

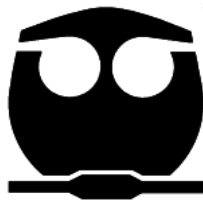


**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

EFFECTO DEL LÍQUIDO DE LA VESÍCULA SEMINAL EN
EL PATRÓN DE MUERTE CELULAR PROGRAMADA
DEL EPITELIO UTERINO DE LA RATA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACEÚTICA BIÓLOGA
P R E S E N T A
KARINA NAVA CARRILLO



MÉXICO D.F.

2009



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.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE	Prof. Enrique Moreno Saenz
VOCAL	Prof. Marco Antonio Cerbón Cervantes
SECRETARIO	Prof. Carmen Adriana Mendoza Rodríguez
1^{er} SUPLENTE	Prof. Rosario Adelaida Muñoz Clares
2^o SUPLENTE	Prof. José Ignacio Paramo Ramírez

Laboratorio de Biología de la Reproducción

Laboratorio 206, Edificio F

Facultad de Química, U.N.A.M.

ASESOR DEL TEMA

Carmen Adriana Mendoza Rodríguez

SUSTENTANTE

Karina Nava Carrillo

AGRADECIMIENTOS

Agradezco el apoyo económico proporcionado por PAPIIT (IN207207), PAIP (6190-08), UNAM y CONACYT (46759-Q y P47829-Q).

A la Dra. Adriana Mendoza por guiarme en cada paso de esta tesis, por toda su paciencia y consejos, pero sobre todo por brindarme su amistad.

Al Dr. Marco Cerbón por la oportunidad de integrarme a su equipo, por su apoyo, palabras de aliento y fe en mí.

A todos mis compañeros de laboratorio por hacer de cada día algo divertido, en especial a los que me apoyaron con las técnicas y el trabajo de laboratorio: Montse, Luciano, Carolina, Mónica, Elly e Ignacio.

A mis amigos: Adriana, Anita, Christian y Nancy. Por su amistad, por escucharme y aceptarme sin juzgarme, por sus consejos, ayuda y todas las risas.

Y especialmente a mis padres Juan y Elsa por su amor, dedicación y esfuerzos, por mostrarme el camino y por toda su paciencia.

DEDICADA

A la memoria de la persona que me brindó su amor sin condiciones, por estar a mi lado siempre que la necesite, porque creyó y confió en mí. Me haces falta tía Vero.

A mis padres por estar a mi lado siempre, por enseñarme a esperar algo mejor de cada día, por intentar entenderme, por soportar mi histeria durante toda la carrera y permanecer junto a mí sin rendirse.

A esa persona especial, por su amor, ternura y comprensión, por las palabras de aliento en los momentos difíciles, por ser mi refugio y por todo el tiempo juntos. Gracias por este inmenso amor que solo tú y yo comprendemos.

ÍNDICE

1. RESUMEN	3
2. INTRODUCCIÓN	7
3. ANTECEDENTES	9
3.1 MUERTE CELULAR PROGRAMADA/APOPTOSIS.....	9
3.2 CONTROL HORMONAL DE LA APOPTOSIS.....	12
3.2.1 Generalidades.....	12
3.2.2 Regulación de la apoptosis en el útero por hormonas esteroides.....	15
3.3 CICLO ESTRAL DE LA RATA	18
3.3.1 Niveleshormonales	18
3.3.2 Proliferación celular en el útero durante el ciclo estral.....	25
3.3.3 Muerte celular del útero durante el ciclo estral.....	26
3.4 APAREAMIENTO.....	28

3.5 MUERTE CELULAR Y APAREAMIENTO.....	29
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	32
5. OBJETIVOS	33
5.1 OBJETIVO GENERAL	33
5.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	33
6. HIPÓTESIS DE TRABAJO	34
7. MATERIAL Y MÉTODOS	35
7.1 ANIMALES DE ESPERIMENTACIÓN.....	35
7.2 OBTENCIÓN DEL LÍQUIDO DE LA VESÍCULA SEMINAL	35
7.3 INTRODUCCIÓN DEL LÍQUIDO DE LA VESÍCULA SEMINAL EN EL ÚTERO.....	36
7.4 PROCESAMIENTO DEL TEJIDO.....	37
7.5 DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE APOPTÓTICO	37
7.6 CUANTIFICACIÓN HORMONAL.....	38

7.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	39
8. RESULTADOS.....	40
8.1 EFECTO DEL LVS SOBRE LA APOPTÓISIS DEL EPITELIO UTERINO DE LA RATA.	40
8.2 NIVELES HORMONALES	45
9. DISCUSIÓN.....	46
10. CONCLUSIONES	50
11. PERSPECTIVAS	52
12. REFERENCIAS	53

1. RESUMEN

Durante el ciclo estral, el útero de la rata presenta cambios morfológicos importantes, incluyendo la proliferación celular de ambos epitelios, luminal y glandular, seguida de la degeneración de estos después de la ovulación como respuesta a los cambios cíclicos en los niveles hormonales. Ambos epitelios uterinos proliferan durante los días del metaestro y diestro, mientras que en el día del proestro únicamente prolifera el epitelio luminal. Se ha demostrado que el mayor índice apoptótico de ambos epitelios ocurre durante la etapa del estro.

Estudios realizados en nuestro laboratorio demostraron que el proceso de apareamiento induce un retraso significativo de la muerte celular programada del epitelio luminal uterino de la rata, durante la etapa del estro. El índice apoptótico del epitelio luminal a las 09:00 horas en ratas no apareadas es de $17.29 \pm 5.44\%$, mientras que en las ratas apareadas es de $1.18 \pm 0.09\%$ a la misma hora. Sin embargo, a las 13:00 horas del estro, el índice apoptótico es similar entre ambos grupos de animales, apareados y no apareados, por lo que se sugirió la posibilidad de que este retraso se deba a los factores contenidos en el eyaculado.

En el presente estudio se determinó la muerte celular del epitelio luminal y glandular del útero de la rata a las 09:00 horas de la etapa del estro, de ratas tratadas intrauterinamente con líquido de la vesícula seminal (LVS) a diferentes concentraciones y de ratas control. Se decidió emplear el LVS debido a la dificultad para obtener el eyaculado completo de la rata, además de que este líquido contribuye con más de la mitad del volumen seminal (50-80%). El índice apoptótico

se evaluó mediante la técnica de TUNEL. Esta técnica se basa en el marcaje de los extremos libres 3'-OH del ADN, generados por la degradación del ADN durante la muerte celular, con un nucleótido modificado (TMR red-dUTP) por medio de la enzima deoxinucleotidil transferasa terminal (TdT). El ADN marcado con dUTP-TMR red, es detectado y analizado mediante el uso de un microscopio de fluorescencia.

Las ratas utilizadas fueron de la cepa Wistar. El LVS se obtuvo de ratas macho jóvenes de fertilidad comprobada y descansadas una semana antes de su utilización; se extrajo mediante compresión suave de la vesícula seminal intacta y se solubilizó en solución fisiológica. El LVS recuperado se administró por inyección intrauterina a ratas hembras a las 17:00 horas del proestro, para lo cual las ratas hembras fueron anestesiadas con una mezcla de ketamina/xilazina (Dosis 120 mg Ketamina/Kg de peso corporal - 4 mg Xilazina/Kg de peso corporal). Se exteriorizó el cuerno uterino izquierdo a través de una incisión dorsal paraventral y se inyectó cerca del oviducto, 50 μ L de las diferentes concentraciones del LVS (sin diluir, dilución 1:2 o dilución 1:5 con solución salina 0.9%), o solamente el vehículo (ratas control). Se reintrodujo el útero en el espacio retroperitoneal y la piel se cerró con seda. Las ratas fueron sacrificadas a las 09:00 horas de la etapa del estro. Inmediatamente después del sacrificio, se obtuvo el útero y se procesó para el ensayo de TUNEL.

Los resultados mostraron que el LVS es capaz de retrasar la muerte del epitelio luminal uterino de la rata a las 09:00 horas del estro, de forma similar al proceso de apareamiento. Las ratas tratadas únicamente con el vehículo

presentaron en el epitelio luminal un índice apoptótico de $13.06 \pm 0.95 \%$, mientras que las ratas tratadas con LVS dilución 1:5 presentaron en el mismo tipo celular un índice apoptótico de $6.95 \pm 0.55\%$. En el epitelio luminal de úteros de ratas tratadas con LVS dilución 1:2 se observó un índice apoptótico de $4.84 \pm 0.95\%$ y para las tratadas con LVS concentrado el índice apoptótico fue de $4.26 \pm 0.43\%$. Para el epitelio glandular no se encontraron diferencias significativas en el índice apoptótico entre ninguno de los grupos estudiados. Ya que en este estudio se evitó completamente el estímulo vagino-cervical del apareamiento, los resultados sugieren que el retraso de la muerte celular del epitelio luminal uterino de las ratas apareadas es debido a los factores presentes en el LVS.

2. INTRODUCCIÓN

El ciclo estral de la rata tiene una duración de entre 4 y 5 días, los ciclos más comunes son los de 4 días, cada ciclo estral consta de cuatro etapas cada una con una duración de 24 horas, proestro (P), estro (E), metaestro (M) y diestro (D). Durante el ciclo estral, el útero de la rata presenta cambios morfológicos importantes que incluyen la proliferación celular en ambos epitelios, luminal (EL) y glandular (EG), seguida de la degeneración de éstos después de la ovulación, esto sucede como respuesta a los cambios cíclicos en los niveles de hormonas esteroides (Butcher et al., 1974; Spornitz et al., 1994; Mendoza-Rodríguez et al., 2002; Mendoza-Rodríguez et al., 2003a). Ambos epitelios uterinos proliferan durante los días del metaestro y diestro, mientras que en el día del proestro solamente prolifera el epitelio luminal (Mendoza-Rodríguez et al., 2003a). Se ha demostrado que el mayor índice apoptótico de ambos epitelios ocurre durante la etapa del estro (Burroughs et al., 2000; Mendoza-Rodríguez et al., 2002).

Se sabe que la rata hembra requiere de una adecuada estimulación vagino-cervical para iniciar los cambios neuroendocrinos requeridos para la correcta implantación del huevo en el útero. Se han demostrado los efectos del apareamiento en diferentes funciones cerebrales, incluyendo la expresión de genes, secreción de proteínas y activación de receptores (Kornberg and Erskine, 1994; Meredith et al 1998; Northrop and Erskine, 2008; Oberlander and Erskine, 2008). Los cambios que presenta el útero durante el ciclo estral permiten que el tejido esté listo para la fertilización y un posible embarazo. En ausencia de

embarazo, los cambios uterinos son reversibles, permitiendo la preparación para un embarazo en un próximo ciclo. Sin embargo, si el apareamiento y la fertilización ocurren, los cambios histomorfológicos en el útero toman otra ruta para soportar el embarazo (Zhang and Paria, 2006).

Se ha demostrado que el apareamiento induce cambios durante la etapa del estro, en el índice apoptótico del epitelio luminal uterino, caracterizado por un retraso en la muerte celular programada, comparado con el observado en animales no apareados. En animales no apareados, la muerte celular del epitelio luminal incrementa de forma gradual, desde las 03:00 horas del día del estro y continúa hasta las 13:00 horas del mismo día cuando alcanza su nivel máximo. En contraste, en animales apareados, el epitelio luminal permanece intacto hasta las 09:00 horas del día del estro. Sin embargo, a las 13:00 horas del estro, el índice apoptótico en animales apareados es similar al de los animales no apareados. (Mendoza-Rodríguez et al., 2008). Lo anterior indica que el proceso de apareamiento es capaz de retrasar la muerte celular del epitelio luminal uterino, pero no de inhibirla.

3. ANTECEDENTES

3.1 MUERTE CELULAR PROGRAMADA/APOPTOSIS

Existen dos tipos de muerte celular: la apoptosis y la necrosis (Ameisen, 1996; Barinaga, 1996), ambas involucran eventos bioquímicos y morfológicos que provocan la muerte celular (Figura 1). La necrosis es producida por un daño mecánico o por la exposición a sustancias tóxicas. Se caracteriza por la ruptura de la membrana celular debido a que el daño causa una alteración en el intercambio de iones y de agua, provocando la salida de los componentes celulares. Se presenta frecuentemente con una inflamación aguda e involucra a grupos celulares adyacentes (Ameisen, 1996).

En contraste, la apoptosis o muerte celular programada es una muerte que se produce de manera coordinada en células que se encuentran en exceso, que son peligrosas o que se encuentran dañadas (Thompson, 1995; Zörnig *et al.*, 2001) (Figura 1). Esta muerte celular ocurre a lo largo de la vida de los organismos multicelulares y se encuentra estrictamente regulada. Tiene un papel muy importante en el desarrollo normal y la homeostasis de los tejidos, así como durante la embriogénesis (Lang, 1997) e incluso durante la regresión de los órganos (Hsueh, 1994; Chun *et al.*, 1996; Evans-Storms y Cidlowski, 1996; Amsterdam *et al.*, 1997; Moulton *et al.*, 1997), e involucra generalmente células individuales de un tejido.

