

Leji 163



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE CIENCIAS

**“ POSIBLE PARTICIPACION DE LOS ESTROGENOS DEL
BLASTOCISTO EN EL PROCESO DE IMPLANTACION
NORMAL Y RETARDADA DE LA RATA.”**

TESIS PROFESIONAL

Que para obtener el Título de
LICENCIADO EN BIOLOGIA

presenta

TERESA RUIZ GARCIA

MEXICO, D. F.

1983



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

I N D I C E

	PAG.
I. INTRODUCCION	1
II. OBJETIVO	40
III. MATERIAL Y METODOS	41
IV. RESULTADOS	59
V. DISCUSION Y CONCLUSIONES	81
VI. BIBLIOGRAFIA	85

INTRODUCCION

Desde el inicio de la existencia del hombre, la población humana ha estado limitada por la disponibilidad de alimentos. Durante sus dos primeros millones de años el hombre vivió como cazador, herbívoro y saprófito. En aquellas circunstancias, la biósfera no podía mantener una población de más de 10 millones, algo menos que la población de la ciudad de México hoy día. Más tarde, hace unos 10,000 años, una vez que domesticó plantas y animales, el hombre empezó a conformar la biósfera en su propio beneficio.

Conforme se hicieron más eficientes las técnicas primitivas de producción agrícola y ganadera, aumentó la producción de alimentos y se hizo posible el crecimiento de la población. Esta a su vez, exigió una mayor disponibilidad de alimentos, obligando al hombre a alterar aún más la biósfera a fin de satisfacer sus necesidades alimenticias. Así pues, el crecimiento de la población y las mejoras en la producción de alimentos se han influido recíprocamente.

Sin embargo, cualesquiera que sean las medidas que se tomen para aumentar el suministro de alimento cada vez se duda más que el ecosistema agrícola sea capaz de adaptarse al aumento previsto de la población humana de 7000 millones de habitantes para fines de siglo (22).

Es por esto que el control de la natalidad ha adquirido un papel tan importante en los últimos años y en consecuencia se le ha dado un fuerte impulso a los estudios encaminados a dilucidar los procesos bioquímicos que intervienen en la reproducción.

La rata, entre otros animales, ha sido utilizada ampliamente como modelo experimental en estudios sobre diferentes aspectos de la reproducción,

debido a su gran disponibilidad, facilidad de manejo y a la similitud existente entre su fisiología y la de otros mamíferos. Según Austin y Short (163) la rata de laboratorio ha sido el pilar de la endocrinología experimental por décadas, y en ella se han podido precisar los aspectos fisiológicos, morfológicos y bioquímicos que acontecen durante el ciclo estral.

Seguido de la adquisición de la pubertad, el estro (o calor) ocurre en hembras no embarazadas en ciclos rítmicos, especie-específicos. El período de tiempo entre el inicio de un estro y el siguiente es llamado ciclo estral. La periodicidad sexual en la mayoría de los mamíferos es dominada por dicho ciclo. Este depende tanto de factores endógenos como de factores exógenos. Entre los primeros es determinante la secreción gonadal de hormonas, mientras que los exógenos incluyen una serie de estímulos como la temperatura y el fotoperíodo. La hipófisis tiene una importancia fundamental como coordinadora de éstos debido a su relación con el mundo exterior a través del sistema nervioso, y con el resto del sistema endócrino por medio de un complejo sistema de interacciones hormonales (7, 103, 163, 183). El hipotálamo es el regulador central de las funciones internas del cuerpo y las coordina con los eventos externos. Recibe información de otras partes del cerebro, y sus células son sensibles a cambios en la composición en la sangre. Estas producen factores liberadores (neurosecreciones) que regulan la actividad de la hipófisis (124).

Los productos secretados por las glándulas endócrinas son las hormonas estas proporcionan transmisión química de información de una célula a otra, distinta a la comunicación nerviosa. Una hormona es una sustancia que induce el crecimiento, diferenciación y/o alteración de las actividades metabólicas de las células de tejidos específicos denominados "órganos blanco" (6, 109).

Puesto que las hormonas son vertidas a la sangre antes de ser usadas,-

Los niveles circulantes pueden dar alguna indicación de la actividad de la glándula endócrina correspondiente y de la exposición del órgano blanco. Debido a las pequeñas cantidades requeridas de las hormonas, los niveles sanguíneos - pueden ser extremadamente bajos. Las hormonas incluyen proteínas con peso molecular de 30,000 o menor, pequeños polipéptidos, derivados de un solo aminoácido y esteroides (89).

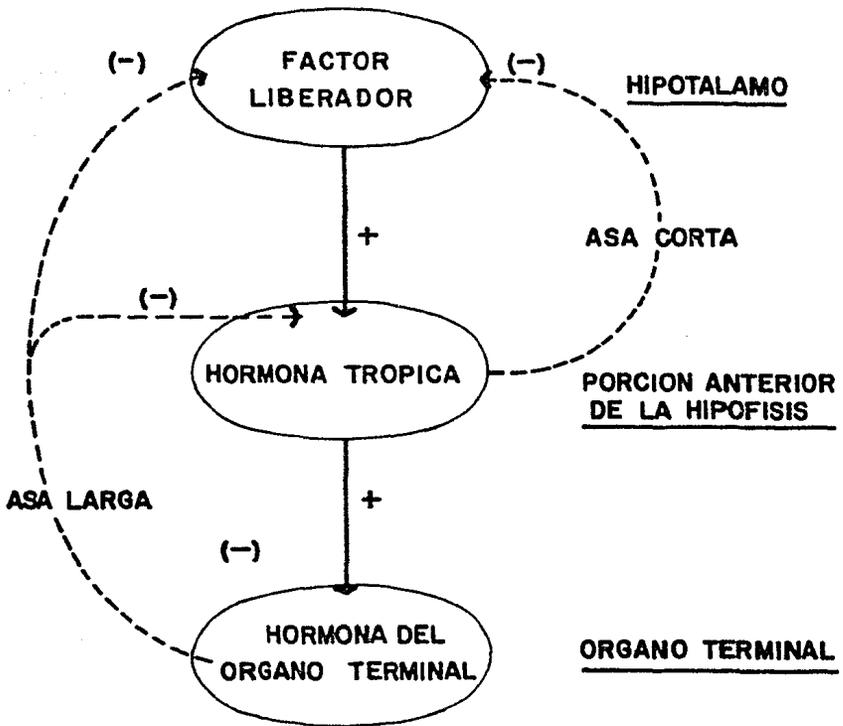
La función más característica de la hipófisis anterior es la elaboración de hormonas que influyen sobre las actividades de otras glándulas endocrinas, principalmente las que tienen que ver con la reproducción o el stress. Estas hormonas, a las que se les ha llamado hormonas trópicas, son transportadas - por la sangre a otras glándulas blanco y ayudan al mantenimiento de ellas y a producir sus respectivas hormonas. Las hormonas trópicas están bajo el control positivo y control negativo de factores peptídicos del hipotálamo (factores liberadores e inhibidores o neurohormonas hipotalámicas). La producción y liberación de las neurohormonas, a su vez, son sensibles a estímulos neurales y metabólicos y pueden ser inhibidas por sus hormonas trópicas respectivas - ("realimentación de asa corta") (fig. 1.). Además, las hormonas trópicas -- están usualmente sujetas a inhibición por retroalimentación a nivel hipofisario o hipotalámico por el producto hormonal de la glándula blanco. Así, la hidrocortisona, los esteroides sexuales y la tiroxina inhiben la liberación de sus - respectivas hormonas trópicas (89).

A continuación analizaremos algunos aspectos de las hormonas relacionadas con los procesos reproductivos:

1). Hormonas Protéicas.

Una vez alcanzada la madurez sexual, la hipófisis anterior secreta tres hormonas protéicas que ejercen un profundo efecto sobre las gónadas, llamándose

**FIGURA I FISILOGIA DEL EJE HIPOTALAMO-
HIPOFISIS-GONADA**



Control general por retroacción de los sistemas endócrinos que involucra el hipotálamo, la hipófisis anterior y el órgano terminal.

en consecuencia hormonas gonadotrópicas. Estas hormonas son la FSH, hormona folículo estimulante, la LH, hormona luteinizante y la prolactina o LTH, -- hormona luteotrópica (6,109).

La hormona estimulante del folículo (FSH) y la hormona luteinizante -- (LH) son sustancias trópicas que influyen sobre la función y maduración del -- testículo y del ovario. Son glucoproteínas con pesos moleculares de 25,000 (FSH) y de 40,000 (LH) aproximadamente. La secreción de hormonas luteinizante y estimulante del folículo es regulada por un solo factor liberador hipotalá--mico, la hormona liberadora de las hormonas luteinizante y estimulante del -- folículo (LH/FSH-RH). La LH/FSH-RH actúa directamente sobre la hipófisis -- para aumentar el AMPc y la liberación de gonadotropinas (6,7,89).

La hormona estimulante del folículo (FSH) se enlaza a receptores espe--cíficos sobre la membrana plasmática de sus células blanco. Promueve el desarrollo folicular, prepara al folículo para la acción de la hormona luteinizante -- (LH) y favorece la liberación de estrógeno por la misma hormona. En el macho, estimula el crecimiento del túbulo seminal y de los testículos y desempeña un papel importante en las etapas primarias de la espermatogénesis. La secreción de FSH es inhibida a nivel de la hipófisis y posiblemente del hipotálamo por la administración de testosterona, progesterona y probablemente por la propia hormona estimulante del folículo. Por lo general los estrógenos estimulan la secrereción de FSH pero pueden inhibirla, dependiendo de las circunstancias (6,7,89, 133).

