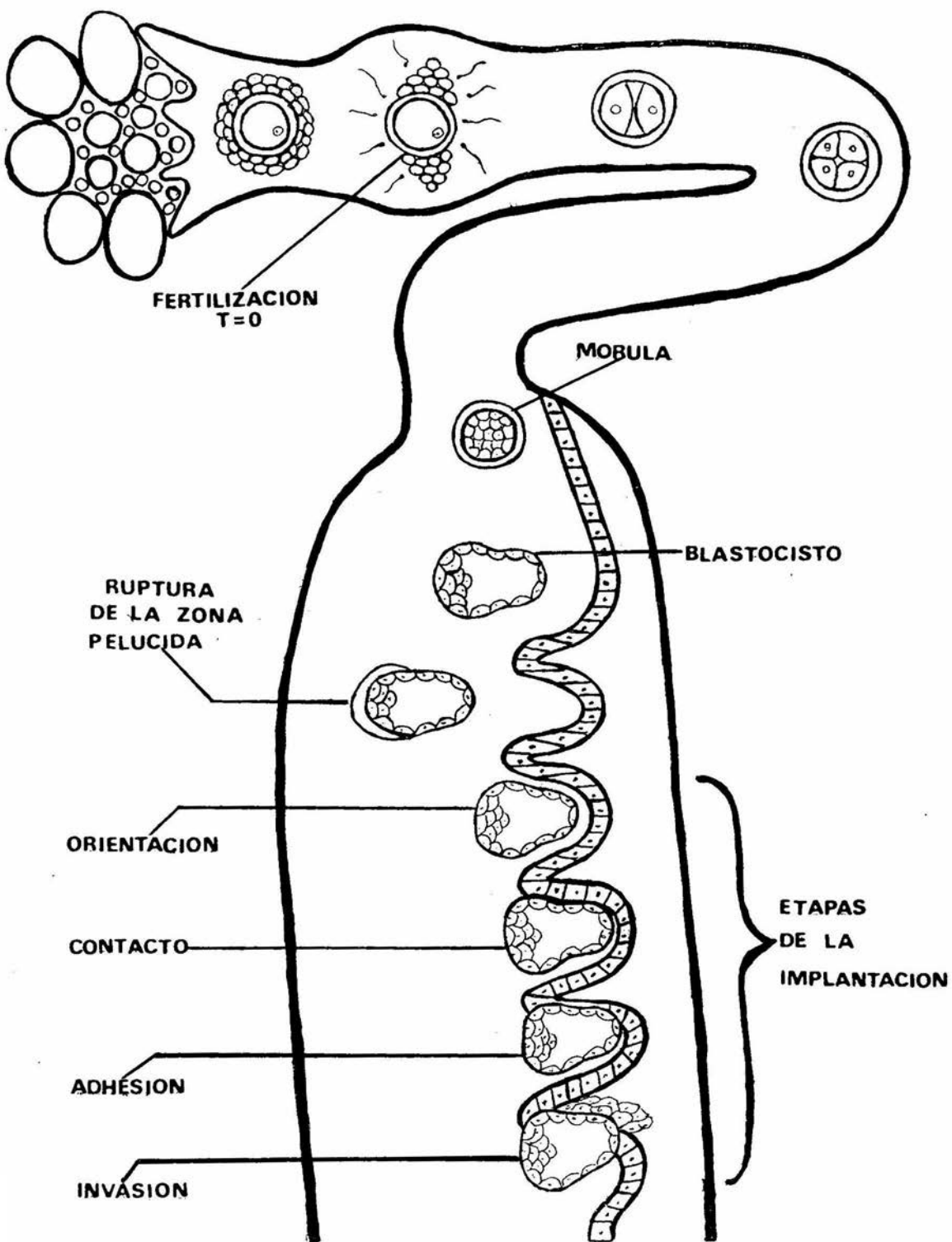
2.- CONTACTO O APOSICION.- En la rata el epitelio endometrial envuelve al blastocisto y el contacto del trofoblasto con el epitelio uterino se establece por el hinchamiento del endometrio (reacción de ataque epitelial), (Enders, 1970 y Enders y Schlafke, 1969). En ella se produce la interdigitación de las microvellosidades del trofoblasto y del epitelio luminal. En el endometrio aumenta la permeabilidad sanguínea con la producción de edema y extravasación de proteínas séricas, lo que hace posible, como ya se mencionó anteriormente, diferenciar las zonas de implantación del resto del útero, al administrar colorantes de alto peso molecular (Ljungkvist y Nilsson, 1974).

3.- ADHESION.- En ella se establece entre el trofoblasto y el epitelio endometrial un estrecho contacto, resistente a la ruptura por medios físicos, también el blastocisto adquiere su posición definitiva. en este proceso se establece primero la adhesión célula-célula y posteriormente complejos de unión primitivos (tipo desmosomas), ( Enders, 1975; Schlafke y Enders, 1975).

4.-INVASION O PENETRACION.-Dependiendo de la especie, el trofoblasto penetra a través del epitelio luminal por diversos mecanismos: fagocitosis, desplazamiento mecánico y/o migración activa (Enders, 1975).

Los cambios uterinos experimentados durante la implantación son más marcados en las zonas de implantación que en las zonas de interimplantación, debido a que en ellos ocurre la reacción al blastocisto. En la tabla 1 se comparan algunos cambios bioquímicos entre la zona y la interzona de implantación, relacionados principalmente con la reacción decidual.

Figura 7. ETAPAS DE LA IMPLANTACION.- El proceso de la implantación en la rata se divide en cuatro fases: Orientación.- El blastocisto se coloca cerca del extremo antimesometrial del lumen uterino y la zona pelúcida se disuelve. Contacto o Aposición.- El epitelio endometrial envuelve al blastocisto y el contacto trofoblasto-epitelio se establece por hinchamiento del endometrio (reacción de ataque epitelial). Adhesión.- Se establece un estrecho contacto entre el trofoblasto y el epitelio endometrial, así, el blastocisto adquiere su posición definitiva. Invasión o Penetración.- El trofoblasto atraviesa el epitelio luminal y penetra parte del estroma (Tomado de Ibañez, 1981).



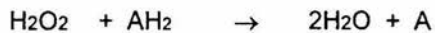
ESPECIE		CAUSA PROBABLE
I. MACROMOLECULAS		
DNA (Heald, 1976)	Rata	Aumento en el ritmo mitótico
RNA (Heald, 1976)	Rata	Aumento en la síntesis proteica
PROTEINAS (Heald, 1976)	Rata	Inducción de síntesis proteica por hormonas
II. METABOLITOS		
Acido láctico (Heald, 1976)	Rata-ratón	Aumento en la glucólisis
Triacilgliceroles (Weithauf, 1988)	Ratón	Aumento en la síntesis de triacilgliceroles
AMPc (Heald, 1976)	Rata	Como mediador hormonal
ATP (Heald, 1976)	Rata	Aumento en la demanda energética

Tabla 1.- METABOLITOS Y MACROMOLECULAS QUE AUMENTAN EN EL SITIO DE IMPLANTACION (De acuerdo a Baiza, 1980; Gil y col., 1984).

## B. ANTECEDENTES.

### 1.-La Peroxidasa y su Importancia en la Implantación.

En la reacción catalizada por la peroxidasa, el peróxido de hidrógeno es reducido a agua mediante el empleo de diversos donadores de electrones (ascorbato, quinonas, citocromo c, etc):



AH<sub>2</sub> = forma reducida del donador

A = forma oxidada del donador

La peroxidasa uterina está localizada en las vesículas del retículo endoplásmico y algunas regiones del aparato de Golgi, de las células epiteliales, glandulares y estromales, también se encuentra actividad de esta enzima en los leucocitos eosinófilos, que se presentan como células transitorias, en el estroma del endometrio y del miometrio (Agrawal y Laloraya, 1978; Brökelmann y Fawcett, 1969).

La peroxidasa podría tener una participación importante en los cambios del endometrio durante la adquisición de la fase receptiva y su respuesta al estímulo decidual, ya que se le ha relacionado con la respuesta uterina a estrógenos y con la hiperemia uterina inducida por ellos (Anderson y DeSombre, 1975; Brökelmann y Fawcett, 1969; Farley y col., 1992; Kepping y Jellinck, 1978; King y col., 1981; Lucas y col., 1955).

Desde 1955 se encontró por primera vez, que la inyección de estrógenos produce un notable aumento en la actividad de peroxidasa en el tejido uterino (Lucas, 1955). La actividad de esta enzima en el útero de rata es mayor durante el



estro con respecto a otras etapas del ciclo estral (Anderson y DeSombre, 1975; Brökelmann y Fawcett, 1969; Jellinck y col., 1977), se piensa que esto se deba al predominio de la acción estrogénica sobre el útero en esta etapa y que posiblemente el  $17\beta$ -estradiol induzca también la síntesis de peroxidasa durante periodos de estimulación por estrógenos endógenos como es el caso del estro (Anderson y DeSombre, 1975):

Existen actualmente dos opiniones diferentes para explicar el origen de la actividad de peroxidasa uterina inducida por estrógenos; por una parte se propone un origen extrínseco en el que la enzima deriva de la fracción soluble de los leucocitos eosinófilos que invaden el útero después de una estimulación por estrógenos, por otra se sugiere un origen intrínseco, es decir, que la peroxidasa es uno de los componentes de las partículas microsomales de las células del endometrio (Olsen y Lyttle, 1982).

Diversas evidencias indican que la peroxidasa de ambos orígenes es inducida por estrógenos pero de manera más predominante la que provienen de los eosinófilos. En un estudio histoquímico, se ha encontrado que al poco tiempo de la administración de estrógenos, la peroxidasa se localiza principalmente en los eosinófilos, neutrófilos y eritrocitos, mientras que en el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi de las células epiteliales y estromales aumenta más tardíamente a las 12 h después del tratamiento. Además cuando se administran antiestrógenos como el C-1628 después de un tratamiento estrogénico la peroxidasa uterina disminuye en un 48% y la eosinofilia también disminuye en una proporción similar (Brökelmann y Fawcett, 1969).

En un estudio bioquímico comparativo de las peroxidasa uterinas, se indica que la de origen eosinofílico y la de origen estromal inducidas por efectos estrogénicos, son similares y que una proporción sustancial de la peroxidasa inducida por estrógenos es de origen eosinofílico (Olsen y Lyttle, 1982). Al parecer

la enzima de los eosinófilos se encuentra soluble en el citosol y la epitelial y estromal es microsomal (Brökelmann y Fawcett, 1969).

Mediante el empleo de anticuerpos monoclonales se ha demostrado de manera directa que la peroxidasa del útero de rata en respuesta a estrógenos es principalmente de origen eosinofílico (Keeping y Lyttle, 1984).

Para explicar la función de la eosinofilia uterina inducida por estrógenos, se ha propuesto que los receptores a estrógenos presentes en los eosinófilos y en las células del útero, forman el llamado sistema receptor-eosinófilo y que posiblemente se encuentra involucrado en las respuestas uterinas no genómicas, tempranas a los estrógenos como son: el edema, el aumento en la permeabilidad vascular, la liberación de histamina etc, (Tchernitchin, 1970, 1973 y 1979; Tchernitchin y col., 1974, 1975 y 1978).

Los exámenes histológicos muestran un gran número de eosinófilos uterinos unidos a la pared de los capilares y vasos sanguíneos en el útero de rata. La presencia simultánea de receptores a estrógenos en la membrana citoplásmica de los eosinófilos y en la pared de los capilares y vasos sanguíneos uterinos podría ser una de las causas de la especificidad orgánica de la eosinofilia uterina inducida por estrógenos (Tchernitchin, 1973), además proporciona una explicación del posible mecanismo de migración de estas células al útero, ya que el reconocimiento de los vasos sanguíneos uterinos por los eosinófilos puede depender de ello y se ha sugerido que los receptores libres de estrógenos de la pared capilar pueden tener afinidad al complejo receptor-estrógeno del eosinófilo lo que podría originar un complejo "birreceptor" que anclaría al leucocito hacia el vaso sanguíneo como un posible paso inicial para la penetración del estroma uterino (Tchernitchin, 1979).

Otra posibilidad complementaria es la de que los eosinófilos podrían liberar gránulos densos a los espacios extracelulares. Estos gránulos serían los

responsables de la respuesta temprana a los estrógenos, ya que contienen enzimas hidrolíticas (arilsulfatasa,  $\beta$ -glucuronidasa, etc) que podrían causar el aumento en la permeabilidad vascular (Tchernitchin, y col., 1985).

El aumento temprano de eosinófilos después de la administración de estrógenos sugiere que estos podrían provocar la atracción de los eosinófilos hacia el útero. La migración de los eosinófilos al parecer es regulada por la acción de un factor quimotáctico dependiente de estrógenos, el ECF-U, este factor es una proteína de aproximadamente 17 kDa, se ha demostrado que es sintetizada y/o liberada por las células estromales del útero de ratas inmaduras bajo la influencia de E<sub>2</sub> (Farley, 1992; Lee y col., 1989), además en estudios histoquímicos de secciones de útero de rata se ha mostrado que los eosinófilos se acumulan principalmente en el estroma del endometrio (Leiva, 1991).

La significancia biológica de la peroxidasa dependiente de estrógenos no ha sido aclarada, aunque existen algunas hipótesis sobre su probable función, entre otras se ha sugerido que la peroxidasa interactúa con el E<sub>2</sub> y que ambos intervienen en el transporte de electrones en procesos oxidativos y/o en el catabolismo de cantidades excesivas de estrógeno en el útero (Jellinck, 1976), también se ha relacionado esta enzima con el aumento del fluido sanguíneo en él (Farley y col., 1992).

La peroxidasa puede intervenir en la conversión de estrógenos a sus formas catecol (Ball y Knuppen, 1990) y se ha propuesto que los catecolestrógenos son intermediarios vasoactivos de la hiperemia uterina (Farley, 1992), siendo importantes en la respuesta vascular temprana a estrógenos. El mecanismo por el cual actúan los catecolestrógenos es aún poco entendido, sin embargo, se piensa que estos inhiben el catabolismo de las catecolaminas y que esto podría causar la prolongación y la potenciación de sus acciones fisiológicas (Ball y Knuppen, 1990).

La actividad de la peroxidasa uterina está probablemente correlacionada con la respuesta vascular temprana (hiperemia) causada por estradiol, ya que el aumento en ella precede al incremento de volumen sanguíneo uterino, lo que sugieren que un cambio en la actividad de la peroxidasa puede estar involucrado con la iniciación de la vasodilatación uterina (Farley, y col., 1992).

Un aumento temprano en la actividad de peroxidasa después de la exposición de estrógenos y previa a la respuesta vascular puede ser importante en el desarrollo de la hiperemia uterina. Los catecolestrógenos no únicamente dilatan la arteria uterina in vivo, sino que también los compuestos estrogénicos son efectivos. Se ha sugerido que los catecolestrógenos pueden ser mediadores de los efectos vasculares de los estrógenos (Farley y col., 1992).

Por lo tanto, se podría dar la siguiente secuencia de eventos: el aumento de la eosinofilia uterina como respuesta temprana del útero a los estrógenos y en consecuencia un aumento de la actividad de peroxidasa, posteriormente se llevaría al cabo la hidroxilación de estrógenos con la formación de catecolestrógenos (catalizada por esta enzima), este mecanismo induciría la subsecuente vasodilatación, los cambios en la permeabilidad vascular y finalmente la peroxidasa sería inactivada (Farley y col., 1992).

