



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Escuela Nacional de Estudios Profesionales
" IZTACALA "



"Número y Distribución de Eosinófilos en la
Implantación de la Rata"

T E S I S

Que para obtener el título de:

B I O L O G O

P r e s e n t a :

Martín Martínez Torres



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

No importan las equivocaciones ni las exageraciones. Lo que vale es el valor de pensar en voz alta, decir las cosas tal como se sienten en el momento que se dicen. Ser lo suficientemente temerario para proclamar lo que uno cree que es la verdad sin importar las consecuencias y caiga quien cayere. Si fuera uno a esperar a tener la verdad absoluta en la mano, ó sería un necio ó se volvería uno mudo para siempre. El mundo se detendría en su marcha.

José Clemente Orozco.

cambrón a. comunicación personal.

con respeto A MIS ANTEPASADOS

A LA MUJER QUE COOPERA
CONMIGO DIA A DIA PARA
QUE FORMEMOS NUESTRO
Cuāhtinchan



con cariño A MIS SUCEORES
(por lo pronto Boris y Corina)

A MIS AMIGOS

AGRADECIMIENTOS

Al Doctor Luis H. Pérez Astudillo
Por apoyar y estimular mi interés por el
quehacer científico.

A la Doctora Elsa Calleja Quevedo
Por las facilidades y el apoyo brindado

ESTE TRABAJO SE DESARROLLO EN EL LABORATORIO DE
BIOLOGIA DEL DESARROLLO PERTENECIENTE A LA UNI-
DAD DE MORFOLOGIA Y FUNCION DE LA ESCUELA NACIO
NAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES IZTACALA, BAJO LA
DIRECCION DEL DOCTOR LUIS H. PEREZ ASTUDILLO.

I N D I C E

	pag.
INTRODUCCION	1
Período de Preimplantación	1
Implantación	2
Respuesta Uterina	2
Receptores Estrogénicos	6
Leucocitos Eosinófilos	6
Características de los Eosinófilos	7
OBJETIVO	9
MATERIAL Y METODOS	10
RESULTADOS	17
Observaciones de Microscopía de Luz	17
Observaciones de Microscopía Electrónica	22
Análisis Estadístico	25
DISCUSION	32
CONCLUSION	36
BIBLIOGRAFIA	37

INTRODUCCION

El establecimiento de las relaciones materno-fetales implica la sincronía de una serie de eventos (fisiológicos, bioquímicos, morfológicos, hormonales etc.) por parte del embrión y la madre. El estudio de éstos eventos en los mamíferos plantea la investigación de muy diversos fenómenos particulares en cada especie, involucrados en la Ovo-implantación (1,2,3). Previamente a este proceso, en el útero gestante ocurren una serie de cambios (Periodo de Preimplantación) que conducen al establecimiento de un periodo corto de receptividad endometrial al blastocisto (4).

- Periodo de Preimplantación -

Este periodo comprende toda la serie de cambios que se presentan en el tracto genital femenino desde la ovulación y liberación del ovocito en el oviducto hasta el momento anterior a la implantación (3,4).

Se sabe que tanto la maduración del folículo ovárico como su ruptura durante la ovulación dependen básicamente de la secreción de Gonadotropinas Hipofisarias (5). Los ovocitos liberados son transportados a través del oviducto y si ocurre la fertilización ésta se lleva a cabo en el ámpula oviductal (2). El tiempo que dura el transporte del cigoto en el oviducto es muy variable, dependiendo de la especie (3), en la rata dura alrededor de 90 horas (4). El intervalo de tiempo entre el arribo al útero y el momento de la implantación también es bastante variable, y no sólo depende de la especie sino además del estado fisiológico de la hembra (3,4).

Entre los hechos que suceden durante la preimplantación hay una serie de cambios morfofuncionales del endometrio que lo preparan para la ovo-implantación (4). Esta serie de cambios ha sido estudiada por diversos autores, y se sabe que son gobernados por la acción de hormonas esteroideas ováricas (4,6,7,8,9,10,11,12), entre dichos cambios destacan:

- a) Aumento en la síntesis de proteínas (8,10)
- b) Síntesis de DNA y RNA del endometrio (10,12)
- c) Mitosis de las células estromales (10,11)
- d) Síntesis de enzimas (10)
- e) Aumento en la síntesis de AMP_o y glucógeno (13,14)

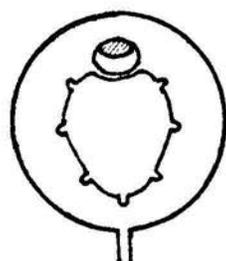
- Implantación -

En la rata, además de la progesterona, la acción de los estrógenos es indispensable para propiciar las condiciones uterinas necesarias para que se lleve a cabo la implantación (7). Aunque existe cierta discrepancia (10,15), se acepta que la secreción primaria de progesterona y posteriormente la "oleada estrogénica" del 4º día de preñez (16,17,18,19) son responsables que el endometrio se presente receptivo al estímulo de oidnogénico dado por el blastocisto en implantación (4). Hasta el momento se desconoce la naturaleza del estímulo embrionario, pero en la rata se tienen evidencias indirectas de que pueden ser estrógenos (20,21,22, 23).

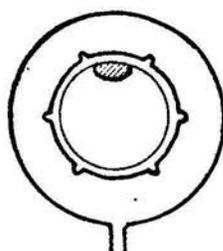
Al proceso de implantación se le ha definido como: "la adopción de una posición fija del blastocisto en el endometrio materno" (1); en la rata se efectúa en el 6º día post coito (3,4). En los mamíferos eutericos se presentan tres patrones principales de implantación. Estos son designados como: Intersticial, Central y Excéntrica (ver figura 1). En roedores como la rata, ratón y hamster, entre otros, es excéntrica (3)(figura 1-c). Este tipo de implantación se caracteriza porque el embrión permanece pequeño y está contenido en una cámara formada a un lado de la luz del útero (figura 1-c). Durante éste proceso se distinguen varias etapas que son: Orientación, Contacto, Adhesión y Penetración (24)(figura 2).

- Respuesta Uterina -

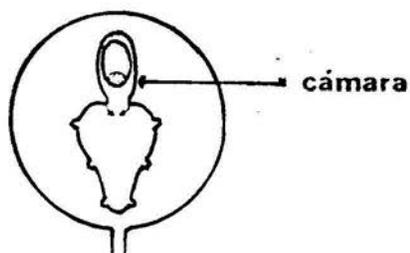
El cambio más precoz y fácilmente observable en los sitios de implantación del útero de rata es el incremento en la permeabilidad de los vasos capilares sanguíneos, esto puede ser demostrado inyectando por vía



a) INTERSTICIAL



b) CENTRAL



c) EXCENTRICA

Figura 1) Patrones de implantación más comunes observados en los mamíferos a) Intersticial (ejemplo: Hominidos), b) Central (ejemplo: Quirópteros) y c) Excéntrica (ejemplo: Roedores)

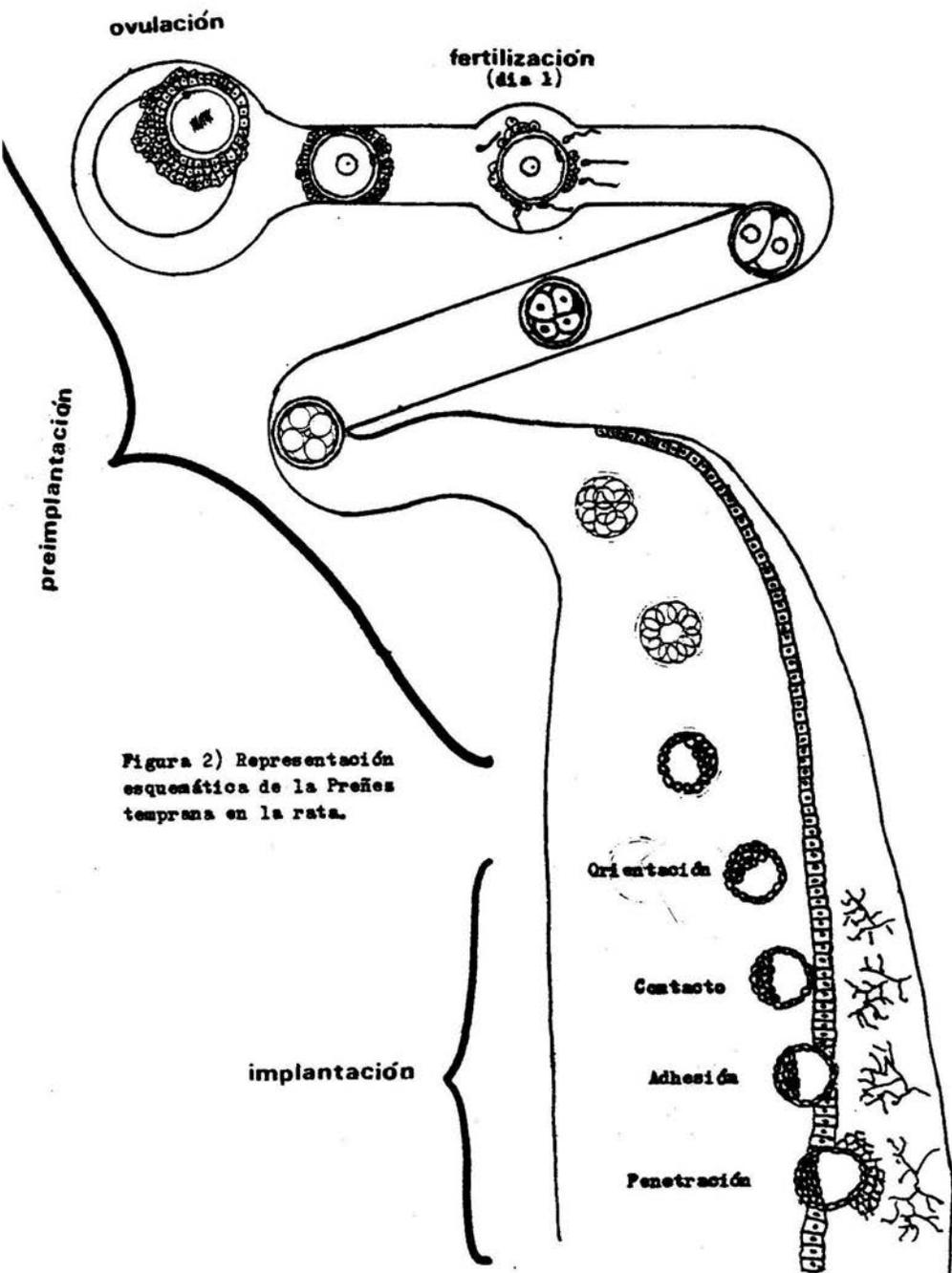


Figura 2) Representación esquemática de la Preñez temprana en la rata.

endovenosa colorantes de alto peso molecular (por ejemplo Azul de Evans) (25); Estableciéndose como una condición indispensable para que se realice la ovo-implantación (4,7), anadido a esto se desencadenan otros cambios locales como:

- a) Edema en el área del estroma que rodea al blastocisto (16)
- b) Degradación y cambios en la estructura de la colágena (8)
- c) Mitosis de las células estromales (10,17)
- d) Inicio de la diferenciación de las células deciduales en la región antimesometrial que rodea al blastocisto (26,27).
- e) Desaparición de los sitios aniónicos del epitelio endometrial (28)
- f) Síntesis de RNA en las células estromales (10)
- g) Síntesis de DNA en las células estromales (8,10,12)
- h) Síntesis de proteínas en las células estromales (8)
- i) Liberación de histamina (29)
- j) Activación de enzimas, involucradas en la diferenciación celular, sintetizadas durante la fase de preimplantación (30)

La respuesta decidual no puede ser inducida por estadios preblastocísticos (31) o por blastocistos no viables (32).

