

En el líquido uterino podrían distinguirse cambios dependientes de hormonas relacionados con la citodiferenciación, que permitan esclarecer los eventos moleculares asociados con la sensibilización uterina para la implantación. Asimismo se ha informado que ciertas enzimas endometriales, se incrementan del día 3 al 6 de preñez, como la monoamina oxidasa, la acetil-o-metil transferasa, y la estradiol deshidrogenasa (Psychoyos, 1986).

Además las proteínas del líquido uterino forman parte importante del ambiente extracelular durante el periodo de preimplantación, y probablemente influyen en el metabolismo y la proliferación del embrión. Los tipos y abundancia de las proteínas presentes en él varía dependiendo de las concentraciones séricas de estrógenos y progesterona. Surani (1977), reporta que en el quinto día de preñez en la rata, hay una disminución considerable en la cantidad de proteínas en el líquido uterino, las que difieren cualitativamente de las proteínas presentes en el suero y en el líquido uterino del proestro.



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.

## IV. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad aun existe controversia para conocer y comprender, cuales son los mecanismos celulares y moleculares, asociados a la adquisición de la fase de receptividad endometrial, y por las evidencias acumuladas, se proponen algunos procesos que pudieran contribuir, o estar asociadas a ella:

A.- Existe la secreción especie - específica de proteínas en el líquido uterino.

B.- Estimulada por la acción de ciertos factores como son: citocinas y factores de crecimiento.

C.- A cambios estructurales en las células del endometrio que faciliten el contacto epitelio- blastocisto.

D.- A la adquisición de un alto potencial proliferativo de las células del estroma, que se desencadenaría si se da el estímulo adecuado.

E.- O bien, a una interacción o combinación de todos estos factores que estén regulando el proceso, para crear un ambiente receptivo para la implantación.

Ahora bien, los cambios endocrinos durante el ciclo reproductivo y la preñez, resultan en la remodelación extensa de los tejidos en el útero, que la adecuan para la recepción del embrión, donde las proteasas susceptibles de participar en la remodelación de matrices extracelulares del tejido endometrial: las metaloproteinasas y los activadores del plasminógeno, agentes conocidos que degradan a las matrices extracelulares.

## V. HIPÓTESIS

La composición del líquido uterino puede reflejar cambios fisiológicos uterinos durante el ciclo reproductivo y la preñez del organismo y no solo eso, sino también, constituir parte del medio ambiente extracelular que rodea al blastocisto, durante la fase peri-implantacional.

Ahora bien es posible que existan cambios en la composición de proteínas secretadas a la luz uterina en este periodo y que se encuentren variaciones en las proteasas que actúan sobre la matriz extracelular, como las metaloproteinasas y los activadores del plasminógeno. Los cuales podrían estar asociadas con la remodelación de los tejidos uterinos, para la adquisición de la receptividad uterina, la respuesta decidual y la invasión del endometrio.

## **VI. OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Correlacionar la actividad proteolítica y los tipos de proteasas presentes en el líquido y epitelio uterino, con los principales eventos que ocurren durante el periodo peri-implantación.

### **OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Determinar si existe cambios en la actividad colagenolítica en el líquido uterino, en los días 3,4,5,6 y 7 de preñez en la rata.
2. Delimitar los tipos de proteasas presentes en el líquido uterino y en la porción epitelial del endometrio, mediante zimografía, en los días 3,4,5,6 y 7 de preñez.
3. Analizar si hay cambios en el patrón electroforético de gelatinasas y activador del plasminógeno propios de la fase de receptividad uterina.

## VII. MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron ratas Wistar vírgenes de un peso aproximado de 200 a 250 g, mantenidas en un ciclo de luz-oscuridad de 14-10 h, con disposición de agua y alimento *ad libitum*. Se aparearon por el método de trío, 2 hembras y un macho por jaula. Se realizaron frotis vaginal todas las mañanas, para detectar la presencia de espermatozoides, lo que nos indica el primer día de preñez. A los días 3, 4, 5, 6 y 7 de gestación, se sacrificaron por dislocamiento cervical, se perfundieron por la arteria aorta abdominal, aproximadamente con 120 ml de solución salina amortiguada con fosfatos (PBS) pH 7.4, para eliminar la sangre del útero.

### 1. OBTENCIÓN DEL LÍQUIDO Y EPITELIO UTERINOS

Los úteros se disectaron, presionando el extremo vaginal con una pinza hemostática, se separaron los cuernos uterinos, y se lavaron en PBS, se retiró el exceso de PBS en papel filtro y el órgano se transfirió a parafilm. En el extremo unido al oviducto se inyectaron 50  $\mu$ l de PBS con una jeringa Hamilton, dejando drenar por el otro extremo previamente cortado por arriba de la pinza, colectando el líquido uterino sobre el parafilm, y se procedió de la misma forma con el otro cuerno uterino, utilizando el líquido recuperado previamente. El líquido uterino recuperado (aproximadamente 40  $\mu$ l), se centrifugó a 11000 rpm por 3 minutos en una microcentrifuga Eppendorf. Con cuidado se recuperó el sobrenadante, y se congeló a  $-40^{\circ}$  C hasta su uso (no congelando más de dos semanas).

Los úteros se cortaron longitudinalmente y se procedió a obtener la fracción epitelial, para ello se colocaron en tubos de ensaye con fondo

cónico con 1.5 ml de PBS y 5 perlas de vidrio de 3 - 5 mm de diámetro, se agitaron vigorosamente en el Vortex a máxima velocidad durante 2 minutos. El líquido se transfirió a un homogenizador Potter-Elvehem de teflón-vidrio, y se introdujo el pistilo 10 veces a una velocidad de 600 rpm por 15 segundos, el homogeneizado se recuperó, y se congeló -40°C hasta su uso (Fagg y col., 1979).

## 2. MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD COLAGENOLÍTICA

En las muestras de líquido uterino en los diferentes días estudiados se determinó, mediante espectrofotometría la escisión de un sustrato específico para colagenasa, el 2,4,dinitrofenil-Pro-Gln-Gli-Ile-Ala-Gli-Gln-D-Arg-OH (Sigma P.M. 992), este se disolvió en amortiguador de Tris-HCl 0.05M. conteniendo 0.15 M de NaCl, y 5mM de CaCl<sub>2</sub> a un pH 7.5 ( Gray y col., 1982 ).

La hidrólisis se llevó a cabo incubando a distintos tiempos, en tubos de ensaye, 0.1 ml del sustrato disuelto en el amortiguador señalado, conteniendo 0.02% de albúmina de suero de bovino (BSA) más 0.1 ml de líquido uterino. Se incubó a 37° C con agitación en la oscuridad, a los tiempos de 30, 60, y 120 min.

Se paró la reacción con 0.5 ml de HCl 1 M por 5 min. Para la extracción y cuantificación del hidrolizado se le agregó 1 ml de acetato de etilobutanol ( 1:0.5 v/v), se agitó vigorosamente en un vortex, se centrifugó a 5000 rpm a temperatura ambiente por 10 min, en una centrifuga clínica. Se extrajo la fase orgánica y se leyó a 365 nm en un espectrofotómetro modelo A PU 8710 (Philips, Cambridge United Kindom), se realizaron 5 determinaciones con duplicado (Gray y col., 1982).