### **C. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Los estudios donde se ha correlacionado la actividad de peroxidasa y los estrógenos se han realizado únicamente en ratas prepúberes y ovariectomizadas donde se administra estradiol exógeno y en ratas normales durante el ciclo estral, sin embargo, aún falta determinar si durante la preñez en la rata cuando se presenta la oleada estrogénica durante el día 4, como un requisito para inducir la receptividad uterina al blastocisto, ocurre un aumento en la actividad de esta enzima y si tiene relación con el aumento de permeabilidad vascular (hiperemia) que ocurre en el útero como respuesta a los estímulos del blastocisto.

Es posible que el aumento de estrógenos del día 4 de preñez en la rata, que induce el surgimiento de la fase de receptividad uterina, también conduzca a un aumento de la actividad de peroxidasa (durante dicha fase) y quizá esta enzima podría mediar la respuesta vascular uterina inducida por los estímulos del blastocisto.

### **D. HIPOTESIS**

A) Debido a que la fase de receptividad del endometrio es inducida por estrógenos y la actividad de esta hormona ocasiona la migración de eosinófilos así como el aumento de actividad de peroxidasa en el útero de animales ovariectomizados, entonces, es posible que el surgimiento de esta fase se acompañe de un aumento marcado en la actividad de la peroxidasa uterina.

B) Si la actividad de peroxidasa aumenta en la fase de sensibilidad uterina, entonces, es posible que los estímulos del blastocisto provoquen su liberación y que participe en la inducción de los cambios vasculares uterinos característicos de la respuesta de este órgano durante la implantación embrionaria.

### **III. OBJETIVOS**

#### **A. Objetivo General.**

Determinar si la actividad de peroxidasa experimenta cambios relacionados con la adquisición de la fase de receptividad endometrial y que indiquen su participación en la respuesta vascular uterina durante la implantación.

#### **B. Objetivos Particulares**

1.- Estudiar las variaciones en la actividad de la peroxidasa uterina del día 3 al 6 de preñez en la rata.

2.- Estudiar los cambios que se presentan en las concentraciones de proteínas, DNA, peso seco y porcentaje de humedad uterinos en los diferentes días de preñez estudiados.

3.- Comparar la actividad de peroxidasa y la concentración de proteínas, DNA y peso seco entre las zonas donde ocurrirá la implantación (Z I) con el resto del útero (I Z) durante el día 6 de preñez.

#### IV.- MATERIALES Y METODOS.

Se utilizaron ratas Sprague-Dowley de entre dos y medio y tres meses de edad con un peso de 200 a 250 g, las que se mantuvieron en condiciones de temperatura constante y con un fotoperiodo de 12 h de luz y 12 de oscuridad. El alimento (Purina Rat Chow) y el agua se les proporcionó *ad libitum*.

Se tomaron diariamente frotis vaginales antes de las 10:00 a.m., al menos durante cinco días para asegurar la ciclicidad sexual. Las etapas del ciclo fueron identificadas de acuerdo a la figura 2. Las ratas se aparearon por el sistema de trío (2 hembras y 1 macho). El día en que se encontraron espermatozoides en el frotis vaginal se consideró como el día uno de preñez.

Se trabajó durante los días 3 a 5 de preñez, empleando 2 ratas por cada serie de determinaciones, en el día 6 se usaron 5 y en la fase de estro 2. Se realizaron 5 determinaciones por cada parámetro estudiado. Una serie de determinaciones implica la medición por duplicado de la peroxidasa soluble y extraíble, el peso seco, el DNA y las proteínas.

Durante el día 6 de preñez, con el propósito de separar las zonas con respuesta vascular, del resto del útero y tratarlas como muestras separadas, a cada rata se le inyectó por vía intravenosa 1 ml de azul de tripano al 1% en solución salina y se esperó 30 min antes de sacrificarlas (Ljungkvist y Nilsson, 1974).

Todas las ratas se sacrificaron por dislocación cervical entre las 9:00 y las 10:00 a.m. Los úteros se extrajeron, se lavaron en NaCl al 0.9%, se disecó la grasa y el mesometrio.

Posteriormente se cortaron en pequeños fragmentos, se homogeneizaron y se les midieron diferentes parámetros: actividad de peroxidasa, peso seco, proteínas y DNA, como se detalla en la figura 8.

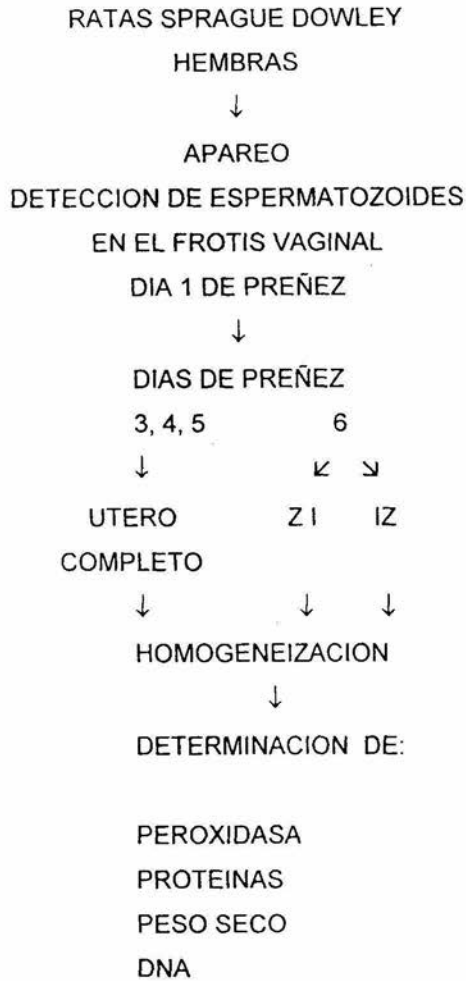


Figura 8. ESQUEMA METODOLOGICO GENERAL.- Se trabajó con ratas Sprague-Dowley preñadas. Durante los días 3, 4 y 5 se utilizó el útero completo y en el día 6 se separaron las Z I de las I Z. A las muestras se les determinaron varios parámetros: actividad de peroxidasa, proteínas, peso seco y DNA.



## A. MEDICION DE LA ACTIVIDAD DE PEROXIDASA.

### 1.- Procesamiento del Tejido.

Los úteros fragmentados se congelaron sobre un baño de hielo seco y acetona, se molieron en un mortero para pulverizarlos y posteriormente se homogeneizaron al 20% p/v en amortiguador de Tris-HCl 0.5 M, pH 7.2, empleando un homogeneizador Potter-Elvehjem de vidrio-vidrio.

Se centrifugaron a 38 000 g a 4 °C durante 30 minutos, en una centrifuga Beckman J2-HS y se recuperó el sobrenadante en donde se encontraba la fracción de la enzima posiblemente proveniente de los eosinófilos. La pastilla se homogeneizó en amortiguador de Tris-HCl 0.5 M, pH 7.2 conteniendo  $\text{CaCl}_2$  0.5 M y se centrifugó a 100 000 g a 4 °C durante 30 minutos, en una ultracentrifuga Beckman modelo L5-75, el sobrenadante fue la fracción extraíble o microsomal de la enzima. Ambas fracciones se ajustaron a una concentración final de  $\text{CaCl}_2$  0.25 M. (Fig. 9).

### 2.- Medición de la Actividad Enzimática.

Con las muestras de la fracción soluble y la extraíble se midió la actividad de la enzima por el método de Farley y col., (1992). En este método se utiliza una mezcla de reacción que contiene o-fenilendiamina y peróxido de hidrógeno como sustratos, produciéndose compuestos coloridos constituidos posiblemente por moléculas de diaminas, diiminas y/o fenazinas, derivados de la o-fenilendiamina, que puede ser medido a una longitud de onda de 496 nm (Fig. 10).

### 3.- Método.

Se realizó la siguiente mezcla de reacción:

-650  $\mu\text{l}$  de amortiguador de citrato de sodio (Merck) 154 mM, pH 5.

-200  $\mu\text{l}$  de o-fenilendiamina (Sigma) 75 mM.

-50  $\mu\text{l}$  de peróxido de hidrógeno (Merck) 100 mM

-100  $\mu\text{l}$  de muestra de enzima

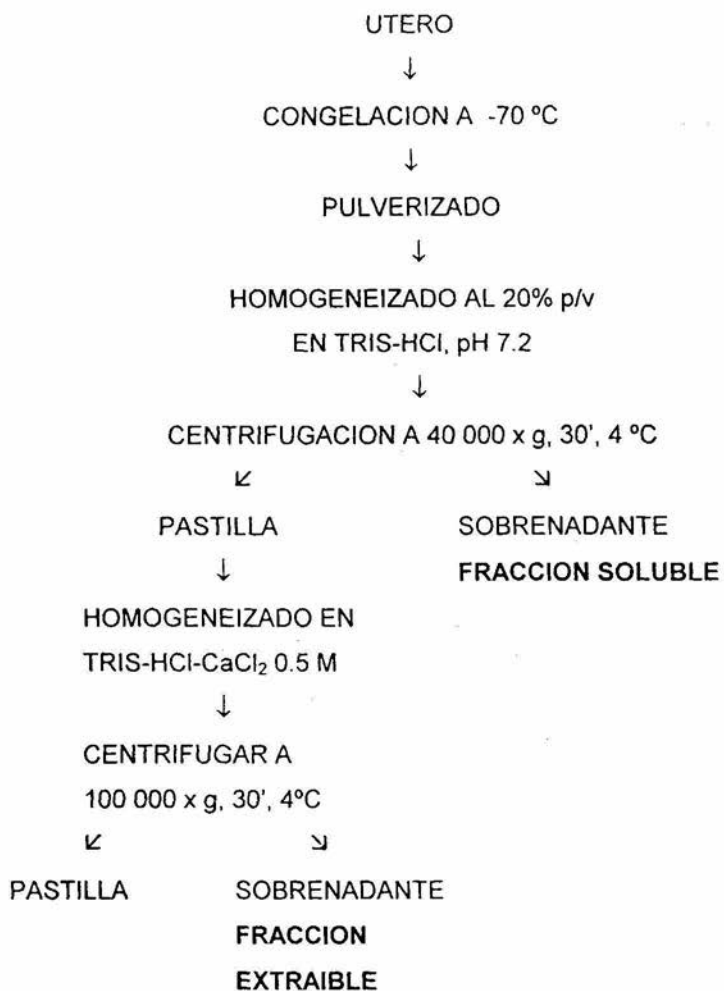


Figura 9 . PROCESAMIENTO DEL TEJIDO PARA LA MEDICION DE LA ACTIVIDAD DE PEROXIDASA. - El procesamiento seguido se basó en el método de Farley y cols., (1992). El homogeneizado al 20% se centrifugó a 40 000 x g y el sobrenadante representó la fracción soluble de la enzima. La pastilla se extrajo con  $\text{CaCl}_2$  , se rehomogenizó, se centrifugó a 100 000 x g y el sobrenadante obtenido constituyó la fracción extraible de la enzima.

### MEZCLA DE REACCION

AMORTIGUADOR CITRATO DE SODIO 154 mM pH 5	650 $\mu$ l
o-FENILENDIAMINA 75 mM	200 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 100 mM	50 $\mu$ l
MUESTRA DE ENZIMA	100 $\mu$ l

↓

30', 25 °C

↓

DETENER LA REACCION CON HCl 2M, 1 ml

↓

ABSORBENCIA A 496 nm

Figura 10. MEDICION DE LA ACTIVIDAD DE PEROXIDASA.- La medición de la actividad enzimática se realizó por el método de Farley y col., (1992), usando o-fenilendiamina y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como sustratos, produciéndose compuestos coloridos de composición indeterminada (diaminas, diiminas y/o fenazinas derivados de la o-fenilendiamina), debido a esto y de acuerdo a la bibliografía consultada, en este trabajo se definió unidad enzimática como la cantidad de enzima que provoca un cambio de 1.0 de absorbencia durante 30 minutos a 25 °C.

La mezcla se incubó a 25 °C durante 30 minutos, se detuvo la reacción con HCl 2 M y se leyó la absorbencia a 496 nm en un espectrofotómetro Beckman DU-64.

Debido al desconocimiento de la identidad exacta de los productos de la reacción, la actividad de la enzima se expresó como unidades, definidas como la cantidad de enzima que causa un cambio de absorbencia de 1 durante 30 minutos a 25 °C empleando la mezcla de reacción ya señalada.

## **B. MEDICION DE PROTEINAS, DNA Y PESO SECO.**

Simultáneamente a lo descrito anteriormente se homogeneizaron muestras paralelas del útero, al 20% p/v en amortiguador de Tris-HCl 0.5 M, pH 7.2, en un homogeneizador Potter-Elvehjem vidrio-vidrio manteniéndolas sobre un baño de hielo, de estas se tomaron las alícuotas necesarias para la determinación de peso seco por el método de Bernal y cols. (1981).

Para las otras mediciones se procesó el tejido de la siguiente manera : A 0.5 ml del homogeneizado, se le agregó 0.5 ml de ácido perclórico 1 M, se centrifugó a 5 000 rpm durante 10 min, en una centrifuga clínica marca Sol-Bat, a la pastilla obtenida se le añadió 1 ml de ácido perclórico 2 M, se incubó a 70 °C durante 30 min, se centrifugó a 5 000 rpm por 10 minutos y se recuperó el sobrenadante, en el que se cuantificó el DNA por el método de Giles y Myres (1965). A la pastilla se le agregaron 4 ml de hidróxido de sodio 1 N (Fig. 11) y se cuantificaron las proteínas por el método de Lowry y cols. (1951), (Ver Apéndice).

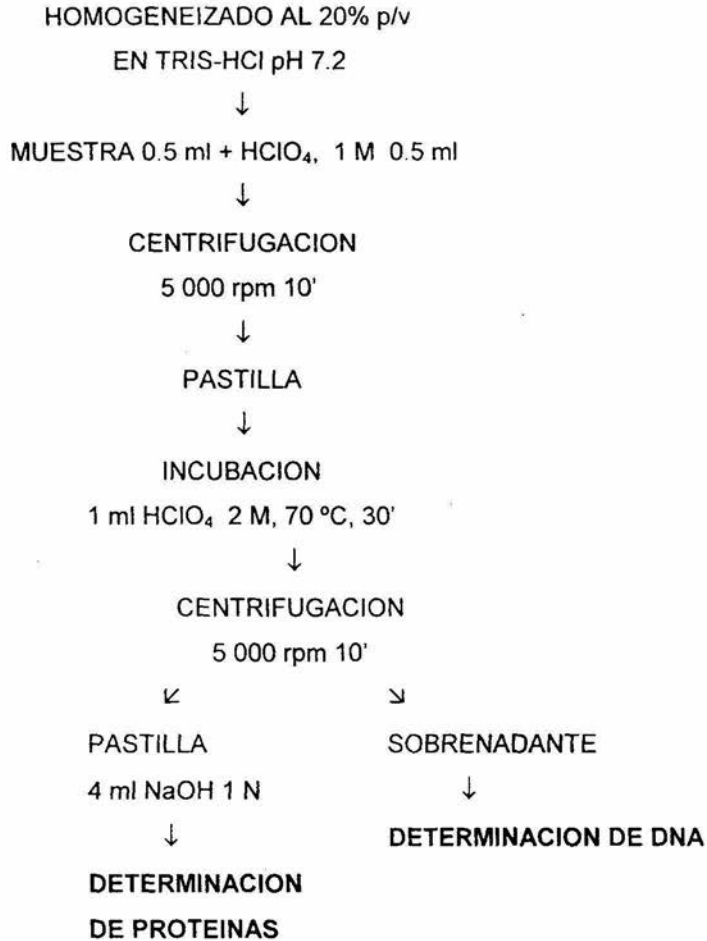


Figura 11. PROCESAMIENTO DEL TEJIDO PARA LA DETERMINACION DE PROTEINAS Y DNA.- En el homogeneizado al 20% se precipitaron las macromoléculas con ácido perclórico 1 M, se centrifugó a 3 000 rpm, la pastilla fue incubada para hidrolizar los ácidos nucleicos, posteriormente se centrifugó y el sobrenadante que contenía nucleótidos se midió el DNA, mientras que la pastilla se disolvió en NaOH y se cuantificaron las proteínas.