La hormona luteinizante (LH) estimula en la hembra la maduración final del folículo de Graff, la ovulación y el desarrollo del cuerpo amarillo. Tanto la secreción de estrógenos como la de progesterona son estimuladas. En el ovario, la hormona luteinizante puede estimular elementos no germinales, que contienen

las células intersticiales, para producir andrógenos, androstenediona, dihidroepiandrostenediona y testosterona. En el macho, la LH estimula la producción de testosterona por el testículo, la cual a su vez mantiene la espermatogénesis y activa el desarrollo de los órganos sexuales accesorios tales como los vasos deferentes, la próstata y las vesículas seminales. La hormona luteinizante se une a receptores de la membrana plasmática (relativamente específicos) de las células lúteas e intersticiales, que no son afectados por la hormona estimulante del folículo (6,7,89,133).

La LH y la FSH pueden sensibilizar las células aumentando el número de receptores específicos a los que se enlazan los esteroides sexuales y por lo tanto afectan la acción androgénica y la estrogénica (89).

La prolactina hipofisaria (LTH) es una proteína de peso molecular aproximado de 23,000 que es producida por las células acidófilas hipofisarias. En los animales, la prolactina activa al cuerpo amarillo y hace que la producción de progesterona sea mantenida por el cuerpo amarillo desarrollado. La prolactina aumenta durante el embarazo y puede estimular el desarrollo de las glándulas mamarias. La prolactina puede ser inhibida por un factor hipotalámico, el factor inhibidor de prolactina (PIF) y al parecer puede ser estimulada por un factor liberador menos establecido y por la hormona liberadora de tirotrópina (TRP). Ambos estrógenos y el acto de succionar estimulan la secreción de prolactina (6,7,89).

2). Hormonas Esteroidales.

Los ovarios, testículos y glándulas adrenales secretan hormonas esteroidales, que comprenden un amplio grupo de moléculas derivadas de un precursor común, el colesterol. El colesterol se sintetiza a partir de acetil-CoA en muchos tejidos corporales. Forma parte del componente lipídico de la membrana

celular (6, 103). Su estructura molecular se basa en un sistema de cuatro anillos carbónicos que forman el núcleo perhidro (1, 2) ciclopentanofenantreno. La conversión de colesterol a pregnenolona marca el primer paso para la formación de la mayoría de las hormonas esteroidales, siendo las más importantes los progestágenos, los andrógenos, los estrógenos y los glucocorticoides -- (fig. 2).

Las rutas metabólicas que llevan a la síntesis de cada uno de estos grupos hormonales, están íntimamente ligadas (7, 103). Muchas hormonas esteroidales son transportadas en la corriente sanguínea fuertemente unidas a proteínas plasmáticas. Ya que las hormonas esteroidales son poco solubles en agua, esto representa una forma de incrementar su solubilidad en medios acuosos como el plasma sanguíneo, así como la capacidad de permanecer en éste, protegidas del metabolismo del hígado. El esteroide es probablemente inactivo biológicamente cuando está combinado con la proteína y se encuentra en equilibrio con los esteroides libres; forma en la que son asimilados por los tejidos (6).

En las últimas décadas se ha venido prestando una marcada atención al papel que desempeñan los esteroides sulfato como metabolitos o intermediarios en la biosíntesis de hormonas biológicamente activas y se ha podido precisar -- que éstos intervienen en forma importante en dicha biosíntesis.

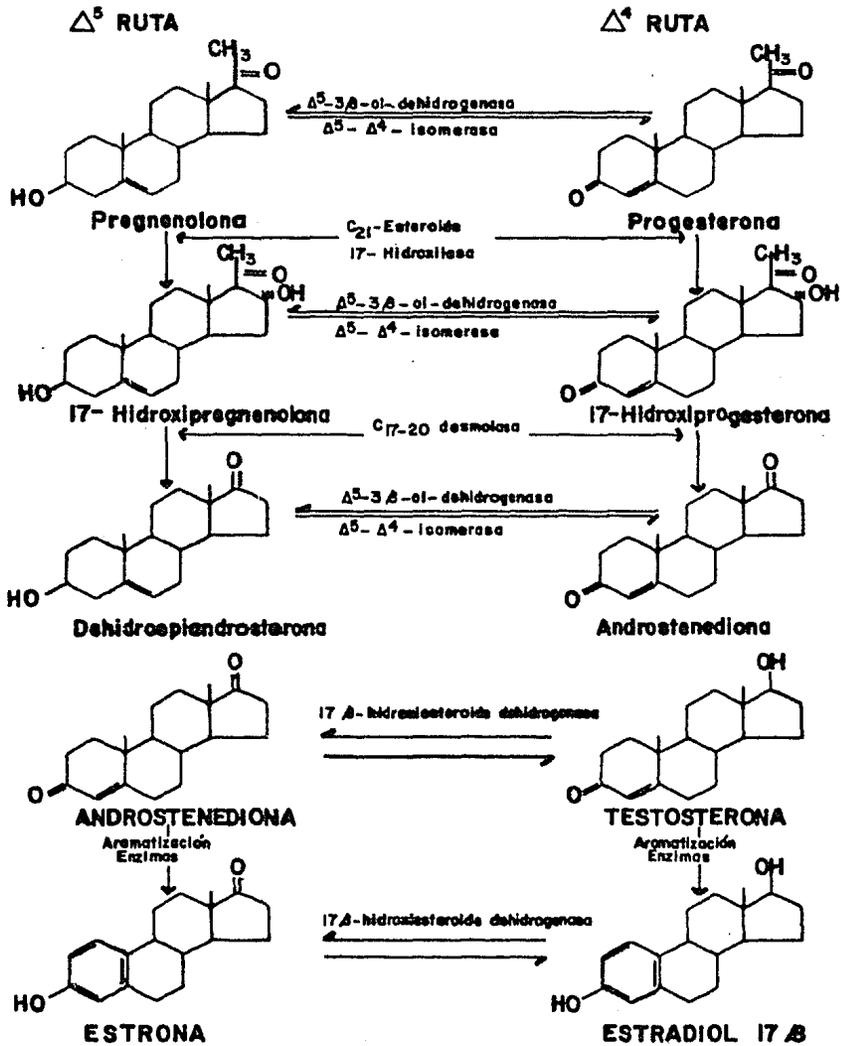
Cuando los esteroides se conjugan con el sulfato inorgánico forman esteroides sulfato. Estos comprenden dos grupos principales:

1). Los alquil sulfatos, compuestos esteroidales con estructura hidroxil, en los que el hidróxido se encuentra conjugado con un sulfato. Entre ellos se encuentran:

Colesterol sulfato (C-S)

Pregnenolona sulfato (P-S)

FIGURA 2 BIOSINTESIS DE ESTROGENOS



Rutas utilizadas por el ovario y la corteza adrenal para la síntesis de estrógenos.

17 OH pregnenolona sulfato 17OHP-S

Dehidro epiandrosterona sulfato D-S'

2). El segundo grupo está constituido por los aril-sulfatos de los estrógenos, esteroides que exhiben un grupo fenólico en el anillo A de su estructura. Son representativos de este grupo:

Estrona Sulfato (E_1S)

Estradiol sulfato (E_2S)

El grupo SO_4 de estos compuestos confiere a la molécula una gran polaridad presentando la característica de ser hidrosolubles, a diferencia de los -- esteroides libres que son liposolubles.

El ovario secreta dos tipos principales de hormonas femeninas: las hormonas foliculares o estrógenas producidas por las células del folículo de Graff en desarrollo, y las hormonas progestacionales, que derivan de la actividad de las células del cuerpo lúteo, el cual se forma en el ovario a partir de los folículos ováricos que se han roto (89).

Los andrógenos, testosterona y androstenediona, son precursores en la síntesis de los estrógenos en los testículos, ovarios, suprarrenales y placenta. Los estrógenos comprenden una clase de hormonas de principal importancia para los procesos reproductivos en la hembra. Se caracterizan químicamente por un anillo A-aromático y un grupo OH en la posición 3 del núcleo esteroideo. El principal representante de los estrógenos, y su forma activa más importante es el 17β estradiol, el cual se encuentra en equilibrio metabólico con la estrona menos activa. Está unido a una proteína portadora específica del plasma (proteína fijadora de esteroides sexuales) que también transporta a los andrógenos. El 17β estradiol es producido por el ovario por estimulación de las hormonas - gonadotrópicas provenientes de la adenohipófisis. Ejerce su acción sobre el -

crecimiento y desarrollo del útero, vagina y glándulas mamarias principalmente, estimula la formación y mantenimiento de los caracteres sexuales secundarios, prepara al útero para el transporte de los espermatozoides, incrementa la permeabilidad vascular, tiene acción anabólica e influye en el comportamiento sexual de la mayoría de las especies (6,7,89,102,103).

Los estrógenos también suprimen la producción de la hormona hipofisaria que inicia el desarrollo del folículo (la hormona estimulante del folículo, FSH). En contraste, parecen estimular la LH hipofisaria. Los estrógenos también actúan manteniendo los caracteres sexuales secundarios femeninos, ejerciendo una acción antagónica a la de la testosterona. El estradiol se une a una proteína receptora específica del citosol en las células blanco, después de lo cual el complejo resultante es trasladado al interior del núcleo. Durante este proceso, la proteína receptora es alterada estructuralmente ("transformación del receptor") incrementando por esto la capacidad del complejo para fijar la cromatina y causar un aumento en la síntesis de RNA. La unión con la proteína receptora del citosol es relativamente inespecífica, ocurriendo la mayor parte de la especificidad tisular para la acción del estradiol a nivel de la subsiguiente transformación compleja y fijación nuclear. Además, los estrógenos incrementan la síntesis de RNA polimerasa en el tejido blanco, lo que puede originar una síntesis más generalizada de proteínas (89).

La progesterona en las hembras es sintetizada por el cuerpo lúteo, el tejido adrenal y placentario a partir de su precursor inmediato, la pregnenolona. En contraste con la testosterona y el estradiol, la progesterona está unida, en el plasma, a la globulina fijadora de corticosteroides. Intracelularmente se une a una proteína fijadora específica en el citosol. El complejo entonces entra en el núcleo y altera la síntesis de RNA mediante su reacción con la cromatina (89).