Por otro lado, se ha involucrado a la histamina como el factor intraterino responsable de la inducción de la reacción decidual (33). A pesar de que en trabajos Shelesnyak demostró que había liberación de histamina de las células cebadas asociada con el proceso de implantación (34,35,36); la propuesta de que esta amina vasoactiva es la inductora de la reacción decidual no ha tenido aceptación general (37).

A partir de la década pasada se ha venido haciendo una reevaluación de la participación de la histamina en el proceso de Implantación-Reacción Decidual (38,39,40,41,42). Desgraciadamente esta serie de trabajos no aclara la participación real de la histamina en este proceso (41,42). Además, también se ha involucrado a las prostaglandinas como responsables de las respuestas deciduales primarias (43,44).

- Receptores Estrogénicos -

Se ha demostrado la existencia de dos sistemas receptores estrogénicos uterinos; el primero de ellos es de tipo genómico, llamado Citosol-Nuclear (Tipo I)(45,46,47). Este receptor se encuentra en células musculares, epiteliales, glandulares y estromales del útero (48,49,50). El segundo es de tipo extragenómico y se encuentra en la membrana de los leucocitos eosinófilos (51,52,53,54). Recientemente se ha postulado que éste representa el Receptor Uterino Nuclear Tipo II (55).

Se considera que estos dos sistemas están involucrados en diferentes mecanismos de acción estrogénica intrauterina. Se propuso que estos dos sistemas actúan de forma independiente (56). El sistema citosol-nuclear es responsable de la síntesis de RNA y proteínas (47,57), mientras que el sistema eosinofílico es responsable de las primeras respuestas estrogénicas uterinas como incremento en la permeabilidad vascular, inhibición de agua y liberación de histamina (54,58,59).

Se ha postulado recientemente la existencia de un tercer receptor estrogénico uterino, cuyos efectos funcionales empiezan a ser esclarecidos (60).

- Leucocitos Eosinófilos -

Trabajos anteriores han demostrado que la población de eosinófilos en el útero de rata varía conforme al ciclo estral (61,62), además, se determinó que no hay eosinófilos en el útero de ratas inmaduras y que su número es bajo en las fases dominadas por la progesterona (por ejemplo durante la preñez)(61,62). Se sabe que otras hormonas esteroideas como la Testosterona, Cortisona, Hidrocortisona y Progesterona no inducen eosinofilia uterina ni interfieren con la incorporación de estrógenos por eosinófilos (58,63). Ha quedado totalmente establecido que la eosinofilia es causada por estrógenos (64) y que la variación en la población de eosinófilos en el útero durante el ciclo estral es dependiente de la variación de estrógenos ováricos (55,65).

- Características de los Eosinófilos -

El primero en describir los leucocitos eosinófilos de la sangre fue Jones en 1846. Shultze da una descripción morfológica de esta célula en 1865 (61). Paul Erlich reportó en 1879 en Berlín que los leucocitos eosinófilos constituyen un grupo distintivo diferente de leucocitos y que sus gránulos se tiñen típicamente de rojo con eosina (66). En 1880 de el nombre de «gránulos a los gránulos que se tiñen acidofílicamente con colorantes de anilina (61).

Se acepta que los leucocitos eosinófilos en su mayoría son producidos en la Médula Osea (61). Los eosinófilos varían de tamaño midiendo de 10 a 15 μm de diámetro, poseen un núcleo multilobulado que adopta una disposición en alforja o anular (67). Esta célula se caracteriza porque su citoplasma contiene gran cantidad de gránulos afines a la eosina, dichos gránulos tienen forma ovoide y miden de 0.5 a 1.5 μm de longitud y de 0.3 a 1.0 μm de diámetro (68). En muchas especies estos gránulos revelan una barra central referida como "cristaloide" o "corazón" que difiere en densidad electrónica de la matriz que lo rodea (68) y es perfectamente observable a microscopía electrónica (figura 3). Dicho cristaloide de esta constituido por la Proteína Básica Mayor (69) y la matriz es rica en Peroxidasa Eosinofílica, la cual posee características fisiológicas particulares (70).

Además, en el eosinófilo se han detectado otros gránulos más pequeños referidos como Microgránulos Específicos, ellos pueden asumir diversas formas (de anillo, de copa o de alterio); aunque su naturaleza química no ha sido determinada, la localización periférica de estas estructuras hacen pensar que ellos forman parte de la maquinaria secretoria de los leucocitos eosinófilos (68).

Estudios recientes en gránulos eosinofílicos de rata y caballo han demostrado la presencia de β -glucoronidasa, Arilsulfatasa, Ribonucleasa, Lisofosfolipasa y Fosfolipasa D (71). Además se ha encontrado que el eosinófilo también tiene actividad colagenolítica (72). Como es sabido de antaño los eosinófilos participan fagocitando complejos antígeno-anticuer

po, tienen actividad antiparasitaria, antitumoral; pero sus funciones totales aun no han sido esclarecidas (69).

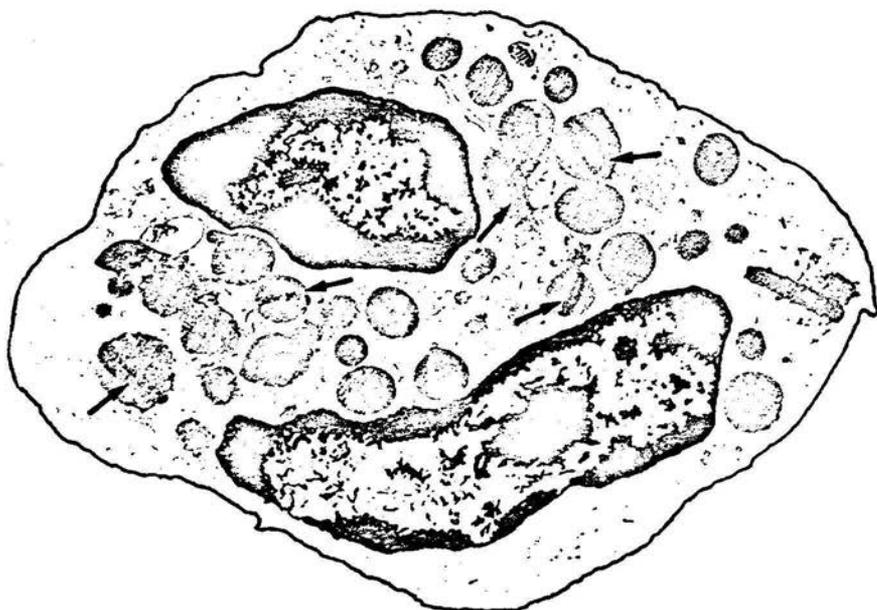


Figura 3) Leucocito Eosinófilo, las flechas se ñalan el cristalcoide de los gránulos (17000 X).

O B J E T I V O

Se ha reportado recientemente que el eosinófilo es el responsable de que el útero manifieste las primeras respuestas inducidas por estrogénos, como incremento en la permeabilidad vascular y edema entre otras (56,59); dichas respuestas coinciden con las señaladas por Psychoyos como respuestas deciduales tempranas, e indispensables para que se lleve a cabo la implantación (4,16). Es probable que el eosinófilo sea responsable de estos cambios deciduales tempranos en el sitio de implantación.

El objetivo de éste trabajo es: Estudiar la morfología, el número y la distribución de los leucocitos eosinófilos durante la implantación

MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron ratas wistar de 200 ± 25 gramos de peso corporal a las cuales se les mantuvo con agua y comida AD LIBITUM, con un ciclo de luz-oscuridad de 14-10 horas respectivamente. Se efectuaron frotis vaginales diariamente, antes de las 10 de la mañana para determinar la fase de su ciclo estral; en la fase de preestro-estro se colocó a cada hembra con un macho para su apareamiento, en la mañana del día siguiente se separaron a las hembras en las cuales se observó espermatozoides en su frotis vaginal, designando a este como día uno de preñez. Del lote de ratas preñadas se utilizaron 19 para el estudio de Microscopía de Luz y 6 para Microscopía Electrónica.

Par el estudio de Microscopía de Luz se utilizó el siguiente procedimiento:

En la mañana del 6º día de preñez (entre 10 y 11 A. M.) se hizo el reconocimiento de las zonas de implantación mediante la inyección intravenosa de Azul de Evans al 0.5% en solución salina fisiológica (se administró 0.5 ml por cada 100 gramos de peso corporal)(25) (ver foto 1). Quince minutos después se sacrificó al animal por sobredosis de éter. Se disecó el útero y se separaron las zonas de implantación (bandas azules, ver foto 2) de las interzonas (áreas claras) y se fijaron ambas en Formol al 10% durante 24 horas.

Se formaron dos grupos de estudio:

GRUPO A (se utilizaron 10 ratas)

En este grupo se tomó la primer zona de implante e interzona cercana al ovario de cada cuerno uterino.

GRUPO B (se utilizaron 9 ratas)

En este grupo se tomó al azar una zona de implante con su respectiva interzona de cada cuerno uterino.

Se elaboraron éstos dos grupos de estudio para saber si la diferencia en la población de eosinófilos del sitio de implantación en relación

al intersitio permanecía, independientemente de la localización que tuvieran a lo largo del útero.