La actividad colagenolítica se expresó en unidades, definiendo una unidad como la cantidad de enzima que ocasiona un cambio de absorbancia de uno, a 120 min de incubación en las condiciones del ensayo.

A todas las muestras se les cuantificó la cantidad de proteínas mediante el método de Bradford ( Bradford, 1976).

### 3. DETERMINACIÓN DEL PATRÓN ELECTROFORÉTICO DE PROTEASAS

Se analizaron los líquidos uterinos y la porción epitelial mediante zimografía, empleando electroforesis unidimensional en geles de poliacrilamida al 7.5% o al 10% con SDS, copolimerizados con gelatina (Sigma) 4 mg/ml; o con gelatina y plasminógeno (Sigma) 2.5 mg/ml (ver apéndice). En el primer caso para la detección de gelatinasas y en el segundo para el activador del plasminógeno. Se utilizó una cámara Bio-Rad modelo mini-Protean II. En ambos casos se aplicó en cada carril 25  $\mu$ l de muestra previamente mezclada con amortiguador de muestra 1:1 v/v. Se dejaron correr en corriente constante de 10 mAmp por gel, utilizando una fuente de poder de Bio-Rad modelo 1000/500. Los zimogramas se repitieron por triplicado o más, tanto del líquido uterino como de la porción epitelial. Posteriormente los geles se retiraron de la cámara y se transfirieron a Tritón X-100 al 2.5 % durante 30 minutos a 37°C en agitación constante. Los geles se lavaron 3 veces con agua desmineralizada y se incubaron con una solución de Tris-HCl 0.25 M, pH 7.4 durante 48 h a 37° C con agitación constante y en la oscuridad.

Al término del tiempo se retiró la solución de incubación, y los geles se tiñeron con azul de Comassie R-250. Después de la incubación y tinción, en los geles se observa una banda de hidrolizado in situ que corresponde a la proteasa de estudio.

Para los zimogramas con gelatina, se incubaron geles procesados paralelamente con EDTA 40 mM, para discriminar las proteasas que requieren metales; para el zimograma con gelatina más plasminógeno, geles paralelos se incubaron con amilorida (Sigma) 100 mM, un



inhibidor del activador del plasminógeno tipo urocinasa.

Para determinar la ubicación de las bandas de hidrolizados se utilizaron marcadores de peso molecular (Sigma) del rango de 205 a 29 kDa, conteniendo las siguientes proteínas, miosina 205 kDa,  $\beta$  galactosidasa 116, fosfolipasa  $\beta$  97.4, albúmina bovina 66, albúmina de huevo 45, anhidrasa carbónica de 29 kDa. La intensidad relativa de las bandas se evaluaron en un densitómetro.

#### 4. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los datos de actividad colagenolítica en los distintos días de preñez fueron comparados por la prueba de ANOVA (Daniel W, 1983).

## VIII. RESULTADOS

### 1. ACTIVIDAD COLAGENOLÍTICA EN EL LÍQUIDO UTERINO DURANTE LA PREÑEZ TEMPRANA

La actividad de colagenasa en el líquido uterino en los diferentes días de gestación estudiados; incubados a los 120 minutos con una alícuota de 100  $\mu$ l, no presentó diferencias estadísticamente significativas  $P > 0.05$  (tabla 2). Previamente ensayamos distintos tiempos de incubación de 30, 60 y 120 min y seleccionamos el mas adecuado (figura 3), siendo éste el de 120 min en vista de que se observa una relación lineal y directamente proporcional entre el cambio de absorbancia debido a la actividad de la enzima y los tiempos de incubación estudiados.

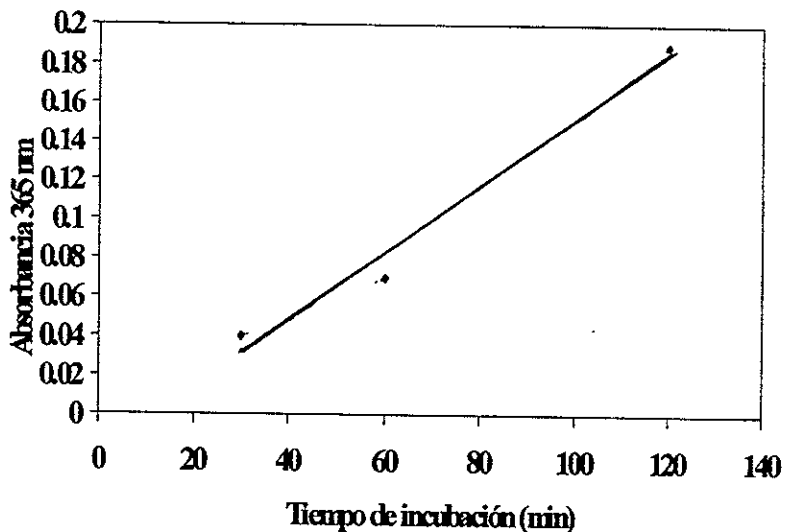


Figura 3. Evaluación del tiempo de incubación para la medición de la actividad colagenolítica, se midió la actividad de esta enzima en el líquido uterino del quinto día de preñez (alícuota de 100  $\mu$ l), incubando a los 30, 60, y 120 min, y midiendo el cambio en absorbancia a 365 nm debida a la degradación del péptido empleado.

TABLA 2

Actividad colagenolítica en el líquido uterino en el periodo peri-implantación.

DÍAS PREÑEZ	ACTIVIDAD COLAGENOLÍTICA 100μl LÍQUIDO UTERINO		
3	0.10775	±	0.0314
4	0.13025	±	0.0353
5	0.1330	±	0.0243
6	0.113	±	0.0565
7	0.144	±	0.0263

Cada valor representa la media y el error estándar ( $\bar{X} + E.E.$ ) de 5 determinaciones ensayadas por duplicado. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas, en la actividad colagenolítica entre los días estudiados.

## 2. DETECCIÓN DEL ACTIVADOR DEL PLASMINÓGENO

En los geles de poliacrilamida-SDS copolimerizados con gelatina y el activador del plasminógeno, si esta presente el activador del plasminógeno, el plasminógeno es convertido a plasmina y está hidroliza a la gelatina observándose una banda de lisis (zonas claras). También se pueden observar otras bandas de lisis debidas a gelatinasas, por ello se incuban geles paralelos con un inhibidor del activador del plasminógeno, en nuestro caso amilorida. Al comparar ambos geles (con inhibidor y sin inhibidor) se detectó en el líquido uterino una banda de lisis inhibible con amilorida por lo que corresponde al activador del plasminógeno tipo

urocinasa, y presentó una masa molecular de 76 kDa (figura 4).