Esta hormona aparece después de la ovulación y produce un desarrollo - extenso del endometrio, preparando al útero para la recepción del embrión y para su nutrición. Esta hormona también suprime el estro, la ovulación y la producción de la hormona luteinizante de la hipófisis, que en un principio estimula la formación del cuerpo lúteo. La progesterona antagoniza la acción de los estrógenos en varios tejidos, incluyendo el moco cervical, el epitelio vaginal y las trompas de Falopio. También estimula a las glándulas mamarias. Cuando ocurre el embarazo, el cuerpo amarillo se mantiene activo y se suspenden la menstruación y la ovulación. La concentración de progesterona disminuye hacia el final del embarazo. Si no hay fertilización, las hormonas foliculares progesteronales súbitamente disminuyen.

El ciclo estral está constituido por cuatro fases principales: proestro, -- estro, metaestro y diestro (figs.3, 4, 5). El momento de la ovulación está sincronizado con el estro para asegurar que el óvulo y el espermatozoide estén presentes en el momento preciso para que se lleve a cabo la fecundación, y el útero esté preparado para recibir al blastocisto. La sincronización es esencial para el mantenimiento de una elevada tasa de fertilización ya que la vida funcional del óvulo y el espermatozoide, así como la del cigoto, en el tracto reproductivo femenino está generalmente limitada a un corto período. La duración del -- ciclo estral varía con las especies (7, 77, 162, 185).

Muchos animales que presentan periodicidad en la receptividad sexual también muestran cambios tanto en patrones de comportamiento como en las -- características de la citología del frotis vaginal (77), (fig. 3).

En la rata, el proestro, que dura aproximadamente 12 hrs., es básicamente un período de preparación durante el cual ocurre el crecimiento y maduración folicular bajo la influencia de la FSH. En la fase inicial del proestro

FIGURA 3

CARACTERISTICAS CITOLOGICAS Y CONDUCTUALES DURANTE EL CICLO-ESTRAL DE LA RATA

Fase del ciclo	Pared Vaginal	Citología Vaginal	Duración	Conducta Sexual
ESTRO			12 Hr.	ACEPTACION DEL MACHO, LORDOSIS.
METAESTRO			21 Hr.	NO ACEPTACION DEL MACHO.
DIESTRO			57 Hr.	NO ACEPTACION DEL MACHO.
PROESTRO			12 Hr.	SEÑALES DE ACEPTACION DEL MACHO AL FINAL DE ESTA FASE.

El epitelio vaginal experimenta cambios marcados durante el ciclo estral. En el estro predominan células cornificadas, en el metaestro ocurre la invasión leucocitaria y desprendimiento de la capa de células cornificadas por lo que el frotis presenta ambos tipos celulares. En el diestro el frotis vaginal presenta abundancia de leucocitos y la aparición de células epiteliales no cornificadas. En el proestro se encuentran solo células epiteliales no cornificadas.

FIGURA 4. EL CICLO ESTRAL Y SU REGULACION

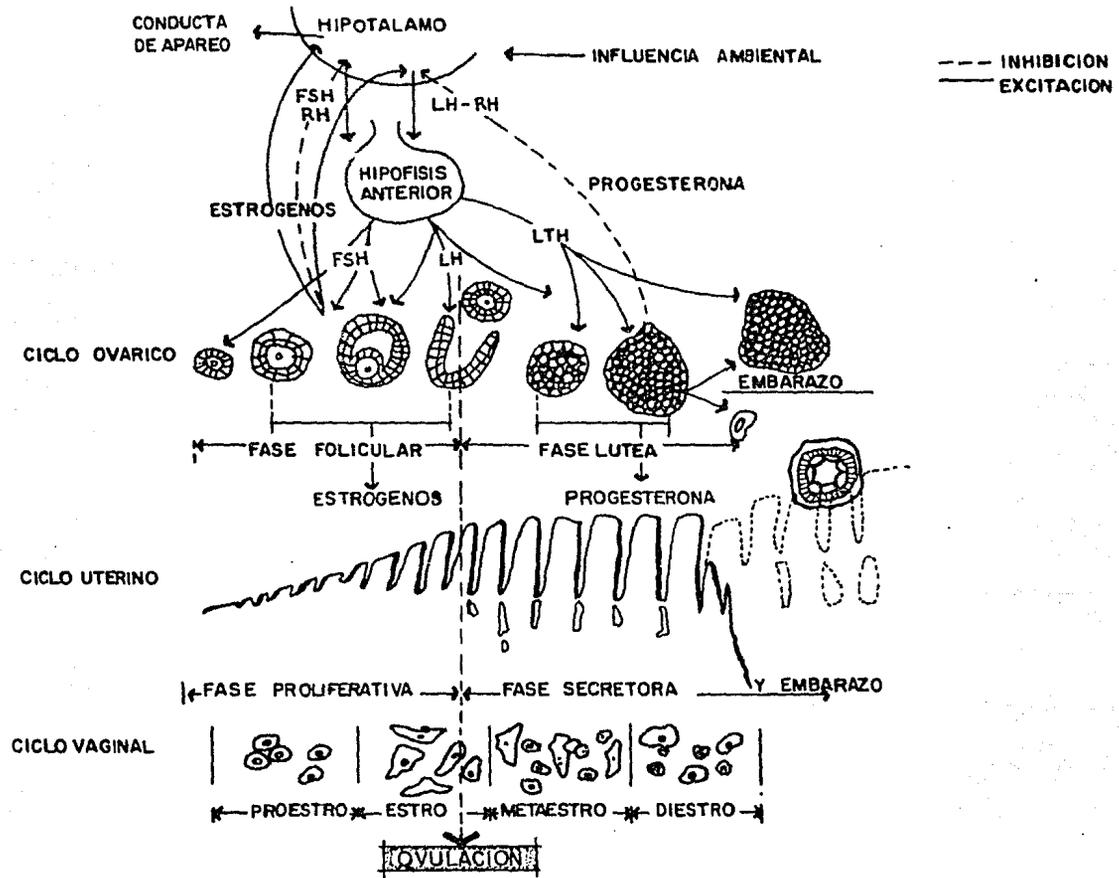
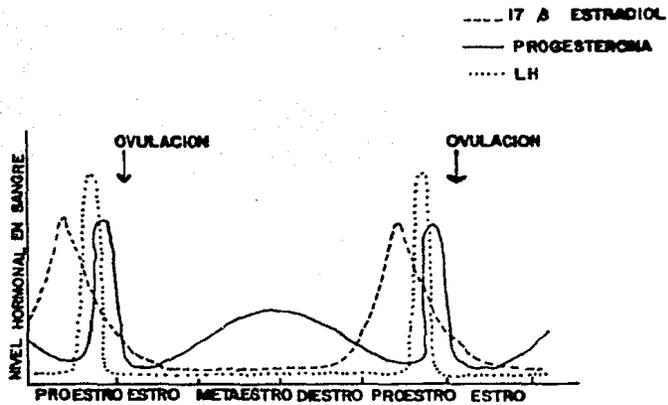


FIGURA 5 NIVELES HORMONALES RELATIVOS EN EL TORRENTE SANGUINEO, DURANTE EL CICLO ESTRAL EN LA RATA (162)



VARIACIONES HORMONALES DURANTE EL CICLO ESTRAL EN LA RATA

la secreción de 17β estradiol del folículo de Graff en desarrollo alcanza su -- pico, lo que dispara la producción de LH. Existe también un pico preovulación de secreción de progesterona que casi coincide con el pico de LH, el cual inducirá la ovulación en folículos que anteriormente hayan sido estimulados por la FSH. La ovulación se presenta en las primeras horas de la mañana siguiente - (ya durante el estro). La progesterona preovulatoria tiene una función esencial en la rata; si ésta ha de mostrar el comportamiento de receptividad, se debe a - la influencia de altos niveles de estrógenos, inmediatamente seguidos de altos niveles de progesterona. El frotis vaginal característico de esta etapa presenta células nucleadas (6, 7, 77, 104, 162).

El estro se caracteriza como el período de receptividad sexual, período en el cual la hembra permitirá la cópula. Como consecuencia de las interacciones hormonales que tienen lugar durante el proestro los ovocitos penetran en - los oviductos en el momento más propicio para la fecundación. Durante el estro el lúmen uterino se distiende, mientras que la creciente cornificación del epitelio vaginal hace que el frotis esté formado por células cornificadas no nucleadas, exclusivamente. Durante el final del estro, estas células aparecen degenerativas y en muchos casos son recobradas como agregados de material celular. La duración de esta fase es de aproximadamente 12 hrs. (6, 7, 67, 68, 77, 104, 162).

El metaestro, con una duración de 21 hrs. aproximadamente, sigue al estro y ocurre poco después de la ovulación. En el epitelio vaginal aparecen células cornificadas y leucocitos. Durante el metaestro se inicia una segunda oleada de progesterona que alcanza su pico durante el diestro y corresponde a la etapa luteinizante. El tamaño del útero se reduce al acercarse el diestro - (6, 7, 77, 104, 162).

El diestro que dura aproximadamente 57 hrs. es una fase que se caracteriza por la aparición masiva de leucocitos en los frotis vaginales, así como por la delgada mucosidad vaginal, y por la formación de cuerpos lúteos, los cuales secretan pequeñas cantidades de progesterona (6, 7, 77, 104, 162), (figs. 4 y 5).

El tiempo que transcurre desde la ovulación hasta el momento inmediato a la anidación, recibe el nombre de período de preimplantación (31). Este se caracteriza por cambios morfológicos y funcionales del endometrio, que se deben a la presencia del espermatozoide en una etapa muy temprana, y a factores hormonales (41, 146) y a la influencia del huevo posteriormente (137, 138).