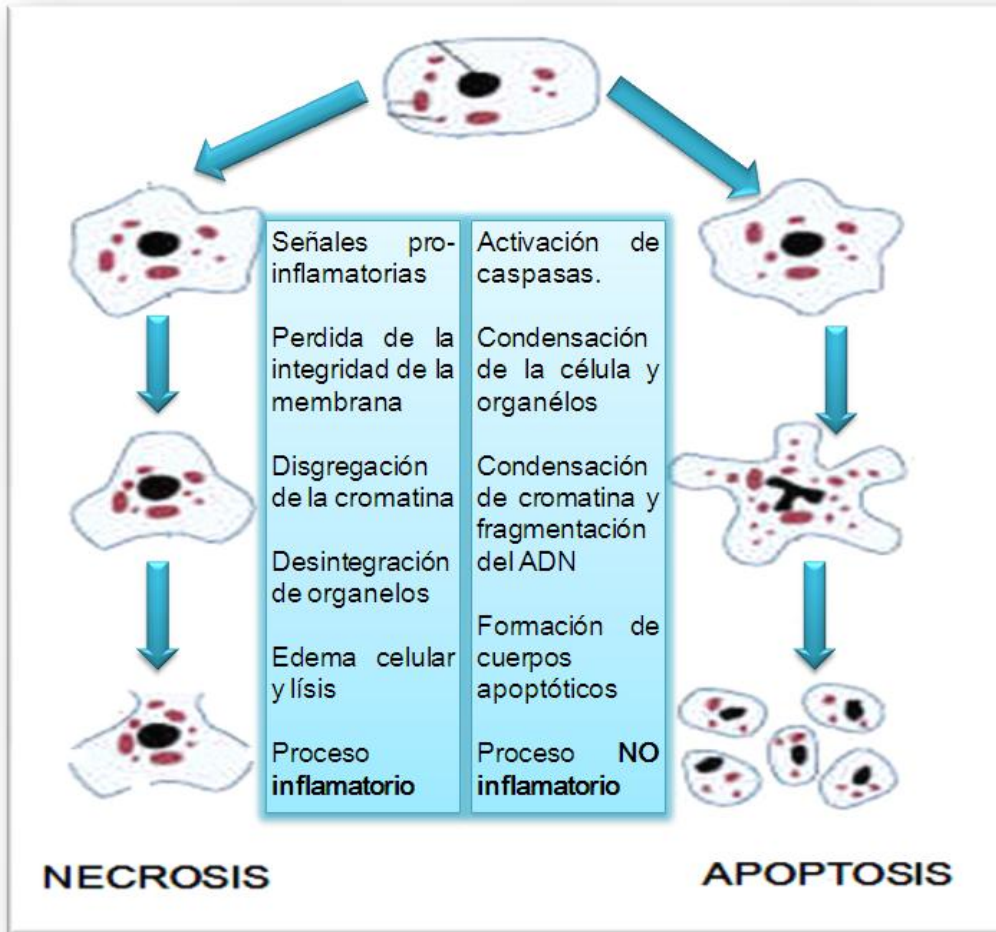


Figura 1. NECROSIS vs APOPTOSIS. Se muestran los cambios morfológicos que sufre la célula en los procesos de muerte celular necrótica y apoptótica.

La apoptosis es tan importante como la mitosis para el control de la población celular. Algunos ejemplos en que resalta su importancia son:

a) la reabsorción de la cola del renacuajo, al llevarse a cabo su metamorfosis en rana (Tata, 1994),

b) en la formación de los dedos y pies en el feto (Lang, 1997) y durante el desarrollo de la mucosa intestinal y de la retina (Haanen y Vermes, 1996), se requiere de la remoción del tejido por apoptosis,

c) la regresión normal de tejidos dependientes de hormonas es inducida por cambios en las concentraciones de hormonas trópicas y es mediada por apoptosis, así como en otros procesos de involución normal como la atresia folicular ovárica (Hsueh, 1994; Chun *et al.*, 1996; Evans-Storms y Cidlowski, 1996; Moulton *et al.*, 1997) y la eliminación del revestimiento interno del útero (endometrio) para iniciar la menstruación (Amsterdam *et al.*, 1997),

d) la formación de conexiones entre neuronas (sinapsis) en el cerebro requiere de la eliminación por apoptosis, de células en exceso (Bernal y Nunez, 1995).

Además, la apoptosis es requerida para eliminar células que podrían alterar la integridad del organismo como:

a) células infectadas con virus,

b) células del sistema inmune que provocarían enfermedades autoinmunes (Migliorati, 1994; Deist *et al.*, 1996),

c) células con daño en el DNA,

d) células cancerígenas dañadas por radio y quimioterapia.

En general, la apoptosis ocurre en dos fases. En la primera etapa o fase de activación: la célula comprometida a morir se encoge, libera el citocromo c (*Cyt c*) de la mitocondria, aparecen vesículas similares a burbujas en la superficie, se compacta y segrega la cromatina en masas típicamente circunscritas. Existe irregularidad en la membrana del núcleo y de la superficie celular, y condensación

del citoplasma, mientras que los organelos se mantienen íntegros (Abbadie *et al.*, 1993). En la siguiente etapa o fase de ejecución, se observan los cambios más drásticos de la muerte celular: el núcleo se fragmenta, el citoplasma se condensa y se forman protuberancias en la superficie celular. La separación de las protuberancias superficiales produce cuerpos apoptóticos de varios tamaños y diferente composición. La fosfatidilserina un fosfolípido de membrana, se expone en la superficie celular y se une a los receptores de células fagocíticas como macrófagos o células dendríticas. Estas células fagocitan los fragmentos celulares apoptóticos. Estos hechos son tan ordenados que al proceso se le llama frecuentemente muerte celular programada (Hengartner, 2000).

3.2 CONTROL HORMONAL DE LA APOPTOSIS

3.2.1 Generalidades

La apoptosis es un proceso fisiológico importante que modula el desarrollo normal y la homeostasis en una gran variedad de tejidos. Este proceso se encuentra regulado por hormonas, citocinas y factores de crecimiento que regulan la muerte celular al estimular o inhibir el crecimiento, o al inducir la apoptosis bajo condiciones fisiológicas, patológicas, o ambas (Tabla 1). Por ejemplo, se ha visto que las hormonas esteroideas regulan la apoptosis en células y tejidos blanco como la glándula mamaria, la próstata, el ovario, el útero, el testículo, etc. (Pushkala y Gupta, 2001). Por otro lado, la inhibición de la apoptosis por factores de

crecimiento se ha relacionado con su capacidad para hacer que la célula entre al ciclo celular.

Tabla 1. Hormonas, citocinas y factores de crecimiento involucrados en la apoptosis

<p>Inhibidores de la apoptosis</p> <ul style="list-style-type: none">➤ Testosterona (T)➤ Estradiol (E2)➤ Progesterona (P4)➤ Factores de Crecimiento (EGF, IGF-1, NGF, PDGF)➤ Interleucinas (IL)➤ Hormona del Crecimiento (GH)➤ Prolactina (PRL)➤ Gonadotropinas (LH, FSH)
<p>Inductores potenciales de la apoptosis</p> <ul style="list-style-type: none">➤ Glucocorticoides➤ Progesterona (P4)➤ Hormonas tiroideas (T3, T4)➤ Disminución de Factores de crecimiento➤ Factor de crecimiento transformador β➤ Factor de Necrosis Tumoral (TNF)➤ Ligando de Fas (FasL)

Además, se ha visto que la función de un gran número de genes que tienen un papel en la muerte celular está regulada por la concentración de algunos factores de crecimiento. Por ejemplo, la función de c-Myc para inducir la muerte celular puede ser inhibida en presencia de ciertos factores de crecimientos (Harrington *et al.*, 1994). Por otro lado, c-Myc puede inducir la apoptosis a partir

del arresto celular provocado por una disminución en la concentración de factores de crecimiento (Hermeking y Eick, 1994).

La apoptosis también puede estar regulada a nivel de la transcripción, esto es por la regulación de la expresión de factores de transcripción. Por ejemplo, puede ocurrir la apoptosis al disminuirse la transcripción de GATA-1, un factor de transcripción necesario para la maduración de precursores eritroides cuando el receptor de estrógenos se une a su ligando en estas células (Blobel y Orkin, 1996).

Las hormonas peptídicas pueden presentar actividad anti o pro-apoptótica. Un ejemplo del primer tipo es la prolactina (PRL), que previene la fragmentación de DNA inducida por dexametasona mediante el receptor de glucocorticoides en células con linfoma Nb2 (Fletcher-Chiappini *et al.*, 1993). También, la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) y probablemente otros factores pituitarios pueden estar involucrados en prevenir la apoptosis en las glándulas adrenales (Ceccatelli *et al.*, 1995).

Por otro lado, una hormona peptídica muy importante para la diferenciación sexual: la Sustancia Inhibidora Muleriana (MIS) tiene una función anti-proliferativa y actúa a través de un programa de muerte celular iniciado vía receptor y es regulada a través de factores trasactivantes como SRY (Sex Determining Region Y) y testosterona (Catlin *et al.*, 1993). A otras hormonas como la gonadotropina coriónica humana (hCG) y la hormona folículo estimulante (FSH) no se les ha atribuido un efecto sobre la apoptosis que no sea un efecto indirecto por el aumento de hormonas esteroides ováricas (Wimalasena *et al.*, 1991).

El conocer los mecanismos por los cuales las hormonas controlan la muerte celular programada permitirá diseñar estrategias para prevenir y tratar enfermedades que afectan a tejidos endócrinos (Thompson, 1995; Gibbons y Dzau, 1996). Por ejemplo, la inducción de la apoptosis puede ocasionar enfermedades como la diabetes de tipo I, en la cual se eliminan las células beta del páncreas, o una atrofia patológica hormono-dependiente (Denmeade *et al.*, 1996; Ceccatelli *et al.*, 1995). Así mismo, una falla en la apoptosis puede ocasionar enfermedades autoinmunes o degenerativas como el cáncer y el Alzheimer (Milas *et al.*, 1994; Denmeade *et al.*, 1996; Wolozin *et al.*, 1996).

3.2.2 Regulación de la apoptosis en el útero por hormonas esteroideas

Los estudios en tejido uterino han demostrado que el crecimiento y la regresión cíclica del tracto reproductivo femenino por apoptosis se encuentran bajo el control de las hormonas esteroideas estradiol (E_2) y progesterona (P_4) (Hop Wood y Levison, 1976; Sandow *et al.*, 1979). El E_2 tiene un efecto mitogénico en el epitelio uterino, mientras que la P_4 inhibe la proliferación al inhibir la mitosis dirigida por estrógenos (Martin *et al.*, 1970). La P_4 , además de sus funciones de inducción de la ovulación, la preparación del endometrio para la implantación y el mantenimiento del embarazo, es capaz de inhibir la apoptosis (Terada *et al.*, 1989). Estos efectos anti-apoptóticos se han observado al utilizar como modelo el útero de la rata.

El incremento de los niveles plasmáticos de E₂ induce la proliferación del tejido. Posteriormente, la integridad del tejido se mantiene, en parte por el efecto anti-apoptótico de la P₄. Si no se produce la fertilización, los niveles de progesterona caen y el epitelio uterino regresa por apoptosis (Sato *et al.*, 1997). De manera similar, estos efectos de proliferación y apoptosis se presentan en ratones ovariectomizados (ovx) tratados con E₂ y P₄ (Martin *et al.*, 1970; Terada *et al.*, 1989). En estos estudios se ha sugerido que la P₄ sola o con E₂ puede reducir la muerte celular independientemente de su acción sobre la división celular, ya que inhibe la división celular inducida por E₂ (Terada *et al.*, 1989). Sin embargo, a pesar de que se sabe que la disminución en la concentración de estas hormonas es un estímulo que provoca la muerte celular del epitelio uterino, aún no se ha esclarecido el mecanismo molecular a través del cual regulan la apoptosis.

Por otro lado, es bien sabido que el mecanismo de acción de ambas hormonas está mediado vía un receptor nuclear que se activa al unirse con su ligando para funcionar como un factor de transcripción (Evans, 1988). Las células que presentan este receptor tienen regulada, por efectos hormonales, la expresión de muchos genes. En el útero tanto las células epiteliales como las células estromales presentan receptores a hormonas esteroideas ováricas (Tibbetts *et al.*, 1998). Diferentes estudios *in vivo* sugieren la acción parácrina de estas hormonas. Por ejemplo, al agregar E₂ a un cultivo primario de células epiteliales normales, esta hormona no genera una actividad mitógena (Uchima *et al.*, 1987). El efecto mitogénico del E₂ en epitelio uterino y vaginal se observó únicamente al recombinar un cultivo de células epiteliales con células estromales y posteriormente, el tejido recombinante se insertó *in vivo* (Cooke *et al.*, 1986).

En otro estudio se crearon tejidos recombinantes knock-out solo para el RE epitelial (ko-E), y knock-out solo para el RE estromal (ko-S). Los tejidos recombinantes se cultivaron por 4 semanas como cápsulas subrenales injertadas en hembras intactas de ratones nude, posteriormente los hospederos fueron tratados con estradiol o aceite (control) una semana después de ovariectomizar. Se determinaron tanto el índice de marcaje epitelial como la expresión del ER. Los resultados mostraron que el E₂ indujo un incremento similar en el índice de marcaje epitelial comparado con controles tratados con aceite, en ambos tipos de tejidos recombinante, a pesar de la ausencia de RE en células epiteliales en recombinantes ko-E. Este efecto proliferativo fue bloqueado por un antagonista del RE. En contraste los tejidos recombinante ko-S mostraron un índice de marcaje epitelial bajo y no se vio estimulado por E₂ a pesar de la expresión epitelial del RE en células epiteliales. Estos resultados demuestran que el RE en células epiteliales no es ni necesario ni suficiente para inducir la proliferación del epitelio uterino por E₂ (Buchanan *et al.*, 1998; Cooke *et al.*, 1997). Una evidencia similar se ha encontrado para el caso del efecto antimitogénico de la P₄ en el epitelio uterino (Kurita *et al.*, 1998). Se observó que esta hormona inhibía la síntesis de DNA, inducida por E₂, en células del epitelio uterino de ratón *knock-out* para el receptor a progesterona (RP), cuando estas células epiteliales eran recombinadas con células del estroma uterino de ratón silvestre. En contraste, la P₄ no bloqueaba la síntesis de DNA, inducida por E₂, cuando el epitelio uterino intacto (RP+) se combina con estroma knock-out para el RP (Kurita *et al.*, 1998).