En la figura 4 se observa que esta enzima (76 kDa) se presentó en todos los días estudiados. La intensidad de la banda del hidrolizado es similar en los días 3, 4 y 7, y se observa una ligera disminución de la intensidad al día 5 y 6.

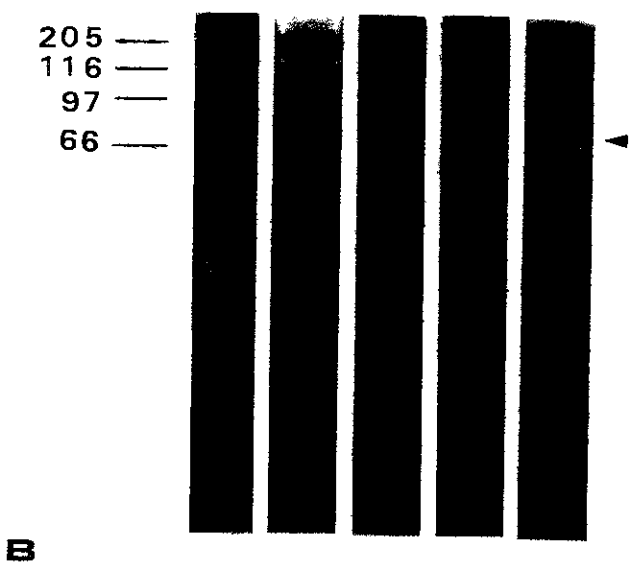
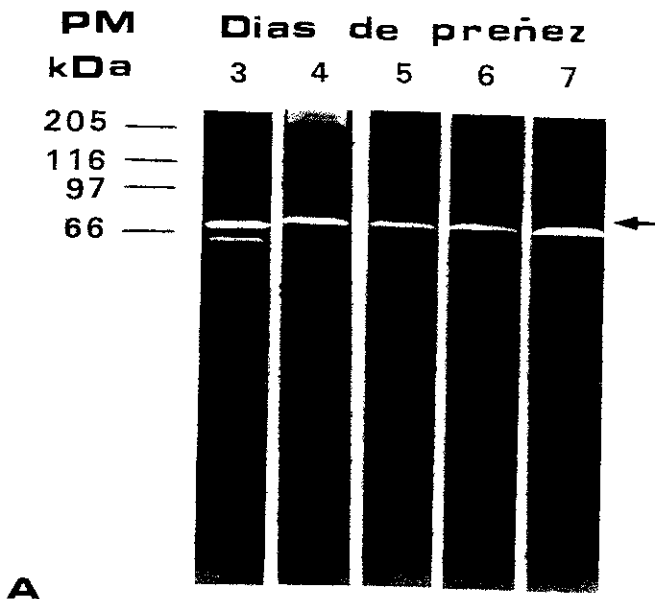


Figura 4. Detección del activador del plasminógeno en el líquido uterino. En geles de poliacrilamida-SDS al 10%, copolimerizados con gelatina más plasminógeno. Se observa una banda de digestión (A) que corresponde al activador del plasminógeno tipo urocinasa (flecha) puesto que fue inhibida por amilorida (cabeza de flecha) (B).

### 3. PATRÓN ELECTROFORÉTICO DE GELATINASAS DURANTE LA PREÑEZ TEMPRANA

Los resultados del análisis electroforético de los geles de poliacrilamida-SDS copolimerizados con gelatina, obtenidos de líquido uterino se muestra en la figura 5, y los del epitelio en la figura 6.

En el análisis de los zimogramas correspondientes, distinguimos la presencia de varias gelatinasas dependientes de metales (metaloproteinasas), inhibidas al ser incubadas con EDTA 60 mM. Las bandas claras indican la posición del hidrolizado in situ de la gelatina en el gel. Las bandas del hidrolizado varían entre 57 y 217 kDa.

Se observaron dos tipos de comportamientos en las bandas presentes en los zimogramas, hay bandas que se presentan durante todos los días estudiados y con poca variación en la intensidad del hidrolizado y otras que varían notablemente y/o se detectan solo en algunos días, describimos ambos tipos a continuación.

A). Bandas que no variaron durante los diferentes días estudiados.

a) La banda de mayor intensidad de digestión, es la de masa molecular aproximada de 68 kDa. En los geles se puede apreciar su actividad en todos los días estudiados, siendo ligeramente menor en el día 4 de preñez en el caso del líquido uterino (figura 5). Su comportamiento fue similar para todos los días estudiados en la porción epitelial (figura 6).

b) La siguiente banda en intensidad, es la de masa molecular aproximada de 73 kDa, de menor intensidad que la anterior. Presenta actividad en todos los días, con mayor intensidad de lisis en el día 7 de preñez en el líquido uterino (figura 5), y su comportamiento fue similar en la porción epitelial (figura 6).

c) La banda de masa molecular aproximada de 57 kDa, en la porción epitelial. Se presentó en todos los días ensayados, observándose una

epitelial. Su presencia es similar en todos los días estudiados (figura 6).

e) Banda de masa molecular aproximada de 119 kDa, en la porción epitelial. Aparece con poca intensidad, pero presente en todos los días ensayados (figura 6).

B) Bandas de hidrolizado que variaron en los diferentes días estudiados.

a) La banda de masa molecular alrededor de 99 kDa, en la porción epitelial. Se detectó en todos los días, excepto en el 5° día de preñez, que corresponde al día de la implantación en la rata, presenta además una ligera disminución en el día 7 de preñez (figura 6).

b) Banda de masa molecular de alrededor de 217 kDa, en la porción epitelial únicamente en los días 3 y 4 de preñez, con poca intensidad de lisis (figura 6).

c). Banda presente en el líquido uterino, de masa molecular de alrededor de 174 kDa. Se observa mayor intensidad de lisis en los días 4 y 7 de preñez, en los otros días prácticamente no se observa (figura 5).

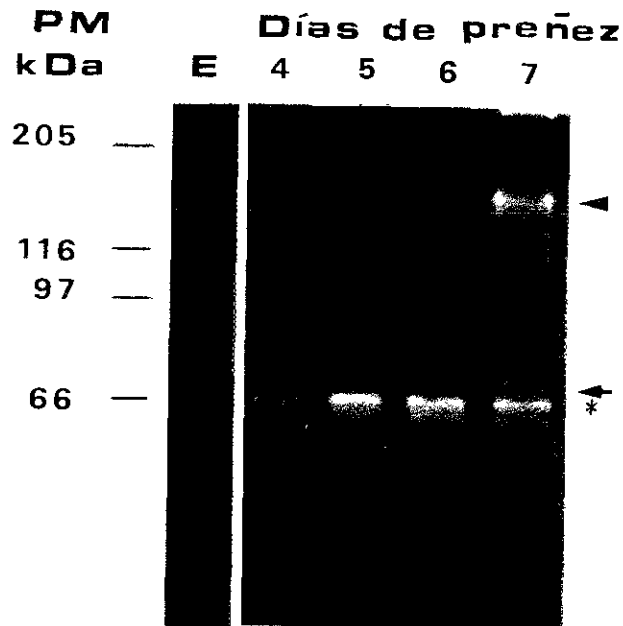


Figura 5. Detección de gelatinasas en el líquido uterino, se realizaron geles de poliacrilamida-SDS al 7% copolimerizados con gelatina. Las flechas indican la posición del hidrolizado *in situ* de la gelatina en el gel, de la proenzima de la gelatinasa A (MMP-2), y el asterisco nos indica la gelatinasa A en su forma activa. La cabeza de flecha indica una probable gelatinasa de 174 kDa. El primer carril (E) corresponde a los pesos moleculares( kDa) de los estándares: miosina 205,  $\beta$  galactosidasa 116, fosforilasa  $\beta$  97.4, albúmina bovina 66, albúmina huevo 45 y anhidrasa carbónica 29.