### C. ANALISIS ESTADISTICO.

Para averiguar si hubieron diferencias entre los días de preñez estudiados, se aplicó el análisis de varianza (ANOVA) para un factor a los datos obtenidos para los días 3 al 5 y debido a que el día 6 presenta cambios morfológicos notables por la presencia del blastocisto se hizo una ANOVA de 1 factor entre el día 5 y las Z I e I Z.

#### JUEGO DE HIPOTESIS

Hipótesis nula (Ho) = no existen diferencias significativas entre las medias de los días estudiados.

Hipótesis alternativa (Ha) = Al menos un par de medias es diferente.

#### ESTADISTICO DE PRUEBA

$$F_o = \frac{\text{Cuadrado medio del tratamiento}}{\text{Cuadrado medio del error}} = \frac{C M T}{C M E}$$

Para obtener este dato estadístico se calcula la tabla de ANOVA que en este trabajo se realizó en el programa estadístico Statgraphics, para p de 0.05 y 0.01. Posteriormente para determinar a que pares de medias eran las que diferían significativamente se llevó al cabo la prueba de comparación múltiple de Scheffe, para lo anterior se emplearon los programas Quattro y Statgraphics.

Los datos de porcentaje de humedad uterina se transformaron a sus respectivos arcosenos, con el fin de realizar el análisis correspondiente.

## **V. RESULTADOS**

En términos generales la actividad de peroxidasa extraíble, las concentraciones de proteínas, DNA y peso seco en el útero, presentaron un comportamiento semejante durante la preñez temprana. Todos ellos aumentaron progresivamente en los primeros días de preñez, del día 3 al 5 presentándose una elevación notable en el último, mismo que corresponde con la fase de receptividad uterina (tabla 2; figs. 12, 13 y 14).

Posteriormente al día 6, como consecuencia de la presencia del blastocisto en la zona de implantación, tendieron a disminuir el peso seco, las concentraciones de proteínas, de DNA y la actividad de peroxidasa extraíble.

La actividad de peroxidasa soluble también aumentó del día 3 al 5 de preñez, pero a diferencia de todos los parámetros anteriores, el día 6 disminuyó marcadamente, tanto en las zonas de implantación como en el resto del útero. A continuación describiremos con detalle lo encontrado para cada parámetro.

### **A. CAMBIOS EN LA ACTIVIDAD DE PEROXIDASA DURANTE LA PREÑEZ EN LA RATA.**

En la tabla 2 y en las figuras 12, 13 y 14 se presentan de manera numérica y gráfica los valores obtenidos de la actividad específica de peroxidasa expresada en U/mg de proteína, U/mg de peso seco y U/mg de DNA respectivamente. En los tres casos presentaron un comportamiento similar.

#### **1.- Actividad de Peroxidasa Extraíble.**

La actividad de la peroxidasa extraíble durante el día 3 de preñez fue menor a la de los días 4 y 5 ( $p \leq 0.01$ ), (tabla 2).

Posteriormente aumentó progresivamente del día 3 al 5, encontrándose en este último los valores más altos, sin embargo, las actividades de los días 4 y 5 no presentaron diferencias estadísticas ( $p > 0.05$ ) (tabla 2 y figs. 12, 13 y 14).

Al día 6 de preñez, la actividad en la zona de implantación disminuyó con respecto a aquella del día 5 (tabla 2 y figs. 12, 13 y 14), lo que es estadísticamente significativo cuando la actividad se expresó por mg de proteínas o por mg de peso seco ( $p \leq 0.01$ ), pero no cuando se refiere al DNA. Por su parte la actividad en el resto del útero no cambia respecto a la del día 5 ( $p > 0.05$ ), (tabla 2).

## 2.- Actividad de la Peroxidasa Soluble.

La actividad de la fracción soluble de la enzima también aumentó progresivamente del día 3 al 5 de preñez presentando un pico máximo este último día.

La actividad del día 4 fue mayor a la del día 3 ( $p \leq 0.01$ ) y la del día 5 fue mayor a la del día 4 ( $p \leq 0.01$ ), esto último cuando se expresa por mg de proteínas o por mg de peso seco pero no lo fue si se refiere al DNA ( $p > 0.05$ ), (tabla 2 y figs. 12, 13 y 14).

Al día 6, la actividad de la enzima soluble, disminuyó significativamente en las Z I y las I Z, respecto al día anterior con una  $p \leq 0.01$  (excepto en las I Z, cuando los datos se refieren al DNA) y fue más pronunciada en las I Z (tabla 2; figs. 12, 13 y 14). La actividad de la enzima fue mayor en las Z I que en las I Z ( $P \leq 0.01$ ), (tabla 2).

## 3.- Comparación Entre la Actividad de la Peroxidasa Soluble y Extraíble.

La actividad de la fracción soluble fue mayor que la encontrada en la fracción extraíble en los días 3, 4, 5 y en las Z I (tabla 2; figs. 12, 13 y 14). Sólo en las I Z la actividad en ambas fracciones fue similar.



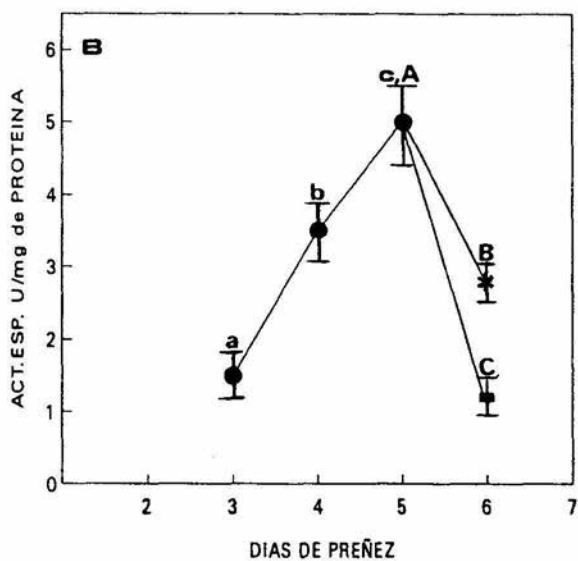
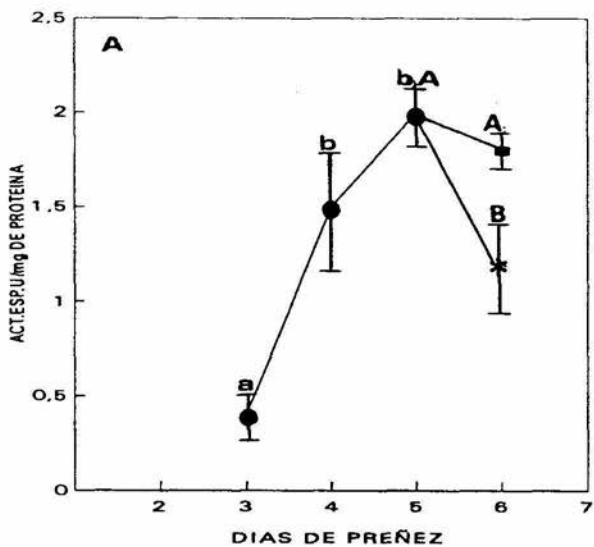
días de preñez	ACTIVIDAD DE PEROXIDASA						
	(U/mg DE PROT)		(U/mg DE PESO SECO)		(U/mg DE DNA)		
	F. SOL.	F. EXT.	F. SOL.	F. EXT.	F. SOL.	F. EXT.	
3	1.50 ± 0.24 a	0.42 ± 0.02 a	0.5 ± 0.06 a	0.15 ± 0.015 a	64 ± 13 a	18 ± 4 a	
4	3.50 ± 0.30 b	1.50 ± 0.30 b	1.3 ± 0.10 b	0.6 ± 0.2 b	116 ± 17 b	48 ± 7 b	
5	5 ± 0.5 c, A	2.1 ± 0.2 b, A	2 ± 0.2 c, A	0.7 ± 0.1 b, A	145 ± 10 b, A	58 ± 8 b, A	
6	Z I	2.8 ± 0.25 B	1.2 ± 0.25 B	1 ± 0.2 B	0.4 ± 0.1 B	120 ± 20 A	53 ± 14 A
	I Z	1.2 ± 0.20 C	1.8 ± 0.10 A	0.4 ± 0.1 C	0.6 ± 0.1 A, B	37 ± 5.5 B	41 ± 12 A

TABLA 2. ACTIVIDAD DE PEROXIDASA DURANTE LA PREÑEZ TEMPRANA EN LA RATA.- Se determinó la actividad de peroxidasa en la fracción soluble ( F. Sol. ) y extraíble ( F. Ext. ) del útero en los días 3 a 6 de preñez como se describe en materiales y métodos. Al día 6 el útero se separó en las zonas de implantación (Z I) y de interimplantación (I Z). Se expresó la actividad enzimática en unidades (U) considerando una unidad como la cantidad de enzima que produce un cambio en la absorbencia de 1 para una incubación de 30 minutos a 25 °C empleando la mezcla de reacción ya descrita. Se presenta la media y desviación estándar ( $\bar{x} \pm D. E$ ) de 5 determinaciones separadas realizadas por duplicado.

Los datos para los días 3, 4 y 5 se compararon por ANOVA de un factor (letras minúsculas) y los del día 6 a su vez se compararon con las Z I e I Z por la misma prueba (letras mayúsculas), en ambos casos se realizó la prueba de comparaciones múltiples de Scheffe. Las letras iguales indican grupos de datos homogéneos, las minúsculas para una  $p \leq 0.01$ .

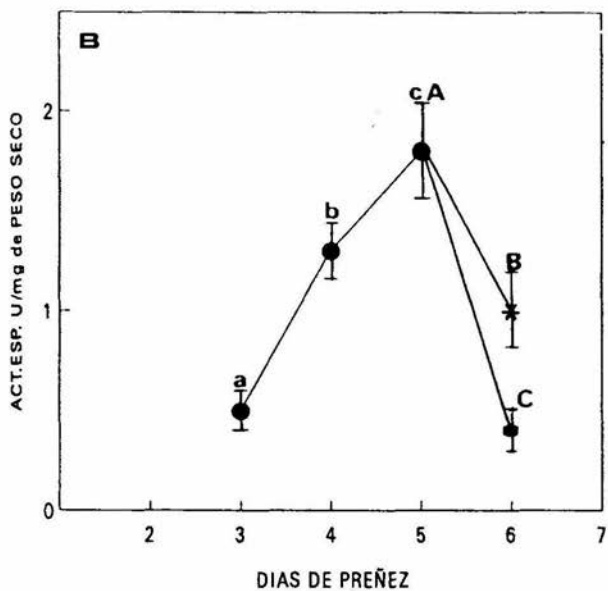
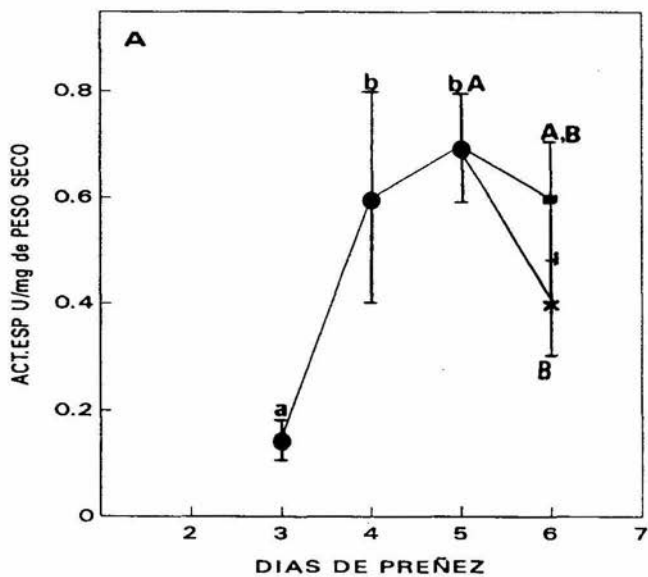
Figura 12. ACTIVIDAD DE PEROXIDASA DURANTE LA PREÑEZ EN LA RATA (U/mg DE PROTEINAS).- Se representan gráficamente los datos de la tabla 2, correspondientes a la actividad expresada por proteínas. La Gráfica A representa la actividad de la enzima en la fracción extraíble y la Gráfica B la fracción soluble. Las gráficas presentan las  $\bar{x} \pm D. E.$  de cinco repeticiones realizadas por duplicado.

Los datos para los días 3, 4 y 5 se compararon por ANOVA de un factor (letras minúsculas) y los del día 5 a su vez se compararon con las Z I e I Z por la misma prueba (letras mayúsculas), en ambos casos se realizó la prueba de Scheffe. Las letras iguales indican grupos de datos homogéneos con una  $p \leq 0.01$ .



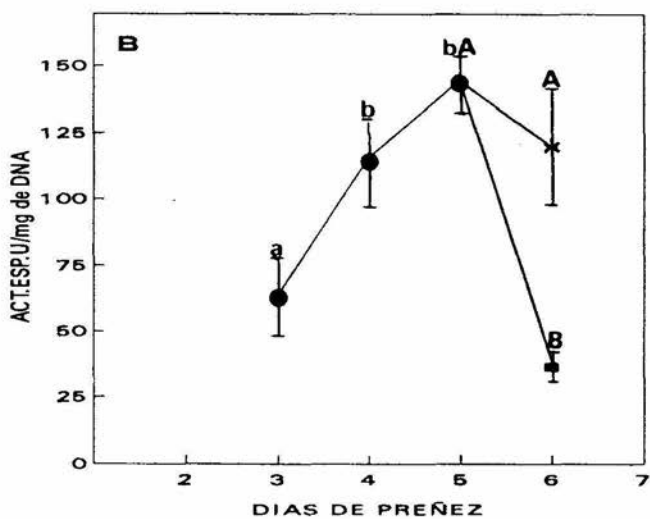
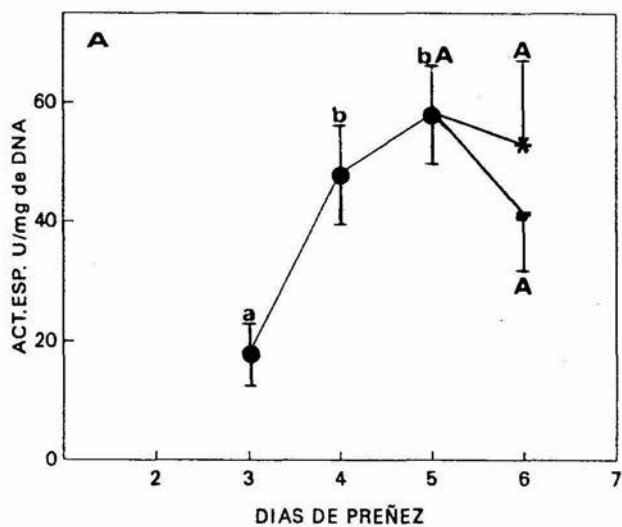
U.C.-UTERO COMPLETO(●) Z.I.-ZONA DE IMPLANTACION(\*)  
I.Z.-INTERZONA(■)

Figura 13. ACTIVIDAD DE PEROXIDASA DURANTE LA PREÑEZ EN LA RATA (U/mg DE PESO SECO).- Se representan los datos de la tabla 2, con las  $\bar{x} \pm D$ . E de cinco determinaciones realizadas por duplicado. La Gráfica A presenta los resultados de la fracción extraíble y la Gráfica B los de la fracción soluble, las letras iguales indican los grupos homogéneos, las minúsculas para la comparación de los días 3, 4 y 5 y las mayúsculas para comparar el día 5 y las Z I e I Z con una  $p \leq 0.01$ .