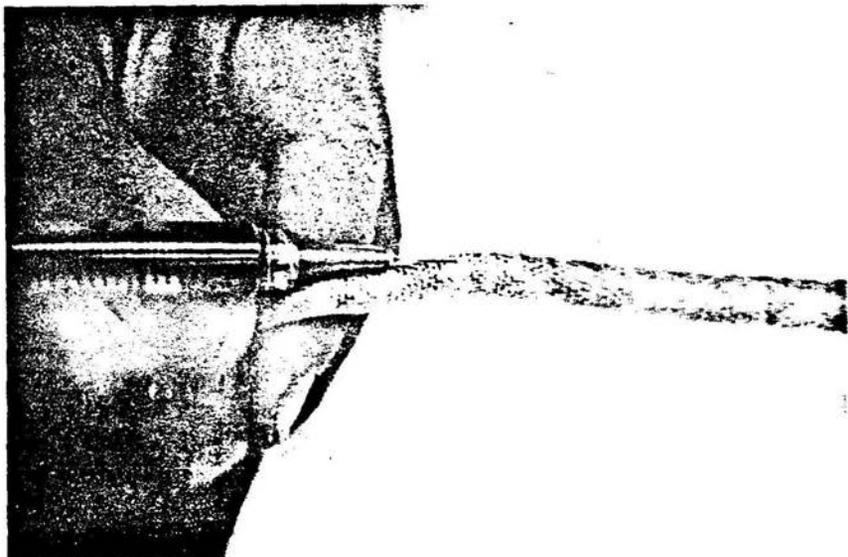


Foto 1) Administración intravenosa del Asal de Evans para detectar las zonas de implantación.

En los dos grupos de estudio, las zonas de implante y las interzonas fueron procesadas por la técnica histológica de rutina (73). Se incluyeron en parafina y se obtuvieron cortes seriados de 6 μ m.

Para teñir selectivamente los eosinófilos se probaron distintas técnicas (74,75,76). Se utilizó la que se describe a continuación (ver caso



Foto 2) Las flechas señalan las zonas de implantación detectadas mediante la técnica de Psycoyos (25).

dro A) por dar excelentes resultados; esta técnica es una modificación - muestra de la descrita por Tohernitchin (76).

De la zona de implantación se contaron los eosinófilos únicamente de los cortes en los cuales estuvo presente el embrión (a esto es a lo que consideramos como SITIO DE IMPLANTACION y que constituyó el grupo experimental. De las interzonas (que constituyó el grupo testigo) se contó la población de eosinófilos en uno de cada cinco cortes de la serie, el conteo se hizo en el Miometrio y en el Endometrio (dividiéndolo en antimesometrio y mesometrio)(ver figura 4), tanto en los sitios de implantación como en las interzonas, utilizando el objetivo de 40X. Se comparó estadísticamente la población de una cantidad de cortes del sitio de implantación con otra igual de su respectiva interzona utilizando el Análisis de Varianza de Dos Factores.

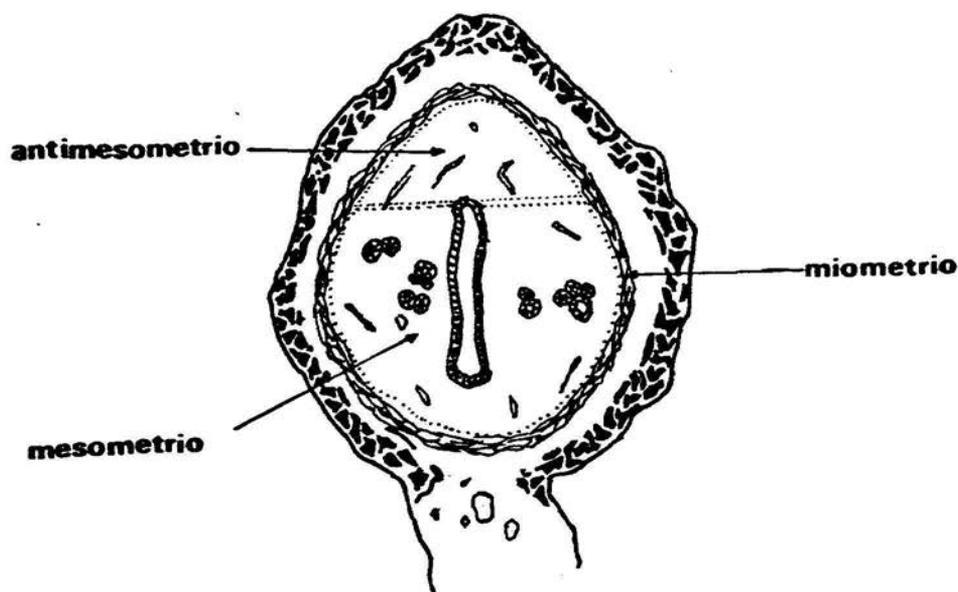


Figura 4) Esquema de un corte transversal de útero de rata donde se muestran las regiones en que se efectuaron los conteos.

C U A D R O A

Descripción de la técnica empleada para teñir selectivamente a los leucocitos eosinófilos:

Xilol I	3 minutos
Xilol II	3 minutos
Etanol Absoluto	3 minutos
Etanol al 96 %	3 minutos
Etanol al 90 %	3 minutos
Etanol al 80 %	3 minutos
Etanol al 70 %	3 minutos
Hematoxilina de Harris ⁺	10 minutos
Lavar en agua corriente	5 minutos
Alcohol Acido	3 baños
Solución Saturada de Carbonato de Litio	30 segundos ⁺⁺
Eritrosina Acuosa al 0.5%	5 minutos
Lavar en Agua Corriente	
Etanol al 70 %	2 minutos
Etanol al 80 %	2 minutos
Etanol al 90 %	2 minutos
Etanol al 96 %	2 minutos
Etanol Absoluto I	3 minutos
Etanol Absoluto II	3 minutos
Xilol I	3 minutos
Xilol II	3 minutos
Montar en resina Sintética	

Los gránulos de los leucocitos eosinófilos se tiñen de rojo y el resto del tejido de azul.

+ Se puede utilizar Hematoxilina de Weigherts o de Heindenhain.

++ En este tiempo vira de café pálido a azul.

Para el estudio de Microscopía de Electrónica se utilizó el siguiente procedimiento:

En la mañana del 6º día de preñez (entre 10 y 11 A. M.) se hizo el reconocimiento de las zonas de implantación mediante la técnica de Psychoyos (25). Quince minutos después se fijó el útero por Perfusión Aórtica con Gluteraldehído al 2.5% en amortiguador de Cacodilato de Sodio al 0.125 M a pH 7.4 durante 10 minutos (77). Previo a la fijación se lavó el torrente circulatorio con solución salina fisiológica. Posteriormente se diseccionó el útero, se obtuvieron las zonas de implantación y fueron pos fijadas en Tetróxido de Osmio al 1% en amortiguador de Cacodilato de Sodio al 0.125 M a pH 7.4.

Después de la deshidratación en series de alcoholes graduales se incluyeron en Epon 182 (77). Con un Ultramicrotomo Reicher-Jung se obtuvieron cortes plateados (de 60 a 90 nm) de la región antimesometrial los cuales fueron contrastados dentro de una caja de Petri (que contenía una placa de papel filtro humedecido con una solución de Hidróxido de Sodio) sobre una plancha caliente (a 60 °C) de la siguiente manera:

Solución de Acetato de Uranilo al 1% 20 minutos

Solución de Citrato de Plomo de Reynolds 20 minutos

Los cortes fueron examinados en un Microscópio Electrónico Jeol 100 CX2, utilizando un voltaje de 80 Kv.

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el Análisis de Varianza de Dos Factores (79,80) y para interpretar la F se utilizó la Prueba de Tukey (81); donde la diferencia entre dos medias es significativa a un nivel α determinado, si iguala o excede a DSH, que es:

$$DSH = 1 - \alpha J - J(n-1) \sqrt{\frac{MS_w}{n/I}}$$

donde:

1- $q_{J-J(n-1)}$ = Percentil con J y $J(n-1)$ grados de libertad.

MS_w = Media de Cuadrados de los niveles de Factores de Análisis de Varianza (Varianza Estimada dentro del Grupo).

n/I = Número de observaciones por grupo entre muestras independientes.

R E S U L T A D O S

- Observaciones de Microscopía de Luz -

Los eosinófilos se encuentran, de acuerdo con otros autores (59,61, 62), principalmente en la parte profunda de la mucosa uterina, entre el tejido conectivo de las capas musculares y ocasionalmente entre las fibras musculares de la capa circular (ver fotos 3,4,5,6 y 7).

En algunos cortes se observaron "nubes de gránulos" eosinofílicos aparentemente libres en la substancia intercelular.

En todos los casos estudiados del sitio de implante se observó una modificación en el epitelio de la región antimesometrial que circunda al embrión sin que éste tenga contacto físico con las células epiteliales (ver fotos 8 y 9).

No se observa en eosinófilos en el estroma de la región subepitelial del sitio de implantación ni del intersitio (ver foto 8).

No existen diferencias morfológicas, a nivel de microscopía de luz, entre los eosinófilos del sitio de implantación con respecto a los del intersitio. Se detectan tanto eosinófilos con núcleo en anillo como arriñonado, siendo mucho más abundantes estos últimos.

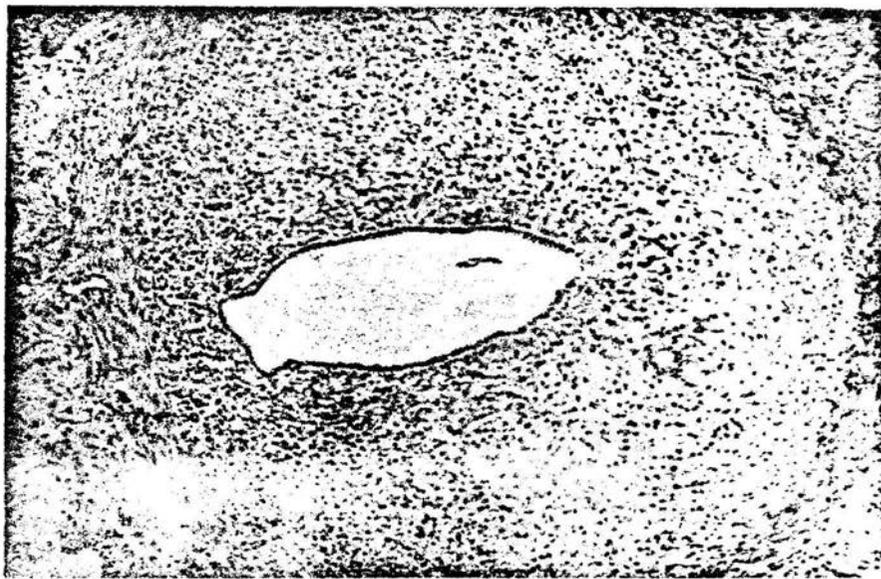


Foto 3) Vista panorámica de un corte transversal del sitio de implantación. La flecha señala al embrión (28 X).