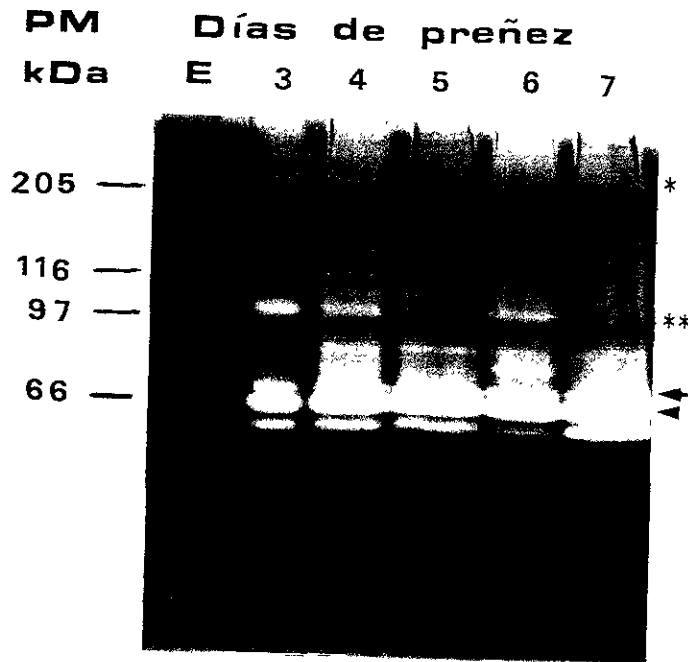


Figura 6. Detección de gelatinasas en el epitelio del endometrio. Se realizaron en geles de poliacrilamida-SDS al 7%, copolimerizados con gelatina. La flecha indica la banda de hidrolizado de la proenzima de la gelatinasa A (MMP-2) y de la enzima en su forma activa (cabeza de flecha). El asterisco nos indica la gelatinasa de 217 kDa presente únicamente en los días 3 y 4 de preñez. Se detectó también una banda de 99 kDa que desaparece el día 5 de preñez (\*\*\*) probablemente corresponde a la gelatinasa B (MMP 9). El primer carril del gel (E) corresponde a los estándares.

## IX. DISCUSIÓN

Durante la preñez temprana, el útero es sensible a la presencia del blastocisto únicamente durante un tiempo determinado, en el que permite la nidación. Este cambio transitorio de sensibilidad uterina depende de la capacidad del útero para recibir y responder a las señales bioquímicas del blastocisto. Estas señales podrían actuar directamente sobre las células estromales, o ser transmitida a través del epitelio, o bien sobre el epitelio y éste liberaría otro mensaje a los tejidos profundos del útero. Las evidencias sugieren que las células epiteliales transmiten el mensaje desde el blastocisto al estroma. Esta propiedad del epitelio, en la rata y el ratón depende de la acción de los estrógenos y la progesterona. Es conocido que las células uterinas son blanco de los estrógenos y de la progesterona, y estos a su vez regulan las propiedades de la membrana apical, el metabolismo y la proliferación de las células epiteliales. Las células epiteliales de revestimiento y glandulares colaboran en crear un medio ambiente molecular adecuado para el blastocisto. También es conocido que los esteroides sensibilizan al útero para la implantación; pues un día antes de la sensibilidad uterina, las células estromales sintetizan DNA y proliferan bajo el control de los estrógenos y la progesterona. La máxima sensibilidad uterina en la rata es al 5° día de preñez (Moulton y Koenig, 1986). En este día el blastocisto también desencadena la reacción decidual, y la capacidad para esta respuesta en el endometrio es óptima (Psychoyos, 1986).

En el líquido uterino, se detectó al activador del plasminógeno tipo urocinasa, con una masa molecular de alrededor de 76 kDa, durante los días estudiados, probablemente sea equivalente al activador del plasminógeno tipo urocinasa de 70 kDa reportado por Stuart y col., (1983) en el epitelio y el líquido uterino de ratas inmaduras o tratadas

con estrógenos. Cabe mencionar que la porosidad de los geles varía con la marca de reactivo utilizado y la copolimerización con gelatina y plasminógeno, alteran el corrimiento en el gel.

En los roedores la primera señal del proceso de la implantación inicia con el incremento de la permeabilidad vascular endometrial. En los ratones ocurre en la tarde del día 4 y en la rata en la tarde del día 5, lo que es acompañado con el paso de proteínas séricas, como el plasminógeno y la albúmina a los tejidos (Psychoyos, 1973), como consecuencia el plasminógeno aumenta su concentración en el líquido uterino. Lo anterior implica que tanto en el tejido como en el líquido uterino hay mayor capacidad de activar a las metaloproteinasas, al día 5 y 6 de preñez, ya que están presentes las dos primeras enzimas que inician la activación de diversas proteasas que degradan a la matriz extracelular: el activador del plasminógeno y el plasminógeno.

Se ha descrito que existe un gradiente de concentración de proteasas a través del útero desde el miometrio al epitelio y de aquí al líquido uterino, siendo 10 veces mayor en el líquido con respecto al miometrio (Stuart y col., 1983). Cabe mencionar que en nuestro trabajo faltó por hacer la detección del activador del plasminógeno en la porción epitelial, en donde es probable encontrarlo y posiblemente sea la fuente principal de esta enzima en el líquido uterino.

Además del activador del plasminógeno se detectaron diversas metaloproteinasas, tanto en el líquido como en el epitelio uterino en nuestro estudio, de ellas es importante señalar:

1. Las bandas de alrededor de 73 y 68 kDa presentes en el líquido y el epitelio uterino, probablemente correspondan a la proenzima y enzima de la gelatinasa A ó MMP-2, reportadas por Das y col., (1997), Bishop y Campana, (1996). Ambas bandas migran muy cercanamente, teniendo una menor intensidad (la de mayor masa molecular) que la otra, es factible que esta sea la proenzima y la otra de mayor intensidad de digestión sea

la enzima activa. También en los estudios de Martelli y col., (1996), se detectó una gelatinasa de origen uterino, que migró a 66 kDa. Por otro lado también, se conoce que la gelatinasa A se libera en forma latente como una proenzima, activada por metaloproteinasas-tipo membrana (MMP-MT), o por la plasmina (Lala y Hamilton., 1996).