U.C.-UTERO COMPLETO(●) Z.I.-ZONA DE IMPLANTACION (\*)  
I.Z.-INTERZONA(■)

Figura 14. ACTIVIDAD DE PEROXIDASA DURANTE LA PREÑEZ EN LA RATA (U/mg DE DNA).- Se representan los datos de la tabla 2, con las  $\bar{x} \pm D. E$  de cinco determinaciones realizadas por duplicado. La Gráfica A presenta los resultados de la fracción extraíble y la Gráfica B los de la fracción soluble, las letras iguales indican los grupos de datos homogéneos, las minúsculas para la comparación de los días 3, 4 y 5 y las mayúsculas para comparar el día 5 y las Z I e I Z con una  $p \leq 0.01$ . Cuando las desviaciones estándares se sobrepone sólo se representan de un lado de la media.



U.C.-UTERO COMPLETO(●) Z.I.-ZONA DE IMPLANTACION(\*)  
I.Z.-INTERZONA (■)

## **B.- ACTIVIDAD DE PEROXIDASA DURANTE LA FASE DE ESTRO EN LA RATA.**

Como parámetro de comparación, con el propósito de estandarizar la metodología y de manera secundaria a los objetivos de este trabajo, se eligió medir la actividad de la enzima durante la fase de estro, ya que de acuerdo a la literatura consultada, en esta etapa se presenta la mayor actividad de esta enzima respecto a las otras fases del ciclo reproductor de la rata; debido a la influencia de los estrógenos sobre el útero (Agrawal y Laloraya, 1978; Brökelmann, 1969; Brökelmann y Fawcett .,1969; Ross y Klebanoff, 1966).

En este caso se observó que es mayor la actividad de peroxidasa presente en la fracción extraíble en comparación a la encontrada en la fracción soluble (tabla 3), esto difiere a lo encontrado durante la preñez, en que se presenta un obvio predominio de la enzima soluble, excepto en las I Z (tablas 2 y 3; figs. 12, 13 y 14).

La actividad de la fracción extraíble del estro ( $8.7 \pm 1.35$  U/mg de proteína) fue cuatro veces mayor que el valor más alto encontrado para la misma fracción en los días estudiados durante la preñez.

La actividad de peroxidasa soluble durante el estro, resultó prácticamente igual a la encontrada en la fracción soluble de la Z I (tablas 2 y 3), mientras que el valor de la fracción extraíble en el estro fue ocho veces mayor que la fracción extraíble de las Z I.

## **C.-CAMBIOS EN LAS CONCENTRACIONES DE PROTEINAS, PESO SECO Y DNA DURANTE LA PREÑEZ EN LA RATA.**

Estos tres parámetros mostraron un comportamiento semejante al de la actividad de peroxidasa extraíble, ya que de los días 3 al 5 de preñez, aumentaron progresivamente, para alcanzar un máximo este último día y en el día 6, las concentraciones disminuyeron en las Z I en relación al día anterior.



El valor más alto de peso seco se encontró al día 5 de preñez, el cual fue mayor al de los días 3 y 4 y a las I Z ( $p \leq 0.05$ ) e igual que de las I Z ( $p > 0.05$ ). La concentración de proteínas en el día 5 fue el valor más alto encontrado pero fue igual del día 4 y las I Z ( $p > 0.05$ ). La concentración de DNA del día 5 fue el más alto, pero este fue igual al de las I Z ( $p > 0.05$ ) y mayor a la de los días 3 y 4 y al de las Z I, ( $p \leq 0.01$ ), (tabla 4 y figura 15).

El peso seco y las concentraciones de DNA y proteínas disminuyeron en las Z I respecto al día 5 ( $p \leq 0.05$ ), mientras que los valores de estos parámetros bioquímicos para las I Z fueron estadísticamente similares a los del día 5 de preñez ( $p > 0.05$ ).

Cuando se compararon los valores de los parámetros de las Z I con el de las I Z, se encontró que no presentaron diferencias estadísticas para el peso seco y la concentración de proteínas ( $p > 0.05$ ), mientras que la concentración del DNA fue menor en las Z I respecto a las I Z ( $p \leq 0.01$ ).

#### **D. RELACIONES BIOQUIMICAS DE MASA FUNCIONAL Y CONTENIDO DE HUMEDAD DURANTE LA PREÑEZ EN LA RATA.**

Se calcularon varias relaciones bioquímicas con el propósito de analizar el estado morfofisiológico del útero en la preñez ya que las relaciones proteínas/DNA, proteínas/peso seco y DNA/peso seco se han planteado como parámetros del tamaño y la actividad metabólica celular (Cerecedo y col., 1959; Hernandez y col., 1981 y Hilf y col., 1963), por tanto, los parámetros anteriormente citados son importantes para el análisis del útero durante la preñez.

El mayor porcentaje de humedad uterina se encontró en el día 3 de preñez ( $p \leq 0.05$ ). Posteriormente este porcentaje disminuye progresivamente alcanzando su valor más bajo el día 5, finalmente en el día 6 aumenta en las Z I respecto al día

5 ( $p \leq 0.05$ ), mientras que en las IZ es similar respecto al mismo día ( $p \leq 0.05$ ), (tabla 5).

En la tabla 6, se observan los resultados de las relaciones bioquímicas de masa funcional durante la preñez en la rata.

La relación proteínas/DNA disminuye del día 3 al 5, encontrándose este día el valor más bajo, al día 6 se eleva en las Z I ( $p \leq 0.05$ ) y permanece constante en las I Z ( $P > 0.05$ ), (tabla 6).

La relación proteínas/peso seco fue más alta el día 4 de preñez y disminuyó al día 5 ( $p \leq 0.05$ ), en el día 6 fue similar al día anterior ( $p > 0.05$ ), (tabla 6).

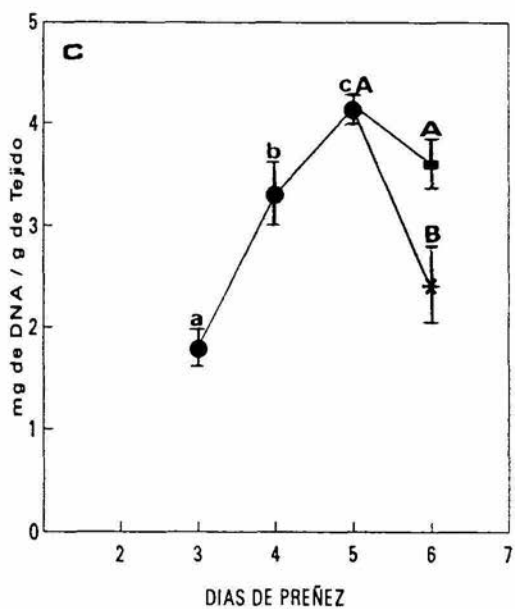
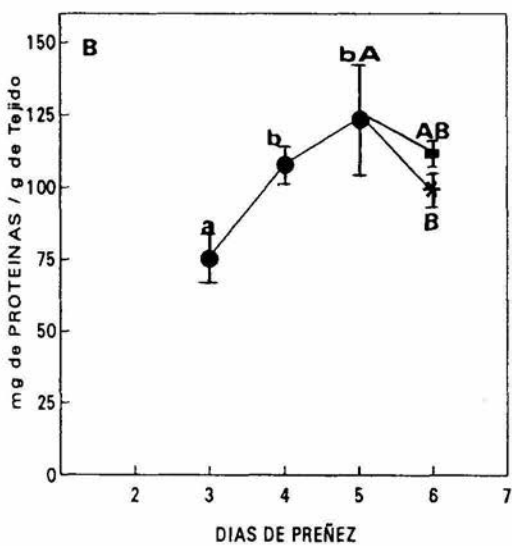
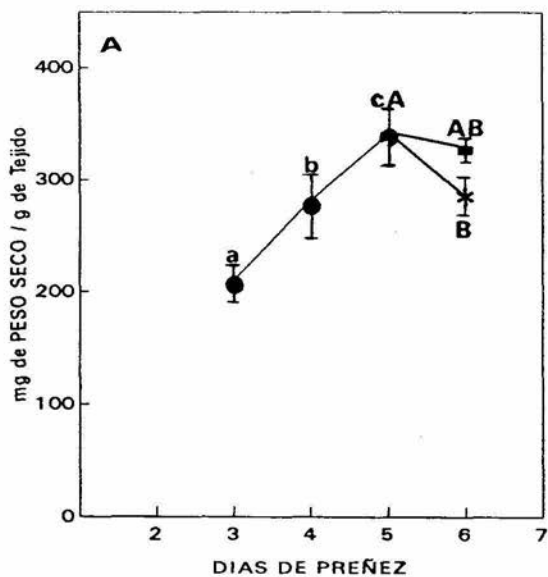
FRACCIÓN	ACTIVIDAD DE PEROXIDASA	
	U/mg DE PROTEINA	U/ mg DE PESO SECO
F. SOL	2.7 ± 0.4	1 ± 0.15
F. EXT	8.7 ± 1.35	3.1 ± 0.6

TABLA 3. ACTIVIDAD DE PEROXIDASA UTERINA DURANTE EL ESTRO EN LA RATA.- Se presentan las  $\bar{x} \pm D. E.$  de cinco repeticiones realizadas por duplicado de la actividad de peroxidasa soluble (F. Sol) y extraíble (F. Ext) durante el estro en la rata, se observa que la actividad de la enzima extraíble fue tres veces mayor que la obtenida en la fracción soluble.

DÍAS DE PREÑEZ	PESO SECO mg/g de tejido	PROTEINAS mg/g de tejido	DNA mg/g de tejido
3	210 ± 13 a	76 ± 9 a	1.8 ± 0.25 a
4	284 ± 40 b	108 ± 6.5 b	3.3 ± 0.35 b
5	340 ± 30 c, A	124 ± 19.5 b, A	4.15 ± 0.1 c, A
Z I	290 ± 20 B	100 ± 8 B	2.4 ± 0.4 B
6 I Z	329 ± 13 A, B	112 ± 4 A, B	3.6 ± 0.3 A

TABLA 4. PESO SECO Y CONCENTRACIONES DE PROTEINAS Y DNA EN EL UTERO DURANTE LA PREÑEZ EN LA RATA.- Se midieron el peso seco y la concentración de proteínas y DNA en el útero como se indicó en materiales y métodos; al día 6 de preñez, se separaron previamente las zonas de implantación (Z I) del resto del útero (I Z). Se muestran las  $\bar{x} \pm D. E.$  de cinco repeticiones realizadas por duplicado. Las letras iguales indican los grupos de datos homogéneos, las minúsculas para comparar los días 3, 4 y 5 y las mayúsculas para la comparación entre el día 5 y las Z I e I Z. Para el peso seco y las proteínas se presentan con una  $p \leq 0.05$  y para el DNA de  $p \leq 0.01$ .

Figura 15. PESO SECO Y CONCENTRACION DE PROTEINAS Y DNA DURANTE LA PREÑEZ EN LA RATA (mg/g DE TEJIDO).- Se determinó el peso seco (Gráfica A), las concentraciones de proteínas (Gráfica B) y DNA (Gráfica C) en el útero, como se indicó en material y métodos. Los días 3, 4 y 5 se empleó el útero completo. Al día 6 se separaron las zonas de implantación (Z I) del resto del útero (I Z). Se muestran las  $\bar{x} \pm D. E$  de cinco repeticiones realizadas por duplicado con dos ratas cada uno. Las letras iguales indican los grupos de datos homogéneos, las minúsculas para comparar los días 3, 4 y 5 y las mayúsculas para la comparación entre el día 5 y las Z I e I Z. Para el peso seco y las proteínas se empleó una  $p \leq 0.05$  y para el DNA de  $p \leq 0.01$ .



U.C.-UTERO COMPLETO (●) Z.I.-ZONA DE  
 IMPLANTACION (\*) I.Z.-INTERZONA (■)

DIAS DE PREÑEZ		HUMEDAD (%)
3		79 ± 1.3 a
4		72 ± 3.4 b
5		66 ± 3 c, A
6	Z I	71 ± 2 B
	I Z	67 ± 1.3 A, B

TABLA 5. PORCENTAJE DE HUMEDAD UTERINA EN LA RATA PREÑADA.- El porcentaje de humedad del útero se calculó considerando el peso húmedo y el peso seco del órgano, al día 6 se separaron las zonas de implantación (Z I) del resto del útero (I Z). Se presentan las  $\bar{x} \pm D. E.$  de cinco determinaciones realizadas por duplicado. Las letras iguales indican los grupos de datos homogéneos, las minúsculas para comparar los días 3 a 5 y las mayúsculas para la comparación entre el día 5 y las Z I e I Z con  $p \leq 0.05$ . Los resultados obtenidos se transformaron a su respectivo arcoseno para su análisis estadístico.

DIAS DE PREÑEZ	PROTEINAS/DNA	PROTEINAS/PESO SECO	DNA/PESO SECO
3	43 ± 5 a	0.36 ± 0.02 a, b	0.01 ± 0.001
4	33 ± 4 a,b	0.38 ± 0.04 b	0.0115 ± 0.002
5	30 ± 4 b, A	0.33 ± 0.1 a, A	0.012 ± 0.0015
Z I	43.5 ± 5 B	0.35 ± 0.01 A	0.01 ± 0.001
6			
I Z	31 ± 2 A, B	0.34 ± 0.015 A	0.01 ± 0.0005

TABLA 6. RELACIONES BIOQUIMICAS DE MASA FUNCIONAL DURANTE LA PREÑEZ EN LA RATA.- Se presentan las  $\bar{x} \pm D. E.$  de cinco determinaciones realizadas por duplicado. Las letras iguales indican los grupos de datos homogéneos, con  $p \leq 0.05$ , las minúsculas cuando se compararon los días 3, 4 y 5 y las mayúsculas para la comparación entre el día 5 y las Z I e I Z con  $p \leq 0.05$ ; en la relación DNA/PESO SECO no se encontraron diferencias entre los distintos días estudiados ( $p > 0.05$ ).