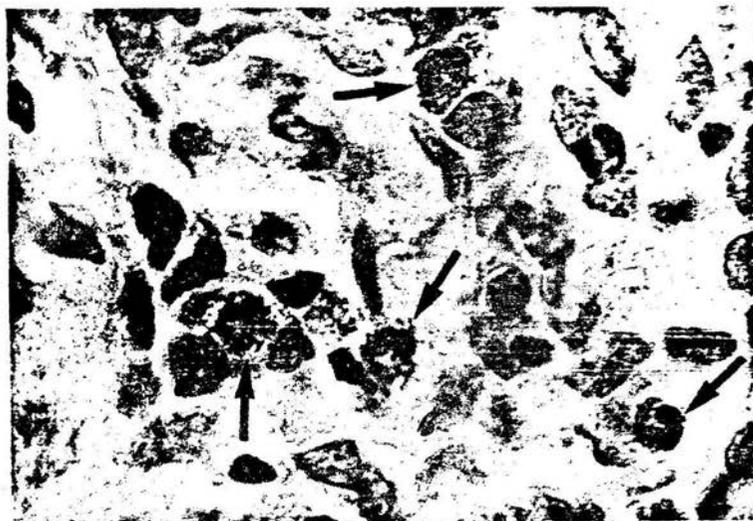


Foto 4) Las flechas señalan los eosinófilos situados en la mucosa uterina (1160 X).

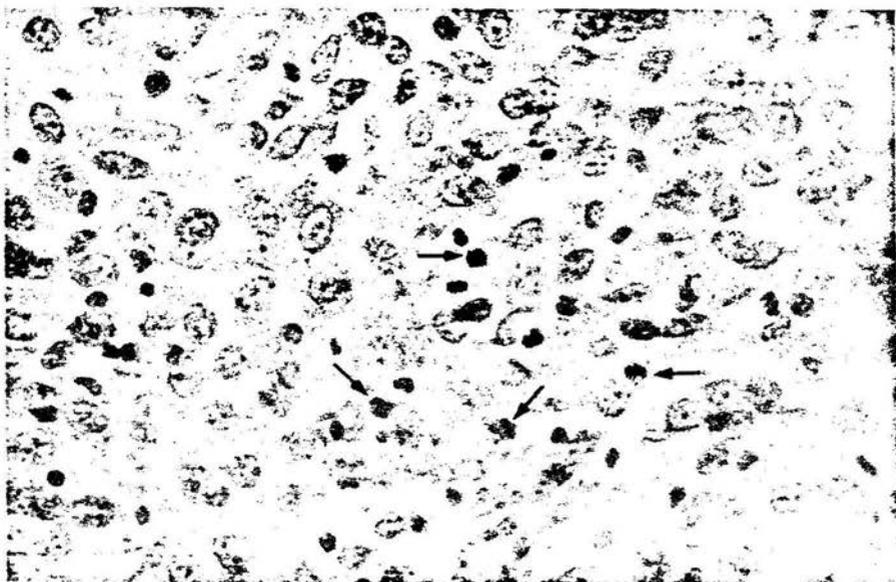


Foto 5) Vista panorámica de la mucosa uterina, las flechas señalan a los leucocitos eosinófilos (320 X).

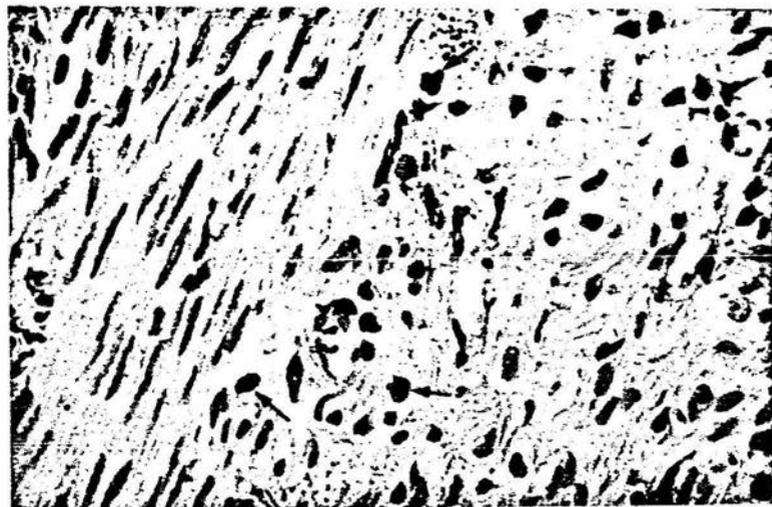


Foto 6) Las flechas muestran los eosinófilos situados en el tejido conectivo de las capas musculares del útero de rata (400 X).

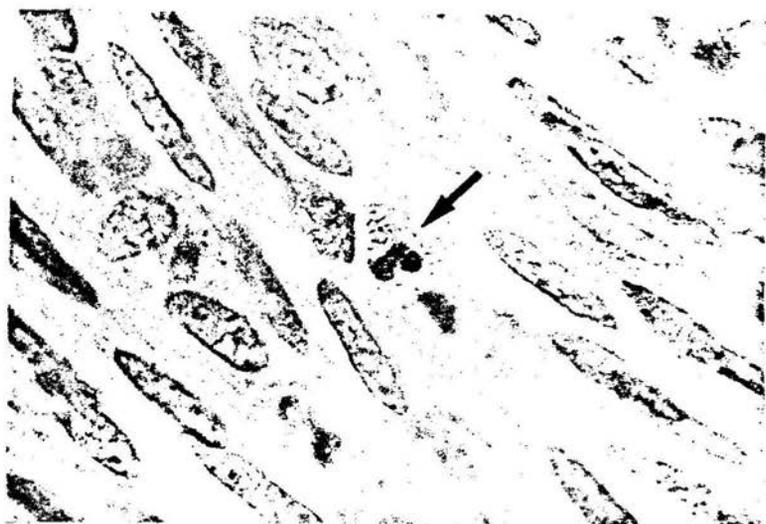


Foto 7) La flecha señala al eosinófilo detectado entre las fibras musculares de la capa circular del útero de rata (1160 X).

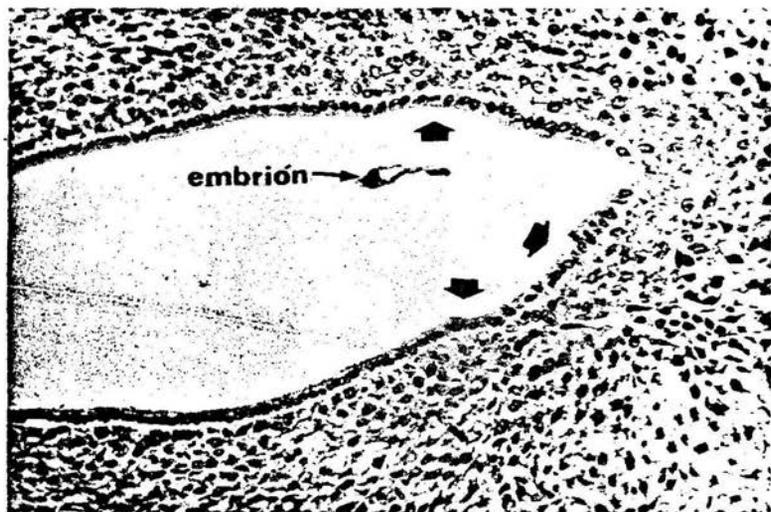


Foto 8) Sitio de Implantación, no se detectaron eosinófilos en el estroma subepitelial. Las flechas señalan las modificaciones epiteliales en el antimesometrio del sitio de implante (256 X).

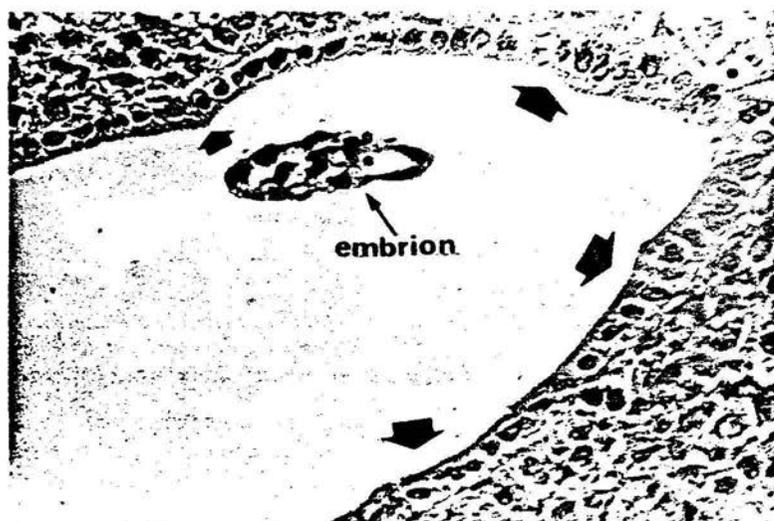


Foto 9) Sitio de Implantación, no se detectaron eosinófilos en el estroma subepitelial. Las flechas señalan las modificaciones epiteliales en el antimesometrio del sitio de implante (1160 X).

- Observaciones de Microscopía Electrónica -

La identificación de los leucocitos eosinófilos se logró mediante la observación de los gránulos ovoides y del cristaloides que éstos contienen (ver micrograffa 1).

Sólo se hicieron observaciones en la región endometrial del sitio de implantación pues es donde se llevan a cabo los cambios deciduales tempranos.

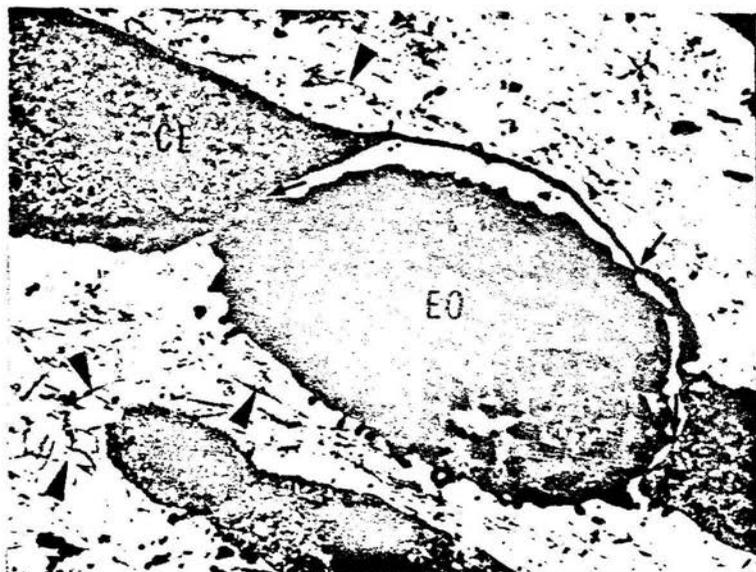
Se encontro que hay contacto entre los eosinófilos y las células estromales, adoptando la mayoría de ellas una forma característica como la que se observa en la siguiente micrograffa (ver micrograffa 2).

En las células estromales que tienen contacto con eosinófilos se observó gran cantidad de retículo endoplásmico rugoso a diferencia de aquellas células estromales en que no se observó contacto. También se observaron fibras de colágena adyacentes (ver micrograffa 2)

En nuestras observaciones a Microscopía Electrónica de Transmisión no se pudo establecer que tipo de unión que se lleva a cabo entre el eosinófilo y la célula estromal.