Por otro lado, un estudio realizado por Kurita y colaboradores en el 2001 reportó un mecanismo parácrino para la regulación de la apoptosis en el epitelio uterino. Se prepararon tejidos recombinantes que contenían **1.** Epitelio y estroma tipo silvestre **2.** Epitelio RP- con estroma silvestre **3.** Epitelio tipo silvestre con estroma RP- **4.** Epitelio y estroma knock-out para RP. Los resultados demostraron que la P_4 inhibía la apoptosis del epitelio uterino sólo en tejido recombinante preparado con estroma RP+ y concluyeron que la apoptosis en el epitelio uterino está regulada vía el RP estromal.

Estos hechos sugieren que la proliferación y la regresión del epitelio pueden estar reguladas por la acción parácrina de estas hormonas y podría explicar el por qué el epitelio uterino presenta una regresión durante la fase de transición del proestro al estro del ciclo estral al disminuir los niveles plasmáticos de hormonas ováricas.

3.3 CICLO ESTRAL DE LA RATA

3.3.1 Niveles hormonales

La rata es un mamífero de ovulación espontánea, es decir, la ovulación no depende de una estimulación externa como en el caso del conejo, en el cual es necesaria la cópula para que se presente la ovulación. Así mismo, las ratas ovulan durante todo el año y su ciclo estral está constituido por cuatro etapas: proestro, estro, metaestro (también llamado diestro temprano) y diestro. En ratas que presentan ciclo de cuatro días de duración, los niveles de estradiol (E_2) en plasma

periférico son basales (8 ± 2 pg/ml) durante el estro (Figura 2) (Brown-Grant *et al.*, 1970; Butcher *et al.*, 1974; Freeman, 1988). Los niveles de E_2 en plasma comienzan a aumentar en la tarde del metaestro y durante el diestro hasta llegar a su máximo valor (45 ± 2 pg/ml) a las 09:00 horas del proestro (Butcher *et al.*, 1974). Durante la tarde del proestro los niveles de E_2 caen rápidamente y alcanzan valores basales en las primeras horas de la mañana del estro. El E_2 es secretado por los folículos de De Graaf que se encuentran en desarrollo. Los tipos celulares responsables de dicha secreción son las células de la teca interna y las células de la granulosa.

El incremento en la concentración de estrógenos en la sangre desencadena un estímulo neural cíclico que activa la liberación de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) por el hipotálamo. La GnRH a su vez desencadena la secreción de la hormona luteinizante (LH) a través de la hipófisis. Los niveles circulantes de LH empiezan a incrementarse alrededor de las 14:00 a 15:00 horas del proestro, y alcanzan su nivel máximo (37 ± 5 ng/ml) entre las 17:00 y las 19:00 horas de esa misma tarde (Figura 2) (Brown-Grant *et al.*, 1970; Butcher *et al.*, 1974; Freeman, 1988).

Este rápido incremento de LH induce la ruptura folicular y la ovulación en las primeras horas del estro. El nivel de LH en sangre empieza a disminuir en la noche del proestro y alcanza sus niveles basales (0.5 ± 0.15 ng/mL) en las primeras horas de la mañana del estro, permaneciendo así durante el metaestro y el diestro (Brown-Grant *et al.*, 1970; Butcher *et al.*, 1974; Freeman, 1988): el

patrón de secreción de la hormona folículo estimulante (FSH) y prolactina durante el ciclo estral es similar al de la LH.

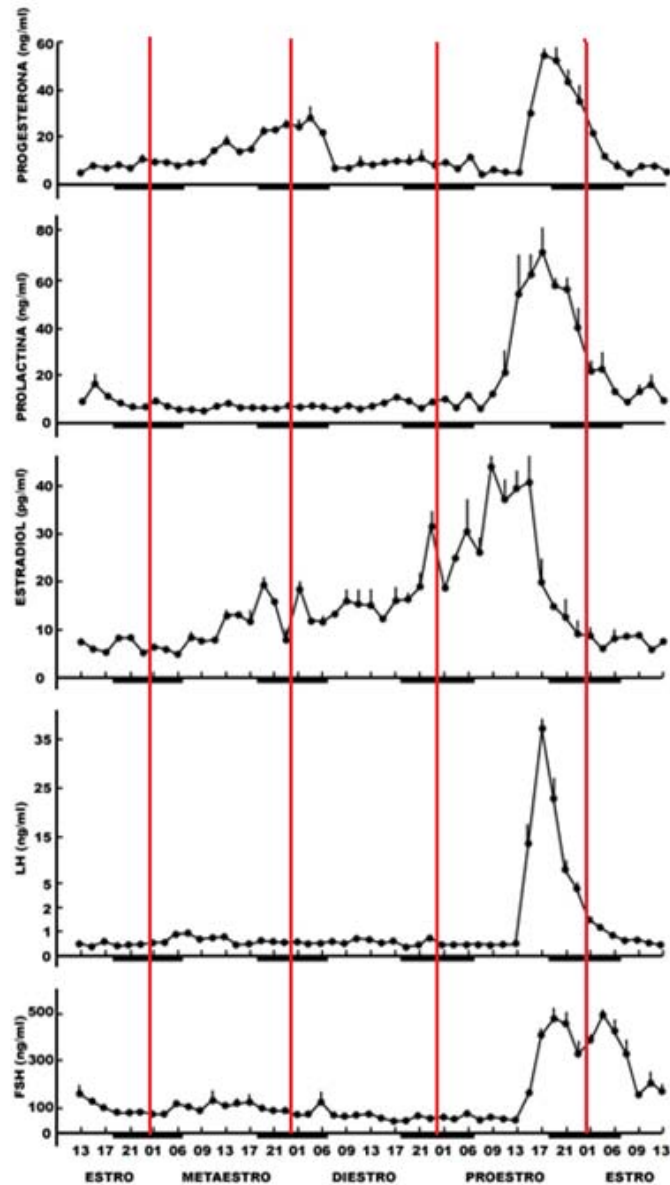


Figura 2. CONCENTRACIONES HORMONALES DURANTE EL CICLO ESTRAL. Concentración de P₄, prolactina, E₂, LH y FSH en plasma periférico obtenido en intervalos de 2 horas a través de los 4 días del ciclo estral de la rata. Las barras negras en la base representan los intervalos de oscuridad en la colonia, las líneas rojas representan las transiciones en las etapas y los números en la base representan la hora del día (Freeman, 1988).

Durante el ciclo estral se presentan dos incrementos en los niveles de progesterona secretada en plasma periférico (Figura 2). Durante la tarde del proestro se observa un incremento de progesterona, secretada por las células de la granulosa del folículo pre-ovulatorio, la cual alcanza su valor máximo entre las 18:00 y 21:00 horas (46 ± 7 ng/ml). Este incremento sucede casi simultáneamente al incremento de hormona luteinizante. Los niveles de progesterona vuelven a niveles basales (2 ± 1 ng/ml) para la mañana del estro (Butcher *et al.*, 1974; Freeman, 1988). Un segundo pico, de origen lúteo, se presenta alrededor del mediodía del metaestro (24 ± 3 ng/ml), se prolonga hasta las primeras horas de la mañana del diestro y desciende a niveles basales poco tiempo después del amanecer del diestro.

Pocas horas después del incremento de progesterona en la tarde del proestro se presenta un comportamiento característico de lordosis. Es probable que el aumento de los niveles de estrógenos seguido por el aumento de los niveles de progesterona facilite la lordosis en el estro, ya que este comportamiento no se presenta en ninguna otra etapa del ciclo estral. El cambio en las concentraciones de hormonas durante el ciclo estral afecta la actividad del oviducto, útero, cérvix y vagina, así como también algunos efectos fisiológicos generalizados.

La forma más común como se determina la etapa del ciclo estral en el que se encuentra cada rata, es por medio del estudio de los cambios morfológicos en las células del epitelio vaginal. En un frotis vaginal pueden presentarse dos o más tipos celulares, pero es el tipo celular predominante el que indica la etapa del ciclo

estral en el que se encuentra. Los tres diferentes tipos celulares que se pueden observar en un frotis vaginal de rata son: **a)** células epiteliales nucleadas, **b)** leucocitos polimorfonucleares y **c)** células epiteliales cornificadas. La pared vaginal durante el estro presenta un aspecto seco, blanco y carente de brillo pero cambia durante el metaestro presentando un aspecto húmedo y rosado (Figura 3).

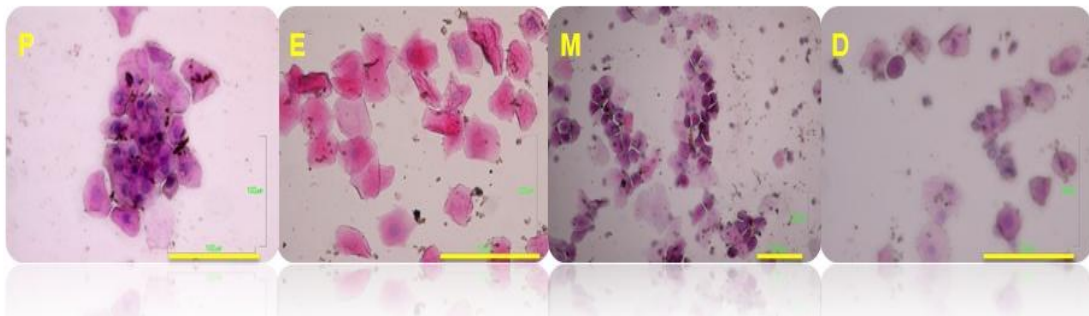


Figura 3. MORFOLOGÍA CELULAR CARACTERÍSTICA DEL CICLO ESTRAL (Tinción hematoxilina-eosina). Tipos celulares observados en frotis vaginal de rata durante las diferentes etapas del ciclo estral. En proestro (P) se observan células con núcleos bien definidos, el color predominante es el de la hematoxilina. En estro (E) se observan principalmente células cornificadas, en este caso el color predominante es el de la eosina. Tanto en metaestro (M) como en diestro (D) se observan abundantes leucocitos y la desaparición gradual de las células cornificadas. Línea=100 μ m.

Durante el estro la pared vaginal presenta un aspecto seco, blando y carente de brillo pero cambia durante el metaestro, presentando un aspecto húmedo y rosado. Estos cambios están asociados con la cornificación de las capas superiores durante el estro y con la extensa descamación al final de esta etapa. A medida que se aproxima el proestro los tipos celulares presentes en los fluidos vaginales consisten de células epiteliales nucleadas y leucocitos y

ocasionalmente algunas células cornificadas (Figura 3). Durante el proestro (P), los leucocitos desaparecen, las células epiteliales nucleadas aumentan en número y son posteriormente desplazadas de manera gradual por células cornificadas sin núcleo. El principio del estro (E) ocurre cuando el frotis presenta 75% de células nucleadas y 25% de células cornificadas. Eventualmente, las células cornificadas son las únicas presentes. El metaestro (M) y el diestro (D) se caracterizan por la aparición de un gran número de leucocitos y la desaparición de las células cornificadas (Baker, 1979).

El útero también presenta cambios cíclicos, dependientes de esteroides, tanto en su estructura como en su función. Durante cada ciclo, el útero inicialmente se prepara para recibir y transportar el espermatozoide del cérvix al oviducto y, subsecuentemente se prepara para recibir los embriones del oviducto. El útero está compuesto por dos capas: miometrio y endometrio. El miometrio es la porción muscular de la pared uterina. Consiste de dos capas de músculo liso: una capa gruesa interna que es circular y una capa más delgada externa que es longitudinal. Entre ambas capas se encuentra una capa de tejido conectivo que contiene nervios, vasos linfáticos y sanguíneos. El endometrio consiste de una matriz o estroma, sobre la cual se asienta un epitelio columnar simple bajo (epitelio luminal) con extensiones glandulares (epitelio glandular) que penetran el estroma (Figura 4) (Hafez, 1970).

Durante el proestro, el endometrio está bajo la influencia de los estrógenos producidos por los folículos ováricos (fase folicular), su vascularización se incrementa, el epitelio se convierte en un epitelio columnar bajo y las glándulas presentan cierto crecimiento. La actividad proliferativa del epitelio da lugar a un

gran incremento en el área superficial; la proliferación principal es del epitelio luminal. Las células epiteliales secretan un fluido de constitución líquida que contiene algunas proteínas, principalmente enzimas proteolíticas. En esta etapa aumenta la contractibilidad y excitabilidad del endometrio (Hafez, 1970).