## **V I. DISCUSION**

En este trabajo se demostraron por primera vez variaciones en la actividad de peroxidasa relacionados con los cambios uterinos durante la fase de preimplantación. La actividad de las fracciones soluble y extraíble de la enzima aumentaron marcadamente en la fase de receptividad uterina (día 5) y posteriormente caen cuando el blastocisto ha inducido la respuesta vascular uterina de la implantación.

A continuación se discutirá el posible significado de los cambios encontrados en la actividad de peroxidasa en el peso seco, las concentraciones de proteínas y de DNA durante la preñez temprana.

### **A. CAMBIOS BIOQUIMICOS DURANTE LA ADQUISICION DE LA RECEPTIVIDAD UTERINA (DIA 3 A 5).**

#### **1.- Actividad de Peroxidasa.**

En la rata el periodo de receptividad es de alrededor de 24 h, empieza al inicio del día 5 y finaliza al principio del día 6 de preñez, en este periodo el blastocisto manda señales químicas que inducen la respuesta uterina y se inicia la reacción decidual.

Se ha propuesto que en la rata la actividad de los estrógenos hasta la tarde del día 4 de preñez es indispensable para la implantación y para que el útero adquiera la receptividad al embrión, ya que estos eventos se evitan si las ratas preñadas se ovariectomizan antes pero si se efectúa después, la implantación se realiza (Shelesyak, 1960).

Existen dos propuestas acerca del requerimiento de estrógenos para la implantación en la rata:



a) La del pico estrogénico.- Para algunos autores (Shelesnyak, 1960; Psychoyos, 1976) ocurre una oleada, pico o elevación abrupta de estrógenos en la tarde del día 4.

b) La de la estimulación continua estrogénica.- Otros autores (Saldarini y Yochim, 1967; Yochim, 1975) opinan que se necesita una estimulación estrogénica baja, continua y acumulativa durante la preparación uterina para la implantación durante los primeros 4 días de preñez.

La peroxidasa podría tener una participación importante en los cambios del endometrio durante la adquisición de la fase receptiva y su respuesta al estímulo decidual, ya que se le ha relacionado con las respuestas uterinas a estrógenos y con la hiperemia uterina inducida por ellos (Anderson y DeSombre, 1975; Brökelmann y Fawcett, 1969; Farley y col., 1992; Kepping y Jellinck, 1978; King y col., 1981, Lucas y col., 1955).

La actividad de la peroxidasa soluble y la extraíble fueron aumentando desde el día 3, con un máximo en el día de la receptividad endometrial pero la peroxidasa soluble siempre fue mayor a la extraíble, lo que podría indicar una mayor intervención de aquella en la implantación.

El comportamiento de la actividad de ambos tipos de peroxidasa encontrado coincidió más con lo propuesto por Yochim (1975) sobre la acción estrogénica en el inicio de la preñez, ya que la actividad de peroxidasa comienza a aumentar antes de que ocurra el pico estrogénico propuesto por Shelesnyak (de la mañana del día 3 a la mañana del día 4 de preñez) y continúa aumentando con un máximo en el día 5, pero no de manera abrupta como sería el resultado de un pico, sino de manera discreta, este comportamiento se ha observado en otras características metabólicas del endometrio (consumo de  $O_2$ , producción de  $CO_2$ , etc), (Yochim, 1963).

#### A) Peroxidasa Soluble.

Se ha propuesto que la peroxidasa de esta fracción es de origen eosinofílico (Farley y col., 1992; Lyttle y col., 1984), por lo que nuestros resultados podrían indicar que la preparación del útero para adquirir la receptividad implica la migración de eosinófilos al mismo y la fase de receptividad se caracterizaría por una gran cantidad de eosinófilos en el útero, lo que en consecuencia provocaría la presencia de la peroxidasa soluble.

Debido al requerimiento de estrógenos para la adquisición de la receptividad uterina, es posible que el aumento de peroxidasa y eosinófilos de este día sea dependiente de estas hormonas, ya que como se mencionó antes los estrógenos inducen en el útero de la rata ovariectomizada un aumento de ambos.

#### B) Peroxidasa Extraíble.

La actividad de este tipo de enzima presenta también un máximo el día 5, correspondiente con la receptividad uterina, este tipo de peroxidasa proviene principalmente de microsomas de células residentes del endometrio. En conjunto, al día 5 de preñez, hay un aumento en la actividad de la peroxidasa soluble y microsomal del útero. Lo anterior podría implicar una alta capacidad de este órgano, en su fase de receptividad para convertir estrógenos a catecolestrógenos, los cuales podrían intervenir en los cambios vasculares uterinos inducidos por el blastocisto, observados desde la tarde del día 5.

#### 2.- Composición Macromolecular del Utero.

Se analizaron varias características bioquímicas de las muestras de tejido y se utilizaron como indicadores del estado morfofisiológico del útero en la preñez, los resultados obtenidos se compararon con lo informado en la literatura.

El peso seco se ha empleado para conocer la cantidad de materia orgánica e inorgánica en un tejido en relación a su peso húmedo y en base a ello se puede determinar el porcentaje de agua que este contiene (Bernal y col., 1981).

Se encontró un peso seco mayor en la fase de sensibilidad que los días anteriores, lo que indica un aumento en la concentración de compuestos orgánicos e inorgánicos en el tejido, esto puede deberse a dos posibles causas: a una disminución en la hidratación del tejido, como lo indican nuestros resultados y/o a la acumulación de macromoléculas en él, esto coincide con un aumento en el metabolismo en su fase de sensibilidad durante la pseudopreñez, ya que en ella el consumo de oxígeno es elevado, aumentan el peso total del útero (Saldarini y Yochim, 1967), el contenido total de proteínas y de RNA por endometrio (Pepe y Yochim, 1971) y hay una mayor síntesis de DNA, esto último también se ha encontrado en la rata preñada (Tachi y col., 1972, 1974).

La síntesis de DNA y de proteínas aumentan al día 5 de preñez en la rata con respecto a los días anteriores (las proteínas presentan picos bifásicos durante el día 3 y 5 de acuerdo a Psychoyos, 1967 y 1973). Nuestros resultados coinciden con lo anterior, ya que las máximas concentraciones de DNA y de proteínas se encontraron durante el día 5, lo que podría relacionarse con una elevada proliferación celular posiblemente de tipo estromal un día antes y con la alta síntesis de DNA, pues estas células proliferan desde el día 3 con un máximo al día 4 (Tachi y col., 1976), influenciados quizá por la progesterona que aumenta los receptores a estradiol en ellas, lo que hace que proliferen en respuesta a los estrógenos (Martel, 1982).

Las relaciones bioquímicas, de PROTEINAS/DNA, PROTEINAS/PESO SECO y DNA/PESO SECO, han sido planteadas como parámetros globales del tamaño y actividad metabólica celular (Cerecedo y col., 1959; Hernandez y col., 1981; Hilf y col., 1963). La relación PROTEINAS/DNA elevada se ha relacionado con una gran actividad metabólica en la célula y la diferenciación activa, en el caso del endometrio

humano se ha tomado como indicadora de la diferenciación decidual que ocurre espontáneamente al final de la fase secretora (Hernandez y col., 1981).

En nuestro trabajo, aunque las concentraciones de proteínas y de DNA, referidos al peso húmedo, aumentaron al día 5, la relación PROTEINAS/DNA disminuyó y fue mayor el día 3 (Ver tabla 6). Esta relación se ha considerado como un indicador del tamaño celular (Hernandez y col., 1981) y podría sugerir que la relación del citoplasma respecto al núcleo puede ser menor al día 5 en relación a los dos anteriores, lo que es posible ya que para este día se ha postulado que las células del estroma se detienen en G<sub>2</sub> y aunque hay síntesis de DNA no ocurre la posterior mitosis, hasta que no se da el estímulo decidual (Tachi, 1974).

La relación PROTEINAS/PESO SECO fue mayor el día de la oleada estrogénica que el de la fase de sensibilidad, debido posiblemente a la mayor proliferación celular estromal del día 4 respecto al 5 (Tachi, 1974).

En la relación DNA/PESO SECO no hubo diferencias entre el día 4 y 5, lo que indica que lo observado para la concentración del DNA respecto al peso húmedo puede deberse a los cambios de hidratación del tejido.

## **B. CAMBIOS BIOQUIMICOS DEL UTERO DURANTE SU RESPUESTA AL BLASTOCISTO.**

### **1.- Actividad de Peroxidasa.**

Como ya describimos anteriormente las actividades de las peroxidasas soluble y extraíble aumentan alcanzando un máximo en el día de la fase de sensibilidad, esto indica que ambas son importantes en el proceso de sensibilización del útero al blastocisto pero la peroxidasa soluble podría tener una mayor intervención en este proceso, ya que fue mayor a la extraíble.

Se presentó una caída en la actividad de la enzima en ambas fracciones, entre el día 5 y 6, lo que podría sugerir que el blastocisto intervino en buena parte con sus efectos locales en la caída de la enzima soluble en las Z I y las I Z y de la extraíble en las Z I. A continuación se describirán con mayor detalle las diferencias entre estas dos fracciones y otros hallazgos interesantes de este trabajo.

#### A) Peroxidasa Soluble.

Se ha propuesto que se origina de la fracción soluble de los eosinófilos (Farley y col., 1992) y se ha asociado con los estrógenos y la vasodilatación. Se ha encontrado que los eosinófilos invaden al útero después de una estimulación estrogénica (Tchernitchin, 1970, 1973, 1974), lo que al parecer es regulado por un factor quimotáctico, el ECF-U dependiente de estrógenos, el cual es sintetizado y/o liberado por las células estromales del útero de la rata inmadura bajo la influencia de E<sub>2</sub> (Lee y col., 1989).

La fase de sensibilidad uterina (día 5) es inducida por estrógenos y es posible que durante ella ocurra la migración de eosinófilos mediada por estas hormonas, que este mecanismo sea regulado por el ECF-U hacia el útero y que por estímulos locales del blastocisto, dentro de los que podrían encontrarse los estrógenos mismos, se induzca la migración de estas células a las zonas de implantación y probablemente su degranulación.

La degranulación de eosinófilos, se ha propuesto como la causante del aumento de permeabilidad vascular y la edematización del útero después del tratamiento con estrógenos (Tchernitchin y col., 1975, 1976), la respuesta local al blastocisto se caracteriza también por estos mismos cambios vasculares, por lo que es factible que puedan relacionarse también con la degranulación de los eosinófilos, lo que explicaría porque en ambos tipos de peroxidasa (de manera más marcada en la soluble) se notó una caída en las Z I respecto al día 5, debido a ello en este estudio se sugiere que los efectos locales del blastocisto indujeron la degranulación de los eosinófilos y también la formación de un factor quimotáctico específico para

ellos más concentrado en la Z I, por lo que los eosinófilos de la I Z migrarían a la Z I y en consecuencia, la disminución en la actividad de peroxidasa soluble sería mayor en la I Z respecto a la Z I tal y como se observó en nuestros resultados.

La mayor actividad de peroxidasa en la Z I en relación a la I Z se puede relacionar con que la primera presenta mayor permeabilidad, edematización y la presencia de fenestraciones o lagunas intercelulares rasgos no presentes en la I Z (Parr y Parr, 1989).

Se han presentado muchos trabajos apoyando la hipótesis de los efectos locales del blastocisto (Castro, 1981; Castro y Hicks, 1983; Dickmann y col., 1976 y Weitlauf, 1988). En ratas ovariectomizadas a pesar de la supresión de hormonas esteroides sexuales de origen materno ocurre un aumento en la concentración de receptores a estrógeno y progesterona en las Z I, siendo esto modulado por los efectos locales del blastocisto.

En las Z I, la concentración de estrógenos es mayor que en las I Z (Castro, 1983), es por ello factible que los blastocistos produzcan sus propios estrógenos y ejerzan acción local como la degranulación eosinofílica.

Los eosinófilos pueden degranular bajo la acción de estrógenos y se ha demostrado que el estradiol ocasiona que ellos degranulen in vitro e in vivo (Ross, 1966; Tchernitchin, 1973). Esta degranulación provoca que los eosinófilos liberen enzimas hidrolíticas (colagenasa,  $\beta$ -glucuronidasa, catepsina, fosfatasa ácida y alcalina, etc), las cuales podrían producir la despolimerización de las fibras de colágena o los mucopolisacáridos de la sustancia fundamental (Tchernitchin, 1976) dicha despolimerización se ha involucrado con el aumento de permeabilidad vascular y la edematización tisular, esto podría ocurrir en las Z I acorde con nuestro estudio.

En contraste con lo encontrado en este trabajo para la peroxidasa soluble, Martínez, (1985), informó que la población de eosinófilos uterinos es menor en las

Z I, sugiriendo que esto sucede por la degranulación de eosinófilos inducida por algun(os) mensajero(s) embrionario(s) al inicio de la implantación. Las diferencias encontradas en ambos trabajos con las muestras de Z I e I Z pueden deberse a las distintas cepas y metodologías empleadas, pues, Martínez (1985) evaluó a la población de eosinófilos con un método de tinción de eritrosina, el cual tiñe la proteína básica mayor, característica de sus gránulos y en este trabajo se estudió la actividad de peroxidasa y es posible que la composición de los gránulos de estas células varíen durante el proceso de implantación.

Existen dos teorías para explicar la migración de eosinófilos inducida por estrógenos: una involucra receptores, en particular el sistema receptor-eosinófilo; otra indica que la migración es inducida por factores quimotácticos como el ECF-U (de este último ya se habló anteriormente). A continuación se analizará su posible intervención con el proceso de la implantación embrionaria en la rata.

Las respuestas uterinas se dividen en dos grupos dependiendo del tiempo que tarde este órgano en responder a la administración de estrógenos:

1.- Las respuestas tempranas o no genómicas, como son el aumento en oxidación de glucosa, síntesis de glucógeno, edematización y eosinofilia uterina (Palomar y col., 1992; Tchernitchin y col., 1976; Tchernitchin, 1979).

2.- Las respuestas tardías o genómicas como el aumento de síntesis de proteínas, de RNA y de la mitosis que requieren más tiempo (Tchernitchin y col., 1975, 1976, 1978 y 1979).

Existen diversos estudios donde se han demostrado relaciones entre las respuestas de tipo no genómico y el llamado receptor-eosinófilo (Tchernitchin, 1976, 1979), (figura 16).

Acerca de este tipo de sistema, Tchernitchin ha propuesto la presencia simultánea de receptores en la membrana citoplásmica de los eosinófilos y en la

pared de los capilares sanguíneos del útero (figura 16a). Primero los estrógenos se unen a la membrana citoplásmica de los eosinófilos (y/o a la pared capilar uterino) (fig.16b), con los receptores en ellos. Esto permitiría la unión de los eosinófilos a la pared capilar del útero (fig. 16c) y representaría el paso inicial para la penetración del eosinófilo al mismo (fig. 16d).

Esta teoría se ha propuesto también para explicar la especificidad orgánica de la migración de eosinófilos al útero inducida por estrógenos (Tchernitchin, 1976).

La importancia del sistema receptor-eosinófilo y la teoría del "birreceptor" de los trabajos de Tchernitchin en el proceso de la implantación es innegable pues podría intervenir como uno de los mecanismos que conducen al edema, cambios vasculares y la eosinofilia uterina se podría presentar en la preñez temprana.