Micrograffa 1) Leucocito Eosinófilo (14 000 X).



Micrograffa 2) Contactos entre eosinófilo y célula estromal, las flechas señalan el sitio de contacto entre dichas células. Las puntas de flecha señalan las fibras de colágena. CE: Célula Estromal, EO: Eosinófilo (10000 X).

Hay variaciones en la cantidad de gránulos ovoides entre los diferentes eosinófilos que tienen contacto con las células estromales (ver-micrografías 2 y 3).



Micrograffa 3) Contactos entre eosinófilo y célula estromal, las flechas señalan el sitio de contacto entre dichas células.
CE: Célula Estromal, EO: Eosinófilo (14 000 X).

- Análisis Estadístico -

La comparación estadística de la población de eosinófilos del sitio de implantación con respecto al intersitio (utilizando el Análisis de Varianza de Dos Factores) demostró que hay diferencia significativa ($F=0.01$) encontrándose menor cantidad de eosinófilos en el sitio de implantación (ver cuadro Ia, Ib y IIa, IIb). Utilizando la Prueba de Tukey para Comparación Múltiple encontramos que la diferencia, entre el sitio de implantación con respecto al intersitio, es debida al mesometrio ($F=0.01$). No hay diferencia significativa entre el antimesometrio y el miometrio (ver cuadro Ic, IIc, gráfica I y gráfica II).

GRUPO "A"

C U A D R O I a

NUMERO Y DISTRIBUCION DE EOSINOFILOS EN EL UTERO DE RATA*

AREA	SITIO DE IMPLANTE		INTERSTITIO		
++ Antimesometrio	28.3	57.0	47.5	62.8	$\bar{x}=9.883$ $\mu_3=24.7075$
	37.4	57.0	52.4	95.0	
	29.2	101.2	30.4	101.0	
	38.9	140.5	30.5	173.5	
	42.6	49.3	98.8	71.5	
	43.5	35.9	85.3	52.5	
	132.1	15.0	107.8	21.5	
	68.9	15.6	82.7	15.8	
	6.6	13.4	54.0	13.2	
	136.6	17.3	56.3	6.6	
	$\Sigma=1126.3$		$\Sigma=1259.1$		
++ Mesometrio	68.2	119.6	231.2	268.0	$\bar{x}=2872.1$ $\mu_2=71.8025$
	75.5	143.3	199.8	326.9	
	32.8	155.7	115.8	374.6	
	49.6	163.3	116.3	314.4	
	43.8	159.7	243.8	286.0	
	72.5	92.0	177.1	183.1	
	100.1	14.6	376.7	64.7	
	174.4	16.0	389.5	52.5	
	82.5	18.1	209.4	47.4	
	57.1	20.0	300.3	61.8	
	$\Sigma=1658.8$		$\Sigma=4339.3$		
++ Micometrio	84.4	151.9	149.4	118.9	$\bar{x}=2327.3$ $\mu_1=58.1825$
	56.7	183.0	91.7	191.0	
	59.7	280.6	84.6	219.0	
	51.3	310.6	70.4	160.3	
	180.4	48.7	254.7	70.5	
	208.0	27.2	200.5	73.5	
	169.3	27.4	150.8	31.0	
	175.4	26.7	193.6	15.0	
	104.4	29.0	167.1	24.9	
	144.4	19.8	178.7	29.0	
	$\Sigma=2338.9$		$\Sigma=2474.6$		
	$\Sigma SI=5124.0$		$\Sigma I=8073.0$		
	$\Sigma T=13179.0$				

Se utilizaron 10 ratas

Cada uno de los datos tabulados en estas regiones pertenecen a la media del número de eosinófilos por corte (13.0) obtenidos por rata.

Clave de Letras:

ΣSI - Sumatoria del Sitio de Implante
 ΣI - Sumatoria del Interstitio
 ΣT - Sumatoria Total

GRUPO "A"

C U A D R O I b

TABLA DE ANOVA

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Media de Cuadrados	F ₀
Subgrupos	5	350116.2	70023.24	
A	1	72471.7	72471.7	14.907363
B	2	169587.9	84793.93	17.442038
Interacción A B	2	108056.6	54028.3	11.113572
Error dentro de Grupos	114	554207.6	4861.47	
Total	119	904323.8		
F 0.01(1,119)=6.84		F 0.01(2,119)=4.78		F 0.01(2,119)=4.78

GRUPO "A"

C U A D R O I c

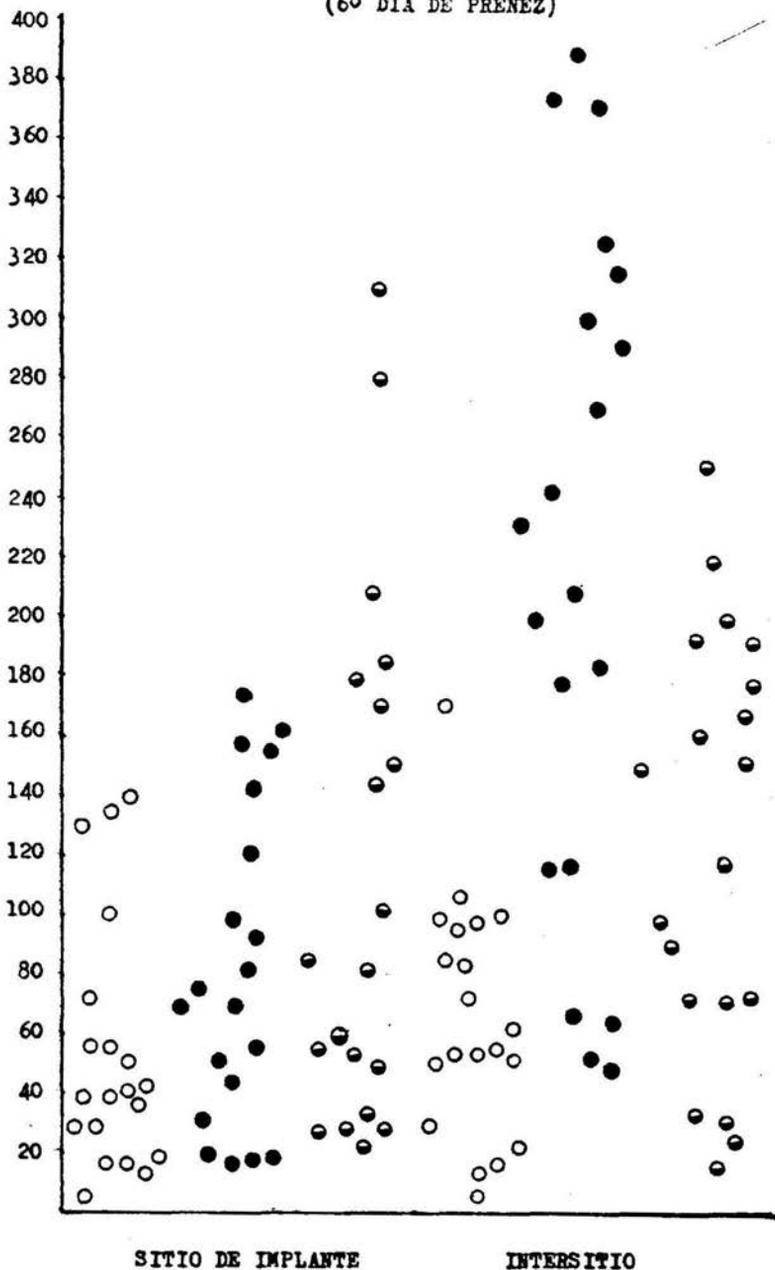
Prueba de Tukey
para Comparación Múltiple

DIFERENCIA	ABSOLUTA	ENTRE	MEDIAS
$\mu_1 - \mu_2$:	59.6-149.9		=90.3
$\mu_1 - \mu_3$:	59.6-120.3		=61.0
$\mu_2 - \mu_3$:	149.9-120.3		=29.6

DSH (0.01) = 61.42

GRAFICA I

DISTRIBUCION DE EOSINOFILCS EN EL UTERO DE RATA++
(6º DIA DE PREÑEZ)



++ Los datos graficados son los
tabulados en el cuadro Ia

- Antimesometrio
- Mesometrio
- ◐ Miometrio

GRUPO "B"

C U A D R O I I a

NUMERO Y DISTRIBUCION DE EOSINOFILOS EN EL UTERO DE RATA ⁺					
AREA	SITIO DE IMPLANTE		INTER SITIO		
++ Antimesometrio	22.3	8.4	18.0	11.6	$\bar{x}=4813.5$ $\mu_3=120.337$
	26.4	42.7	14.4	57.3	
	9.3	18.3	8.2	13.8	
	21.7	45.7	35.8	79.8	
	8.6	30.6	11.9	51.0	
	11.5	13.0	13.9	15.4	
	27.8	16.6	39.6	14.6	
	10.6	8.2	12.0	6.2	
	69.3	19.9	157.7	16.2	
		$\Sigma=410.9$		$\Sigma=577.4$	
++ Mesometrio	40.6	19.0	95.4	50.6	$\bar{x}=5998$ $\mu_2=149.925$
	44.5	70.2	119.8	130.4	
	16.9	26.0	40.7	46.0	
	24.5	75.2	53.1	177.9	
	32.9	77.8	69.5	220.4	
	17.9	124.4	35.0	175.1	
	37.5	100.0	63.0	182.0	
	22.2	17.2	53.0	45.8	
	132.5	23.6	321.5	90.0	
		$\Sigma=902.9$		$\Sigma=1969.2$	
++ Micometrio	30.8	27.9	51.8	40.2	$\bar{x}=2385.4$ $\mu_1=59.635$
	30.8	128.4	47.7	92.5	
	33.3	41.0	45.5	38.8	
	45.3	154.7	53.1	115.8	
	45.9	146.6	44.9	131.3	
	40.1	40.0	39.6	49.4	
	98.0	32.7	53.3	32.9	
	43.9	25.5	52.7	32.4	
	146.7	84.6	150.9	58.8	
		$\Sigma=1196.2$		$\Sigma=1131.1$	
	$\Sigma SI=2510.0$		$\Sigma I=3677.1$		
		$\Sigma T=6187.7$			

+ Se utilizarón 9 ratas

++ Cada uno de los datos tabulados en estas regiones pertenecen a la media del número de eosinófilos por corte (13.5) obtenidos por rata

Clave de Letras:

ΣSI = Sumatoria del Sitio de Implante

ΣI = Sumatoria del Intersitio

ΣT = Sumatoria Total

GRUPO "B"

C U A D R O IIb

TABLA DE ANOVA

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Media de Cuadrados	F _a
Subgrupos	5	84678.69	16935.738	
A	1	12625.22	12625.22	5.993599
B	2	52207.69	26103.84	12.392337
Interacción A B	2	19845.78	9922.89	4.710715
Error dentro de grupos	102	214857.96	2106.45	
Total	107	299536.65		
F 0.05(1,102)=3.94		F 0.01(2,102)=4.82		F 0.05(2,102)=3.09