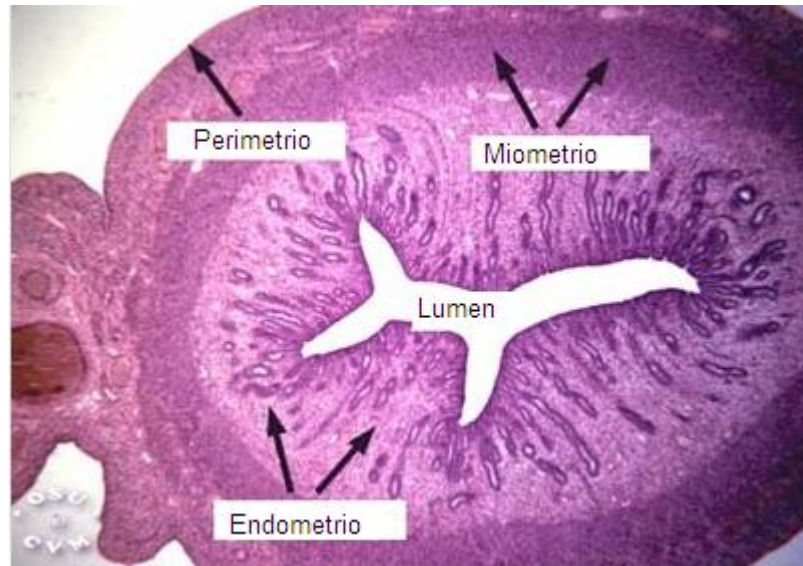


Figura 4. ESTRUCTURA DEL ÚTERO DE LA RATA. Se muestran las diferentes capas que componen el útero de la rata, en el endometrio se pueden observar las extensiones glandulares (epitelio glandular) y el epitelio luminal cercano al lumen.

Durante el estro y el metaestro (fase lútea) las estructuras del endometrio están controladas por la progesterona producida por el cuerpo lúteo: el endometrio se expande, el epitelio luminal se convierte a uno de tipo columnar alto y las glándulas crecen hasta su máximo tamaño, las glándulas ahora son activamente secretoras; secretan un fluido rico en glicoproteínas, azúcares y aminoácidos. Las células del estroma se hacen más largas y más hinchadas. La progesterona actúa sobre el miometrio causando el crecimiento de las células y, en contraste con los

estrógenos, disminuye la excitabilidad de la musculatura uterina. Al final de la fase lútea, durante el diestro, el epitelio secretor se colapsa, el endometrio se reabsorbe y es reemplazado por una pequeña capa de estroma cubierta con tejido epitelial, lista para entrar a un nuevo ciclo (Hafez, 1970).

3.3.2 Proliferación celular en el útero durante el ciclo estral

La proliferación de cada uno de estos tipos celulares durante el ciclo estral ha sido determinada por medio de la medición de la actividad mitótica uterina. Los estudios realizados en nuestro laboratorio, reportan que la máxima proliferación de ambos epitelios, luminal y glandular ocurre durante los días del metaestro y diestro, mientras que en el proestro únicamente prolifera el epitelio luminal y en el día del estro solo se observa proliferación en las células del estroma (Mendoza-Rodríguez et al, 2003).

Un estudio realizado posteriormente por Masurak *et al*, para investigar la localización microanatómica de la actividad proliferativa uterina durante el ciclo estral, utilizando Ki-67 (un marcador de proliferación celular), mostro que la actividad de Ki-67 varía con las diferentes etapas del ciclo estral en cada compartimento uterino. Durante el proestro, el mayor grado de proliferación celular ocurrió en las células del miometrio, seguido por las células estromales y el menor se observó en las células del epitelio glandular y luminal. Durante el estro, el mayor grado de proliferación celular ocurrió en las células del miometrio, seguido por las células estromales, con una mínima proliferación en células del epitelio luminal y glandular. Durante el metaestro, el mayor grado de proliferación se

presentó en células estromales y miometriales, mientras que la menor proliferación se observó en las células del epitelio luminal y glandular. (Marusak *et al.*, 2007).

Estos resultados muestran que la mínima actividad de Ki-67, en los compartimentos uterinos luminal y glandular, se da en la etapa del estro, tal como se había determinado previamente en nuestro laboratorio (Mendoza-Rodríguez *et al.*, 2003).

3.3.3 Muerte celular del útero durante el ciclo estral

La muerte celular ocurre a lo largo de la vida de los organismos multicelulares y está estrictamente regulada. Algunos ejemplos destacados de apoptosis incluyen la selección negativa de linfocitos para eliminar células autoreactivas o no-reactivas, la muerte celular de células neuronales durante el auto-ensamblaje del sistema nervioso central y la formación de dígitos por la involución de las células de los intertrigos. La apoptosis es un proceso regulado, controlado por diversas señales intra y extracelulares, la cual se encuentra involucrada en la muerte coordinada de células somáticas que se encuentran en exceso, que son peligrosas o que se encuentran dañadas (Zörnig *et al.*, 2001).

Se ha demostrado que el útero de diversos mamíferos, incluyendo el humano, presenta muerte celular por apoptosis (Sandow *et al.*, 1979; Pollard *et al.*, 1987; Spornitz *et al.*, 1994; Spencer *et al.*, 1996). Usando una metodología histomorfológica se ha observado muerte celular por apoptosis en el útero de la rata, en el cual se ha establecido una correlación inversa entre la proliferación y la

muerte celular (Spornitz *et al.*, 1994). Sin embargo, hasta hace poco tiempo no existía información sistemática de la muerte celular en el útero de la rata durante el ciclo estral.

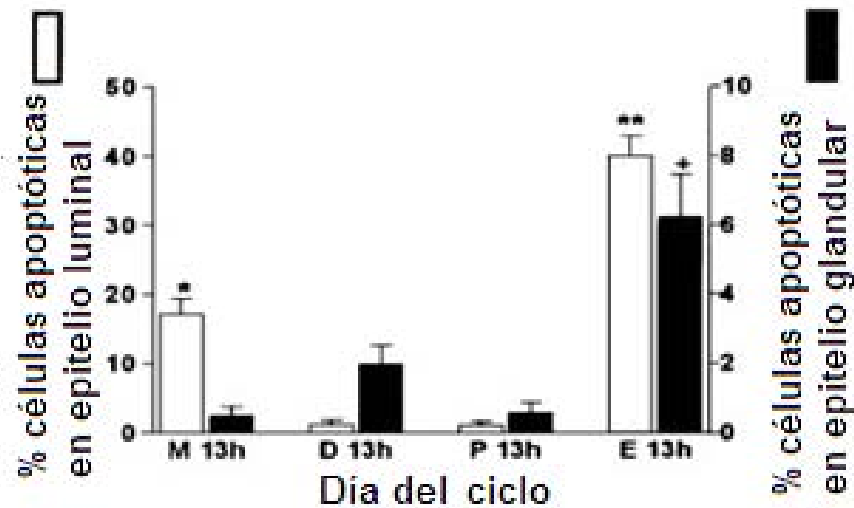


Figura 5. ÍNDICE APOPTÓTICO DEL EPITELIO UTERINO DE LA RATA.

Índices apoptóticos del epitelio uterino durante el ciclo estral determinado mediante la técnica de TUNEL. M, metaestro; D, diestro; P, proestro; E, estro. Los resultados se expresan como la media \pm SEM; ** $p < 0.001$ comparado con los otros días del ciclo, * $p < 0.01$ comparado con D y P. (Mendoza-Rodríguez *et al.*, 2002)

Los resultados obtenidos en nuestro laboratorio (Mendoza-Rodríguez *et al.*, 2008), mediante la técnica de TUNEL, indican que el mayor índice apoptótico en los epitelios luminal y glandular se observa durante la etapa del estro, mientras que el menor se observa durante la etapa del proestro (Figura 5). Los valores de índice apoptótico fueron mayores en el epitelio luminal que en el glandular. En el epitelio luminal se observa una disminución significativa del índice apoptótico durante los siguientes días del ciclo. En contraste en el epitelio glandular, el índice

apoptótico disminuye considerablemente en el día del metaestro y posteriormente aumenta ligeramente en el día del diestro (Figura 5). (Mendoza-Rodríguez et al, 2002).

3.4 APAREAMIENTO

El apareamiento es un proceso complejo que involucra cambios neuroendocrinos y hormonales. Este proceso es tan complejo que aún no se conoce totalmente, aunque se han estudiado parcialmente, los efectos que tiene el apareamiento sobre las diversas áreas del cerebro.

Se sabe que en ratas hembras, la estimulación vagino-cervical derivada del proceso de apareamiento induce cambios neuroendocrinos importantes asociados con la reproducción, como el incremento en la duración de la lordosis (Diakow., 1975), un incremento inmediato en la liberación de la hormona luteinizante (LH) (Erskine., 1992), y los aumentos en la prolactina sérica durante el embarazo temprano (Yang *et al.*, 2000, Gunnet., 1983). Se han identificado poblaciones de neuronas que se activan después del apareamiento con un incremento en la expresión de Fos, la proteína del gen de expresión temprana c-fos. La estimulación vagino-cervical induce la expresión de Fos en la amígdala media y el hipotálamo, específicamente en el área preóptica media (Yang and Voght., 2001).

La información sensorial desde el útero, cérvix y vagina es transportada a través de los nervios pélvico y espinal hipogástrico (Steinman 1992). En el reflejo ovulatorio, la estimulación vagino-cervical producida durante el apareamiento

activa neuronas catecolaminérgicas en el tronco cerebral, en particular en el locus coeruleus (Yang and Voght., 2001). Sin embargo, no se conoce mucho acerca de cómo contribuyen los factores contenidos en el eyaculado a los cambios uterinos presentados durante el apareamiento.

3.5 MUERTE CELULAR Y APAREAMIENTO

Se ha demostrado que los patrones de muerte celular del epitelio luminal uterino, son modificados significativamente por el proceso de apareamiento. (Figuras 6 y 7).

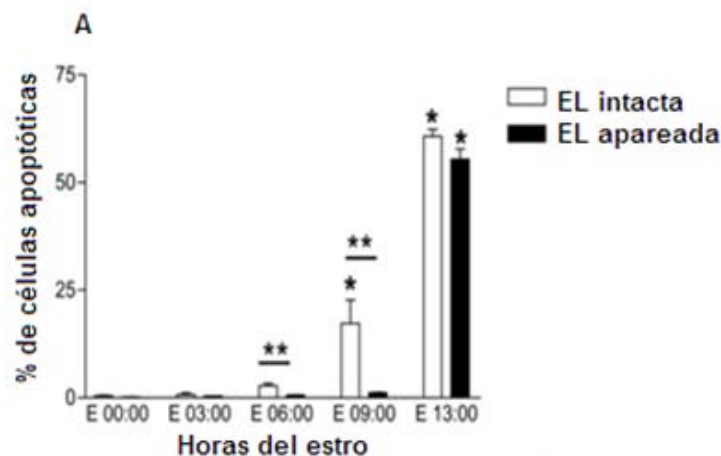


Figura 6. ÍNDICE APOPTÓTICO DEL EPITELIO LUMINAL UTERINO DE RATAS INTACTAS vs RATAS APAREADAS. Se muestra el índice apoptótico del epitelio luminal uterino de ratas intactas y de ratas apareadas a diferentes horas de la etapa del estro. Se aprecia claramente que la mayor diferencia de índices apoptóticos entre ratas intactas y ratas apareadas se tiene a las 09:00 horas. Los datos se presentan como la media \pm ESM de 4 ratas por cada hora. * $P < 0.01$ comparado con las otras horas estudiadas. ** $P < 0.01$ como comparación entre ratas no apareadas y ratas apareadas a la hora del estro indicada (Mendoza-Rodríguez et al, 2008).

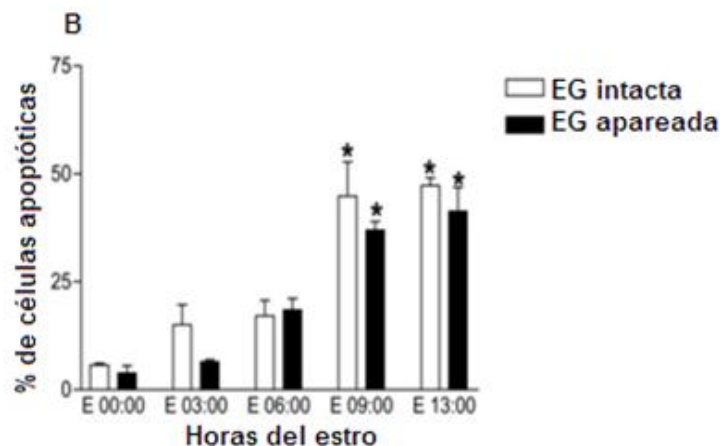


Figura 7. ÍNDICE APOPTÓTICO DEL EPITELIO GLANDULAR UTERINO DE RATAS INTACTAS vs RATAS APAREADAS. Se muestra el índice apoptótico del epitelio glandular uterino de ratas intactas y de ratas apareadas a diferentes horas de la etapa del estro. Se aprecia claramente que la mayor diferencia de índices apoptóticos entre ratas intactas y ratas apareadas se tiene a las 09:00 horas. * $P < 0.01$ comparado con E 00:00, 03:00, y 06:00 horas; no existen diferencias entre E 09:00 and E 13:00 hr. (Mendoza-Rodríguez et al, 2008)

Se han observado células apoptóticas en el epitelio luminal uterino de animales no apareados desde las 03:00 horas de la etapa del estro, mientras que en animales apareados, un incremento importante en la cantidad de células apoptóticas se observa hasta las 13:00 horas del estro (Figura 6). Esta diferencia en los patrones de muerte celular sugiere que hay señales en los animales apareados que retardan la muerte celular. Además, las señales pre-apoptóticas se han detectado antes de que ocurra la ovulación, por lo que se sugiere que la ovulación no es la principal señal para prevenir la muerte celular del endometrio (Mendoza-Rodríguez et al. 2003). Ya que los niveles de hormonas en suero de ratas apareadas y no apareadas es similar, (Mendoza-Rodríguez et al., 2008), es

posible que las señales moleculares que inducen el retraso en la muerte celular programada estén dadas por el semen (Tabla 2).