#### B) Peroxidasa Extraíble.

La peroxidasa extraíble se relaciona con los microsomas del endometrio y no con los eosinófilos y es propiamente endógena, en nuestro trabajo, se comportó de manera diferente a la enzima soluble una vez iniciada la interacción del blastocisto con el útero, pues a diferencia de esta última, su actividad fue mayor en las I Z que las I Z y sólo cae en las Z I, respecto al día anterior, ya que forma parte de las células residentes del endometrio y no de células migratorias como los eosinófilos que podrían ser atraídas selectivamente a las Z I.

La peroxidasa se ha relacionado con el aumento de fluido sanguíneo en el útero (hiperemia) y con la iniciación de la vasodilatación de este órgano (Farley y col., 1992). También se ha propuesto su intervención en el catabolismo de sustancias vasoactivas (catecolaminas) como mediadoras de la vasodilatación (Ball y col., 1990).

La formación de los catecoestrógenos (CEs) se ha asociado a los microsomas por ello la peroxidasa extraíble proveniente de los microsomas sería



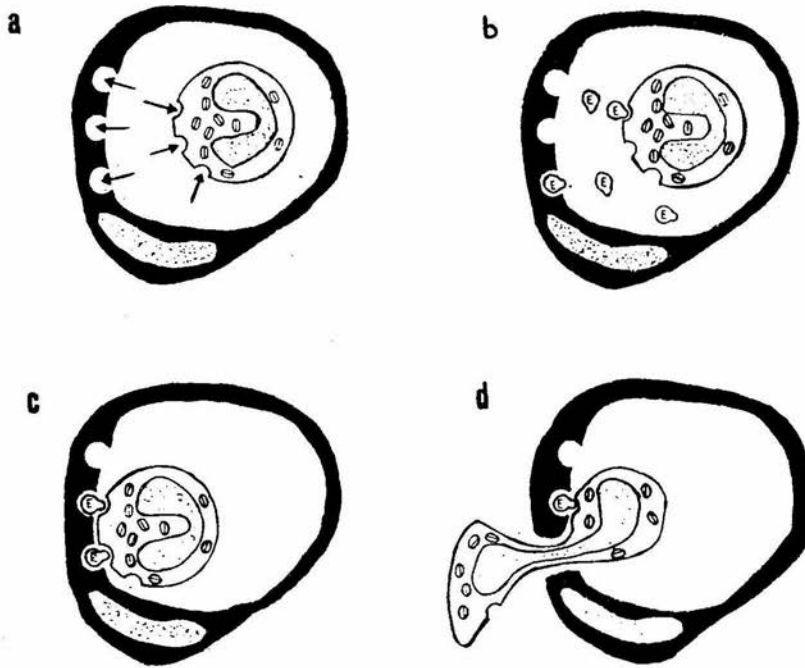


Figura 16. MODELO DE ANDRES TCHERNITCHIN ACERCA DE LA MIGRACION DE EOSINOFILOS AL ENDOMETRIO (Tomado de Tchernitchin y col., 1976).

A) Las flechas señalan la presencia simultánea de receptores estrogénicos en la membrana citoplásmica de los eosinófilos y en la pared de los pequeños vasos sanguíneos uterinos.

B) Unión de estrógenos a sus receptores en la membrana de los eosinófilos y en la pared de los pequeños vasos sanguíneos uterinos.

C) Adhesión de los eosinófilos a la pared de los vasos sanguíneos uterinos, debido a la afinidad simultánea de estrógenos a los receptores en la superficie de los eosinófilos y los vasos sanguíneos.

D) Penetración del eosinófilo dentro del útero.

importante para explicar los cambios en permeabilidad vascular durante el proceso de la implantación.

La peroxidasa puede intervenir en la conversión de estrógenos a catecolestrógenos (CEs), (Ball y Knuppen, 1990) y se ha propuesto que los CEs son mediadores de los efectos vasculares de los estrógenos, un mecanismo similar podría ocurrir en los cambios vasculares uterinos inducidos por el blastocisto, en particular en las Z I.

Existe la hipótesis de que la acción de los estrógenos en inducir la implantación es mediante la formación local de CEs (dada su vida media corta) (Paria y col., 1990).

La formación de CEs se puede originar mediante dos mecanismos y en ambos se ha sugerido la intervención de la peroxidasa:

1.- La acción de la peroxidasa puede producir fenoles y mediante la formación de radicales hidroxilo se iniciaría la oxidación de los fenoles a radicales fenoxi que constituirán eventualmente los dihidroxibencenos o catecoles particularmente en forma de quinonas (Ball y Knuppen, 1990).

2.- La formación de CEs en los microsomas puede ser catalizada por la enzima 2/4 hidroxilasa que depende del NADPH y de una enzima, la monooxigenasa que pertenece al sistema enzimático microsomal dependiente del citocromo P-450, el cual se ha asociado con la peroxidasa y mediante la unión de ambos, esta enzima podría participar en la formación de CEs (Paria y col., 1990).

Se ha encontrado un aumento de la 2/4 hidroxilasa en la tarde del día 4 de preñez en la ratona, este equivale al día 5 en la rata y a su periodo de sensibilidad y es seguido por una disminución al día siguiente (Paria y col., 1990).

Paria y col., (1990) han sugerido que la progesterona y los estrógenos modulan la actividad de la 2/4 hidroxilasa y que el comportamiento encontrado en su

modelo experimental con ratones se debe a la secreción de estrógeno ovárico en la preimplantación.

El comportamiento de la 2/4 hidroxilasa fue muy semejante al encontrado en la peroxidasa en este trabajo, además de que ambas enzimas podrían estar reguladas por la progesterona y los estrógenos necesarios en el proceso de la implantación, se puede sugerir que el útero de la fase receptiva tiene enzimas que le proporcionan un alto potencial para producir CE's, esto coincide con el periodo en que la respuesta de permeabilidad vascular comienza a establecerse (tarde del día 5 en la rata o tarde del día 4 en la ratona) y cuando esta respuesta ya se ha establecido (día 6 en la rata y 5 en la ratona), el potencial del útero para formar CE's (ya sea por medio de la 2/4 hidroxilasa y/o la peroxidasa) también cae.

## 2.- Parámetros Bioquímicos.

Cuando el útero se encuentra en la fase de la receptividad uterina, responde a los estímulos del blastocisto con la llamada reacción decidual que en la rata se inicia el día 5 de preñez. Este día el blastocisto manda señales químicas al endometrio lo que ocasiona que este último experimente diversos cambios como: aumento de permeabilidad vascular, apoptosis del epitelio luminal, las células estromales se convierten en células deciduales que son más activas tanto en síntesis de proteínas y ácidos nucleicos, como en el metabolismo energético, etc.

Se encontró que la concentración de DNA por miligramo de peso húmedo fue menor en las Z I, coincidiendo con lo informado por Hicks (1981). Esto quizá se explique por la hidratación del tejido, pues también se encontró un mayor porcentaje de humedad en las Z I en comparación con las I Z, lo cual también coincide por lo presentado por Hicks y col., (1981), (encontraron un aumento en el porcentaje de humedad del 12% en las Z I respecto a las I Z), debido a esto, cuando las proteínas y el DNA se refieren al peso seco, son prácticamente iguales en ambas muestras (Z I, I Z).

El mayor grado de hidratación de las Z I se ha relacionado con la concentración de nucleótidos cíclicos y con la posibilidad de que uno de los estímulos mandados por el blastocisto al útero sean los estrógenos, los cuales inducirían cambios vasculares.

En la rata el AMPc y el GMPc se acumulan en las Z I y se ha sugerido que esto ocurre debido a la inducción estrogénica, ya que en las Z I los receptores a  $E_2$  son más elevados que en las I Z (Martel y Psychoyos, 1982). La respuesta del endometrio a los estrógenos consiste en dos pasos: en el primero ocurre un aumento en la hidratación del tejido que se ha atribuido posiblemente al aumento de la concentración del GMPc, por ello, podría ocurrir la mayor hidratación en las Z I con respecto a las I Z tal y como se encontró en este trabajo, esto correlaciona con el aumento de nucleótidos comunicado por Hicks (1981) en las Z I. En el segundo paso de la respuesta estrogénica del endometrio se verían aumentadas las actividades enzimáticas y la síntesis de proteínas en las Z I, debido al aumento en AMPc (Hicks, 1981).

En el día 6 la relación proteínas/DNA acorde a lo propuesto en el ser humano fue mayor en las Z I en relación con las I Z y de acuerdo con lo señalado por Hicks en la rata (1981) y que confirma la elevada actividad metabólica presente en las Z I (Gil y col., 1978), ya que esta tasa (proteínas/DNA) se ha relacionado con una alta actividad metabólica y la diferenciación activa del endometrio durante la reacción decidual necesaria para que se lleve al cabo la implantación (Hernandez y col., 1981).

### **C. ACTIVIDAD DE PEROXIDASA DURANTE EL ESTRO EN LA RATA.**

Los eosinófilos pueden jugar un papel importante en la función reproductiva normal de la rata, el útero en la etapa de estro contiene cerca de 8 000 000 de eosinófilos y en el diestro cerca de 150 000 (Lee, 1989). King (1981) concluye que del 95% al 98% de la peroxidasa uterina es de tipo eosinofílico.

En este trabajo se encontró que durante el estro la actividad de peroxidasa uterina fue mayor en la fracción extraíble que en la soluble, en contraste a lo encontrado en la preñez esto podría deberse a los distintos regímenes hormonales que influyen en el útero, en el estro y la preñez.

En el estro, el útero esta bajo los efectos predominantes de los estrógenos, quienes tienen un pico durante el proestro, mientras que en la preñez interviene una combinación hormonal de progesterona y estrógenos, en este caso los estrógenos actúan sobre un útero expuesto previamente a altas concentraciones de progesterona, al menos por 48 h, estos regímenes hormonales afectan en forma diferente al útero de la rata (Tachi y col., 1974).

La acción de los estrógenos sólo sobre la peroxidasa y los eosinófilos uterinos ha sido muy estudiada, sin embargo, su acción en combinación con la progesterona no lo ha sido. Nuestros datos indican que en estas últimas condiciones los estrógenos también inducirían un aumento de la actividad de peroxidasa y de la población de eosinófilos uterinos, sin embargo, la proporción entre la enzima soluble y microsomal sería mayor que la inducida por los estrógenos sólo, lo que indicaría que los estrógenos en el útero pretratado con progesterona, podrían tener un efecto más marcado sobre la población de eosinófilos del útero. En nuestro laboratorio se seguirá investigando este aspecto.

#### **D. ANALISIS DE LAS HIPOTESIS PLANTEADAS EN EL PRESENTE TRABAJO.**

Se comprobó la hipótesis de que durante el día de sensibilidad uterina se presentó una marcada actividad de peroxidasa uterina, siendo la de carácter eosinofílico la más abundante, lo que sugiere que también en la diferenciación progestacional uterina, puede ocurrir por influencia estrogénica, la migración de eosinófilos hacia el útero tal y como se ha encontrado en ratas ovariectomizadas tratadas con estrógenos.

Nuestros datos apoyan la idea de que los estímulos del blastocisto podrían provocar la liberación de peroxidasa y esta última podría participar en los mecanismos que inducen los cambios vasculares uterinos característicos de la implantación embrionaria.

#### **E. POSIBLE PARTICIPACION DE LA PEROXIDASA EN LA IMPLANTACION DE LA RATA.**

En base a los resultados obtenidos, se propone que de los días 3 al 5 de preñez la actividad de peroxidasa aumenta paulatinamente alcanzando un máximo en el día 5 en el cual ocurre la sensibilidad uterina, lo que podría indicar que depende de la acción acumulativa de los estrógenos sobre un útero bajo la influencia de la progesterona.

La influencia estrogénica ocasionaría migración de eosinófilos hacia el útero con un consecuente aumento de actividad de peroxidasa asociada a estos últimos. Esta migración sería regulada tal vez por el factor quimotáctico ECF-U dependiente de estrógenos y en el proceso de migración de los eosinófilos podrían intervenir receptores a estrógenos en ellos y en el endotelio de los capilares, acorde a lo postulado en la hipótesis del "birreceptor" de Tchernitchin. Posteriormente por estímulos del blastocisto dentro de los que podrían encontrarse los estrógenos mismos, la actividad de peroxidasa y los eosinófilos disminuiría en el día 6 debido a una posible degranulación de estas células, lo que provocaría la liberación de peroxidasa y otros componentes de ellos. la formación de CEs con la participación de la peroxidasa podría inducir la edematización y el aumento en permeabilidad vascular propias de las Z I, por último ocurriría la inactivación o degranulación de la peroxidasa (figura 17).

Figura 17. POSIBLE PARTICIPACION DE LA PEROXIDASA EN LA IMPLANTACION DE LA RATA .- De los días 3 a 4 la actividad estrogénica sobre un útero bajo la acción de progesterona (P) induciría un aumento paulatino en la actividad de peroxidasa con un máximo al día 5. En el día 5, correspondiente a la fase de sensibilidad uterina, por influencia del blastocisto ocurriría una migración de eosinófilos hacia las Z I del útero con un consecuente aumento de peroxidasa. Esta migración podría ser regulada por el ECF-U y por el estímulo local del blastocisto, la actividad de peroxidasa y los eosinófilos disminuiría en el día 6 por la degranulación de los eosinófilos que provocarían la liberación de peroxidasa, misma que intervendría en la formación de CEs y estos inducirían la edematización y el aumento en permeabilidad vascular propias de la implantación.

DIAS DE PREÑEZ

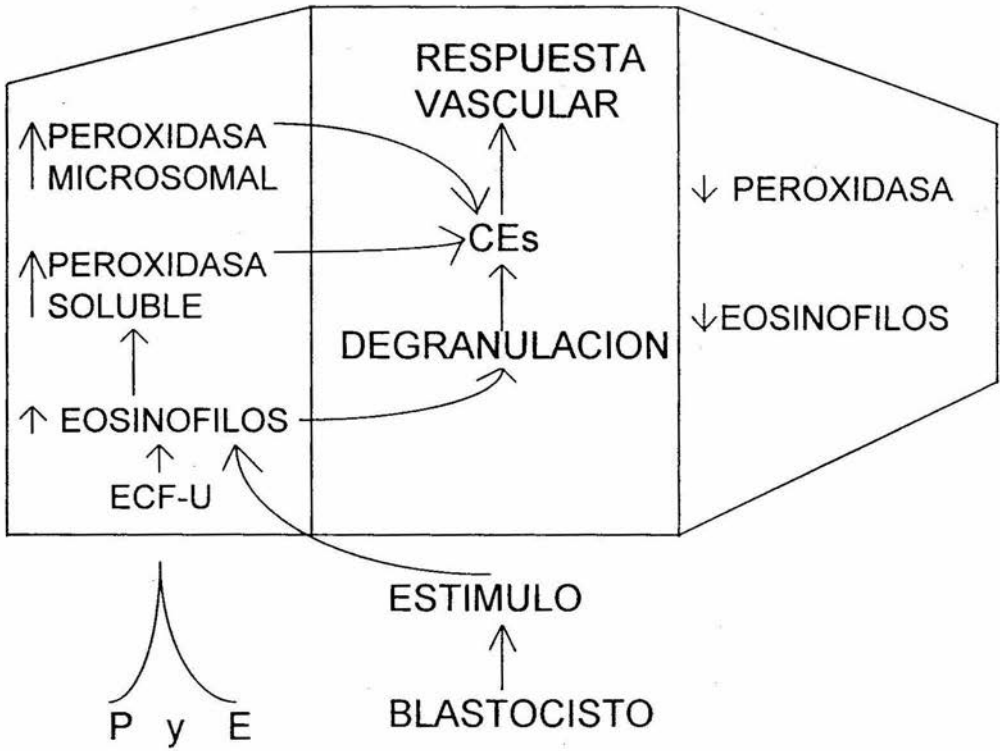
3

4

5

6

RECEPTIVIDAD





## F. PERSPECTIVAS DEL PRESENTE TRABAJO.

De acuerdo a los estudios obtenidos surgen para nosotros más incógnitas sobre los mecanismos involucrados en las respuestas uterinas ante la presencia del blastocisto y como este último ejerce su influencia local en el endometrio.