GRUPO "B"

C U A D R O IIc

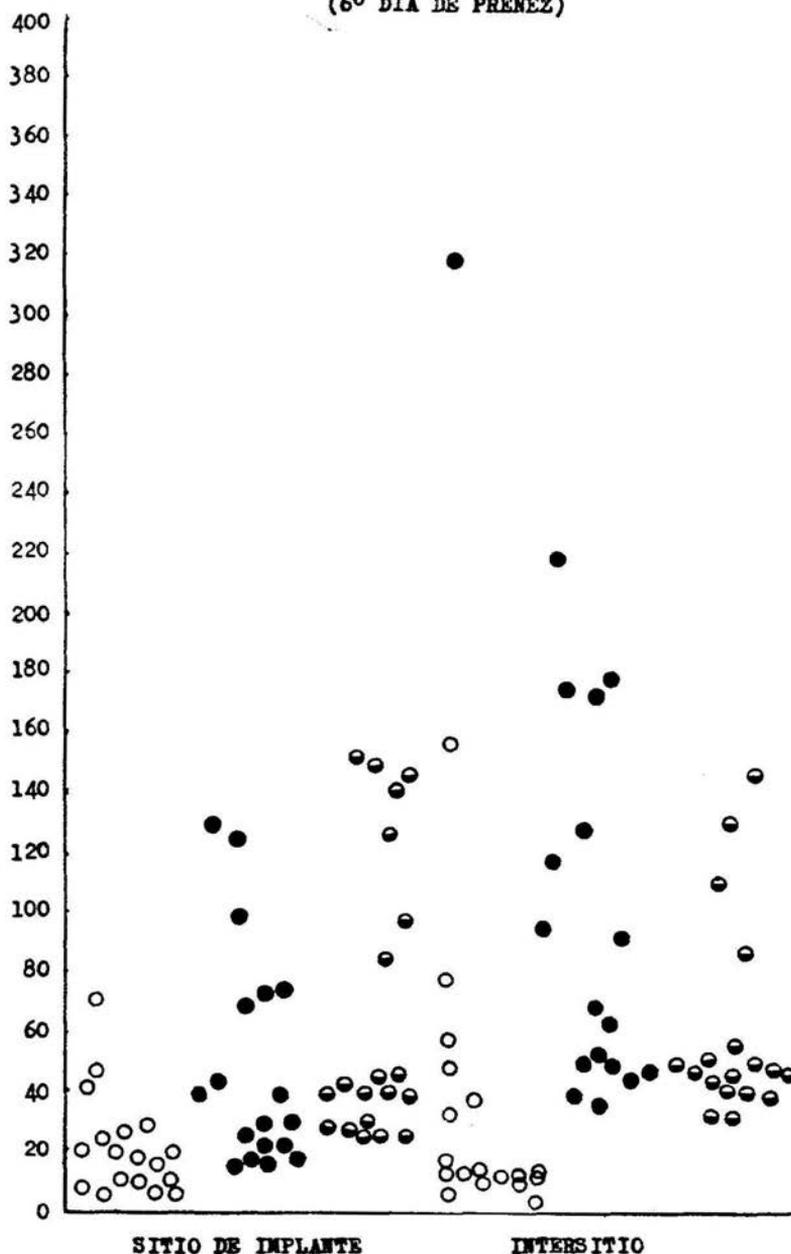
Prueba de Tukey
para Comparación Múltiple

DIFERENCIA ABSOLUTA ENTRE MEDIAS		
$\mu_1 - \mu_2$:	24.7-71.8	= 47.1
$\mu_1 - \mu_3$:	24.7-58.1	= 33.4
$\mu_2 - \mu_3$:	58.1-71.8	= 13.7

DSH (0.01) = 36.02

GRAFICA II

DISTRIBUCION DE EOSINOFILCS EN EL UTERO DE RATA⁺⁺
(6° DIA DE PREÑEZ)



⁺⁺ Los datos graficados son los tabulados en el cuadro IIa

○ Antimesometrio
● Mesometrio
◐ Micometrio

DISCUSION

Los resultados muestran diferencias estadísticas significativas entre la población de eosinófilos del sitio de implantación con respecto al intersitio, encontrándose en menor número en el sitio de implante; esta diferencia puede ser propiciada por la degranulación previa de los eosinófilos inducida por el(los) mensajero(s) embrionario(s) al inicio de la implantación. Es sabido que para que pueda realizarse la implantación es necesaria la "oleada estrogénica" (4,7), pero este pico estrogénico sólo crea las condiciones necesarias de receptividad endometrial al estímulo embrionario, este periodo de receptividad es transitorio (82); si el estímulo embrionario no se presenta en este momento la respuesta decidual no se manifiesta (4). Es posible que dicha oleada estrogénica del cuarto día de preñez, entre otras funciones, atraiga a los eosinófilos al útero. En trabajos anteriores Tchernitchin demostró que la administración de estrógenos a ratas prepúberes causa eosinofilia uterina (64). Desde la década pasada se ha discutido que estos estrógenos sean los únicos responsables (aparte de la progesterona) del proceso de implantación; Dickman propuso que el embrión participa de manera activa en este evento (21,22,23) mediante la emisión de mensajeros en el sitio donde se va a implantar (23,83). En la rata y en otros mamíferos hay evidencias indirectas de que el embrión sintetiza esteroides (estrógenos) (20,21,44,-84); en la rata se postuló que los utiliza para cuatro procesos fundamentales como: a) transformación de mórula a blastocisto, b) liberación y disolución de la zona pelúcida, c) inicio de la implantación y d) actividades metabólicas todavía no definidas en la mórula y el blastocisto.

Es factible que los estrógenos sintetizados en el embrión constituyan el estímulo que desencadena la reacción decidual. Dichos estrógenos embrionarios pueden ser los responsables de que los eosinófilos degranulen en el endometrio del sitio de implante al inicio de la implantación (en la tarde del quinto día de preñez) y que en el sexto día se muestren

diferencias en el número de eosinófilos como se señaló previamente en los resultados. Pensamos que estos esteroides crean condiciones hiperestrogénicas muy localizadas (que corresponden a los futuros sitios de implantación) y que por ésta razón los leucocitos eosinófilos degranulen. Este punto de vista es apoyado por trabajos anteriores en los cuales se ha reportado que en condiciones hiperestrogénicas los eosinófilos degranulan (59,62). En nuestras observaciones a microscopía de luz se encontraron "nubes de gránulos" de eosinófilos; posiblemente sean leucocitos eosinófilos en fase de degranulación. Por otro lado, en ratas ovariectomizadas en el quinto día de preñez, se ha demostrado una diferencia en la distribución de receptores de estrógenos y progesterona en los sitios de implantación con respecto a los intersitios, al cuantificarlos al sexto día de preñez.

A nivel ultraestructural se han reportado uniones celulares entre células deciduales en el útero de ratonas preñadas (87), en la rata se han estudiado los cambios ultraestructurales de las células estromales durante la implantación inducida por estrógenos después de un retardo experimental (88). El contacto entre eosinófilos y células estromales implican funciones muy complejas. También se han reportado contactos entre eosinófilos y fibroblastos, o con macrófagos durante el estro (62). La existencia de contactos entre eosinófilos-célula estromal en el sitio de implante es difícil de interpretar pues las funciones totales de los eosinófilos aun no han sido aclaradas. Por otro lado, se sabe que hay procesos morfogénicos regulados por contacto célula a célula, por ejemplo durante la morfogénesis del riñón (89). En nuestro caso, el observado durante la implantación, podrían estar involucrados en la diferenciación de célula estromal a célula decidual. Además se observó que en las células estromales que llevan a cabo estos contactos hay desarrollo del retículo endoplásmico rugoso lo que no se observó en las células estromales que no hacían dicho contacto; otros autores han reportado que después del estímulo decidual (en ratas preñadas y ratas ovariectomizadas) se ha detectado un cambio en el patrón de síntesis de proteínas tanto cu

litativa como cuantitativamente (10,90), estas evidencias pueden apoyar la cuestión antes formulada.

El tipo de contacto no pudo ser instituido, pero puede estar mediado por la unión: receptor estrogénico del eosinófilo-estrógeno-receptor estrogénico de la célula estromal. Este modelo ya ha sido postulado en otro sistema, durante la diapedesis de los leucocitos eosinófilos de los capilares sanguíneos uterinos (76)(ver figura 5). Asimismo, se han observado gránulos de eosinófilos en las células estromales del útero de rata en estro y además se ha visto que en condiciones hiperestrogénicas hay cambios en la morfología nuclear de las células estromales, cambios que semejan los sufridos durante la decidualización (5,91).

El factor intrauterino responsable del desencadenamiento de las respuestas deciduales tempranas (como incremento en la permeabilidad vascular, edema uterino) hasta el momento es desconocido. Se ha involucrado como responsable directo de estos fenómenos a las células cebadas, pero trabajos recientes no aclaran la cuestión (34,42,43). Quizá los leucocitos eosinófilos participen en el incremento de la permeabilidad vascular y el edema uterino durante la implantación, pues se ha propuesto que ellos pueden degradar la colágena de la membrana basal de los capilares sanguíneos, y de ésta forma incrementar la permeabilidad vascular (92). La liberación de prostaglandinas E_1 y/o E_2 de los eosinófilos también podrían jugar un papel en el incremento de la permeabilidad vascular (91). Kennedy (93) ha observado incremento en la permeabilidad vascular uterina después de la administración de prostaglandinas E_2 y F_2 por separado. En cuanto al edema, el eosinófilo también podría participar pues posee en sus gránulos enzimas que, se ha propuesto, de alguna manera participan en la modificación de mucopolisacáridos de la sustancia fundamental y de las fibras de colágena (93) del endometrio. Este tipo de leucocito, además de poseer enzimas tales como glucoronidasa y arilsulfatasa entre otras, también puede degradar colágena tipo I y III; estos tipos de colágena existen en el útero de ratas y mujeres embarazadas (94,95).

Así pues, es probable que los eosinófilos participen en la manifes
tación de las primeras respuestas deciduales.