Tabla 2. Niveles séricos de estradiol E2 y progesterona P4 en animales apareados y no apareados.

	E2 (pg/mL) ratas no apareadas	E2 (pg/mL) ratas apareadas	P4 (ng/mL) ratas no apareadas	P4 (ng/mL) ratas apareadas
E 00:00 hrs	30.71 ± 13.84	34.05 ± 11.28	37.99 ± 3.71	32.96 ± 5.52
E 03:00 hrs	29.35 ± 3.32	34.95 ± 22.13	23.15 ± 3.62	13.29 ± 7.43
E 06:00 hrs	32.11 ± 8.64	42.37 ± 6.90	24.72 ± 8.65	26.05 ± 9.70
E 09:00 hrs	33.78 ± 4.51	29.12 ± 14.82	7.85 ± 5.82	6.84 ± 2.50
E 13:00 hrs	27.10 ± 9.98	19.38 ± 14.29	13.51 ± 4.77	9.37 ± 7.51

Los niveles fueron determinados por radioinmunoanálisis. Los datos se expresan como la media ± DS de 4 animales por grupo.

Se ha reportado que los factores seminales actúan en el tracto reproductivo femenino para promover la sobrevivencia de los espermatozoides, condicionar la respuesta inmune femenina para tolerar la concepción, la organización y cambios celulares en el endometrio para facilitar la implantación y el desarrollo del embrión (Robertson 2005).

En estudios recientes de proteómica en líquido seminal humano se han identificado cerca de 900 proteínas (Pilch and Mann, 2006). En roedores se han identificado varias proteínas y muchas citocinas en el líquido de la vesícula seminal (Gopichandran et al, 2006). Sin embargo, no se han caracterizado todas las proteínas que constituyen el líquido de la vesícula seminal de los roedores.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se sabe que el proceso de apareamiento induce cambios neuroendocrinos e histomorfológicos en el útero que permiten la fertilización y adecuada implantación del huevo. Se ha demostrado que las ratas apareadas presentan un retraso significativo de la muerte celular en el epitelio luminal uterino, comparado con el observado en ratas no apareadas. Además, se ha visto que los niveles hormonales de las ratas apareadas son iguales a los observados en ratas no apareadas, por lo que se propone que los factores contenidos en el semen son los responsables del retraso de la muerte celular del epitelio luminal. Sin embargo, no se tienen datos que correlacionen el efecto del líquido seminal, sin el estímulo vagino-cervical del apareamiento, con el patrón de muerte celular del epitelio uterino de la rata.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar si el líquido de la vesícula seminal, sin el estímulo vagino-cervical del apareamiento, es capaz de retrasar la muerte celular programada del epitelio luminal uterino de la rata, en forma similar al proceso de apareamiento.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Analizar el índice apoptótico del epitelio uterino de ratas tratadas intrauterinamente con líquido de la vesícula seminal a diferentes concentraciones.
- Estudiar si existen diferencias en el índice apoptótico del cuerno uterino izquierdo (tratado) y el cuerno uterino derecho (no tratado).
- Establecer una correlación entre la concentración del líquido de la vesícula seminal y el retraso en la muerte celular del epitelio luminal uterino de la rata a las 09:00 horas del estro.

6. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Debido a que el fenómeno de apareamiento es capaz de inhibir de manera transitoria la muerte celular programada del epitelio luminal uterino de la rata, y sabiendo que más del 50% de la composición del eyaculado lo proporciona el líquido de la vesícula seminal, se espera que al administrar intrauterinamente líquido de la vesícula seminal (para evitar el estímulo vagino-cervical), durante la etapa del proestro (17:00 horas), se observe un retraso en la muerte celular programada del epitelio uterino de la rata.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 ANIMALES DE ESPERIMENTACIÓN

Para este estudio se utilizaron ratas hembras adultas de la cepa Wistar con un peso comprendido entre 200-250 g, las cuales se mantuvieron en un ciclo luz:oscuridad 12:12, con agua y comida *ad libitum*. Únicamente se utilizaron las ratas que presentaron por lo menos cuatro ciclos estrales regulares con cuatro días de duración, los cuales se determinaron mediante el análisis microscópico de frotis vaginales diarios. Los animales se inyectaron intrauterinamente con líquido de la vesícula seminal recién obtenido y se sacrificaron a las 09:00 horas de la etapa del estro. Se utilizaron grupos de 5 animales para cada una de las concentraciones estudiadas.

7.2 OBTENCIÓN DEL LÍQUIDO DE LA VESÍCULA SEMINAL

Se utilizó líquido de la vesícula seminal, ya que es el principal componente del volumen seminal (i.e., 50-80%) (Mark W. & Heather S., 2007). Todos los machos empleados para la obtención del líquido de la vesícula seminal fueron de fertilidad comprobada y descansados una semana previa a su utilización. El líquido se extrajo mediante compresión suave de la vesícula seminal intacta (50 – 100 μ L de líquido recuperado por vesícula), se conservó en baño de agua a 37° C hasta su utilización. Las diluciones se hicieron con solución salina al 0.9%.

7.3 INTRODUCCIÓN DEL LÍQUIDO DE LA VESÍCULA SEMINAL EN EL ÚTERO

El líquido de la vesícula seminal fue administrado por inyección intrauterina a las ratas hembras como describió Tremellen, et al (1998) con mínimas modificaciones. En general, a las 17:00 horas del día del proestro, las ratas hembras fueron anestesiadas con una mezcla de ketamina/xilacina (Virbac S.A, Carros–Francia/Pisa Agropecuaria, S.A. de C.V., Hgo. México) en proporción 300 μ L/50 μ L (Dosis 120 mg Ketamina/Kg de peso corporal - 4 mg Xilazina/Kg de peso corporal). Se exteriorizó el cuerno uterino izquierdo a través de una incisión dorsal paravertebral y se inyectó cerca del oviducto 50 μ L de alguna de las diferentes concentraciones del líquido de la vesícula seminal, (LVS concentrado, LVS diluido 1:2 o LVS diluido 1:5 con solución salina 0.9%) o solamente el vehículo (ratas control), usando una aguja calibre 30. El cuerno uterino se reintrodujo en el espacio retroperitoneal, y se cerró la piel con seda calibre 4-0. Las ratas se recuperaron de la anestesia dentro de los 60 minutos posteriores a la inyección intrauterina. Las ratas se sacrificaron por decapitación a las 09:00 horas de la etapa del estro, confirmado previo al sacrificio mediante frotis vaginal. La sangre de las ratas se centrifugó por 10 minutos a 2500 rpm para obtener el suero. Todas las muestras se conservaron a -70°C hasta el momento del análisis. Inmediatamente después del sacrificio, se disectaron ambos cuernos uterinos.

7.4 PROCESAMIENTO DEL TEJIDO

Cada cuerno uterino se fijo por separado con paraformaldehído al 4% en PBS durante 2 horas. Posteriormente los tejidos fueron deshidratados, en soluciones crecientes de etanol (50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 96%, 100%), Xilol-Etanol y Xilol absoluto y se impregnaron e incluyeron en parafina. Se hicieron cortes de 5 μm de grosor en micrótopo (LEICA RM2145) y se colocaron en laminillas CORNING tratadas con solución de Poli-L-lisina (Sigma - Aldrich).

7.5 DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE APOPTÓTICO

La determinación del índice apoptótico de ambos epitelios uterinos, se realizó mediante la técnica de TUNEL en cortes histológicos. Para lo cual se utilizó un kit de detección *in situ* de muerte celular (Roche Diagnostics Corp., Mannheim, Germany), siguiendo las instrucciones del fabricante. Este kit se basa en el marcaje de los extremos libres 3'-OH del ADN, los cuales se generan por la degradación del ADN durante la muerte celular, con un nucleótido modificado (TMR red-dUTP) por medio de la enzima deoxinucleotidil transferasa terminal (TdT). El ADN marcado con dUTP-TMR red, es detectado y analizado mediante el uso de un microscopio de fluorescencia.

En resumen, los cortes de tejido se rehidrataron con Xilol, Xilol-Etanol, soluciones decrecientes de Etanol (100%, 96%, 90%, 80%, 70% y 50%), agua corriente y PBS. Posteriormente se incubaron los cortes con proteinasa K (20

$\mu\text{g/mL}$ en Tris-HCl 10 mM, pH 8), durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después se lavaron con PBS y se permeabilizaron con Triton X-100 (Sigma-Aldrich) al 0.1% en PBS durante dos minutos a 4°C. El control positivo se trató con DNasa (Boehringer Mannheim) (2.5 U) durante 10 minutos a 37°C. Se lavó nuevamente con PBS y se incubaron con la mezcla de reacción del kit de TUNEL (enzima deoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) con mezcla de nucleótidos en buffer de reacción), a 37°C durante 1 hora. Después se lavó nuevamente con PBS y se contratiñeron los núcleos con Hoechst 33258.

El índice apoptótico fue estimado contando el número de células apoptóticas marcadas en cada tipo de epitelio respecto al número total de células correspondientes a cada epitelio. Tres secciones de útero fueron cuantificadas para cada uno de los cuernos uterinos tratados con las diferentes concentraciones. Los resultados se expresaron con la media y el error estándar de la media.

7.6 CUANTIFICACIÓN HORMONAL

Se llevó a cabo la cuantificación del nivel hormonal en suero mediante el método de radioinmunoanálisis (RIA) (Abraham, 1975). Se cuantificaron los niveles de estradiol (E_2) y progesterona (P_4) de cada grupo de animales tratados con líquido de la vesícula seminal y control (solución salina 0.9%), sacrificados a las 09:00 horas de la etapa del estro. La sensibilidad del ensayo fue de 5.4 pg/ml para el estradiol y de 8.3 ng/ml para la progesterona. Los coeficientes de variación intra e interensayo fueron de $5.3 \pm 8\%$ y $6.5 \pm 10\%$ respectivamente.

7.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para determinar si había diferencias significativas en el índice apoptótico de los epitelios uterinos de las ratas tratadas con diferentes concentraciones de LVS y control, se llevo a cabo un análisis de varianza de una sola vía (ANOVA), seguido por una prueba de comparación múltiple de Tukey. Se usó el programa Prism 2.01 para calcular los valores de probabilidad y los errores estándar de la media (\pm ESM).

8. RESULTADOS

8.1 EFECTO DEL LVS SOBRE LA APOPTÓISIS DEL EPITELIO UTERINO DE LA RATA.

Para cuantificar los cambios en el porcentaje de células muertas en cada epitelio uterino se utilizaron úteros de ratas tratadas con diferentes concentraciones de LVS (concentrado, diluido 1:2 y diluido 1:5) y ratas control (solución salina). Los úteros se fijaron con paraformaldehído al 4%, se incluyeron en parafina y se procesaron con un estuche para detección *in situ* de muerte celular (Roche Diagnostics Corp., Mannheim, Germany), contratiñendo con Hoechst y se observaron las células positivas utilizando un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse E600). En la Figura 8, se puede observar la disminución de las células marcadas (células apoptóticas) en el epitelio luminal de los animales tratados con el líquido de la vesícula seminal, en comparación con las ratas control.

En el útero control se observaron células muertas a casi todo lo largo del epitelio luminal (derecho 12.92 ± 1.19 %, izquierdo 13.06 ± 0.95 %); mientras que para los úteros de los animales tratados con LVS, en la concentración en la que se observó mayor número de células muertas en el epitelio luminal (menor inhibición de la apoptosis) fue en la dilución 1:5 (derecho 6.87 ± 0.59 %, izquierdo 6.95 ± 0.55 %), (Figura 8B). Mientras que los animales tratados con LVS diluido 1:2 (derecho 4.55 ± 0.26 %, izquierdo 4.84 ± 0.38 %) y LVS concentrado (derecho 3.97 ± 0.71 %, izquierdo 4.26 ± 0.43 %).