A su vez, el blastocisto preimplantado depende de las secreciones endometriales, de las que obtiene el oxígeno y los sustratos metabólicos que requiere para su crecimiento y desarrollo; esta interacción embrión-sistema materno es regulada hormonalmente (63, 79, 94, 103).

Una vez realizada la fertilización, se inicia el transporte del cigoto a través del oviducto, siendo característica de cada especie la duración de este período (182), durante el cual se verifican las primeras etapas de diferenciación embrionaria (tabla 1). Entre los factores que intervienen en la regulación del transporte destacan las contracciones musculares y el movimiento --ciliar del oviducto, mismos que son influidos por los estrógenos y progestinas (147, 167).

Durante la segmentación el cigoto se divide por mitosis. Sin embargo, en este período no hay crecimiento celular, de modo que el cigoto de dos, --cuatro y ocho células, así como la mórula (racimo de células) y el blastocisto (estadio que presenta una cavidad), son prácticamente iguales en tamaño al óvulo original (31, 63, 103, 110). En la mayoría de los mamíferos se alcanza

TABLA 1.- TIEMPO DE TRANSPORTE DEL CIGOTO A TRAVES
DEL OVIDUCTO E IMPLANTACION.

ESPECIE ESTUDIADA	TRANSPORTE EN EL OVIDUCTO* (DIAS)	IMPLANTACION (DIAS)
Marsupiales	1	inmediata
Insectívoros	1-2	?
Quirópteros (murciélagos)	12-16	10-16
Primates	4-5	8-9
Hombre	3-4	6-7
Roedores		
conejo	3-4	6-7
ratón	3-4	5-6
rata	4	5-6
hamster	3-4	4
cuyo	3-4	6
Carnívoros		
perro	4-5	11-12
gato	6-7	13-14
Ungulados		
caballo	?	49-63
cerdo	2-3	11-20
oveja	2-3	15-17
vaca	4	40

* Tiempo necesario para que se verifiquen los cambios morfológicos y funcionales del endometrio (fase de preimplantación).

el estado de mórula a más tardar al quinto día y el de blástula al final de la -- primera semana de embarazo. Es durante la transición de mórula a blástula - cuando el embrión entra en el útero (63).

El blastocisto está formado por una capa de células externas llamadas trofoblasto, destinadas a formar anexos embrioñarios y relacionarse con el endometrio uterino, y un conjunto de células internas a partir de las cuales - se formará el embrión. Debido a esto, dicho macizo celular es referido como la masa celular embrionaria, o botón embrionario (63, 95).

En la rata los embriones se encuentran normalmente en la parte final - del oviducto a fines de la tarde del cuarto día de embarazo (90 hrs. después de la ovulación), en el estado de 9-16 células, entran en grupo y son rápidamente distribuidos a lo largo del cuerpo uterino. Los blastocistos retienen la zona pelúcida hasta las 12 hrs. del quinto día de embarazo. Durante este día ocurre un edema generalizado en el estroma (145).

En relación a la implantación y reconocimiento materno del embarazo, Short afirma que "una de las primeras señales de que un embrión ha hecho notar su presencia en el útero, es que el cuerpo lúteo del ciclo estral se transforma en cuerpo lúteo de embarazo" (161), y como consecuencia de esto los estros o ciclos menstruales dejan de presentarse. Esta forma de reconocimiento materno del embarazo es común entre los mamíferos euterios, en los que la duración de la gestación excede a la del ciclo normal, y no se presenta en -- ciertos carnívoros (perro, hurón) en los que el tiempo funcional del cuerpo - lúteo es similar en el embarazo y en el ciclo estral, ni en algunos marsupiales en los que la duración de la gestación es un poco más corta que el ciclo estral (75).

La transformación de la función lútea no es la única evidencia del - -

reconocimiento materno del embarazo; en los roedores ocurren cambios endometriales característicos en los sitios de implantación (72), y el embarazo es frecuentemente acompañado por cambios en el metabolismo general materno -- (76, 101, 111). Tales respuestas maternas al embarazo pueden estar relacionadas con innovaciones endócrinas adoptadas durante la evolución de la viviparidad que, excepto por los monotremas, es la forma preferida de reproducción en los mamíferos (75).

Algunos autores piensan que el embrión preimplantado tiene la capacidad de producir una señal responsable de prolongar la vida del cuerpo lúteo, pero se sabe relativamente poco sobre la naturaleza o modo de acción de dicha -- señal (75).

En la mayoría de las especies, durante el transporte, el huevo se encuentra rodeado por la zona pelúcida (147, 167), la cual le da una apariencia esférica de distribución uniforme (73). Al perderse esta zona (en la mayoría de los mamíferos justo antes de que la implantación se inicie) por remoción de glicoproteínas, se origina un cambio de carga en la superficie del blastocisto (la cual era hasta ese momento prácticamente neutra) (73, 126), que le confiere -- compatibilidad de carga con el sitio de implantación (63, 95).

En muchas especies, algunas de las células del trofoblasto tienen -- una actividad proteolítica que localmente digiere un camino a través de la zona pelúcida, permitiendo el paso de elongaciones celulares del trofoblasto. En otras (por ejemplo en la rata o el ratón), las secreciones uterinas presentan enzimas proteolíticas que causan la disolución completa de la zona pelúcida, -- exponiendo directamente la superficie del trofoblasto al epitelio uterino (103).

Para que el blastocisto pueda implantarse, se requiere que presente una adhesividad adecuada y una buena capacidad invasiva; la primera propiedad se

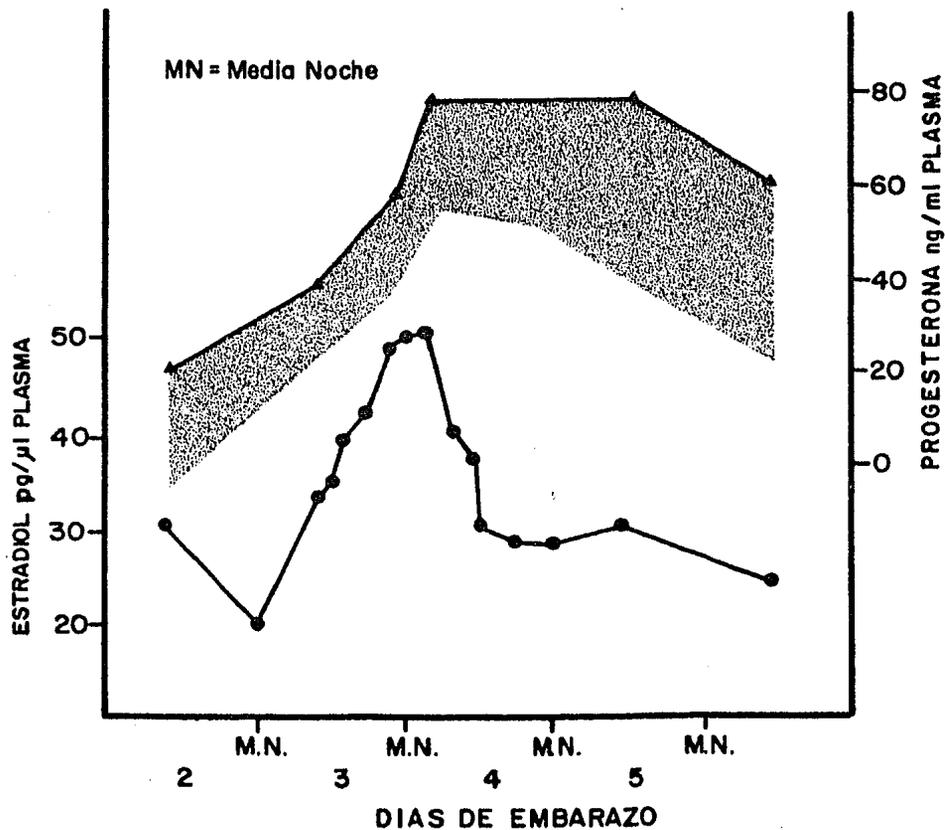
ha relacionado con el depósito intracelular de calcio, fundamentalmente en las regiones en las que establecerá contacto (63).

En especies multíparas (las que tienen más de una cría por camada -- como resultado de la fertilización de varios óvulos), existe un mecanismo de espaciamiento que opera para asegurar que los blastocistos estén distribuidos a lo largo del eje uterino, evitando que se agrupen en un sitio (63, 103).

Después del período de existencia independiente, el desarrollo del embrión en los mamíferos depende de la formación de un contacto íntimo entre las células del trofoblasto y el tejido uterino; la implantación. Dicho de otra forma, la implantación en los mamíferos es el medio por el cual el blastocisto se establece y fija su relación con respecto al útero. Para que esta asociación se inicie, y las funciones embrionarias y maternas propias del proceso de implantación sean satisfechas, el blastocisto y el endometrio deben ser precondicionados a un estado de sensibilidad mutua. Esta depende de un régimen específico de secreción de hormonas ováricas durante el período de preimplantación, en el cual hay una dominancia inicial de estrógenos, durante el proestro, asociada con la maduración folicular y la ovulación, seguida por al menos 48 hrs. de progesterona lútea, la cual es subsecuentemente revasada por un pico de estrógenos nidatorios (66, 75, 128, 145), (fig. 6).

Se ha demostrado en animales de laboratorio (conejo, rata, hamster y ratón) que no todo el endometrio es capaz de recibir al huevo, y que existen sitios de implantación especializados (66), que requieren de cierta maduración metabólica. Durante la maduración de los sitios de implantación, las microvellosidades del epitelio luminal disminuyen en algunas zonas, facilitando la interacción con el huevo. Algunos autores consideran que tanto el blastocisto como el endometrio participan activamente en este proceso, y que se apoyan -

FIGURA 6. NIVELES PLASMATICOS DE 17β ESTRADIOL (\bullet) Y PROGESTERONA (\blacktriangle) DURANTE LOS PRIMEROS DIAS DE EMBARAZO EN LA RATA



mutuamente, sin ser ninguno el principal responsable (31, 94, 128, 145).