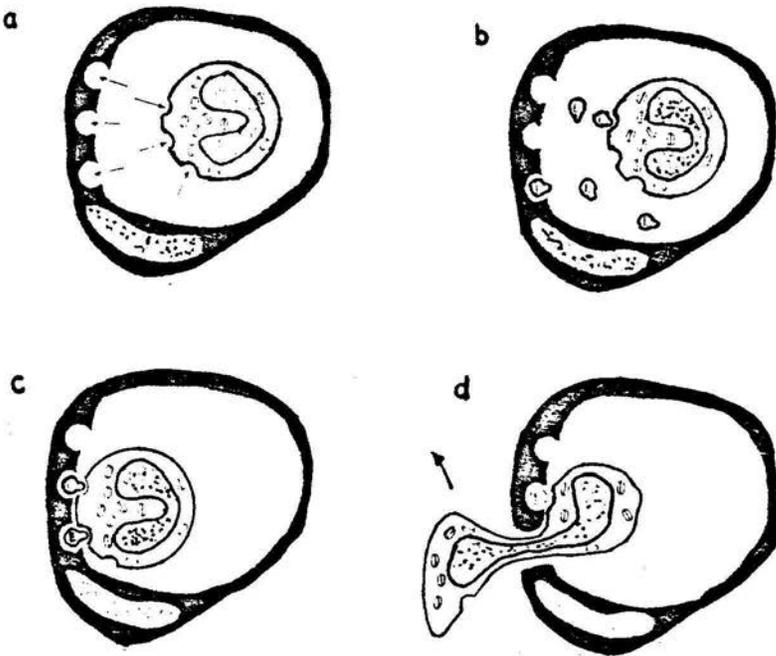


Figura 5) Modelo propuesto por Andres Tchernitchin:

- a) Las flechas señalan la presencia simultánea de receptores estrogénicos en la membrana ci toplásmica de los eosinófilos y en la pared de los pequeños vasos sanguíneos uterinos.
- b) Unión de estrógenos ha sus receptores en la membrana de 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.

C O N C L U S I O N

Por lo anteriormente expuesto se puede concluir que:

- a) Hay diferencias estadísticas significativas entre el número de eosinófilos de los sitios de implantación en relación a los intersitios.
- b) Se sugiere que los eosinófilos participan en el control de las primeras respuestas deciduales indispensables para que la implantación se realice.
- c) Además, se sugiere que intervienen en la diferenciación de células estromales a células deciduales.

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

- 1.- McLaren, A. (1972). The Embryo; en: *Reproduction in Mammals Vol 2 - (Embryonic and Fetal Development)*, (C. R. Austin and R. V. Short Ed.) Cambridge University Press, Cambridge pp. 1-42
- 2.- Enders, A. (1970). *Fertilization, Cleavage and Implantation*; en: *Reproduction and Breeding Techniques for Laboratory Animals* (E. S. E. Haffes Ed.). Lea Febiger Philadelphia pp. 137-156.
- 3.- Wimsatt W. (1975). *Some Comparative Aspects of Implantation..*
Biol. Reprod. 12:1-40
- 4.- Psychoyos, A. (1973). *Hormonal Control of Implantation.*
Vitamins and Hormones 31:201-254
- 5.- Kase, N. G. (1983). *The Microenvironment of the Ovarian Follicle.*
J. Reprod. Med. 28:239-243
- 6.- Finn, A. and Porter, D. G. (1975). *Morfological Changes in the Endometrium During the Ovarian Cycle*; en: *The Uterus* (A. C. Finn and D. G. Porter Ed.). Paul Elek (Scientific Books) LTD, London pp. 42-56.
- 7.- Psychoyos, A. (1967). *The Hormonal Interplay Controlling Egg- Implantation in the Rat*; en: *Advances in Reproductive Physiology Vol II* (A. McLaren Ed.). Logos Press Academic Press pp. 257-277.
- 8.- Jochim, J. M. (1975). *Development of the Progestational Uterus: Metabolic Aspects.*
Biol. Reprod. 12:106-133
- 9.- Finn, A. C. and Porter, D. G. (1975). *The Action of Ovarian Hormones of the Endometrium*; en: *The Uterus* (A. C. Finn and D. G. Porter Ed.). Paul Elek (Scientific Books) LTD London pp. 42-56.
- 10.- Heald, P. J. (1976). *Biochemical Aspects of Implantation.*
J. Reprod. Fertil. Suppl. 25:29-52

- 11.- Tachi, S.; Tachi, C. and 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
- 12.- Prasad, M. R.; Dass, C. M. and Mohla, S. (1968). Action of Oestrogen on the Blastocyst and Uterus in Delayed Implantation and Autoradiographic Study.
J. Reprod. Fertil. 16:97-104
- 13.- Sananes, N. and Psychoyos, A. (1974). Cytochemical localization of Adenyl Cyclase in the Rat Uterus.
J. Reprod. Fertil. 38:181-187
- 14.- Rajalakshmi, M.; Sankaran, M. S. and Prasad, R. N. (1972). Changes in Uterine Sialic Acid and Glycogen during Early Pregnancy in the Rat.
Biol. Reprod. 6:204-210
- 15.- Nimrod(Zmigrod), A.; Landeny, S. and Linder, H. N. (1972). Perinidatory Ovarian Oestrogen Secretion in the Pregnant Rat, Determined by Chromatographic with Electron Capture Detection.
J. Endocrinology 53:249-260
- 16.- Psychoyos, A. (1966). Egg Implantation; en: Ciba Foundation of Study Groups (G. E. W. Wolsten Holme) O. B. E., M. A., F. R., C. P., F. I.; Biol. J. J. & A. Churchill LTD; London pp. 12-27
- 17.- Finn, A. G. and Porter, D. G. (1975). The Control of the Implantation and Decidual Cell Reaction; en: The Uterus (A. C. Finn and D. G. Porter Ed.). Paul Elek (Scientific Books) LTD London pp. 82-97
- 18.- Yoshinaga, K.; Hawkins, R. A. and Stokers, J. F. (1969). Estrogen Secretion by the Rat Ovary IN VIVO During the Estrus Cycle and Pregnancy.
Endocrinology 88:103-112

- 19.- Psychoyos, A. (1960). Nouvelle Contribution à L'étude de la Nidation de L'oeuf chez la Ratte.
Comptes Rendus Acad. Sci., Paris 251:3073-3075
- 20.- Dickman, Z. and Dey, S. K. (1974). Steroidogenesis in the Preimplantation Rat Embryo and its Possible Influence on Morula-Blastocyst Transformation and Implantation.
J. Reprod. Fertil. 37:91-93
- 21.- Dickman, Z.; Sen Gupta, J. and Dey S. K. (1977). Does "Blastocyst Oestrogen" Initiate Implantation?
Science 195:687-688
- 22.- Dickman, Z. (1979). Blastocyst Oestrogens: An Essential Factor for the Control of Implantation.
J. Steroid. Biochem. 11:771-773
- 23.- Dickman, Z. (1979). Systemic Versus Local Requirement For Blastocyst Implantations: A Hypothesis; en: Perspectives in Biology and Medicine 22:390-398
- 24.- Enders, A. (1976). Anatomical Aspects of Implantation.
J. Reprod. Fertil. Suppl. 25:1-15
- 25.- Psychoyos, A. (1960). La Réaction Deciduale est Précedée de Modifications Précoces de la Perméabilité Capillaire de L'utérus.
Comptes Rendus Soc. Biol. 154:1384-1385
- 26.- Finn, C. A. (1971). The Biology of Decidual Cells; en: Advances in Reproductive Physiology (W.H. Marcus Ed.). Bishop Academic Press, New-York-London; Vol V, pp. 1-25
- 27.- Lundkvist, I. and Nilsson, O. (1974). Blastocyst-Endometrial Contact and Fontaine Blue Reaction During Normal Implantation in the Rat.
J. Endocrinology 60:149-154

- 28.- Hewitt, K.; Beer, E. A. and Grinell, E. (1979). Disappearance of Anionic Sites from the Surface of the Rat Endometrial Epithelium at the Time Blastocyst Implantation.
Biol. Reprod. 21:691-707
- 29.- Shelesnyak, M. C. (1959). Fall in Uterine Histamine Associated with Ovum Implantation in Pregnant Rat.
Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. 100:380-381
- 30.- Milligan, S. R. and Miremba, F. M. (1984). Time Course of the Changes in the Uterine Vascular Permeability Associated with Development of the Decidual Cell Reaction in Ovariectomized Steroid Treated Rats.
J. Reprod. Fertil. 68:217-222
- 31.- Alden, R. H. and Smith, J. (1959). Implantation of the Rat Egg. IV: Some Effects of Artificial Ova on the Rat Uterus.
J. Exp. Zool. 142:215-219
- 32.- Segal, S. J. and Nelson, W. o. (1958). An Orally Active Compound with Antifertility Effects in Rats.
Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. 98:431-434
- 33.- Shelesnyak, M. C. (1960). Nidation of the Fertilized Ovum.
Endeavour 19: 81-86
- 34.- Shelesnyak, M. C. (1952). Inhibition of Decidual Cell Formation in the Pseudopregnant Rat by Histamine Antagonist.
Am. J. Physiol. 170:522-27
- 35.- Kraicer, P. and Shelesnyak, M. C. (1958). The induction of Decidualization in the Pseudopregnant Rat by Systemic Administration of Histamine Releasers.
J. Endocrinology 17:324-28

- 36.- Marcus, G. J. and Shelesnyak X. C. (1967). Studies on the Mechanism of Nidation. XX Relation of Histamine Release to Estrogen Action in the Progestational Rat.
Endocrinology 80;1028-1030
- 37.- De Feo, V. J. (1967). Decidualization; en: Celular Biology of Uterus (Ralph M. Wynn Ed.). Meredith Publishing Company, pp. 191-290
- 38.- Gibbons, A. F. E. and Chang M. C. (1972). Number of Mast Cells in the Rat Uterus with Special Reference to its Relation to Hormonal Treatment and Decidual Response.
Biol. Reprod. 6:193-203
- 39.- Jonhson, D. C. and Dey, S. K. (1980). Role of the Histamine in Im-
plantation.
Biol. Reprod. 22:1136-1141
- 40.- Brandon, J. M. and Wallis, R. M. (1977). Effects of Mepyramine, a Histamine H₁-, and Burimamide, a Histamine H₂-receptor Antagonist, on Ovum Implantation in the Rat.
J. Reprod. Fertil. 50;251-254
- 41.- Brandon, J. M. and Bibby, M. C. (1979). A Study of Changes in Ute-
rine Mast Cells During Early Pregnancy in the Rat.
Biol. Reprod. 20:977-980
- 42.- Brandon, J. M. and Rawal, P. J. (1979). Interaction of Oestrogen and Histamine During Implantation in the Rat.
Europ. J. Pharmacol. 57:171-177
- 43.- Sauer, M. J. (1979). Hormone Involvement in the Stab^lishment of Preg-
nancy
J. Reprod. Fertil. 56: 725-743