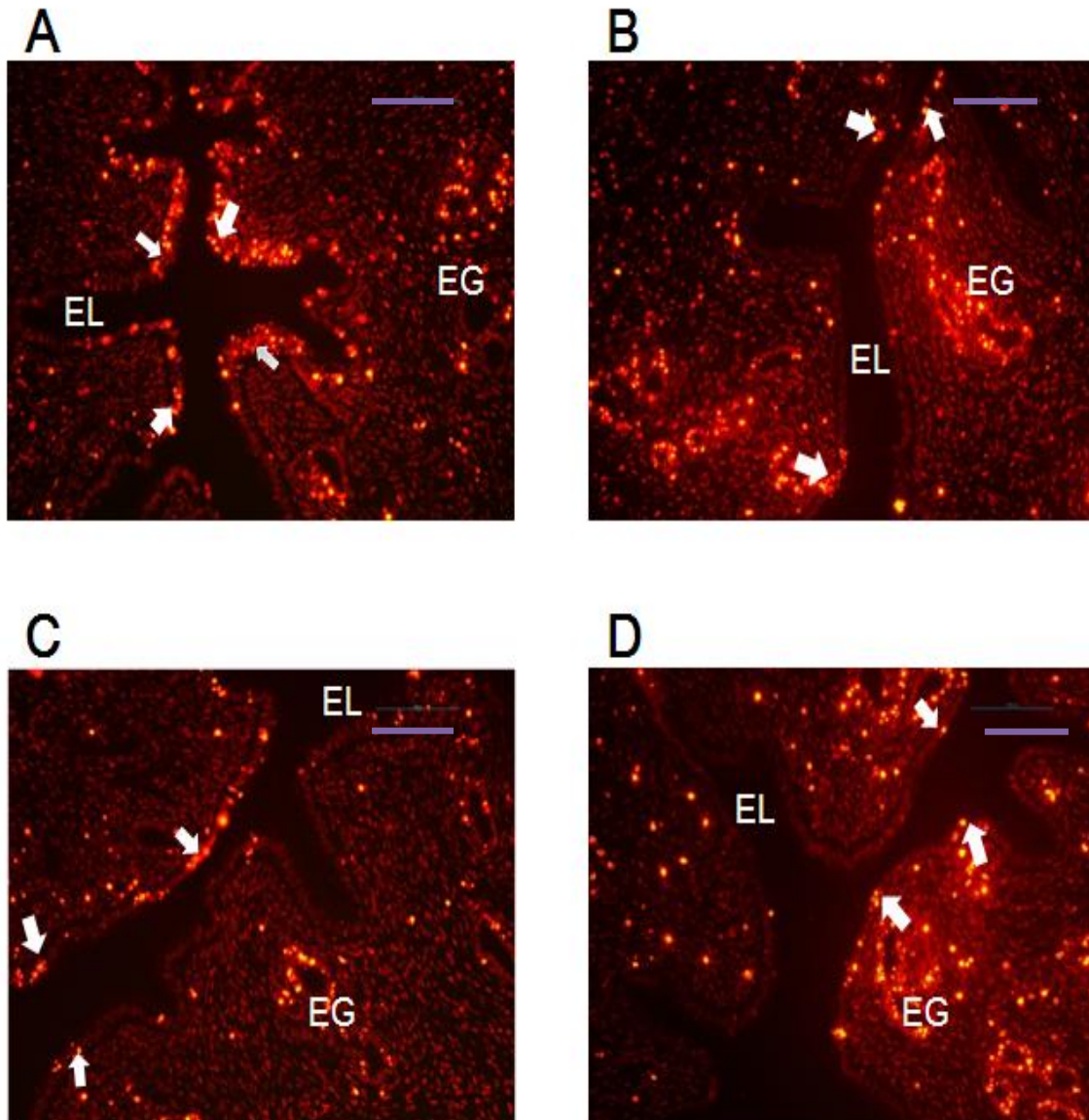


Figura 8. MUERTE CELULAR PROGRAMADA DEL EPITELIO UTERINO TRATADO CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE LVS Y CONTROL DETERMINADO POR EL MÉTODO DE TUNEL. Se muestra un ensayo representativo para cada concentración estudiada y control: A) Control (solución salina 0.9%), B) Tratadas con LVS dilución 1:5, C) Tratadas con LVS diluido 1:2, D) Tratadas con LVS concentrado. Las flechas indican células positivas a la reacción de TUNEL. Barra = 100 μ m. EL=epitelio luminal; EG= epitelio glandular.

Como se esperaba, se obtuvo una mayor inhibición de la apoptosis en los grupos tratados con LVS diluido 1:2 y LVS concentrado. En estos dos grupos también se observaron células muertas en el epitelio luminal pero fueron menos que las células observadas en el LVS diluido 1:5. (Figuras 8C y 8D respectivamente). La cuantificación se realizó sobre laminilla.

En el epitelio glandular no se observaron diferencias significativas en los índices apoptóticos de ratas controles comparadas con ratas tratadas con las diferentes concentraciones de LVS. Para el caso del grupo control se observó un índice apoptótico de $26.11 \pm 1.19\%$, para animales tratados con LVS dil 1:5 en el mismo tipo celular fue de $27.13 \pm 4.17\%$, en el tratamiento con LVS dil 1:2 $33.63 \pm 2.07\%$, mientras que para los animales tratados con LVS concentrado el índice apoptótico fue de $35.27 \pm 3.25\%$. Esto puede observarse en la Figura 8, donde se aprecian células marcadas en el epitelio glandular en todas las concentraciones estudiadas. En ambos epitelios uterinos, luminal y glandular, no se encontraron diferencias significativas entre los úteros derechos (no tratados), comparados con los úteros izquierdos(tratados).

Para obtener el índice apoptótico se cuantificó el número de células totales para cada uno de los epitelios, así como el número de células positivas, obteniendo así el porcentaje de células apoptóticas para cada uno de los epitelios. Los resultados de la cuantificación para el epitelio luminal y epitelio glandular se presentan en las Figuras 9 y 10, respectivamente.

En la Figura 9 se observa el índice apoptótico del epitelio luminal de ambos cuernos uterinos. El índice apoptótico para las ratas control (solución salina 0.9%) fue de $17.92 \pm 1.19\%$, para el grupo tratado con LVS dil 1:5 fue de $6.87 \pm 0.59\%$,

mientras que para los grupos tratados con LVS dil 1:2 y LVS concentrado se tuvieron índices apoptóticos de $4.55 \pm 0.26\%$ y $3.97 \pm 0.71\%$ respectivamente. Se encontró una diferencia significativa entre el grupo control y los tres grupos tratados con LVS (LVS dil1:5, LVS dilución 1:2 y LVS concentrado). El grupo tratado con LVS dilución 1:5 también es significativamente diferente de LVS dilución 1:2 y LVS concentrado. Para los grupos LVS dilución 1:2 y LVS concentrado., se tiene que son significativamente diferentes al grupo control y al grupo LVS dilución 1:5, pero no hay diferencia significativa entre ellos.

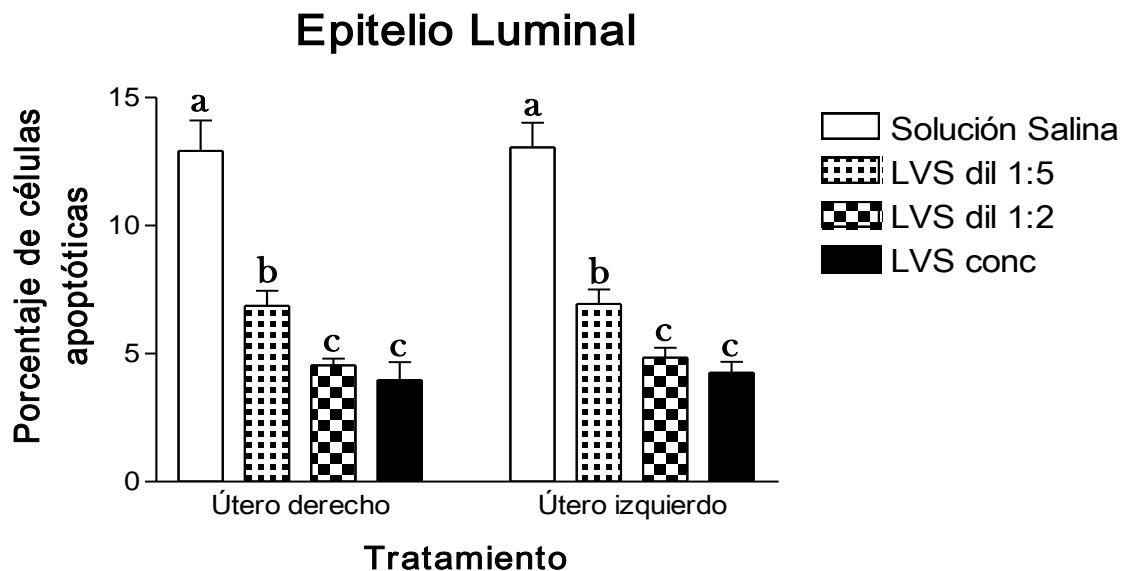


Figura 9. ÍNDICE APOPTÓTICO DEL EPITELIO. LUMINAL UTERINO DE RATAS TRATADAS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE LVS Y SOLUCIÓN SALINA. Se llevó a cabo la reacción de TUNEL en el útero de 5 animales tratados con las diferentes concentraciones de LVS y control. Los resultados se expresan como la media \pm ESM. Para este epitelio: ^a $p < 0.001$ comparado con los úteros tratados LVS dil 1:5, LVS dil 1:2 y LVS concentrado. ^b $p < 0.05$ comparado con LVs dil 1:2 y LVS concentrado. No hay diferencias significativas entre LVS dil 1:2 y LVS concentrado. No existen diferencias significativas entre el útero derecho y el útero izquierdo.

En la Figura 10 se puede ver el índice apoptótico del epitelio glandular de ambos cuernos uterinos. Para los animales control se tiene un índice apoptótico de $26.11 \pm 1.70\%$, para el grupo tratado con LVS dilución 1:5 el índice apoptótico fue de $27.13 \pm 4.17\%$, mientras que para los animales tratados con LVS dilución 1:2 y LVS concentrado se encontraron índices apoptóticos de $33.63 \pm 2.07\%$ y $35.27 \pm 3.25\%$ respectivamente. No se encontraron diferencias significativas en el epitelio glandular uterino de las ratas control comparadas con las tratadas con LVS a ninguna concentración.

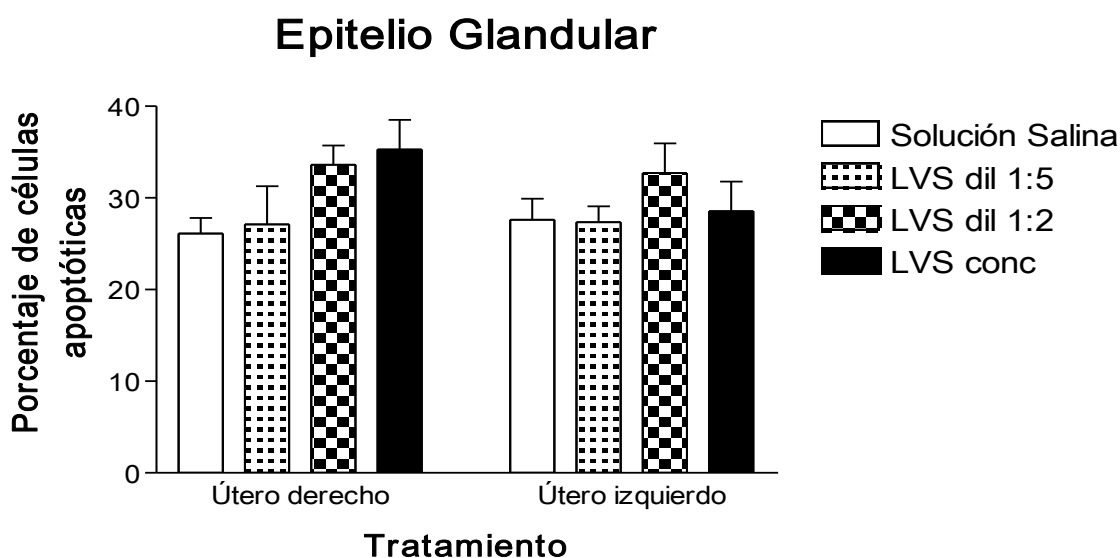


Figura 10. ÍNDICE APOPTÓTICO DEL EPITELIO GLANDULAR UTERINO DE RATAS TRATADAS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE LVS Y SOLUCIÓN SALINA. Se llevó a cabo la reacción de TUNEL en el útero de 5 animales tratados con diferentes concentraciones de LVS. Los resultados se expresan como la media \pm ESM. En este epitelio no existen diferencias significativas para ninguno de los grupos estudiados. No hay diferencias significativas entre el útero derecho y el útero izquierdo.

En ninguno de los epitelios uterinos cuantificados (luminal y glandular), se observaron diferencias significativas entre el útero tratado (izquierdo) y el útero no tratado (derecho). Esto se muestra en las Figuras 9 y 10.

8.2. NIVELES HORMONALES

Se analizó el nivel plasmático de E₂ y P₄ de todos los animales estudiados para verificar el status hormonal durante el ciclo estral. Los niveles hormonales se obtuvieron por radioinmunoanálisis y coinciden con las concentraciones reportadas previamente por Mendoza-Rodríguez para animales apareados y no apareados a las 09:00 horas del día del estro (Tabla 3). Los niveles hormonales obtenidos por radioinmunoanálisis para las ratas tratadas con las diferentes concentraciones de líquido de la vesícula seminal y control (solución salina 0.9%) concordaron con los datos reportados en la literatura.

Tabla 3. Niveles séricos de E2 y P4 a las 09:00 horas del día del estro, de animales tratados intrauterinamente con diferentes concentraciones de LVS y control.

	E2 (pg/mL)	P4 (ng/mL)
Ratas apareadas	29.12 ± 14.82	7.85 ± 5.82
Ratas no apareadas	33.78 ± 4.51	6.84 ± 2.50
S.S	23.61 ± 9.15	21.59 ± 12.34
LVS dilución 1:5	24.88 ± 7.07	18.25 ± 4.27
LVS dilución 1:2	24.55 ± 14.04	23.24 ± 11.65
LVS concentrado	21.99 ± 8.13	19.84 ± 7.88

Los niveles fueron determinados por radioinmunoanálisis. Los datos se expresan como la media ± DS de 5 animales por grupo.

9. DISCUSIÓN

El proceso de apareamiento es muy complejo e incluye la conducta sexual y cambios hormonales en el útero de la rata. Es bien conocido que el apareamiento induce cambios neuroendocrinos indispensables para la reproducción, sin embargo, aun no se conoce bien como es que los factores que se encuentran contenidos en el semen, contribuyen al proceso de fertilización. Este trabajo comprueba que el líquido de la vesícula seminal tiene la capacidad de retrasar la muerte celular programada del epitelio luminal uterino a las 09:00 horas del estro aún en ausencia del estímulo vagino-cervical del apareamiento.