La presencia constante y abundante en los días de preñez estudiados de la gelatinasa A ó la MMP-2, tanto en la porción epitelial como en el líquido uterino, parece indicar que son producidas y secretadas por las células epiteliales, sin descartar la posibilidad de que se sumen secreciones de las células estromales. El haber detectado esta metaloproteinasa en forma abundante durante todo el periodo peri-implantación, nos sugiere que puede estar participando en todos los procesos de remodelación tisular de este periodo, es decir en la adquisición de la receptividad, la decidualización y la invasión del trofoblasto. La primera ocurre del día 3 al 5 de preñez, en este último día el útero es receptivo. La decidualización se inicia en el útero en respuesta a los estímulos embrionarios en la mañana del día 5, inicialmente como cambios metabólicos y bioquímicos, los que posteriormente se traducen en cambios celulares, observándose las primeras células deciduales a la media noche del mismo día (Heald, 1976). Estas células remodelan profundamente la matriz extracelular asociadas a ellas y se tiene evidencia que en los úteros de ratón que al momento están sobrellevando la decidualización también, hay remodelación de los componentes de la matriz extracelular (Das y col., 1997). La invasión del endometrio por el trofoblasto inicia poco después de la adhesión firme del blastocisto al útero, esta adhesión ocurre en la tarde del día 6, posteriormente el blastocisto invade al endometrio.

Otros estudios han detectado la expresión de la MMP-2 (gelatinasa A) y los TIMP 1, 2 durante el periodo de peri-implantación en el intervalo del 5.5 al 8.5 días de preñez en el ratón (Alexander y col., 1996, citado por Das y col., 1997).

2. En el líquido uterino, se presentó una banda de 174 kDa, que parece ser inhibida por altas concentraciones de estrógenos, pues no esta presente en el día 5 de preñez, donde predomina la acción de estrógenos, y nuevamente aparece con mayor intensidad a partir del día 6 de preñez. Esta metaloproteinasa probablemente sea de origen linfomieloide o bien provenga del suero, pues no está presente en la porción epitelial del útero. Y probablemente interviene en todos los procesos de remodelación de los tejidos uterinos, como es la receptividad uterina, en el proceso de la implantación, e inicio de la decidualización.

3. A pesar de encontrar variaciones en los tipos de gelatinasas presentes en el líquido uterino durante la preñez temprana, no encontramos cambios en la actividad colagenolítica total. Es posible que la pérdida o disminución de algunas colagenasas sea compensada por otras. Además la especificidad o sitios de reconocimiento en el sustrato puede variar en las distintas metaloproteinasas, y el sustrato utilizado por nosotros, quizás solo sea adecuado para algunas de ellas. Por otra parte, la enzima que presenta mayor actividad (la de 68 kDa) prácticamente no varía en los días estudiados y puede estar ocultando las variaciones debidas a otras enzimas.

4. En la porción epitelial se presentó una metaloproteinasa de 217 kDa, presente únicamente los días anteriores al día de la implantación. Esta banda disminuye en intensidad del día 3 al 4 y al día 5 prácticamente se pierde, es posible que los estrógenos inhiban su expresión en el epitelio uterino. Y es probable que esta metaloproteinasa intervenga en la adquisición de la receptividad uterina, por el hecho de haberla detectado durante el periodo previo a la implantación. La metaloproteinasa es producto de las células epiteliales es factible que no se secrete a la luz uterina, o bien podría ser degradada rápidamente en el líquido uterino, donde no la encontramos (Mahfoundi y col.1994).

5. La gelatinasa de 99 kDa, detectada en el epitelio, probablemente corresponda a la gelatinasa B ó MMP-9 reportada por Martelli y col.(1993), Bishop y Koenig.(1996), Lala y Hamilton (1996), Das y col. (1997), estos últimos detectaron a la MMP-9 en el útero de ratón, en las células estromales subepiteliales cercanas al blastocisto en el sitio de la implantación, en el día 5 de preñez. Por otra parte, la máxima síntesis de gelatinasa B por parte de las células epiteliales glandulares del endometrio humano, está asociada con altas concentraciones de estrógenos, mientras que su secreción es estimulada por altas concentraciones de progesterona (Jerzioska y col.1996). Aunque la detectamos durante el periodo peri-implantación, no la detectamos en el día 5 de preñez (día de inicio de la implantación en la rata), tal vez a que es secretada o a que deja de producirse o ambas. Lo que si es evidente que aunque sea de origen epitelial, no se secreta a la luz uterina o si se secreta tal vez sea degradada rápidamente.

En la actualidad hay evidencias que en el citotrofoblasto temprano de humano, la gelatinasa B, es mediadora de la invasión del citotrofoblasto, donde la forma activa de la gelatinasa de 92 kDa, esté asociada con células invasivas. Asimismo la invasión trofoblástica puede ser regulada por factores que controlan la activación de las metaloproteinasas y la concentración de los inhibidores de metaloproteinasas, que modulan su actividad (Clifford y col.1991). Lo anterior sugiere que la reaparición de la gelatinasa B a los días 6 y 7 de preñez en el epitelio uterino, favorece la invasión del endometrio.

6. En la porción epitelial detectamos otras metaloproteinasas de aproximadamente 119 y 83 kDa. Presentes en todos los días ensayados. Sugiriendo que intervenga en todos los procesos de remodelación de tejidos, durante la receptividad uterina, implantación y decidualización. Probablemente sea de origen epitelial y no se vierta a la luz uterina, pues no la detectamos en el líquido uterino. Tal parece que no es inhibida por altas concentraciones de estrógenos.

7. Otras de las metaloproteinasas de masa molecular de alrededor de 57 kDa, pudieran tener un comportamiento biológico semejante a las ya mencionadas, con la particularidad de que son dependientes de altas concentraciones de estrógenos, pues en el día 6 disminuyó su intensidad, donde los niveles de estrógenos disminuyen a valores basales de secreción.

En nuestro estudio las diferencias en la masa molecular de las bandas, con respecto a los pesos moleculares reales de las metaloproteinasas, corresponden con lo encontrado por otros autores. Con la limitante intrínseca de la técnica, donde la migración de las bandas en geles de poliacrilamida-SDS copolimerizados con gelatina, tiene los siguientes inconvenientes:

El cálculo de la masa molecular de las bandas de digestión, es una aproximación de la verdadera masa molecular de la enzima, porque el sustrato utilizado (en este caso la gelatina), influye en la migración electroforética de las proteínas.

El detergente SDS (dodecil sulfato de sodio) activa artificialmente a las proenzimas y es difícil determinar si las metaloproteinasas secretadas, corresponden a la proenzima o a la enzima activa. Además de que la migración de las proteínas en los geles con SDS depende de la cantidad de detergente que se una a las proteínas; por lo que existe controversia de que la masa molecular sea determinada adecuadamente por este sistema (Martelli y col. 1993 ).