Durante el proceso de implantación se pueden distinguir varias etapas (fig. 7):

1. Orientación del blastocisto; además de estar espaciados a lo largo del útero, los blastocistos se orientan de manera específica. Por ejemplo, en la rata los blastocistos están generalmente situados cerca del extremo antimesometrial del lúmen uterino y orientados con la parte embrionaria hacia dicho extremo. Durante este proceso ocurre la pérdida de la zona pelúcida (63, 110).

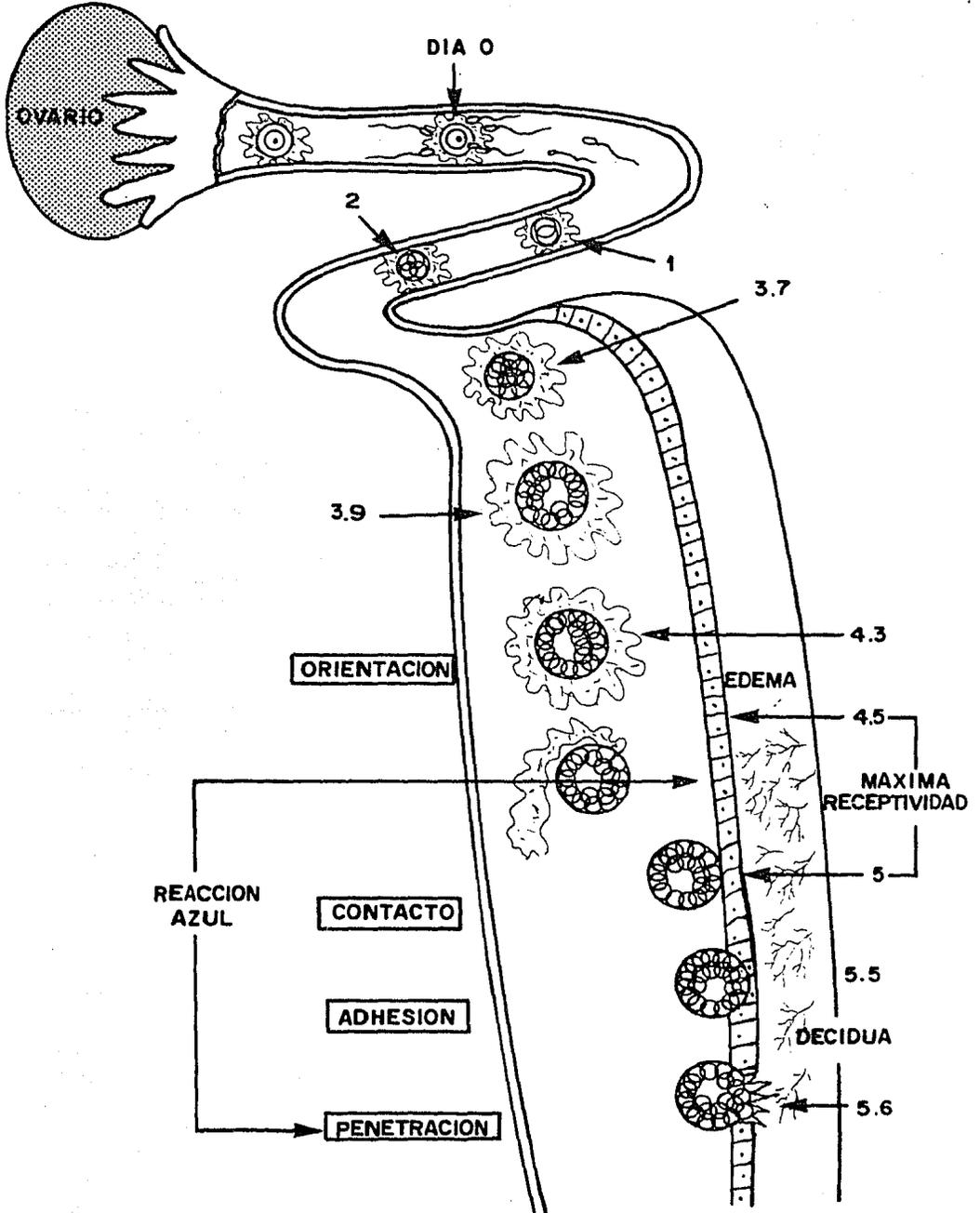
2. Aposición epitelial; posteriormente, ocurre la aposición del blastocisto al epitelio uterino, sin lo cual éste no puede considerarse fijo en su sitio. Durante la aposición el epitelio endometrial envuelve al blastocisto, y entre 12 y 24 hrs. después ocurre la adhesión (62, 63).

3. La adhesión del blastocisto al útero; que consiste en el establecimiento de un estrecho contacto físico, resistente a la ruptura, entre el trofoblasto y el epitelio endometrial (62, 63, 103).

4. Penetración; es la etapa en la que el trofoblasto penetra a través del epitelio luminal interno por diversos mecanismos: fagocitosis, desplazamiento mecánico y/o actividad enzimática (63).

Dependiendo de los tejidos que son erosionados durante la implantación, ésta se clasifica como invasiva o no-invasiva; en la implantación invasiva -- (perro, ratón, conejo, rata, hombre) el blastocisto atraviesa la superficie del epitelio e invade extensivamente el estroma que se encuentra por debajo de éste. Los tejidos del blastocisto pueden erosionar no sólo el epitelio sino también -- las células estromales, el tejido conectivo y en el hombre, incluso las paredes de los vasos sanguíneos. La implantación es clasificada como no-invasiva -- (borrego, cerdo, vaca, caballo) cuando la integridad del epitelio es más ó -

FIGURA 7. EL PROCESO DE IMPLANTACION



menos conservada y éste es incorporado a la placenta. En la implantación no-invasiva es el epitelio uterino y no el estroma, que se encuentra por debajo de éste, el que limita y controla la invasión del blastocisto (103).

Dependiendo de otro tipo de factores, la implantación puede clasificarse como central, excéntrica o intersticial; se ha observado en algunos animales - que el blastocisto permanece en la cavidad uterina, se expande antes de andar se y como consecuencia se pone en contacto con un área mayor de la superficie endometrial, dando como resultado el tipo de implantación denominada central - (perro, conejo, hurón), (64, 97). En algunas otras especies el blastocisto - permanece pequeño y se sitúa en una cripta o receso uterino, caracterizando al tipo de implantación excéntrica (ratón, rata, hamster), (97). En la implanta ción intersticial, el blastocisto permanece pequeño y pasa a través de los intersticios epiteliales para ubicarse finalmente en el tejido conectivo subepitelial (caballo, chimpancé, hombre), (53, 70, 79, 91, 93, 103, 118, 122).

Actualmente se acepta que la reacción decidual es un tipo de transforma ción celular, un proceso de diferenciación inducido en áreas endometriales adya centes al blastocisto, que se considera estrechamente asociado con la anida ción. En la reacción decidual los fibroblastos del estroma del endometrio incre mentan su tamaño, se vuelven poliédricos, se llenan de glucógeno y lípidos, y forman una masa sólida en el tejido conectivo del endometrio en el sitio de im plantación (37, 63, 79).

El blastocisto toma contacto por sí mismo con la superficie luminal del epitelio uterino. El establecimiento de este contacto celular aumenta la posi bilidad de intercambio de información y puede estar directamente involucrado - en la formación de la decídua. El estímulo natural que produce la deciduali zación es aparentemente una simple presión del blastocisto en el epitelio --

luminal (16), ya que se ha demostrado que la serotonina, la acetilcolina, el aceite, soluciones isotónicas y aún el aire, son capaces de inducir la decidua lización si se administra dentro del lúmen uterino en el momento propicio, siendo esta respuesta muy similar a la obtenida de la interacción trofoblasto-endometrio (79, 110, 145).

Los estrógenos ejercen un efecto marcado en las características de la vascularidad uterina, inicialmente produciendo vasodilatación, aumento de permeabilidad y edema endometrial. Aparentemente los estrógenos estimulan a las células epiteliales del útero en dos formas:

1. Estimulan la liberación de una secreción glandular que está constituida por moléculas específicas, tales como enzimas proteolíticas, así como por diversos sustratos; glucosa, aminoácidos e iones.

2. Producen una sensibilización de las células epiteliales haciéndolas sensibles a una señal del blastocisto, de modo que en el momento del contacto, éstas adquieran la capacidad de informar de la presencia del blastocisto a las células estromales, facilitando la reacción decidua (103).

La aparición de la decidua parece tener dos posibles objetivos:

- 1). La nutrición del embrión (88).

- 2). La protección del útero a la invasión del trofoblasto (71,79).

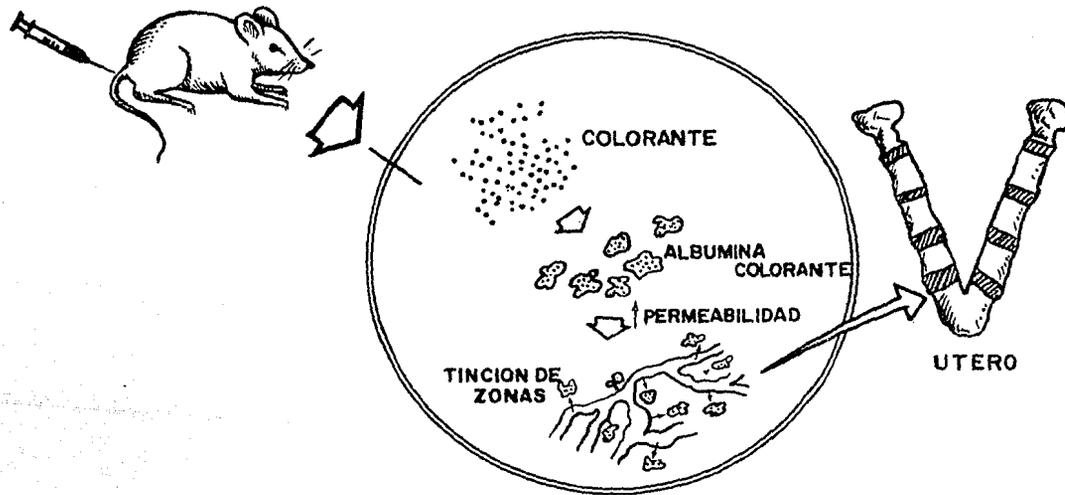
La progesterona es esencial para mantener la decidua y en ausencia de dicha hormona se inicia una degeneración de las células deciduales. (79).