- 44.- Soto-Feine, N.; Peterson, V. and Tchernitchin, A. (1981). Are Progtaglandins Involvent in Early Estrogen Action?
Experientia 37:1351-1352
- 45.- Toft, D. and Gorski, J. (1966). A Receptor Molecule for Estrogen: Isolation from the Rat Uterus and Preliminary Characterization.
Proc. Natl. Acad. Sci. 77:1574-1580
- 46.- Jensen, E. V. (1967). Estrogen Receptor Interactions.
Arch. Anat. Microscop. 56:567-571
- 47.- Jensen, E. V. (1979). The Oestrogen; en: Mechanism of Hormone Action (C. R. Austin and R. V. Short) Cambridge University Press, pp. 157-184
- 48.- Stumpf, W. E. (1968). Subcelular Distribution of ^3H -estradiol in Rat Uterus by Quantitative Autoradiography a Comparison Between ^3H -estradiol and ^3H -noretyndrol
Endocrinology 83:777-782
- 49.- Pietras, R. J. and Szego, C. M. (1977). Specific Binding Sites for Oestrogens at the Outer Surfaces of Isolated Endometrial Cells.
Nature 265:69-72
- 50.- Stumpf, W. E. and Roth, LL. J. (1966). High Resolution Autoradiography with Dry Mounted, Freeze Dried Frozen Sections.
J. Histochem. Cytochem. 14:271-287
- 51.- Tchernitchin, A. and Tchernitchin, X. (1976). Characterization of the Estrogen Receptors in the Uterine and Blood Eosinophil Leukocytes.
Experientia 32:1240-1241
- 52.- Tchernitchin, A. (1967). Autoradiographyc Study of (6, 7- ^3H)-Oetra-diol 17β Incorporation Into Rat Uterus.
Steroids 10:661-668

- 53.- Tchernitchin, A. (1970). Radioautographic Analysis of 6, 7-³H-Estradiol 17 β Uptake in Rat Uterus Following Extraction of Endogenous Estrogens.
Steroids 10:661-668
- 54.- Tchernitchin, A. and Chandross, R. (1973). In VIVO Uptake of Estradiol-17 β by the Uterus of Mature Rat.
J. Steroids Biochem. 4:41-44
- 55.- Lytle, C. R.; Med Lok, K. L. and Sheodhen, D. M. (1984). Eosinophils as the Source of Uterine Nuclear Type II Estrogen Binding Sites.
J. Biol. Chem. 259:2697-2700
- 56.- Tchernitchin, A.; Tchernitchin, I. and Galand, E. (1976). New Concepts on the Action of Oestrogens in the Uterus and the Role of the Eosinophils Receptor System.
Differentiation 5:145-150
- 57.- Hiroshi, U. and Mueller, G. (1963). The Role RNA Synthesis in Early Estrogen Action.
Proc. Natl. Acad. Sci. 50:256-260
- 58.- Tchernitchin, A. (1972). Radioautographic Study of the Effect of Estradiol-17 β .
Steroids 19:575-580
- 59.- Tchernitchin, A. (1973). Fine Estructure of Rat Uterine Eosinophils and the Possible Role of Eosinophils in the Mechanism of Estrogen Action
J. Steroids. Biochem. 4:277-285
- 60.- Kasi, A. et al (1984). A Novel Nuclear form of Estradiol Receptor in MCF-7 Human Breast Cancer.
Science 225(4667):1162-1165
- 61.- Rytoma, T. (1960). Organ Distribution and Histochemical Properties Granulocytes in Rat.
Acta Pathol. Microb. Scand. 60:27-35

- 62.- Ross, R. and Klebanoff, S. (1966). The Eosinophilic Leukocyte. Fine Structure Studies of Changes in the Uterus During the Estrus Cycle. *J. Exp. Med.* 124:653-660
- 63.- Bjersing, L. and Borglin, N. E. (1964). Effects of Hormones on Incidence of Uterine Eosinophilia in Rats. *Acta Pathol. Microb. Scand.* 60:27-35
- 64.- Tchernitchin, A.; Tchernitchin, X.; Vandenhende, J.; Rubrijck, J. and Galand, P. (1974). Dramatic Early Increase in Uterine Eosinophils After Oestrogen Administration. *Nature* 248:142-143
- 65.- Baker, A. P.; Bergman, F. and Paul, K. G. (1967). Studies of Eosinophil Granulocytes. III. Steroids Hormones and Number of Eosinophils in the Uterus of Mouse and Rat. *Acta Endocrinologica* 54:696-706
- 66.- Hirsh, J. G. and Hirsh, B. I. (1980). Paul Erlich and Discovery of the Eosinophils; en: *The Eosinophils in Health and Disease* (Adel A. F. Mahmoud; K. Frank Austen and Arlene Stolper Simon, Ed.). Grune & Stratton, London pp. 3-23
- 67.- Bloom, W. and Fawcett, T. (1975). *A Textbook of Histology* (W. B. Saunders Company), Tenth ed. Philadelphia 1033 p.
- 68.- Zuker-Franklin, D. (1980). Eosinophil Structure and Maturation; en: *The Eosinophil in Health and Disease* (Adel A. F. Mahmoud; K. Frank Austen and Arlene Stolper Simon, Ed.). Grune & Stratton, London pp. 43-59
- 69.- Gleich, G. J.; Loegerging, D. A.; Frigas, E.; Wasow, D. L.; Solley, G. O. and Mann, K. G. (1980). The Major Basic Protein of the Eosinophil Granule: Physicochemical Properties, Localization and Function; en: *The Eosinophil in Health and Disease* (Adel A. F. Mahmoud; K. Frank Austen and Arlene Stolper Simon, Ed.). Grune Stratton, London pp 45-77

- 70.- Klebanoff, S. J.; Jong, E. C. and Henderson, W. R. (1980). The Eosinophil Peroxidase: Purification and Biological Properties; in: The Eosinophil in Health and Disease (Adel A. P. Mahmoud; K. Frank Austen and Arlene Stolper Simon, Ed.). Grune & Stratton, London pp 99-114
- 71.- Weller, P. F.; Wasserman, S. I. and Austen, K. F. (1980). Selected Enzymes Preferentially Present in the Eosinophil; in: The Eosinophil in Health and Disease (Adel A. P. Mahmoud; K. Frank Austen and Arlene Stolper Simon, Ed.). Grune & Stratton, London pp. 115-129
- 72.- Bassett, E. G.; Baker, J.R.; Baker, P. A. and Mayers, D. B. (1976). Comparison of Collagenase Activity in Eosinophil and Neutrophil Fractions from the Rat Peritoneal Exudates. Austr. J. Exp. Biol. Med. Sci. 54:459-465
- 73.- Luna, L. G. (1968). Manual of Histological Staining Methods of Armed Forces Institute of Pathology. Tercera ed. pp. 1-52
- 74.- Grouls, V. and Helpap, B. (1981). Selective Staining of Eosinophils and their Immature Precursors in Tissue Sections and Autoradiographs with Congo Red. Stain Technol. 56:323-325
- 75.- Goldstein, D. J. (1963). Selective Staining of Eosinophil Granules in Sections of Alkaline Orcein in Concentrated Urea Solution. Stain Technol. 38:49-51
- 76.- Tchernitchin, X.; Tchernitchin, A. and Galand, P. (1976). Dynamics of Eosinophils in the Uterus After Oestrogen Administration. Differentiation 5:151-154
- 77.- Ljungkvist, I. and Nilsson, O. (1980). Ultrastructure Changes of the Trophoblast-Epithelial Complex in Mice Subjected to Implantation Blocking Treatment with Indomethacin. Biol. Reprod. 22:719-726

- 78.- Mercer, E. H. and Birbeck, G. (1979). Anual de Microscopfa Electrónica para Biólogos. H Blume Ed., pp. 148
- 79.- Sokal, R. y Rulh, J. (1969). Biometria. Principios y Métodos Estadísticos en la Investigación Biológica. H Blume Ed., 456 p.
- 80.- Haber, A. y Runyor, R. P. (1973). Estadística General. Fondo de Cultura Interamericano. Bogotá, 371 p.
- 81.- Duncan, R.; Knapp, R. G. y Miller, C. (1978). Biostatística. Editorial Interamericana. México, 165 p.
- 82.- Finn, A. C. and Porter E. C. (1975). The Control of Implantation and Decidual Cell Reaction; en: The Uterus (A. C. Finn and D. G. Porter Ed.). Paul Elek (Scientific Books) LTD London, pp 42-56
- 83.- Dikman, Z.; Dey, S. K. and Sengupta, J. (1976). A New Concept: Control of Early Pregnancy by Steroid Hormones Originating in the Preimplantation Embryo.
Vitamins and Hormones 34:215-241
- 84.- Heap, R. B.; Flint, A. P. ; Hartmann, P. E.; Gadsby, J. E.; Staples, L. D.; Akland, N. and Hamon, M. (1980). Oestrogen Production in Early Pregnancy.
J. Endocrinology 89:77-94
- 85.- Logeat, F.; Sartor, P.; Mai, T. V. H. and Malgrom, E. (1980). Local Effect of the Blastocyst on Estrogen and Progesterone Receptors in the Rat Endometrium.
Science 207:1083-1085
- 86.- Ward, W. F.; Frost, A. G. and Orsini, M. W. (1978). Estrogen Binding by Embryonic and Interembryonic Segments of the Rat Uterus Prior to Implantation. Biol. Reprod. 18:598-601
- 87.- Finn, A. C. and Lawn A. M. (1967). Specialized Junctions Between Decidual Cells in Uterus of the Pregnant Mouse.
J. Ultrastructure Research 20:321-327

- 88.- Ljungkvist, Ö. (1978). Ultrastructural Studies of the Endometrial Stromal Cells in Rats During Estradiol-induced Implantation After an Experimental Retard.
Biol. Reprod. 18:306-316
- 89.- Saxen, L.; Ekblom, P. and Thesleff, I. (1980). Mechanism of Morphogenetic Cell Interactions; en: Development in Mammals Vol IV (M. H. Johnson, Ed.). Elsevier/Nonh-Holland Biomedical Press. London, pp. 161-200
- 90.- Lejeune, B.; Lecocq, R.; Lamy, F. and Leroy, F. (1982). Changes in the Pattern of Endometrial Protein Synthesis During Decidualization in the Rat.
J. Reprod. Fertil. 61:519-523
- 91.- Tchernitchin, A. (1983). Eosinophil/Mediated Non Genomic Parameters of Estrogen Stimulation. A Separate Group of Responses Mediated by an Independent Mechanism.
J. Steroids Biochem. 19:95-100
- 92.- Tchernitchin, A. (1979). The Role of Eosinophil Receptors in the - Non-Genomic Response to Oestrogens in the Uterus.
J. Steroids Biochem. 11:417-424
- 93.- Kennedy, T. G. and Lukash, L. A. (1982). Induction of Decidualization in Rats by the Intrauterine Infusion of Prostaglandins.
Biol. Reprod. 27:253-260.
- 94.- Hibbs, M.; Mainardi, C. L. and Kang, A. (1982). Type-Specific Collagen Degradation by Eosinophils.
Biochem. J. 207:621-624
- 95.- Woessner, J. F. (1980). Collagenase in Uterine Resorption; en: Collagenase in Normal and Pathological Connective Tissues (D. E. Woollley and J. M. Evanson, Ed.). John Wiley & Sons LTD. London, pp. - 223-238