Se ha establecido que el proceso de apareamiento modifica significativamente los patrones de muerte celular del epitelio luminal uterino. Se sabe que el índice apoptótico del epitelio luminal uterino de animales no apareados es de $17.29 \pm 5.44\%$ a las 09:00 horas del estro, mientras que en animales apareados es de apenas $1.18 \pm 0.09\%$ a la misma hora (Mendoza-Rodríguez et al., 2008). Sin embargo son pocos los estudios realizados que evalúan la contribución del eyaculado en los cambios uterinos presentados durante el apareamiento. En este estudio se determinaron por separados los índices apoptóticos de ambos epitelios uterinos (luminal y glandular) a las 09:00 horas de la etapa del estro, de ratas tratadas intrauterinamente con diferentes concentraciones de líquido de la vesícula seminal (LVS diluido 1:5, LVS diluido 1:2 y LVS concentrado) y control (solución salina 0.9%), utilizando la técnica de TUNEL. Esta técnica nos permite identificar las células apoptóticas por medio de

un microscopio de fluorescencia. Se demostró que existe una disminución en el índice apoptótico del epitelio luminal uterino a las 09:00 horas del estro, en las ratas tratadas intrauterinamente con LVS. Se decidió emplear líquido de la vesícula seminal debido a que contribuye con más del 50% del volumen total del eyaculado.

Los resultados obtenidos indican que los factores contenidos en el líquido de la vesícula seminal, son capaces de retrasar la muerte celular programada del epitelio luminal uterino a las 09:00 horas del estro (Figuras 8, 9 y 10), de manera equivalente al proceso de apareamiento. Estos resultados concuerdan con el estudio previo realizado en nuestro laboratorio (Mendoza-Rodríguez *et al.*, 2008) en el cual la muerte celular del epitelio luminal uterina de ratas control alcanza un nivel de $17.29 \pm 5.44\%$ a las 09:00 horas de la etapa del estro, que es equivalente a la observada en el presente estudio para las ratas control (solución salina 0.9%) a la misma hora ($17.92 \pm 1.19\%$), mientras que para las ratas apareadas se reportan niveles de solo $1.18 \pm 0.09\%$ en el mismo tipo celular (Mendoza-Rodríguez *et al.*, 2008). Estos resultados concuerdan con los obtenidos para las ratas tratadas con LVS a las diferentes concentraciones estudiadas, aún cuando la disminución no es tan evidente como la reportada para animales apareados (la máxima disminución observada fue de $3.97 \pm 0.71\%$ en los animales tratados con LVS concentrado). Esto probablemente se debe a que en los animales apareados se tienen los factores del eyaculado completo en contacto con el tejido uterino, además de la contribución del estímulo vagino-cervical, pues como ya se dijo este estímulo es suficiente para provocar enormes cambios biológicos en los animales

apareados. Debido a que en el presente estudio se evitó completamente el estímulo cervico-vaginal del apareamiento, se pueden atribuir los efectos observados a los factores contenidos en el líquido de la vesícula seminal. Lo anterior nos indica que el retraso en la muerte celular programada del epitelio luminal uterino es necesario para el proceso de fertilización.

Los datos de índice apoptótico para el epitelio glandular uterino a las 09:00 horas del estro concuerdan con los datos obtenidos previamente en nuestro laboratorio para animales apareados (Mendoza-Rodríguez et al., 2008), en este estudio se reportó un índice apoptótico de $36.99 \pm 1.98\%$ para el epitelio glandular uterino de animales apareados y de $44.82 \pm 7.94\%$ para animales intactos en el mismo tipo celular, es decir, no existe una diferencia significativa en el índice apoptótico de ratas apareadas y no apareadas. En este trabajo tampoco se observó un cambio en el índice apoptótico del epitelio glandular uterino para ninguno de los grupos estudiados (Figura 10). Esto se debe, en parte, a que este compartimiento probablemente no está en contacto directo con los factores contenidos en el líquido de la vesícula seminal durante el proceso de fertilización (Gray et al., 2001; Mendoza-Rodríguez et al., 2005), y a que los epitelios luminal y glandular se encuentran bajo diferentes mecanismos de regulación endocrina (Tachi et al., 1972; Mendoza-Rodríguez et al., 2003a).

Los cuernos uterinos se cuantificaron por separado debido que la administración intrauterina se realizó únicamente en el cuerno izquierdo. Aún así, no se encontraron diferencias significativas en los índices apoptóticos del cuerno izquierdo (tratado) y el cuerno derecho (no-tratado) (Figuras 9 y 10). Esto puede

explicarse, ya que los cuernos uterinos no son órganos aislados el uno del otro, sino que se unen en la vagina, por lo tanto al inyectar el líquido de la vesícula seminal en el útero izquierdo, este es capaz de difundir hacia el otro cuerno uterino, de esta forma se observa el efecto en ambos cuernos uterinos.

Como se esperaba, la disminución del índice apoptótico fue mayor conforme se aumentó la concentración de líquido de la vesícula seminal, pero para el LVS concentrado ya no hubo una disminución significativamente mayor con respecto al del LVS dilución 1:2. Esto sugiere la posibilidad de que los factores contenidos en el líquido de la vesícula seminal estén actuando mediante la unión a un receptor, por lo que al saturarse este receptor no se puede incrementar el efecto observable aún cuando se incrementa la concentración del ligando (Factor antiapoptótico).

El papel de las hormonas esteroides en la regulación de la muerte celular programada del útero durante el ciclo estral se ha estudiado previamente por diversos grupos (Butcher et al., 1974; Spornitz et al., 1994; Mendoza-Rodríguez et al., 2002 y 2003a). Sin embargo, existen pocos estudios acerca de los cambios apoptóticos en el útero después del apareamiento (Zhang and Paria., 2006), y de la participación de las hormonas esteroides en este proceso. En este estudio, no se encontraron diferencias significativas en los niveles séricos de estradiol E2 y progesterona P4 entre ratas tratadas con las diferentes concentraciones de líquido de la vesícula seminal y ratas control.

10. CONCLUSIONES

De acuerdo con los objetivos planteados para el presente estudio, las conclusiones del presente trabajo indican que:

1. El líquido de la vesícula seminal es capaz de inhibir la apoptosis del epitelio luminal uterino a las 09:00 horas de la etapa del estro. La inhibición de la apoptosis producida por el líquido de la vesícula seminal es similar a la observada en ratas apareadas con respecto a ratas control (intactas). Los resultados indican que el líquido de la vesícula seminal contiene factores que contribuyen al retraso del índice apoptótico observado en ratas apareadas.
2. No se observaron cambios en el índice apoptótico del epitelio glandular uterino de las ratas tratadas con líquido de la vesícula seminal a ninguna concentración con respecto al grupo control. Esto concuerda con los resultados observados previamente por Mendoza y colaboradores en ratas apareadas comparadas con ratas no apareadas. Probablemente por el impedimento anatómico para que los factores contenidos en el líquido de la vesícula seminal entren en contacto con el epitelio glandular durante el apareamiento, así como a la diferencia en la regulación endocrina que existe entre el epitelio luminal y el epitelio glandular.

3. La inhibición de la apoptosis inducida por el líquido de la vesícula seminal es dosis dependiente, es decir, a mayor concentración de líquido de la vesícula seminal se observa una mayor inhibición de la apoptosis, pero esta dependencia no es lineal; lo que nos habla de la posibilidad de un receptor para estos factores.

Finalmente, los resultados obtenidos han demostrado que los cambios que presenta el útero durante el proceso de apareamiento pueden ser atribuidos en gran parte a los factores contenidos en el semen, ya que el líquido de la vesícula seminal que es un componente abundante del semen, es capaz de producir el mismo efecto de retraso de la muerte celular programada observado a las 09:00 horas de la etapa del estro en ratas apareadas. Los resultados indican que el líquido de la vesícula seminal tiene la capacidad de inhibir la apoptosis del epitelio luminal uterino, mientras que en el epitelio glandular no se presentan cambios en el índice apoptótico.

Estos resultados sustentan la idea de que los factores contenidos en el líquido de la vesícula seminal juegan un papel importante durante la fertilización y en la remodelación del tejido uterino, culminando con la mejora de la receptividad endometrial para la implantación del embrión.

Es importante reconocer que los estudios realizados en la presente tesis solamente emplean líquido de la vesícula seminal, que aunque es un componente mayoritario del semen, deja fuera otros factores que podrían estar contribuyendo también al retraso de la muerte celular programada.

11. PERSPECTIVAS

Además de estos resultados, es importante analizar si el efecto atribuido al líquido de la vesícula seminal se comporta de manera similar al proceso de apareamiento. Para lo cual es importante analizar el efecto del líquido de la vesícula seminal en el patrón de muerte celular programada del epitelio uterino a diferentes horas de la etapa del estro, para observar si al igual que el proceso de apareamiento este índice apoptótico se recupera a las 13:00 horas del estro.

Además es interesante analizar el contenido proteínico del líquido de la vesícula seminal para encontrar los posibles componentes que estén participando en el efecto antiapoptótico observado y probarlos posteriormente a concentraciones fisiológicas directamente en el útero de la rata y caracterizarlos.

12. REFERENCIAS

- Abbadie, C., Kabrun, N., Bouali, F., Smardova, J., Stéhelin, D., Vandebunder, B., et al. (1993). High levels of c-rel expression are associated with programmed cell death in the developing avian embryo and in bone marrow cells in vitro. *Cell* , 75 (5), 899-912.
- Ameisen, J. C. (1996). The Origen of Programmed Cell Death. *Science* , 272 (5266), 1278-1279.
- Amsterdam, A., Dantes, A., Selvaraj, N., & Aharoni, D. (1997). Apoptosis in steroidogenic cells: Structure-function analysis. *Steroids* , 62, 207-211.
- Baker, D. (1979). Reproduction and breeding: The laboratory rat. *Biology and diseases* (Baker HJ, Lindsey JR, Weisbroth SH ed) , 154.
- Barinaga, M. (1996). Forging a Path to Cell Death. *Science* , 273 (5276), 735-737.
- Bernal, J., & Nunez, J. (1995). Thyroid hormones and brain development. *European Journal of Endocrinology* , 133 (4), 390-398.
- Blobel, G. A., & Orkin, S. H. (1996). Estrogen-Induced Apoptosis by Inhibition of the Erythroid Transcription Factor GATA-1. *Molecular and Cellular Biology* , 16 (4), 1687–1694.
- Broeck, S. V. (2002). Morphological and Biochemical Aspects of Apoptosis, Oncosis and Necrosis. *Anatomycal Histologyc Embryology* , 31, 214–223.

- Brown-Grant, K., Exley, D., & Naftolin, F. (1970). Peripheral plasma oestradiol and luteinizing hormone concentrations during the oestrous cycle of the rat. *The Journal of Endocrinology* , 48 (2), 295-296.
- Buchanan, D. L., Kurita, T., Taylor, J. A., Lubahn, D. B., Cunha, G. R., & Cooke, P. S. (1998). Role of stromal and epithelial estrogen receptors in vaginal epithelial proliferation, stratification, and cornification. *Endocrinology* , 139 (10), 4345-4352.
- Burroughs, K. D., Fuchs-Young, R., Davis, B., & Walker, C. L. (2000). Altered Hormonal Responsiveness of Proliferation and Apoptosis During Myometrial Maturation and the Development of Uterine Leiomyomas in the Rat. *Biology of Reproduction* , 63, 1322–1330.
- Butcher, R. L., Collins, W. E., & Fugo, N. W. (1974). Plasma concentration of LH, FSH, prolactin, progesterone and estradiol-17beta throughout the 4-day estrous cycle of the rat. *Endocrinology* . , 94 (6), 1704-1708.
- Catlin, E. A., MacLaughlin, D. T., & Donahoe, P. K. (1993). Mullerian inhibiting substance: new perspectives and future directions. *Microscopy Research and Technique* , 25 (2), 121-133.
- Ceccatelli, S., Diana, A., Villar, M. J., & Nicoreta, P. (1995). Adrenocortical apoptosis in hypophysectomized rats is selectively reduced by ACTH. *Neuroreport* , 6 (2), 342-344.

- Chun, S.-Y., Eisenhauer, K. M., Minami, S., Billig, H., Perlas, E., & Hsueh, A. J. (1996). Hormonal Regulation of Apoptosis in Early Antral Follicles: Follicle-Stimulating Hormone as a Major Survival Factor. *Endocrinology* , 137 (4), 1447-1456.
- Cooke, P. S., Buchanan, D. L., Young, P., Setiawan, T., Brody, J., Korach, K. S., et al. (1997). Stromal estrogen receptors mediate mitogenic effects of estradiol on uterine epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* , 94 (12), 6535-6540.
- Cooke, P. S., Buchanan, D. L., Young, P., Setiawan, T., Brody, J., Korach, K. S., y otros. (1997). Stromal estrogen receptors mediate mitogenic effects of estradiol on uterine epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* , 94 (12), 6535-6540.
- Cooke, P. S., Uchima, F.-D., Fujii, D. K., Bern, H. A., & Cunha, G. R. (1986). Restoration of normal morphology and estrogen responsiveness in cultured vaginal and uterine epithelia transplanted with stroma. *Proceedings of National Academy of Sciences of USA* , 83 (7), 2109-2113.
- Denmeade, S. R., Lin, X. S., & Isaacs, J. T. (1996). Role of programmed (apoptotic) cell death during the progression and therapy for prostate cancer. *The Prostate* , 28 (4), 251-265.
- Diakow, C. (1975). Motion picture analysis of rat mating behavior. *Journal of Comparative and Physiological Psychology* , 88, 704–712.