Durante mucho tiempo se pensó axiomáticamente que el ovario era la única fuente de estrógenos y progesterona necesarios para el control de varios fenómenos durante la preimplantación así como la implantación del blastocisto (49, 136). Dickman y Dey (51) en 1973 propusieron que existe una segunda fuente de hormonas; el embrión preimplantado.

Además del efecto del embrión en la transformación del cuerpo lúteo, la idea de que el embrión produce una señal que facilita el proceso de implantación en ciertos roedores está bien establecida. Psychoyos (140, 141) demostró que existen áreas locales con permeabilidad capilar incrementada en el endometrio - de rata, mediante la inyección de azul de Triplan o azul de Evans (fig. 8). - Subsecuentemente se han hecho observaciones similares en otras especies incluyendo al hamster (129), el ratón (69) y la oveja (19). Los sitios azules se presentan como consecuencia de la extravasación del colorante en los futuros sitios de implantación; exámenes histológicos revelaron que cada área estaba asociada con un blastocisto cerca, pero no en contacto con el epitelio endometrial. En base a estas observaciones Psychoyos (142), Dickmann, et al. (52) y Bhatt & Bullock (13), han sugerido que el embrión preimplantado (EPI) produce una substancia que actúa localmente, induciendo en el endometrio los cambios relacionados con la implantación inminente, uno de los cuales es el incremento de la permeabilidad capilar. Esta interpretación es apoyada por el trabajo de Deansly -- (36), quien afirma que el blastocisto de cuyo es un estímulo más efectivo para la reacción decidual que el traumatismo local de la pared uterina (75, 110, 145).

Flint (75) encontró que los huevos fertilizados de dos a cuatro células incubados en una solución salina balanceada con estradiol, inducen localmente la reacción azul cuando son transferidos a úteros de ratas pseudoembarazadas - en el quinto día; en tanto que huevos fertilizados incubados en solución salina balanceada libre de estrógenos no produjeron dicha reacción (51). A partir de estos resultados se dedujo que en la rata la liberación de estrógenos contenidos (y posiblemente sintetizados) dentro del blastocisto, estimulan la producción de sustancias vasoactivas, tales como la histamina, serotonina (5-hidroxitrip^tamina), o prostaglandinas, las cuales inducen un incremento local en la - -

FIGURA 8. METODO PARA DETERMINAR ZONAS DE IMPLANTACION.



Método para determinar zonas de implantación; Colorantes de alto peso molecular (Azul tripan, Azul de Evans, etc) forman complejos con la albúmina sérica, los cuales atraviesan y se acumulan en zonas de alta permeabilidad; esto nos permite distinguir las zonas de implantación del resto del útero.

permeabilidad capilar (52, 75).

Bhatt y Bullock han demostrado que la introducción del antiestrógeno -- CI-628 en el útero de conejas intactas al quinto día de embarazo previene la implantación. Más aún, demostraron que el ^3H -estradiol se une al citosol del blastocisto y que el ^3H -estradiol es desplazado por el CI-628. Estos autores sugirieron que en las conejas embarazadas intactas los estrógenos unidos al blastocisto mandan una señal al útero, y cuando estos estrógenos son reemplazados por el CI-628 la implantación es prevenida (13, 41, 51, 75, 78).

Ya que la 3β -HSD (deshidrogenasa) es una enzima clave en la síntesis de hormonas esteroideas, su presencia en blastocistos de varias especies, constituye una fuerte evidencia de esteroidogénesis (49, 51, 78). Más aún se han observado correlaciones cuantitativas positivas entre la actividad de la 3β -HSD y la producción de hormonas (51).

Huff & Elk-Nes (99) demostraron que los blastocistos de conejas contienen un sistema enzimático capaz de sintetizar colesterol y pregnenolona a partir de acetato y de metabolizar varias sustancias esteroideas (41, 46, 49, 51, 52, 78, 164). Lutwak & Seamark (113, 153) han encontrado una concentración significativa de progesterona y una pequeña cantidad de 20α dihidroprogesterona y de 17α hidroxiprogesteroa en el blastocisto y en el fluido del blastocele. -- Perry, et al. (136), han demostrado la presencia de estrógenos no conjugados, así como de progesterona en el blastocisto de cerdo. Asimismo, encontraron evidencias bioquímicas de la presencia de varios sistemas enzimáticos dentro del blastocisto; el de la aromataasa, que está relacionado con la producción de estrógenos a partir de esteroideas neutros; el de la $17-20$ desmolasa, concerniente con la producción de progesterona; el de la 3 -sulfatasa, responsable de la producción de esteroideas no conjugados; y de otros sistemas involucrados en la

formación de esteroides conjugados a partir de estrona y de 17β estradiol. -- Estos descubrimientos indican que la presencia de estrógenos no conjugados y progesterona en el tejido del blastocisto es probablemente el resultado de su síntesis in situ y no el resultado de su difusión a través de la circulación materna. Así, aún en este primitivo estado de desarrollo, el blastocisto de cerdo -- tiene la capacidad enzimática de producir hormonas esteroideas biológicamente importantes (51, 75, 136, 163, 164).

La 17β -HSD (17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa) es la enzima que cataliza la interconversión de estrona a estradiol en los embriones preimplantados. La 17β -HSD no solo está presente en los tejidos endócrinos sino, en una gran variedad de órganos, como son el hígado, riñón e intestino. Debido a que se puede encontrar en tal variedad de tejidos, la presencia de la 17β -HSD, por sí sola, en los EPI's podría tener un significado limitado. Sin embargo, su presencia en conjunto con la 3β -HSD sugiere síntesis de estrógenos (41, 78).

Por otro lado, el útero contiene una aril sulfotransferasa (132), que -- puede ser responsable de la sulfoconjugación de los estrógenos formados por el blastocisto, antes de que éstos sean liberados a la circulación (75, 136). -- Por estudios realizados in vitro, se ha establecido que los sulfatos, tanto de estrona como de 17β estradiol (E_1S y E_2S) participan activamente en la producción de compuestos de estrona y estradiol libres (E_1 y E_2). Se ha demostrado que esta conversión se lleva a cabo por medio de la acción de la estrógeno sulfatasa, enzima que hidroliza el grupo sulfato unido en posición 3 de la molécula estrogénica (28, 140, 171). El hecho de que el blastocisto contiene una estrógeno sulfatasa altamente activa presumiblemente asegura que los estrógenos secretados por éste sean no conjugados, y por lo tanto activos como agentes anti-luteolíticos (75, 132).

Dickmann & Day (46) propusieron que desde el momento en que el --
embrión se encuentra frente al futuro sitio de implantación ejerce un efecto hor
monal local en el endometrio, el cual es crítico para la implantación. En otras
palabras, las dos fuentes de hormonas esteroideas, el ovario y el EPI, se com
plementan mutuamente y la implantación no puede ocurrir en ausencia de cual--
quiera de ellas (38, 41, 46, 49, 51, 52, 75, 78, 99, 164).

La importancia relativa de la contribución hormonal del ovario y el blas
tocisto puede variar de especie a especie. Por ejemplo, en la rata y el ratón -
(51, 75, 145, 163) está bien establecido que la progesterona y los estrógenos
ováricos son indispensables para la implantación. Basándose en evidencias -
experimentales Dickmann, et al. (51) proponen que los estrógenos ováricos -
(o estrógenos exógenos administrados sistémicamente a ratas embarazadas, -
ovariectomizadas) son necesarios pero no suficientes, y que por lo tanto se --
requieren también los estrógenos del blastocisto para la inducción de la implan
tación.

En otras especies como el conejo, cerdo, borrego, chango, cuyo y ham
ster (13, 41, 49, 51, 75, 163), existe evidencia de que no es necesaria la pre
sencia de estrógenos ováricos para producir la implantación.

Sin embargo, la evidencia experimental producida en favor de la hipóte
sis de que el blastocisto produce estrógenos no puede ser considerada inequív
oca, con la posible excepción del cerdo (136) y el conejo (13, 41, 49, 51, 53,
75, 78, 98, 99, 165).

Por otro lado, en el caso del cerdo ha sido recientemente demostrado -
que el inicio de la síntesis de estrógenos coincide con, y probablemente precede,
al tiempo del reconocimiento materno del embarazo. Bazer, et al. (8) han de
mostrado que los estrógenos pueden tener un efecto antiluteolítico local por -

reducción de la secreción uterina de PGF_2 . Esto implica que los estrógenos - del blastocisto no necesitan estar presentes en la circulación materna para ejercer su efecto inicial, lo cual es una idea atractiva ya que es más fácil de considerar que el EPI tenga un efecto local que un efecto sistémico (75).

Los términos diapausa embrionaria e implantación retardada se refieren a un prolongado, y ocasionalmente variable período de gestación, durante el cual el blastocisto es retenido dentro de la cavidad uterina, libre, indiferenciado y casi inactivo metabólicamente (1, 63, 103, 154, 175).