Aunque es discutible que la zimografía sea una técnica semicuantitativa para detectar cambios de densidad de actividad de las metaloproteinasas; resulta ser una buena herramienta para detectar la presencia de metaloproteinasas, y a pesar de las limitaciones que tiene el uso de la zimografía en geles con SDS, nuestras observaciones son consistentes con lo reportado por otros autores.

Sería interesante realizar más estudios para caracterizar a la gelatinasa de 217 y 174 kDa, así como hacer una mutación al gene de la gelatinasa A y de la gelatinasa B, y ver como afectan a la adquisición de la receptividad uterina y al proceso de la implantación y la respuesta materna (decidualización).

El hecho de que algunas proteasas del epitelio uterino se presenten también en el líquido uterino y otras no, sugiere que el proceso de secreción en este tejido sea vectorial, es decir que solo algunas proteínas como la gelatinasa A sean secretadas en la porción apical del epitelio y otras en cambio puedan secretarse predominantemente a la región basal dirigidas al estroma, este puede ser el caso de la gelatinasa B, la que Das, y col. (1997) detectaron en el estroma subepitelial.

Por otra parte se detectaron características propias en el patrón electroforético de metaloproteinasas del líquido y epitelio uterino durante la fase de receptividad endometrial al 5° día de preñez. En el epitelio se pierden las bandas de 217 y 99 kDa, la última corresponde a la MMP-9, mientras que en el líquido uterino disminuye la actividad del activador del plasminógeno y se pierde la banda de 174 kDa.

Es importante señalar que las mórulas entran al útero en la noche del 4° día donde se convierte en blastocisto, por lo que al 5° día entrará en contacto con el líquido uterino y éste presenta un medio menos variado en gelatinasas comparado con el día anterior. Al quinto día en la mañana, el blastocisto flota en el líquido uterino y en la tarde se une en forma laxa al epitelio uterino, las microvellocidades de ambos se interdigitan.

No se sabe si las gelatinasas presentes en el líquido uterino al 5° día tengan alguna repercusión sobre el blastocisto, aunque podrían modificar algunos de los componentes del líquido uterino que lo afecten.



## X. CONCLUSIONES

Consideramos que lo relevante de nuestro estudio, es la detección de variaciones en los tipos de metaloproteinasas asociadas con la receptividad uterina y otros procesos propios de la preñez temprana; dentro de lo que podemos señalar lo siguiente:

- Detectamos la presencia de un activador del plasminógeno tipo urocinasa, en el líquido uterino, con masa molecular de 76 kDa, cuya actividad disminuye en la fase de receptividad uterina.
- Se presentaron 2 gelatinasas con masa molecular alrededor de 76 y 68 kDa que probablemente correspondan a la proenzima y enzima de la gelatinasa A o MMP-2, ambas fueron abundantes en el epitelio y líquidos uterinos, en todos los días estudiados.
- En el líquido uterino se presentó una metaloproteinasa de masa molecular aproximada de 174 kDa, esta se pierde al día 5 de preñez y posiblemente participa en todos los procesos de remodelación de tejidos durante el periodo peri-implantación.
- En la porción epitelial se detectó una metaloproteinasa de masa molecular aproximada de 217 kDa, solo durante los días previos a la implantación (día 3 y 4 de preñez), es posible que intervenga en la adquisición de la receptividad uterina.
- Se presentó en la porción epitelial una gelatinasa de masa molecular aproximada de 99 kDa, la cual quizás sea la gelatinasa B o MMP-9. Ésta se detecta los días 3,4,6 y 7 de preñez, sin observarse al día de la receptividad uterina y es probable que participe en los procesos de la receptividad uterina, decidualización e invasión del trofoblasto.
- Además se detectaron en la porción epitelial a las

los procesos de remodelación de tejidos uterinos, durante el periodo peri-implantación.

- No encontramos diferencia significativa ( $P > 0.05$ ) de actividad colagenolítica entre los diferentes días estudiados.
- En el día de la receptividad uterina se detectó un patrón electroforético de proteinasas propia de esta condición fisiológica.

J. Reprod. Fert. 107: 43-51.

Lala P.K., Hamilton G. (1996). Growth factors, proteases and protease inhibitors in the maternal-fetal dialogue.

Placenta 17: 545-555.

Librach C., Werb Z., Fitzgerald M., Chiu K., Corwin N., Esteves R., Grobelny., Galardy R., Damsky C., Fisher S. (1991). 92 kDa Type IV collagenase Mediates invasion of human cytotrophoblasts.

J.Cell. Biol. 113 (2):437-449.

Mahfoundi A., Nicollier M., Beck L., Mularoni A., Cypriani B., Fauconnet S., Adessi L. (1994). Effect of progesterone on proteins vectorially secreted by glandular epithelial cells of guinea-pig endometrium: modulation by homologous stroma.

J. Reprod. Fert. 100: 637-644.

Marbaix E., Donnez J., Courtoy P., Eeckhout Y. (1992). Progesterone regulates the activity of collagenase and related gelatinases A and B in human endometrial explants.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80:11789 - 11793.

Martelli M., Campana A., Bishop P. (1993). Secretion of matrix metalloproteinases by human endometrial cells in vitro.

J. Reprod. Fert. 98: 67 - 76.

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

Masui Y., Takemoto T., Sakakibara S., Hori H., Nagai Y. (1977).  
Synthetic substrates for vertebrate collagenase.

Biochem. Med.17:215-221.

Moulton B., Koenig B. (1986). Biochemical responses of the luminal  
epithelium and uterine sensitization.

Ann. N. Y. Acad. Sci. 476:95-109.

Myers D., Clark D., Hurst P. (1990). Decreased collagen concentration in  
rata uterine implantation sites compared with non-implantation tissue at  
days 6-11 of pregnancy.

Reprod. Fertil. Dev. 2(6):607-612.

Mylona P., Kielty C., Hoyland J., Aplin J.D. (1995). Expression of type  
VI collagen mRNAs in human endometrium during the menstrual cycle  
and first trimester of pregnancy.

J. Reprod. Fert. 103: 159 - 167.

Parr M.B., Parr E. (1986). Endocytosis in the rat uterine epithelium at  
implantation .

Ann.N.Y.Acad.Sci. 476 :110-121.

Pascal A., Huarte J., Belin D., Vassalli D.(1987). Plasminogen  
activators in tissue remodeling and invasion: mRNA localization in

mouse ovaries and implanting embryos.

J. Cell. Biol. 109:2471-2479.

Psychoyos A., (1973). Hormonal control of ovoimplantation.

Vitam. Horm. 31: 201-256.

Psychoyos A., (1986). Uterine receptivity for nidation.

Ann. N.Y. Acad. Sci. 476:36-42.

Rinkenberger J., Cross J., Werb Z. (1997). Molecular genetics of implantation in the mouse.

Devel. Gen. 21 :6-20

Schultz G., Edwards D. (1997). Biology and genetics of implantation.

Devel. Gen. 21:1-5.

Sing M.M., Chauhan S.C., Trivedi R.N., Maitra S.C., Kamboj V.P. (1996). Correlation of pinopod development on uterine luminal epithelial surface with hormonal events and endometrial sensitivity in rat.