- Erskine, M. S. (1993). Mating-induced increases in FOS protein in preoptic area and medial amygdala of cycling female rats. *Brain Research Bulletin* , 32, 447-451.
- Erskine, M., & Kornberg, E. (1992). Acute luteinizing hormone and prolactin responses to paced mating stimulation in the estrous female rat. *Journal of Neuroendocrinology* , 4, 173–179.
- Evans, R. M. (1988). The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* , 240 (4854), 889-895.
- Evans-Storms, R. B., & Cidlowski, J. A. (1995). Regulation of Apoptosis by Steroid Hormones. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* , 53 (1-6), 1-8.
- Fletcher-Chiappini, S. E., Compton, M. M., La Voie, H. A., Day, E. B., & Witorsch, R. J. (1993). Glucocorticoid-prolactin interactions in Nb 2 lymphoma cells: antiproliferative versus anticytolytic effects. (C. M. Fletcher-Chiappini SE, Ed.) *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* , 202 (3), 345-352.
- Freeman, M. E. (1988). The ovarian cycle of the rat. En *The Physiology of Reproduction* (E Knobil y J Neill, ed). 1893.
- Gibbons, G. H., & Dzau, V. J. (1996). Molecular therapies for vascular diseases. *Science* , 272 (5262), 689-693.

- Gopichandran, N., Ekbote, U. V., Walker, J. J., Brooke, D., & Orsi, N. M. (2006). Multiplex determination of murine seminal fluid cytokine profiles. *Reproduction* , 131 (3), 613-621.
- Gray, C., Bartol, F., Tarleton, B., Wiley, A., Johnson, G., Bazer, F., et al. (2001). Developmental biology of uterine glands. *Biology of Reproduction* , 65, 1311-1323.
- Gunnert, J., & Freeman, M. (1983). The mating-induced release of prolactin: a unique neuroendocrine response. *Endocrinology* , 4, 44–61.
- Haanen, C., & Vermes, I. (1996). Apoptosis: Programmed cell death in fetal development. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* , 64, 129-133.
- Hafez, E. (1970). Female reproductive organs. En: *Reproduction and breeding techniques for laboratory animals* (Hafez ESE, ed) , 74.
- Harrington, E. A., Bennett, M. R., Fanidi, A., & Evan, G. I. (1994). c-Myc-induced apoptosis in fibroblasts is inhibited by specific cytokines. *The EMBO Journal* , 13 (14), 3286-3295.
- Hengartner, M. O. (2000). The Biochemistry of Apoptosis. *Nature* , 407, 770-776.
- Hermeking, H., & Eick, D. (1994). Mediation of c-Myc-Induced Apoptosis by p53. *Science* , 265 (5181), 2091-2093.
- Hop Wood, D., & Levison, D. A. (1976). Atrophy and apoptosis in the cyclical human endometrium. *The Journal of Pathology* , 119 (3), 159-166.

- Hsueh, A. J., Billig, H., & Tsafri, A. (1994). Ovarian Follicle Atresia: A Hormonally Controlled Apoptotic Process. *Endocrine Reviews* , 15 (6), 707-724.
- Kiess, W., & Gallaher, B. (1998). Hormonal control of programmed cell death/apoptosis. *European Journal of Endocrinology* , 138, 482–491.
- Kornberg, E., & Erskine, M. S. (1994). Effects of Differential Mating Stimulation on the Onset of Prolactin Surges in Pseudopregnant Rats. *Psychoneuroendocrinology* , 19 (4), 357-371.
- Kurita, T., Young, P., Brody, J. R., Lydon, J. P., O'Malley, B. W., & Cunha, G. R. (1998). Stromal progesterone receptors mediate the inhibitory effects of progesterone on estrogen-induced uterine epithelial cell deoxyribonucleic acid synthesis. *Endocrinology* , 139 (11), 4708-4713.
- Lang, R. A. (1997). Apoptosis in mammalian eye development: lens morphogenesis, vascular regression and immune privilege. *Cell Death and Differentiation* , 4, 12-20.
- Le Deist, F., Emile, J.-F., Rieux-Laucat, F., Benkerrou, M., Roberts, I., Brousse, N., et al. (1996). Clinical, immunological, and pathological consequences of Fas-deficient conditions. *The Lancet* , 348, 719-723.
- Mark W., D., & Heather S., T. (2007). Proteomics of semen and its constituents. *Clinical Proteomics* (1), 861-875.

- Martin, L., Finn, C. A., & Carter, J. (1970). Effects of progesterone and oestradiol-17 beta on the luminal epithelium of the mouse uterus. *Journal of Reproduction and Fertility* , 21 (3), 461-469.
- Marusak, R. A., Radi, Z. A., & Obert, L. (2007). Expression of Ki-67 in the uterus during various stages of the estrous cycle in rats. *Experimental and Toxicologic Pathology* , 59, 151–155.
- Mendoza-Rodríguez, C. A., Martínez, A. M., Vargas, O., Nava, K., Morimoto, S., Espinosa, M., et al. (2008). Mating modifies apoptosis pattern in epithelial cells of the rat uterus. Enviado para su publicación .
- Mendoza-Rodríguez, C. A., Merchant-Larios, H., Segura-Valdez, M. d., Moreno-Mendoza, N., Cruz, M. E., Arteaga-López, P., et al. (2002). Expression of p53 in Luminal and Glandular Epithelium During the Growth and Regression of Rat Uterus During the Estrous Cycle. *Molecular Reproduction and Development* (61), 445-452.
- Mendoza-Rodríguez, C. A., Merchant-Larios, H., Segura-Valdez, M. L., Moreno-Mendoza, N., Cruz, M. E., Arteaga-López, P., et al. (2003a). c-fos and Estrogen Receptor Gene Expression Pattern in the Rat Uterine Epithelium During the Estrous Cycle. *Molecular Reproduction and Development* (64), 379-388.
- Mendoza-Rodríguez, C. A., Monroy-Mendoza, M. G., Morimoto, S., & Cerbon, M. A. (2003). Pro-apoptotic Signals of the bcl-2 Gene Family in the Rat Uterus

Occurs in the Night Before the Day of Estrus and Precedes Ovulation.
Molecular and Cellular Endocrinology , 208, 31–39.

Meredith, J. M., Moffatt, C. A., Auger, A. P., Snyder, G. L., Greengard, P., & Blaustein, J. D. (1998). Mating-Related Stimulation Induces Phosphorylation of Dopamine and Cyclic AMP-Regulated Phosphoprotein-32 in Progesterin Receptor-Containing Areas in the Female Rat Brain. *The Journal of Neuroscience* , 18 (23), 10189–10195.

Migliorati, G., Nicoletti, I., & D'adamio, F. (1994). Dexamethasone induces apoptosis in mouse natural killer cells and cytotoxic T lymphocytes. *Immunology* , 81, 21-26.

Milas, L., Stephens, L. C., & Meyn, R. E. (1994). Relation of apoptosis to cancer therapy. *In Vivo* , 8 (5), 665-673.

Moulton, B. C., Motz, J., Serdoncillo, C., Akcali, K. C., & Khan, S. A. (1997). Progesterone Withdrawal and RU-486 Treatment Stimulate Apoptosis in Specific Uterine Decidual Cells. *Cell Death and Differentiation* , 4, 76-81.

Northrop, L. E., & Erskine, M. S. (2008). Selective Oxytocin Receptor Activation in the Ventrolateral Portion of the Ventromedial Hypothalamus Is Required for Mating-Induced Pseudopregnancy in the Female Rat. *Endocrinology* , 149 (2), 836-842.

- Oberlander, J. G., & Erskine, M. S. (2008). Receipt of Vaginal-Cervical Stimulation Modifies Synapsin Content in Limbic Areas of the Female Rat. *Neuroscience* , 153, 581–593.
- Pilch, B., & Mann, M. (2006). Large-scale and high-confidence proteomic analysis of human seminal plasma. *Genome Biology* , 7 (5), R40.
- Pollard, J. W., Pacey, J., Cheng, S. V., & Jordan, E. G. (1987). Estrogens and cell death in murine uterine luminal epithelium. *Cell and Tissue Research* , 249 (3), 533-540.
- Pushkala, P. D., & Gupta. (2001). Steroid hormones regulate programmed cell death: a review. *Cytobios* , 106 (413), 201-217.
- Robertson, S. A. (2005). Seminal plasma and male factor signalling in the female reproductive tract. *Cell and Tissue Research* , 322 (1), 43-52.
- Ronald, M. E. (1988). The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* , 240 (4854), 889-895.
- Rowe, D. W., & Erskine, M. S. (1993). c-Fos proto-oncogene activity induced by mating in the preoptic area, hypothalamus and amygdala in the female rat: role of afferent input via the pelvic nerve. *Brain Research* , 621, 25-34.
- Sandow, B. A., West, N. B., Norman, R. L., & Brenner, R. M. (1979). Hormonal control of apoptosis in hamster uterine luminal epithelium. *The American Journal of Anatomy* , 156 (1), 15-35.

- Sato, T., Fukazawa, Y., Kojima, H., Enari, M., Iguchi, T., & Ohta, Y. (1997). Apoptotic cell death during the estrous cycle in the rat uterus and vagina. *The Anatomical Record* , 248, 76–83.
- Serguera, C., Triaca, V., Kelly-Barrett, J., Al Banchaabouchi, M., & Minichiello, L. (2008). Increased dopamine after mating impairs olfaction and prevents odor interference with pregnancy. *Nature neuroscience* , 11 (8), 949-956.
- Spencer, S. J., Cataldo, N. A., & Jaffe, R. B. (1996). Apoptosis in the human female reproductive tract. *Obstet Gynecol Surv* , 51 (5), 314-323.
- Spornitz, U. M., Rinderknecht, B. P., Edelmann, A., Scheidegger, B., & Cairoli, F. (1994). Ultrastructure as a basis for dating of rat endometrium. *The Anatomical Record* , 238 (2), 163-176.
- Steinman, J., Carlton, S. M., & Willis, W. D. (1992). The segmental distribution of afferent fibers from the vaginal cervix and hypogastric nerve in rats. *Brain Research* , 575, 25–31.
- Tachi, C., Tachi, S., & Lindner, H. (1972). Modification by progesterone of oestradiol-induced cell proliferation, RNA synthesis and oestradiol distribution in the rat uterus. *Reproduction and Fertility* , 31, 59-76.
- Tata, J. R. (1994). Hormonal regulation of programmed cell death during amphibian metamorphosis. *Biochemistry and Cell Biology* , 72 (11-12), 581-588.

- Terada, N., Yamamoto, R., Takada, T., Mlyake, T., Terakawa, N., Wakimoto, H., et al. (1989). Inhibitory effect of progesterone on cell death of mouse uterine epithelium. *Journal of Steroid Biochemistry* , 33 (6), 1091-1096.
- Terada, N., Yamamoto, R., Takada, T., Mlyake, T., Terakawa, N., Wakimoto, H., y otros. (1989). Inhibitory effect of progesterone on cell death of mouse uterine epithelium. *Journal of Steroid Biochemistry* , 33 (6), 1091-1096.
- Thompson, C. B. (1995). Apoptosis in the Pathogenesis and Treatment of Disease. *Science* , 267 (5203), 1456-1462.
- Tibbetts, T. A., Mendoza-Meneses, M., O'Malley, B. W., & Conneely, O. M. (1998). Mutual and intercompartmental regulation of estrogen receptor and progesterone receptor expression in the mouse uterus. *Biology of Reproduction* , 59 (5), 1143-1152.
- Uchima, F.-D., Edery, M., Iguchi, T., Larson, L., & Bern, H. A. (1987). Growth of mouse vaginal epithelial cells in culture: functional integrity of the estrogen receptor system and failure of estrogen to induce proliferation. *Cancer Letters* , 35 (3), 227-235.
- Wimalasena, J., Meehan, D., & Cavallo, C. (1991). Human epithelial ovarian cancer cell steroid secretion and its control by gonadotropins. *Gynecologic Oncology* , 41 (1), 56-63.

- Wolozin, B., Iwasaki, K., Vito, P., Ganjei, J. K., Lacanà, E., Sunderland, T., et al. (1996). Participation of presenilin 2 in apoptosis: enhanced basal activity conferred by an Alzheimer mutation. *Science* , 274 (5293), 1710-1713.
- Wolozin, B., Iwasaki, K., Vito, P., Ganjei, J. K., Lacanà, E., Sunderland, T., y otros. (1996). Participation of presenilin 2 in apoptosis: enhanced basal activity conferred by an Alzheimer mutation. *Science* , 274 (5293), 1710-1713.
- Yang, S.-P., & Voogt, J. L. (2001). Mating-activated brainstem catecholaminergic neurons in the female rat. *Brain Research* , 894, 159–166.
- Yang, S.-P., & Voogt, J. L. (2002). Mating-activated nitric oxide-producing neurons in specific brain regions in the female rat. *Brain Research* , 950, 79–87.
- Yang, S.-P., Youngsoo, L., & Voogt, J. L. (2000). Involvement of Endogenous Opioidergic Neurons in Modulation of Prolactin Secretion in Response to Mating in the Female Rat. *Neuroendocrinology* , 72, 20–28.
- Zhang, Q., & Paria, B. C. (2006). Importance of Uterine Cell Death, Renewal, and Their Hormonal Regulation in Hamsters that Show Progesterone-Dependent Implantation. *Endocrinology* , 147 (5), 2215–2227.
- Zörnig, M., Hueber, A.-O., Baum, W., & Evan, G. (2001). Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. *Biochimica et Biophysica Acta* , 1551, F1-F37.