La diapausa embrionaria fue por primera vez descubierta en el ciervo - corzo (Capreolus capreolus) por Bischoff, un anatomista alemán del siglo - - XVIII, al estudiar el por qué de los cinco meses que transcurren entre la cópula y los primeros signos de embarazo en dicha especie (160). El descubrimiento de Bischoff ha sido confirmado en por lo menos otros ocho órdenes de mamíferos, incluyendo a los Marsupiales, Chiróptera, Edentata, Rodentia, Carnívora, Insectívora y Pinnipedia (1, 63, 149).

Existen dos formas de implantación retardada:

- 1). La facultativa o lactacional
- 2). La obligatoria o estacional

En la primera los blastocistos derivados de la cópula "postpartum" entran en un lapso de diapausa corta mientras la madre está lactando intensamente. La implantación lactacional fue descubierta por vez primera en la rata por Latas-te, en 1891, y ha sido desde entonces registrada en el ratón y un gran número de roedores silvestres, así como en Clethionomys glareolus (21), Meriones, unguiculatus, Tetera Indica (15) y Peromiscus sp. (169) y en la mayoría de los marsupiales macrópodos (1, 63, 103, 155, 157, 171).

En el tipo obligatorio o estacional la fase de diapausa siempre termina -

en un período determinado del año, siendo el fenómeno presumiblemente controlado por el medio ambiente. En suma, el período de retardo tiene usualmente una duración fija para cada especie y puede extenderse de cinco (14) a 10 meses (27), como en el ciervo corzo y el tejón (Meles meles) respectivamente. (17, 26). Además de estas especies hay muchas más en las cuales la implantación retardada obligatoria es una parte esencial y normal de su embarazo (por ejemplo: el elefante marino, el murciélago frugívoro, el visón, la comadrena, el carcayu, el oso café y la marta), (1, 63, 103).

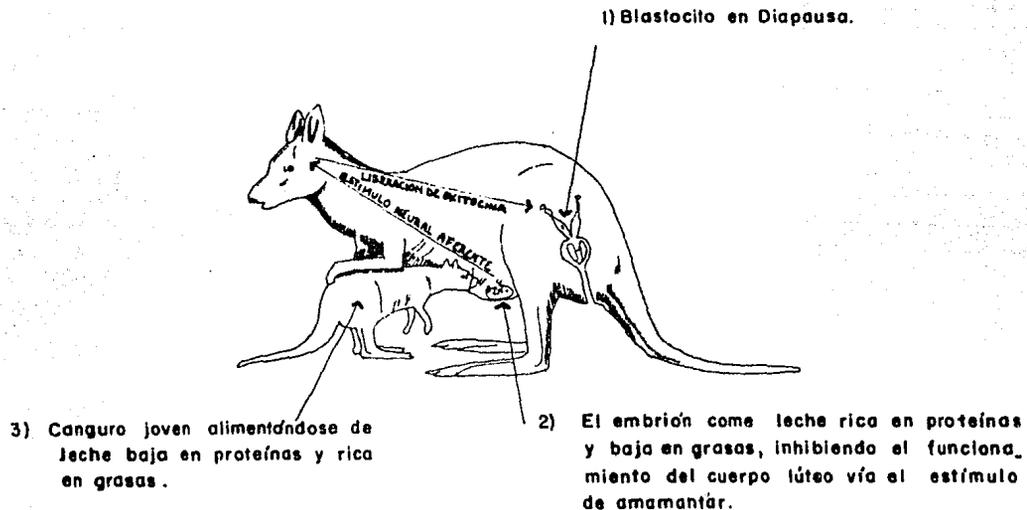
El hecho de que en el transcurso de la evolución la diapausa embrionaria ha incluido independientemente a varios grupos de mamíferos, es evidencia de la poderosa ventaja selectiva asociada con este tipo modificado de embarazo -- temprano. Una de las mayores ventajas conferidas por un largo retraso estacional de la implantación puede ser el de permitir que la cópula y el parto ocurran en períodos óptimos del año. En el ciervo corzo, por ejemplo, la cópula ocurre en julio y agosto cuando los adultos están bien alimentados y están en el período ideal para la reproducción, asegurando una competencia efectiva por las -- cópulas. El embrión permanece como blastocisto hasta que se reactiva en enero, de modo que la cría nace en mayo o junio, cuando las condiciones nutricionales son óptimas para ella (1, 103). El retraso lactacional exhibido, por ejemplo, por ciertos roedores, claramente aumenta la fecundidad, asegurando el reemplazamiento rápido de crías muertas. En los marsupiales macrópodos la diapausa -- del embrión parece tener una función diferente; la cría puede nacer segura en -- cualquier época del año, porque estará protegida de los rigores del medio ambiente por el marsupio. Sin embargo, los irregulares períodos de sequía de ciertas partes de Australia debilitan tanto a los canguros que la madre es incapaz de proporcionar los siempre crecientes requerimientos de leche de la cría en desarrollo

(en la bolsa). Como resultado la crfa puede morir durante este periodo. En caso de que esto ocurra, la retención de un blastocisto latente durante la lactancia asegura el rápido reemplazamiento de la crfa muerta (1, 57, 1115, 163). Sin embargo, dichas ventajas pueden ser secundarias, y se ha sugerido que la diapausa embrionaria evolucionó primariamente como consecuencia de un largo periodo de gestación, o del estro "post-partum" encontrado en la mayoría de los Macropodidae (1, 157, 173), (fig. 9).

En los mamíferos acuáticos como Mironga leonina, la implantación retardada estacional extiende la duración de la gestación a tal grado que el parto es seguido cercanamente por el apareamiento. Como resultado, el tiempo que estos animales tienen que permanecer fuera de sus condiciones ambientales normales es reducido al mínimo (1, 63, 149).

La hibernación ejerce una influencia profunda en la fisiología de la reproducción en dos familias de murciélagos: la Vespertilionidae y la Rhinolophidae. La imposición de un periodo de hibernación en el ciclo reproductivo en las hembras detiene el proceso de los eventos reproductivos empezados en otoño y pospone su término hasta la primavera. Los eventos reproductivos en los murciélagos hibernantes siguen uno de los dos patrones básicos existentes. En el patrón I, el estro y la cópula tienen lugar a finales del verano o principios del otoño y los murciélagos típicamente entran en hibernación tan pronto como sucede esto. Interrupciones intermitentes de la hibernación y cópulas adicionales pueden ocurrir a través de este periodo. Los espermatozoides son almacenados en el tracto reproductivo de la hembra hasta el final del periodo de hibernación (en primavera) cuando la ovulación, fertilización y gestación tienen lugar. En el segundo patrón, la cópula, ocurrida en otoño, es seguida inmediatamente por la ovulación, fertilización y el inicio de la embriogénesis, después del

FIGURA 9. EL PROCESO REPRODUCTIVO EN EL CANGURO ROJO.



Al mismo tiempo, la hembra del canguro rojo puede tener tres crías de edades diferentes dependiendo de ella.

cual las hembras entran en estado de hibernación (embarazadas). Durante la hibernación, la implantación se retrasa y no ocurre hasta que se reanudan las actividades normales del murciélago, en primavera. Las características más interesantes del proceso reproductivo en los murciélagos hibernantes son: el -- retraso en la ovulación y el almacenamiento de esperma después de la cópula en el tipo I y, alternativamente, la implantación retardada después de la fertilización en el tipo II. El significado adaptativo de la hibernación es la conservación de energía, y por lo tanto es de esperar que influya o sea influenciada por otra función energéticamente costosa, como es la reproducción. Así, los efectos mutuos son particularmente aparentes cuando el período de hibernación se superpone al ciclo reproductivo; la hibernación parece interrumpir el -- proceso de los eventos reproductivos, que empezaron en otoño, y pospone su término hasta que el animal emerge de la hibernación en primavera (74, 130).

El murciélago frugívoro Artibeus jamaicensis (familia Phyllostomatidas) es pollestral (tiene varios estros en un año) y presenta un desarrollo embrionario retardado post-implantación. Las hembras pueden estar simultáneamente -- embarazadas y lactando. Un estro "post-partum" puede también ocurrir después del nacimiento de la cría. El blastocisto de esta fertilización se implanta en -- el útero, pero no continúa su desarrollo hasta después de varios meses. Si no hubiese este retardo en el desarrollo embrionario las crías nacerían durante el -- período desfavorable del año (noviembre-enero). El mecanismo responsable de la diapausa embrionaria en esta especie todavía no es conocido (74).

En el visón, la implantación invariablemente ocurre a principios de abril y es normalmente precedida por un corto período de diapausa, la duración de la cual depende de la época del año en la que ocurre la cópula. Usualmente, -- -- cuanto más tarde ocurra la cópula en la estación reproductiva más corto será el

período de gestación. Ya que los nacimientos normales siguen a cópulas de finales de marzo, sin un retardo significativo de la implantación, la función de la fase de retardo en esta especie es obscura. Sin embargo, es posible que para esta especie la implantación retardada sea una adaptación para la dispersión, ya que permite una marcada extensión de la estación reproductiva, sin cambio en la fecha de parto, la cual está presumiblemente fijada a principios de mayo, para asegurar una sobrevivencia máxima de crías (1, 3, 63).

En ratas, ratones y marsupiales macrópodos, la implantación retardada lactacional está asociada con un cese gradual de la división celular, a medida que los blastocistos entran en un estado casi inactivo metabólicamente (1, 5, 28, 29). La naturaleza bioquímica de este estado de diapausa ha sido investigada en la rata y el ratón, y los resultados han sido revisados por McLaren -- (119). La síntesis de DNA está interrumpida (84, 116), la de RNA y proteínas es mínima (84, 177, 179) y la producción de dióxido de carbono es baja (175). Sin embargo, a pesar de esta carencia aparente de actividad metabólica, el tamaño (5, 54, 152, 183), peso y contenido de proteínas y lípidos (92, 179) del blastocisto aumentan gradualmente en el período de retardo. Si la implantación retardada es inducida experimentalmente en ratas o ratones durante el principio del embarazo, por ovariectomía y administración subsecuente de progesterona, el blastocisto entra en un estado de diapausa, aparentemente idéntico al que se presenta durante el retardo lactacional, ya que la síntesis de DNA, RNA y proteínas es mínima (139, 144, 151) y la producción de dióxido de carbono está suprimida (1, 46, 53, 145).