Eur. J. Endocrinol. 135:107-117.

Stewart C., Cullinan E. (1997). Preimplantation development of the mammalian embryo and its regulation by growth factors.

Devel. Gen. 21 : 91-101.

Stuart W. P., Katzenellenbogen B., Kneifel M., Mangel W. (1983). Plasminogen activators in tissues of the immature and estrogen-stimulated rat uterus and in uterine luminal fluid: characterization and properties.

Endocrinology. 112 ( 3 ): 890-897

Suginami H. (1995). Endocrine regulation of early embryonic development and implantation.

Horm. Res. 44 ( 2 ): 1-3.

Surani M.A.H. (1977). Qualitative and quantitative examination of the proteins of rat uterine luminal fluid during pro-oestrus and pregnancy and comparison with of serum.

J. Reprod. Fert.50:281-287.

Tabibzadesh S., Babaknia A. (1995). The signals and molecular pathways involved in implantation a symbiotic interaction between blastocyst and endometrium involving adhesion and tissue invasion.

Hum. Reprod. 10 ( 6 ): 1574-1602.

Yoshinaga K., Hawkins R., Stocker J. (1969). Estrogen secretion by the rat ovary in vitro during the estrous cycle and pregnancy.

Endocrinology 85 :102 - 112.

Zhang X., Shu M., Ross H., Kennedy T. ( 1996). Regulation of plasminogen activator in rat endometrial stromal cells: the role of prostanglandin E 2.

Biol. Reprod. 54: 1046-1051.

## XI. REFERENCIAS

Aplin J.D. (1991). Glycans as biochemical markers of human endometrial secretory differentiation.

J. Reprod. Fert. 91:525-541.

Bany B., Mcrae A. (1992). Uterine uptake of alfa 2-macroglobulin and alfa 1 -proteinase inhibitor from the blood during early implantation in the mouse.

Biol. Reprod. 47:514-519.

Behrendtsen O., Alexander C., Werb Z. (1992). Metalloproteinases mediate extracellular matrix degradation by cells from mouse blastocyst outgrowths.

Development. 114: 447-456.

Beier H., Beier K., Sterzik K. (1996). Nuevo enfoque diagnóstico a la fisiopatología de la receptividad endometrial.

Bischof P., Campana A. (1996). A model for implantation of the blastocyst and early placentation.

Human. Reprod. Update.2(3):262-270



Blankenship T., Given R. (1995). Loss of laminin and type IV collagen in uterine luminal epithelial basement membranes during blastocyst implantation in the mouse.

Anat. Rec. 243: 27 - 36.

Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microquantities of protein.

Anal. Biochem 72:248.

Burrows T.D., King A., Loke Y.W. (1996). Trophoblast migration during human placental implantation.

Hum. Reprod. Update.2(4):307-321.

Clifford L., Werb Z., Fitzgerald M., Chiu K., Corwin N., Esteves R., Grobelny D., Galardy R., Damsky C., (1991). 92-kDa type collagenase mediates invasion of human cytotrophoblasts.

J. Cell. Biol. 113(2):437-49.

Daniel W.W. (1983). Biestadística, base para el análisis de las ciencias de la salud. 4° reimpresión. Editorial Limusa, México p.193-241.

Das S., Shojiro Y., Jue W., Edwards D., Nagase H., Dey S. (1997). Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in the mouse uterus during the peri-implantation period.

Devel. Gen. 21: 44 - 45.

Fagg B., Martin L., Rogers L., Clark B., Quarmby V. (1979). A simple method for removing the laminal epithelium of the mouse uterus biochemical studies.

J. Reprod. Fert. 57:335

Gilbert S. (1994). Developmental biology. Edición cuarta. Sinauer Associates Inc. Publisher. U.S.A., pp.177-183.

Gray R.D., Saneii H. (1982). Characterization of vertebrate collagenase activity by high-performance liquid chromatography using a synthetic substrate.

Anal. Biochem.120:339-346.

Harvey. M., Leco. K., Arcellana-Panililio. M., Zhan. X., Edwards D., Schultz. G. (1995). Proteinase expression in early mouse embryos is regulated by leukaemia inhibitory factor and epidermal growth factor.

Development. 121 :1005-1014.

Heald J., (1976). Biochemical aspects of implantation.

J. Reprod. Fertil., Suppl. 25:29-52

Jeziorska M., Nagase H., Salamonsen L., Woolley D. (1996). Immunolocalization of the matrix metalloproteinases gelatinase B and stromelysin 1 in human throughout the menstrual cycle.

J. Reprod. Fert. 107: 43-51.

Lala P.K., Hamilton G. (1996). Growth factors, proteases and protease inhibitors in the maternal-fetal dialogue.

Placenta 17: 545-555.

Librach C., Werb Z., Fitzgerald M., Chiu K., Corwin N., Esteves R., Grobelny., Galardy R., Damsky C., Fisher S. (1991). 92 kDa Type IV collagenase Mediates invasion of human cytotrophoblasts.

J.Cell. Biol. 113 (2):437-449.

Mahfoundi A., Nicollier M., Beck L., Mularoni A., Cypriani B., Fauconnet S., Adessi L. (1994). Effect of progesterone on proteins vectorially secreted by glandular epithelial cells of guinea-pig endometrium: modulation by homologous stroma.

J. Reprod. Fert. 100: 637-644.

Marbaix E., Donnez J., Courtoy P., Eeckhout Y. (1992). Progesterone regulates the activity of collagenase and related gelatinases A and B in human endometrial explants.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80:11789 - 11793.

Martelli M., Campana A., Bishop P. (1993). Secretion of matrix metalloproteinases by human endometrial cells in vitro.

J. Reprod. Fert. 98: 67 - 76.

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

Masui Y., Takemoto T., Sakakibara S., Hori H., Nagai Y. (1977).  
Synthetic substrates for vertebrate collagenase.

Biochem. Med.17:215-221.

Moulton B., Koenig B. (1986). Biochemical responses of the luminal  
epithelium and uterine sensitization.

Ann. N. Y. Acad. Sci. 476:95-109.

Myers D., Clark D., Hurst P. (1990). Decreased collagen concentration in  
rata uterine implantation sites compared with non-implantation tissue at  
days 6-11 of pregnancy.

Reprod. Fertil. Dev. 2(6):607-612.

Mylona P., Kielty C., Hoyland J., Aplin J.D. (1995). Expression of type  
VI collagen mRNAs in human endometrium during the menstrual cycle  
and first trimester of pregnancy.

J. Reprod. Fert. 103: 159 - 167.

Parr M.B., Parr E. (1986). Endocytosis in the rat uterine epithelium at  
implantation .

Ann.N.Y.Acad.Sci. 476 :110-121.

Pascal A., Huarte J., Belin D., Vassalli D.(1987). Plasminogen  
activators in tissue remodeling and invasion: mRNA localization in

mouse ovaries and implanting embryos.