Para resolver lo anterior se pueden realizar varios experimentos por medio de salpingoclasia unilateral, realizada 15 días antes de aparear a las hembras se puede impedir la presencia de blastocistos en uno de los cuernos del útero de la rata para estudiar el efecto de los blastocistos sobre la actividad de peroxidasa.

Mediante la implantación retardada inducida por ovariectomía en los días 2 o 3 de preñez y mantenida sólo con progesterona, también se pueden observar los efectos de esta hormona sobre la actividad de la peroxidasa y la acción de los estrógenos sobre la enzima al romper el retardo en la implantación.

Por medio de métodos histoquímicos e inmunohistoquímicos se puede determinar en cortes histológicos de útero (esto ya se realiza actualmente en el laboratorio) la ubicación y presencia de esta enzima en los eosinófilos y los tejidos del endometrio, también por medio del empleo de anticuerpos se puede hacer la detección inmunohistoquímica de la peroxidasa.

En lo referente a los estudios de quimotaxis (ya que sólo se han realizado en ratas inmaduras) se puede establecer un modelo experimental para estudiar al factor quimotáctico ECF-U y sobre todo su efecto quimoattractante en los días 5 y las Z I e I Z del día 6 de la preñez.

Es importante también, estudiar las variaciones en la población de eosinófilos en el útero del día 3 al 6 de preñez y como esta y la actividad de peroxidasa son reguladas por estrógenos y progesterona.

## **VII. CONCLUSIONES.**

1.- De los días 3 al 5 la actividad de peroxidasa aumenta paulatinamente alcanzando un máximo durante el día de la fase de sensibilidad uterina. El comportamiento observado sugiere una acción constante y acumulativa de los estrógenos sobre la actividad de peroxidasa.

2.- El comportamiento de la actividad de peroxidasa extraíble y soluble expresada como actividad específica (U/mg de proteínas, U/mg de DNA y U/mg de peso seco) durante los días estudiados, fue semejante por lo que ambas podrían ser importantes en el proceso de la implantación.

3.- La actividad de peroxidasa soluble asociada a eosinófilos siempre fue mayor que la extraíble por lo que este tipo de leucocitos podrían tener una función clave en el proceso de la implantación.

4.- La influencia estrogénica que induce la fase de receptividad uterina podría haber ocasionado la migración de eosinófilos hacia el útero con el consecuente aumento de peroxidasa soluble.

5.- En la peroxidasa soluble ocurre una disminución de actividad en el útero en las Z I e I Z, respecto al día 5, en la extraíble cae sólo en las Z I debido a posibles efectos locales del blastocisto. La disminución durante el día 6 de actividad de la peroxidasa soluble en las Z I e I Z, podría ser causado por la influencia local del blastocisto que posiblemente consistiría en provocar la degranulación y en consecuencia una disminución de los eosinófilos.

6.- El útero en la fase de receptividad podría tener enzimas como la peroxidasa extraíble (asociada a microsomas) y soluble que le darían un alto potencial para producir CEs, lo que coincide con el periodo en que la permeabilidad vascular está por establecerse (tarde del día 5) y cuando ello ocurre (día 6) este potencial también cae. Los CEs podrían mediar los efectos vasculares inducidos por el blastocisto en las Z I.

## VIII. APENDICES

### A. DETERMINACIONES BIOQUIMICAS.

#### 1.-Determinación de Proteínas por el Método de Lowry (1951).

Este método se fundamenta en la adición de iones cúpricos al reactivo de Folín-Ciocalteau, el cual detecta los residuos de tirosina debido a su naturaleza fenólica. El complejo cobre-proteína formado (los iones cobre forman un complejo de coordinación con los cuatro grupos -NH nucleofílicos, que en la reacción con proteínas provienen de los enlaces peptídicos de los aminoácidos) una versión diluida del reactivo de Biuret produce una reducción de varios ácidos que constituyen al reactivo de Folín.

De la reducción producida el 75% se debe al complejo de cobre-proteína, mientras que los residuos de tirosina y triptofano son responsables del resto. El producto se puede leer entre 550 y 660 nm, algunas de sus ventajas son : 1) Es 100 veces más sensible que el método de Biuret y tiene un rango analítico entre 10 µg y 1 mg de proteína, 2) Es mucho más sensible que la reacción con ninhidrina y 3) Es de 10 a 20 veces más sensible y específico que las determinaciones por absorbencia de luz U. V. a 280 nm.

#### REACTIVOS

SOLUCION A : Carbonato de sodio (Merck) al 2%, tartrato de sodio y potasio (Merck) al 0.02% en hidróxido de sodio (Merck) 0.1 M.

SOLUCION B : Sulfato cúprico (Baker) al 0.5% en agua destilada.

SOLUCION C : 50 ml de solución A + 1 ml de solución B.

SOLUCION D : Reactivo de Folín-Ciocalteau (Sigma), diluido en una proporción de 1.1 ml de reactivo comercial en 1.4 ml de agua destilada.

SOLUCION ESTANDAR : Albúmina sérica (Sigma) a una concentración final de 0.3 mg/ml en agua destilada (0.3%)

## METODO

Se tomaron alícuotas de 100  $\mu$ l y 200  $\mu$ l del homogeneizado total y se llevaron a un volumen final de 500  $\mu$ l con agua destilada, adicionando 2 ml del reactivo C, se dejó reposar durante 10 minutos, luego se agregó 0.2 ml de solución D, mezclando y dejando reposar 20 minutos (tabla 7). La concentración de proteína de cada muestra se obtuvo por interpolación de la absorción a 550 nm en la gráfica de la curva estándar de albúmina sérica de bovino y siendo esta lineal. Para medir la absorbencia se usó un espectrofotómetro DU-64 (Beckman). La realización de la curva estándar se detalla en la tabla 7.

TUBO	SOL. EST.		H <sub>2</sub> O (ml)	SOL. C (ml)	SOL. D (ml)	HOMOGENEIZADO
	ALBUMINA (ml)	(mg)				
0	0.0	0.00	0.5	2	0.2	
1	0.1	0.03	0.4	2	0.2	
2	0.2	0.06	0.3	2	0.2	
3	0.3	0.09	0.2	2	0.2	
4	0.4	0.12	0.1	2	0.2	
5	0.5	0.15	0.0	2	0.2	
PROBLEMA			0.5	2	0.2	100 $\mu$ l
PROBLEMA			0.5	2	0.2	200 $\mu$ l

Tabla 7. DETERMINACION DE PROTEINAS.- Se realizó con una solución estándar de albúmina sérica de bovino (0.3 mg/ml). 50 ml de la solución A (carbonato de sodio al 2%, tartrato de sodio y potasio al 0.020% e hidróxido de sodio 0.1 M), más 1 ml de solución B (sulfato cúprico 0.5%) constituyeron la solución C, se incubó 10 minutos antes de agregar la solución D, hecha con el reactivo de Folín-Ciocalteu. Se dejó reposar por 20 minutos antes de leer a 550 nm. Posteriormente mediante la interpolación de los datos, se calculó la concentración de proteínas contenidas en las muestras o tubos problema.

## 2.- Determinación de DNA por el Método de Giles y Myres (1965).

Este método se basa en la reacción de la difenilamina con la desoxirribosa (reacción de Dische), utilizando ácido perclórico, acetaldehído y difenilamina al 4% para lograr una mayor sensibilidad que el método original de Dische. El color aparece después de una incubación de 17 h a 30 °C (Giles y Myres, 1965).

### REACTIVOS

SOLUCION A : Acido perclórico (Baker) 2 M.

SOLUCION B : Acetaldehído (Merck) se preparó una solución madre de 16 mg/ml, la cual se congeló y al momento de usarse se diluyó 1:10 con agua destilada.

SOLUCION C : Difenilamina solución al 4% en ácido acético glacial.

SOLUCION ESTANDAR : DNA de timo de ternera a una concentración de 100 µg/ml.

### METODO

Se tomaron alícuotas de 100 µl, 200 µl y 300 µl, se llevaron a un volumen final de 500 µl con la solución A adicionando después 2 ml de la solución B y finalmente 500 µl de la solución de difenilamina, los tubos se taparon y mezclaron dejándolos incubar a 30 °C durante 18 h, leyendo posteriormente la absorción a 595 y 700 nm esta última se realizó con el fin de corregir la turbidez debida a impurezas, las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro Beckman DU-64 (tabla 8). Para conocer el contenido de DNA de las muestras se interpolaron los datos en una curva realizada con una solución de DNA de timo de ternera (1 mg/ml) acorde a la tabla 8 y se graficó la absorbencia vs. concentración.

## 3.- Determinación de Peso Seco por el Método de Bernal (1981).

El método consiste en hacer reaccionar muestras biológicas con una solución ácida de dicromato de potasio durante 20 min, a 92 °C y en seguida determinar la

densidad óptica del producto formado a 660 nm. Esta técnica se basa en que el ácido sulfúrico y el dicromato de potasio constituyen una mezcla capaz de oxidar a la materia orgánica, reduciéndose al mismo tiempo el cromo, de cromo (+6) a cromo (+3) lo que produce un cambio en la coloración de la solución de naranja a café oscuro. Si se tiene una solución de esta mezcla oxidante y se pone en contacto con la materia orgánica, el cambio de color producido será proporcional a la concentración de materia orgánica presente. Las ventajas de este procedimiento sobre el método estándar de pesada son : 1) Requiere un mínimo de tiempo para la determinación, 2) Su mayor sensibilidad, exactitud y precisión usando equipo estándar de laboratorio, 3) El método es insensible a compuestos inorgánicos y por tanto, puede ser aplicado a homogeneizados de tejidos preparados en soluciones inorgánicas.

## REACTIVOS

SOLUCION A : Solución de dicromato de potasio (Merck) al 20% en ácido sulfúrico concentrado.

SOLUCION ESTANDAR : Manosa (Merck) 0.2 mg/ml en agua destilada.

## METODO

Se utilizaron alícuotas de 25  $\mu$ l y 50  $\mu$ l, el homogeneizado total se llevó a un volumen de 1 ml con agua destilada. Los tubos se colocaron en hielo y se les agregó 2 ml de solución A, dejando resbalar el líquido por las paredes, en seguida se mezclaron, manteniéndolos dentro del hielo para evitar el sobrecalentamiento y se colocaron en un baño de agua hirviendo durante 20 minutos. Se dejaron enfriar y se leyó a 660 nm en un espectrofotómetro Beckman DU-64 (tabla 9). También se realizó una curva patrón de manosa acorde a la tabla 9, para conocer el peso seco de las muestras por medio de la interpolación de los datos

TUBO	SOL. EST.		SOL. A	SOL. C	SOL. D	HOMOGENEIZADO
	DNA (ml)	(mg)				
0	0.0	0.00	0.5	0.05	0.5	
1	0.1	0.01	0.4	0.05	0.5	
2	0.2	0.02	0.3	0.05	0.5	
3	0.3	0.03	0.2	0.05	0.5	
4	0.4	0.04	0.1	0.05	0.5	
5	0.5	0.05	0.0	0.05	0.5	
PROBLEMA			0.4	0.05	0.5	100 $\mu$ l
PROBLEMA			0.3	0.05	0.5	200 $\mu$ l
PROBLEMA			0.2	0.05	0.5	300 $\mu$ l

TABLA 8. DETERMINACION DE DNA.- Se realizó con una solución estándar de DNA de timo de ternera (100  $\mu$ l/ml). Se agregaron, la solución A, formada con ácido perclórico 2 M, la solución B hecha con acetaldehído (1.6 mg/ml) y la solución C o difenilamina al 4%. para corregir la turbidez de las muestras se hicieron dos diferentes lecturas y su sustracción representó la absorbencia de las muestras debida al DNA (575-700 nm).

TUBO	SOL. EST.		H <sub>2</sub> O (ml)	SOL. A (ml)	HOMOGENEIZADO
	MANOSA (ml)	(mg)			
0	0.0	0.0	1.0	2	
1	0.2	0.4	0.8	2	
2	0.4	0.8	0.6	2	
3	0.6	1.2	0.4	2	
4	0.8	1.6	0.8	2	
5	1.0	2.0	0.0	2	
PROBLEMA			0.975	2	25 $\mu$ l
PROBLEMA			0.975	2	50 $\mu$ l

TABLA 9. DETERMINACION DE PESO SECO.- Se hizo con una solución estándar de manosa (0.2 mg/ml). La solución A o mezcla crómica constituida por dicromato de potasio al 20% en ácido sulfúrico concentrado se agregó con cuidado y los tubos se calentaron bajo ebullición durante 20 min. Se dejó enfriar, se mezclaron y se leyó la absorbencia a 660 nm.

## **I X. BIBLIOGRAFIA**

- Agrawal, P. y Laloraya, M. M. (1978) : Histochemical Studies on the Peroxidase Localization in the Rata Ovary and Uterus During Various Reproductive Stages. *Acta Anat.* 102: 94-101.
- Anderson, A. W. y DeSombre, E. R. (1975) : Endogenous Peroxidase Specific Marker Enzyme for Tissues. Displaying Growth Dependency on Estrogen. *J. Cell. Biol.* 64: 668-681
- Baird, D. T. (1972) : Reproductive Hormones. En: *Reproduction in Mammals*. Austin, C. R (Edit), Vol 3. Cambridge University Press. Inglaterra. 1-28.
- Loza, M. C. y Hicks, J. J. (1990) : Influencia del Medio Tubario y Uterino en el Desarrollo Embrionario. *Ginec. Obstet. Méx.* 58 : 245-250.
- Baiza, L. A. (1980) : Concentración de Grupos SH en Utero de Rata Durante el Ciclo Estral. Tesis Profesional ENEP-Iztacala, UNAM. México.
- Ball, P. y Knuppen, R. (1990) : Formation, Metabolism and Physiologic Importance of Catecholestrogens. *J. Am. Obstet. Gynecol.* 163, (6) : 2163-2170.
- Barrington, F. J. (1977) : *Introducción a la Endocrinología General y Comparada*. Ed. Blume. España. 122-146.
- Bates, C. A y Matthies, D. L. (1976) : Observations on Vascular Morphology in the Region of Implantation in the Rat Uterus. *Anat. Rec.* 184: 354.
- Baumann, P., Tchernitchin, G, Grunert, G y Ball, P. (1986) : Effect of Various Doses of Catecholestrogens on Uterine Eosinophilia in the Inmature Rat. *Experientia.* 42: 165-167.
- Bernal, A; Méndez, J. D. y Rosado, A. (1981) : Determinación Rápida del Peso Seco por Colorimetría. *Arch. Invest. Med.* 12: 83-88.
- Boving, B. G y Larson, J. F. (1973) : Implantation. En: *Human Reproduction Conception and Contraception*. Hafez, E y Evans, A. (Edits). Harper y Raw Publishers., Inc. Londres. 133-156.
- Brökelmann, J. (1969) : Peroxidase-Associated Binding of Estradiol on the Rat Uterus. *J. Histochem. Citochem.* 17 (3) : 394-407.