J. Cell. Biol. 109:2471-2479.

Psychoyos A., (1973). Hormonal control of ovoimplantation.

Vitam. Horm. 31: 201-256.

Psychoyos A., (1986). Uterine receptivity for nidation.

Ann. N.Y. Acad. Sci. 476:36-42.

Rinkenberger J., Cross J., Werb Z. (1997). Molecular genetics of implantation in the mouse.

Devel. Gen. 21 :6-20

Schultz G., Edwards D. (1997). Biology and genetics of implantation.

Devel. Gen. 21:1-5.

Sing M.M., Chauhan S.C., Trivedi R.N., Maitra S.C., Kamboj V.P. (1996). Correlation of pinopod development on uterine luminal epithelial surface with hormonal events and endometrial sensitivity in rat.

Eur. J. Endocrinol. 135:107-117.

Stewart C., Cullinan E. (1997). Preimplantation development of the mammalian embryo and its regulation by growth factors.

Devel. Gen. 21 : 91-101.

Stuart W. P., Katzenellenbogen B., Kneifel M., Mangel W. (1983). Plasminogen activators in tissues of the immature and estrogen-stimulated rat uterus and in uterine luminal fluid: characterization and properties.

Endocrinology. 112 ( 3 ): 890-897

Suginami H. (1995). Endocrine regulation of early embryonic development and implantation.

Horm. Res. 44 ( 2 ): 1-3.

Surani M.A.H. (1977). Qualitative and quantitative examination of the proteins of rat uterine luminal fluid during pro-oestrus and pregnancy and comparison with of serum.

J. Reprod. Fert.50:281-287.

Tabibzadesh S., Babaknia A. (1995). The signals and molecular pathways involved in implantation a symbiotic interaction between blastocyst and endometrium involving adhesion and tissue invasion.

Hum. Reprod. 10 ( 6 ): 1574-1602.

Yoshinaga K., Hawkins R., Stocker J. (1969). Estrogen secretion by the rat ovary in vitro during the estrous cycle and pregnancy.

Endocrinology 85 :102 - 112.

Zhang X., Shu M., Ross H., Kennedy T. ( 1996). Regulation of plasminogen activator in rat endometrial stromal cells: the role of prostanglandin E 2.

Biol. Reprod. 54: 1046-1051.

## XII. APENDICE

### ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

Preparación de reactivos.

A). Acrilamida - bisacrilamida 30 : 0.8.

Acrilamida                      30 g.

Bisacrilamida                  0.8 g.

-Aforar a 100 ml con agua desionizada

Filtrar con papel Watman No.1

Guardar en frasco ambar a 4° C.

B). TEMED

Estable sin diluir a 4° C en frasco oscuro.

C). Persulfato de amonio (1.5 % p/v).

0.15 g de persulfato de amonio

disuelto en 100 ml de agua bidestilada

Es inestable, preparar antes de usar.

D). SDS 10% p/v (dodecil sulfato de sodio).

SDS                                  10 g.



Agua bidestilada 100 ml.

E). Amortiguador para el gel concentrador.

Solución madre

TRIS - HCl 0.5 M (pH 6.8)

6 g de TRIS disolver en 40 ml de agua bidestilada

titular a pH 6.8 con HCl 1 M

Ajustar a 100 ml con agua

Filtrar en papel Watman No.1

Almacenar a 4° C.

F). Amortiguador para el gel de resolución .

Solución madre.

TRIS - HCl 1.5 M pH 8.8

18.5 g de TRIS

48 ml de HCl 1 M

Ajustar a 100 ml con agua bidestilada

Filtrar con papel Watman No.1

Almacenar a 4° C en frasco oscuro.

G). Amortiguador de reservorio o de corrida.

Solución madre.

TRIS 0.25 mM, glicina 1.92 M, SDS 1%, pH 8.3

Tris            30.3 g

glicina        144 g

SDS            10 g

Aforar a 1 l con agua bidestilada

Almacenar a 4° C

Diluir 1:10 con agua bidestilada para su uso.

H). Amortiguador de muestra.

Tris -HCl 0.5 M , pH 6.8        2.5 ml.

glicerol                                2 ml

SDS 10%                                4 ml

Agua bidestilada                      1.5 ml.

I). Medio de incubación.

TRIS - HCl pH 7.4

Tris base    3 g

NaCl        4.38 g

CaCl<sub>2</sub>      0.554 g

Azida de Na    0.1 g

Agua bidestilada 500 ml (aforar).

J). Solución teñidora de geles.

50% metanol	500 ml
30% ácido acético	300 ml
10% glicerol	100 ml
10% azul de Coomasie	
R-250	100 ml

Filtrar e incubar los geles 20 minutos.

K). Solución desteñidora de geles.

10% ácido acético	100 ml
10% metanol	100 ml
10% glicerol	100 ml.

### PREPARACIÓN DE GELES PARA ZIMOGRAMA

A). Zimograma al 7% con gelatina o caseína.

	Amort. de Separación	Amort. Concentrador
	7%	4%
Acrilamida bis-acrilamida (30:0.8)	2.34 ml	0.67 ml
Amort. gel separador	2.5 ml	-

Amort. gel concentrador	-	1.25 ml
Agua bidestilada	2.15 ml	2.83 ml
Gelatina o caseína 4 mg/ml	2.5 ml	-
SDS 10%	0.1 ml	0.05 ml
Persulfato amonio 1.5%	0.5 ml	0.25 ml
TEMED	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l.

B). Zimograma al 10 % con activador de plasminogéno .

	Amort.separación	Amort.concentrador
	10%	4%
Acilamida bis-acilamida (30:0.8)	3.33 ml	0.67 ml
Amort.separador	2.5 ml	-
Amort.concentrador	-	1.25 ml
Plasminógeno 2.5 mg/ml	1 ml	-
Agua bidestilada	70 $\mu$ l	2.83 ml
SDS 10%	0.1 ml	0.05 ml
Gelatina 60 mg/ 10ml	2.5 ml	-
Persulfato de amonio 1.5 %	0.5 ml	0.25 ml
TEMED	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l

## DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES (método de Bradford)

### A). Reactivo de Bradford.

Azul de Coomassie G 250	10 mg
95% etanol	5 ml
85% ácido fosfórico	10 ml
Agua bidestilada (aforar)	100 ml.

### B). Estándar de proteína (100 µg/ml).

BSA (albúmina suero de bovino)	3 mg /10 ml sol. NaCl <sub>2</sub> 0.9%
Diluir 1:3 antes de trabajar (NaCl <sub>2</sub> 0.9%).	

### C). Curva estándar.

Concentración Proteína	Estandar	S.Salina 0.9%	R.Bradford
0 µg	0 µl	200µl	1.5 µl
4 µg	40 µl	160 µl	1.5 ml
8 µg	80 µl	120 µl	1.5 ml
12 µg	120 µl	80 µl	1.5 ml
16 µg	160 µl	40 µl	1.5 ml
20 µg	200 µl	0	1.5 ml

Lectura en espectrofotómetro a 595 nm.