- Brökemann, J. y Fawcett, D. W. (1969) : The Endogenous Peroxidase in the Rat Uterus and its Induction by Estradiol. *J. Biol. Reprod.* 1 : 59-71.
- Castro, M. G. (1981) : Efecto del Cigoto Sobre la Incorporación de Precursores Radiactivos a Macromoléculas Endometriales. Tesis Profesional. I. P. N. México.
- Castro, M. G. y Hicks, J. J. (1983): Participación Endócrina del Blastocisto Durante La Implantación. *Ginec. Obstet. Méx.* 15:1.
- Cerecedo, L. R., Bresnick, E. y Schubert, E. T. (1959) : Tumor - Host Relations During Development and After Regression of the Tumor. *Arch. Biochem. Biophys.* 83: 43-53.
- Collado, M. L., Gil Recasens, M. E., Castro M. G. y Hicks, J. J. (1978) : Nuevos Conceptos Relacionados con la Implantación I. Periodo de Preimplantación. *Ginec. Obstet. Méx.* 43:63.
- Dickman, Z., Dey, S. K. y Sengupta, J. (1976) : A New Concept Control of Early Pregnancy by Steroid Hormones Originating in the Preimplantation Embryo. *Vit. Horm.* 34 : 215-241.
- Enders, A. C. (1975) : Anatomical Aspects of Implantation. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 25: 1.
- Enders, A. C. (1970) : Fertilization Cleavage and Implantation. En : *Reproduction and Breeding Techniques for Laboratory Animals*. Hafez, E. (Edit). Lea & Febiger, Filadelfia. E. U. A. 137-156.
- Enders, A. C. y Schlafke, S. (1969) : Cytological Aspects of Trophoblast Uterine Interaction in Early Implantation. *J. Amer. Anat.* 125.
- Farley, D. B., Ford, S. P. y Rosazza, J. P. (1992) : Increase in the Peroxidase Activity in the Rat Uterus During Oestrogen Hyperaemia. *J. Reprod. Fertil.* 95 : 551-558.
- Finn, A. C. y Porter, D. G. (1975) : The Control of the Implantation and Decidual Cell Reaction. En : *The Uterus*. Finn, A. C. y Porter, D. G. (Edits) Elek Paul (Scientific Books) LTD Londres. 82-97.
- Fox, R. J. y Lair, C. (1988) : Sexual Cycles. En : *Reproduction and Breeding Techniques for Laboratory Animals*. Hafez, E. (Edit), Lea & Febiger, Filadelfia E. U. A. 107-122.

- Freeman, M. E. (1988) : The Ovarian Cycle of the Rat. En : *Physiology of Reproduction*. Knobil E. y Neill, J. (Edits). Raven Press LTD., N. Y. 1893-1911.
- Gil-Recasens, M. E., Collado, M. L. y Hicks, J. J. (1978) : Nuevos Conceptos Relacionados con la Implantación. II. Reacción Decidual. *Ginec. Obstet. Méx.* 44 (263) : 211-213.
- Gil-Recasens, M. E. y Hicks, J. J. (1978) : Nuevos Conceptos Relacionados la Implantación. III. Características Bioquímicas. *Ginec. Obstet. Méx.* 44 (266) : 291-508.
- Giles, K. W. y Myres, A. (1965) : An Improved Diphenylamine Method for the Estimation of Deoxyribonucleic Acid. *Nature*. 206:93.
- Hernandez, O., Ballesteros, L. M., Aznar, R y Rosado, A. (1981) : Intrauterine Release of Progesterone II. Modification of Macromolecular Synthesis of Endometrium. *Contracept. Deliv. Syst.* 2. 319-325.
- Heald, P. (1976) : Biochemical Aspects of Implantation. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 2. 24-54.
- Hicks, J. J. (1981) : Endocrinología de la Implantación del Cigoto. *Gac. Méd. Méx.* 117 (12) : 510-520.
- Hicks, J. J. (1990) : A propósito de la Implantación del Cigoto. *Ginec. Obstet. Méx.* 58. Suppl 1:47-52.
- Hicks, J. J. y Gil-Recasens, M. E. (1980) : Características Morfológicas y Funcionales del Cigoto de Mamífero Durante la Preimplantación. *Ginec. Obstet. Méx.* 47 (282) : 275-291.
- Hilf, R., Johnson, M. M., Breuer, C y Borman, A. (1963): Comparative Biochemistry of Three Transplantable Mammary Tumors as Influenced by Steroid Therapy. *Biochem. Transplant. Mamm. Tumors*. 31 (3) : 541-555.
- Howe, R. S., Lee, Y. H., Fischkoff, S. A., y Lyttle, R. C. (1990) : Glucocorticoid and Progesterin Regulation of Eosinophil Chemotactic factor and Complement C3 in the Estrogen-Treated Rata uterus. *Endocrinology*. 126 (6) : 3193-3199.
- Ibañez, M. A. (1981) : Composición Lipídica del Endometrio de Rata en el 5º Día de Preñez. Tesis Profesional. ENEP-Iztacala. UNAM. México. 2-6.
- Jellinck, P. H., McNabb, T., Cleveland, S y Lyttle, C. R. (1976) : Peroxidase in Estrogen-Sensitive Tissues. *Adv. Enz. Reg.* 14. 447-465.

- Jellinck, P. H. y Newcombe, A. M. (1977) : Induction of Uterine Peroxidase: Correlation with Estrogenic Activity. *J. Steroid. Biochem.* 9 : 1193-1195.
- Jellinck, P. H. y Newcombe, A. M. (1980) : Effect of Catechoestrogens and Estrinol on the Induction of Uterine Peroxidase. *J. Steroid. Biochem.* 8 : 681-683.
- Karla, P. S y Karla, S. P. (1977) : Temporal Changes in the Hypothalamic and Serum Luteinizing Hormone Releasing (LH-RH) Levels and the Circulating Ovarian Steroids During the Rat Estrous Cycle. *Act. Endocrin.* 85 : 449-455.
- Kepping, H. S. y Jellinck, P. H. (1978) : Role of Estrogen - Induced Uterine Peroxidase in the Metabolism of Estradiol in vivo. *J. Steroid Biochem.* 9 : 1049-1054.
- King, W. J., Allen, T. C y DeSombre, E. R. (1981) : Localization of Uterine Peroxidase Activity in Estrogen-Treated Rats. *Biol. Reprod.* 25: 859-870.
- Klebanoff, S. J., Jong, G. C y Henderson, W. R. (1980) : The Eosinophil Peroxidase. Purification and Biological Properties. En : *The Eosinophil in Health and Disease*. Adel, A. F y Mahmoud, K (Edits). Grune & Stratton. Londres. 99-114.
- Lee, Y. H., Howe, R. S., Sha, S., Teuscher, C., Sheenan, D. M. y Lyttle, C. R. (1989) : Estrogen Regulation of an Eosinophil Chemostatic Factor in the Inmature Rat Uterus. *Biol. Reprod.* 45 : 818-823.
- Leiva, M. C., Galman, M. y Lyttle, C. R. (1991) : Ontogeny of the Production of an Estrogen Regulated Eosinophil Chemotatic Factor in the Rat Uterus. *Biol. Reprod.* 45 : 818-823.
- Ljungkvist, S. y Nilsson, O. (1974) : Blastocyst Endometrial Contact and Pontamine Blue Reaction During Normal Implantation in the Rat. *Endocrinology.* 60 : 142-154.
- Lowry, O. H., Rosenbroug, N. J., Farr, L. A. y Randall, R. J. (1951) : Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 193. 265-275.
- Lucas, F. V., Neufeld, H. A., Utterback, J. G., Matin, A. P. y Stotz, E. (1955) : The Effect of Estrogen on the Production of a Peroxidase in the Rat Uterus. *J. Biol. Chem.* 214.775-780.
- Lyttle, R. C., Medlock, K. L. y Shehan, D. M. (1984) : Eosinophils as the Source of Uterine Nuclear Type II. Estrogen Binding Sites. *J. Biol. Chem.* 259 (5) : 2667-2700.

- Marcus, G. J. (1974) : Mitosis in the Rat Uterus During the Estrous Cycle, Early Pregnancy and Early Pseudopregnancy. *Biol. Reprod.* 10 : 447-452.
- Markaverick, B. M., Roberts, R. R y Clarck, J. H. (1986) : Uterine Type II. Estrogen-Binding Sites are not of Eosinophil Origin. *J. Biol. Chem.* 261 (1) : 142-146.
- Marquez De Cantú, M. (1988) : Probabilidad y Estadística para Ciencias Químico Biológicas. 1a. Ed. UNAM. México. 361-412.
- Martel, D. y Psychoyos, A. (1982) : Different Responses of Rat Endometrial Epithelium and Estroma to Induction of Oestradiol Binding Sites by Progesterone. *J. Reprod. Fertil.* 64: 387-389.
- Martínez, M. (1985) : Número y Distribución de Eosinófilos en la Implantación de la Rata. Tesis Profesional. ENEP-Iztacala. UNAM. México.
- Moulton, B. C. y Koenig. B. B. (1986) : Biochemical Responses of the Luminal Epithelium and Uterine Sensibilization. *Ann N. Y. Acad. Sci.* 476. 95-105.
- Nilsson, B. O., Bergstrom, S., Ljungkvist, Y. (1978) : Ultrastructure of Implantation. Upsala. *J. Méd. Sci. Suppl.* 22. 27-37.
- Olsen, R. L. y Lyttle, C. R. (1982) : Comparative Studies on Oestrogen-Induced rat Uterus Peroxidase and Rat Eosinophil Peroxidase. *J. Biochem.* 207 : 613-616.
- Palomar, M. M., Baiza, L. A., Guzmán, A. M y Hicks, J. J. (1992) : Mecanismos de Acción de Hormonas Esteroides I. Estrógenos. *Ginec. Obstet. Méx.* 60. 234-239.
- Paria, B. C., Chandan, O y Dey, S. K. (1990) : Catecholestrogen Formation in the Mouse Uterus and its Role in Implantation. *Mol. Cell. Endocrin.* 69. 25-32.
- Parr, M. B. y Parr, E. L. (1989) : The Implantation Reaction. En : *Biology of the Uterus*. Wynn, R. M. y Jollie, W. P. (Edits). Plenum Press, N. Y. 233-267.
- Psychoyos, A. (1973) : Hormonal Control of Ovoimplantation. *Vit. Horm.* 31: 201-256.
- Psychoyos, A. (1967) : The Hormonal Interplay Controlling Egg Implantation in the Rat. *Adv. Reprod. Physiol.* 2 : 257-277.

- Psychoyos, A. (1976) : Hormonal Control of Uterine Receptivity for Nidation. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 25.17-28.
- Psychoyos, A. (1986) : Uterine Receptivity for Nidation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 476. 36-42.
- Ross, R. y Klebanoff, S. J. (1966) : The Eosinophile Leukocytes. Fine Structure Studies of Changes in the Uterus During the Estrus Cycle. *J. Exp. Med.* 124. 653-660.
- Ruiz, G. T. (1983) : Posible Participación de los Estrógenos del Blastocisto en el Proceso de Implantación Normal y Retardada de la Rata. Tesis Profesional. UNAM.
- Saldleir, R. (1982) : Ciclos y Temporadas. En : Células Germinales y Fertilización. Austin, C. R y Short, A. (Edits). *Prensa Médica Mexicana.* 89.
- Schlafke, S y Enders, A. C. (1975) : Cellular Basis of Interaction Between Trophoblast and Uterus an Implantation. *Biol. Reprod.* 12 : 41-65.
- Shelesnyak, M. C. (1959) : A History of Research on Nidation. *Ann N. Y. Acad. Sci.* 5-25.
- Shelesnyak, M. C. (1960) : La Implantación del Huevo Fecundado. *Endeavour.* 19 : 81-86.
- Surani, M. A. (1976) : Uterine Luminal Proteins at the Time of Implantation in Rats. *J. Reprod. Fertil.* 48 : 141-145.
- Tachi, S., Tachi, C. y Linder, H. R. (1972) : Modification by Progesterone of Oestradiol- Induced Cell Proliferation, RNA Synthesis and Oestradiol Distribution in the Rat Uterus. *J. Reprod. Fertil.* 31 : 59-76.
- Tchernitchin, A. (1970) : Radioautografic Analisis of 6, 7 - <sup>3</sup>H-Oestradiol 17-  $\beta$ - Uptake in Rat Uterus Following Extration of Endogeneous Estrogens. *Steroids.* 15 : 799-808.
- Tchernitchin, A. (1973) : Fine Estructure of Rat Uterine Eosinophils and the Possible Role of Eosinophils in the Mecanism of Estrogen Action. *J. Steroids. Biochem.* 4 : 277-285.

- Tchernitchin, A., Tchernitchin, X., Vandenhende, J., Rubrick, J y Galand, P. (1974) : Dramatic Early Increase in Uterine Eosinophils After oestrogen Administration. *Nature*. 248 : 142-143.
- Tchernitchin, A., Tchernitchin, X. y Galand, P. (1975) : Correlation of Estrogen-Induced Uterine Eosinophilia with other Parameters of Estrogen Stimulation with Estradiol-17  $\beta$  and Estriol. *Experientia*. 31. 993-996.
- Tchernitchin, A., Tchernitchin, X. (1976) : Characterization of the Estrogen Receptors in the Uterine and Blood Eosinophil Leukocytes. *Experientia*. 32 (10) : 1240-1242.
- Tchernitchin, A., Tchernitchin, X. y Galand, P. (1976) : New Concepts on the Action of Estrogens in the Uterus and the Role of the Eosinophils Receptor System. *Differentiation*. 5: 145-150.
- Tchernitchin, A., Tchernitchin, X. y Galand, P. (1976) : Dynamics of Eosinophils in the Uterus After Oestrogen Administration. *Differentiation*. 5 : 151-154.
- Tchernitchin, A., Tchernitchin, X., Collao, C y Rodriguez, A. (1978) : Dynamics of Estrogen Binding by Uterine Cells *in vivo*. *Experientia*. 34: 134-136.
- Tchernitchin, A. (1979) : The Role of Eosinophil Receptors in the Non-genomic Response to Oestrogens in the Uterus. *J. Steroid. Biochem*. 11: 417-424.
- Tchernitchin, A., Barrera, J., Arroyo, P., Mena, M. A., Vilches, K. y Grunert, G. (1985) : Degranulation Action of Estradiol on Blood Eosinophil Leukocytes *in vivo* and *in vitro*. *Agents Actions*. 17 (69) : 60-69.
- Weitlauf, H. M. (1988) : Biology of Implantation. En: *The Physiology of Reproduction*. Knobil, E y Neill, J. (Edits). LTD., N. Y. 231-253.
- Wimsatt, W. A. (1975) : Some Comparative Aspects of Implantation. *Biol. Reprod.* 12 :1
- 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.
- Zucker-Franklin, D. (1980) : Eosinophil Structure and Maturation. En : *The Eosinophil in Health and Disease*. Adel, A. F y Mahmoud, K. (Edits). Grune & Straton, Londres. 99-114.