El blastocisto de las especies que exhiben retardo estacional de la implantación se caracteriza también por una carencia general de la actividad metabólica durante la diapausa, aunque existe una variación interespecífica --

considerable con respecto a parámetros como la pérdida de la zona pelúcida, el grado de expansión del blastocisto y la tasa de división celular observados durante la fase de retardo (1).

La implantación retardada obligatoria está normalmente asociada con un completo cese de la división celular en el blastocisto (61, 83). Notables -- excepciones a esta regla son el ciervo corzo (105), el tejón europeo (125) y el zorrillo (120), los cuales muestran un aumento en el número de células del embrión durante la diapausa (1).

Los blastocistos de muchas especies que exhiben un retardo estacional de la implantación presentan una acumulación de inclusiones granulares en el citoplasma de las células del trofocotodermo. El número de gránulos disminuye a medida que se acerca el momento de la implantación. Estos cambios son con sistentes con la hipótesis de que los gránulos representan una reserva endógena de energía que es utilizada gradualmente por el blastocisto durante el retardado (1, 65).

El cese de la latencia de los embriones puede ser inducido por:

- 1) El traslado de los embriones, del animal en retardo lactacional, a una hembra en condiciones de pseudoembarazo (116).
- 2) La administración de estradiol a animales en los que el retar do es natural (116), o inducido por ovariectomía (174).
- 3) La remoción de los blastocistos del útero de animales en re- tardo, seguido de su cultivo in vitro (84).

La sensibilización por estrógenos, en general da como resultado el tér- mino de la diapausa, o reactivación y eventualmente la nidación (63, 103, 119, 154, 175, 180). El sitio y la forma de acción de los estrógenos en la inducción de la nidación se desconoce hasta ahora; pueden actuar directamente sobre el

embrión o causar la remoción de algunos inhibidores que estén presentes en el medio ambiente uterino (143, 154, 181).

La reactivación está asociada en todas las especies con un aumento general en el nivel de actividad metabólica del blastocisto, seguido por la diferenciación de la masa celular interna y de las membranas extraembrionarias (1, -- 175). La naturaleza de estos cambios secundarios muestra una variación interespecífica considerable. El carácter bioquímico de la reactivación del blastocisto ha sido más profundamente estudiado en la rata y el ratón (1, 145). En estas especies el final de la diapausa está asociado con el incremento de ciertos parámetros de actividad celular, como la división celular (20), producción de CO₂ (117) y síntesis de DNA, RNA, y proteínas (35, 139, 177, 178). En todos los macrópodos las primeras indicaciones morfológicas de que la diapausa ha terminado, son un marcado incremento en el diámetro del blastocisto, y el reinicio de la división celular (28, 30, 156, 166, 171). La implantación no tiene lugar sino hasta después de un tiempo de que se ha reiniciado la actividad del blastocisto. Sin embargo, en algunas especies como Potorous tridactylus, la implantación puede no ocurrir nunca (100). El término del retardo obligatorio en los marsupiales es marcado por un incremento pronunciado en el tamaño del blastocisto y la reiniciación de la actividad mitótica en la masa celular interna y el trofoblasto. La implantación tiene lugar unos tres o cuatro días después de la reactivación del blastocisto (1, 61).

Se han llevado a cabo experimentos en los cuales se ha demostrado que el blastocisto no determina ni la iniciación ni el término de la diapausa, sino que éstos dependen del estado del útero (1, 43). Sin embargo, algunos autores han sugerido que los cambios cualitativos y/o cuantitativos en las macromoléculas, moléculas y/o composición de iones del medio embrionario son -

responsables de la iniciación, mantenimiento y término del estado de diapausa
(34, 119, 168, 175).

OBJETIVO

En el proceso de implantación es fundamental la concentración de estrógenos libres (biológicamente activos) que se encuentran en el medio uterino. Su liberación está regulada en forma importante por una enzima, la Estrógeno Sulfatasa uterina.

El objetivo de este trabajo fue el de medir la actividad de ésta enzima en los sitios de implantación y en el resto del útero, durante el proceso de implantación en la rata, para determinar si existe una diferencia significativa en la concentración de estrógenos libres entre el sitio de implantación y el tejido adyacente, como una evidencia indirecta de la posible producción de estrógenos por el blastocisto. Se hizo esta misma comparación durante la implantación retardada, inducida experimentalmente, con el fin de dilucidar la posible participación de la Estrógeno Sulfatasa uterina como moduladora de la producción de estrógenos libres.

MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron ratas vírgenes Long-Evans adultas, de dos a tres meses de edad, con un peso de 200 ± 30 gr, las cuales fueron mantenidas en condiciones de fotoperíodo y temperatura constantes.

Efecto de las hormonas ováricas sobre la actividad de la Estrógeno Sulfatasa Uterina.

1. En la primera fase experimental se les practicó ovariectomía bilateral a un grupo de 111 ratas bajo anestesia inducida por vía intramuscular, utilizando 2 mg de Droperidol por Kg de peso y Ketalar 50 mg/kg. Veinte días después de la intervención, se les separó en dos grupos, (Fig. 10) cada uno de los cuales fue sometido durante cuatro días a una terapia substitutiva diferente:

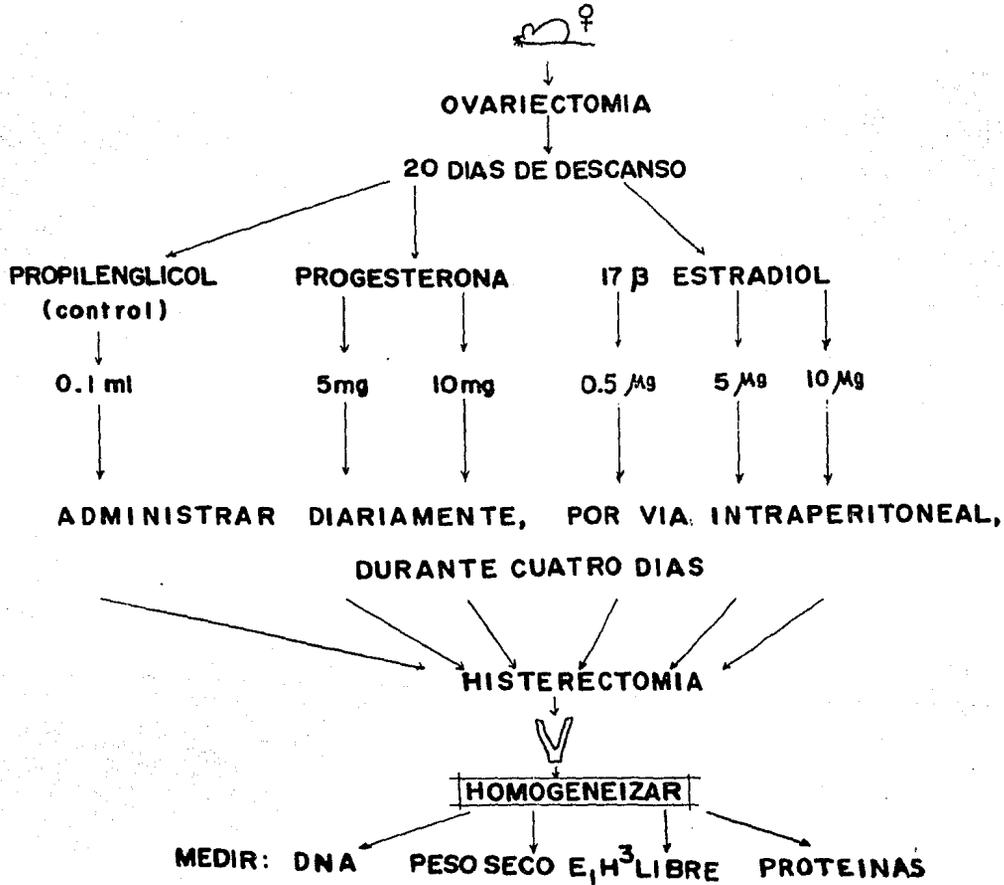
Ia). Este grupo se dividió a su vez en tres subgrupos, para experimentar el efecto de tres diferentes dosis de 17β estradiol por vía intraperitoneal; - 0.5 μ g, 5 μ g, y 10 μ g disueltos en 0.1 ml de propilenglicol.

Ib). Se dividió en dos subgrupos cada uno de los cuales recibió una dosis diferente de progesterona; 5 y 10 mg por vía intraperitoneal. También se utilizó 0.1 ml de propilenglicol como vehículo.

Ic). Grupo Control. A los animales de este grupo se les administraron 0.1 ml de propilenglicol por vía intraperitoneal.

Al término del tratamiento se sacrificaron los animales por dislocación cervical, se disectaron los úteros, se liberaron de grasa, fueron cortados en fragmentos de 3 mm de largo aproximadamente y pesados; el tejido de cada uno de los grupos se homogeneizó en un amortiguador Krebs-Ringer-Bicarbonato - pH 7.2, el cual contenía nicotidamida 30 mM, (KRBN pH 7.2), en una concen-

FIGURA 10. ESQUEMA METODOLOGICO



tración tal que 0.3 ml del homogeneizado correspondieron a 10 mg de tejido. - El homogeneizador utilizado fue del sistema vidrio-vidrio. Durante todo el procedimiento el tejido fue mantenido sobre hielo para evitar que se desnaturaliza ran las protefñas.

Determinación de la actividad de la Estrógeno Sulfatasa Uterina en la - implantación normal y retardada.

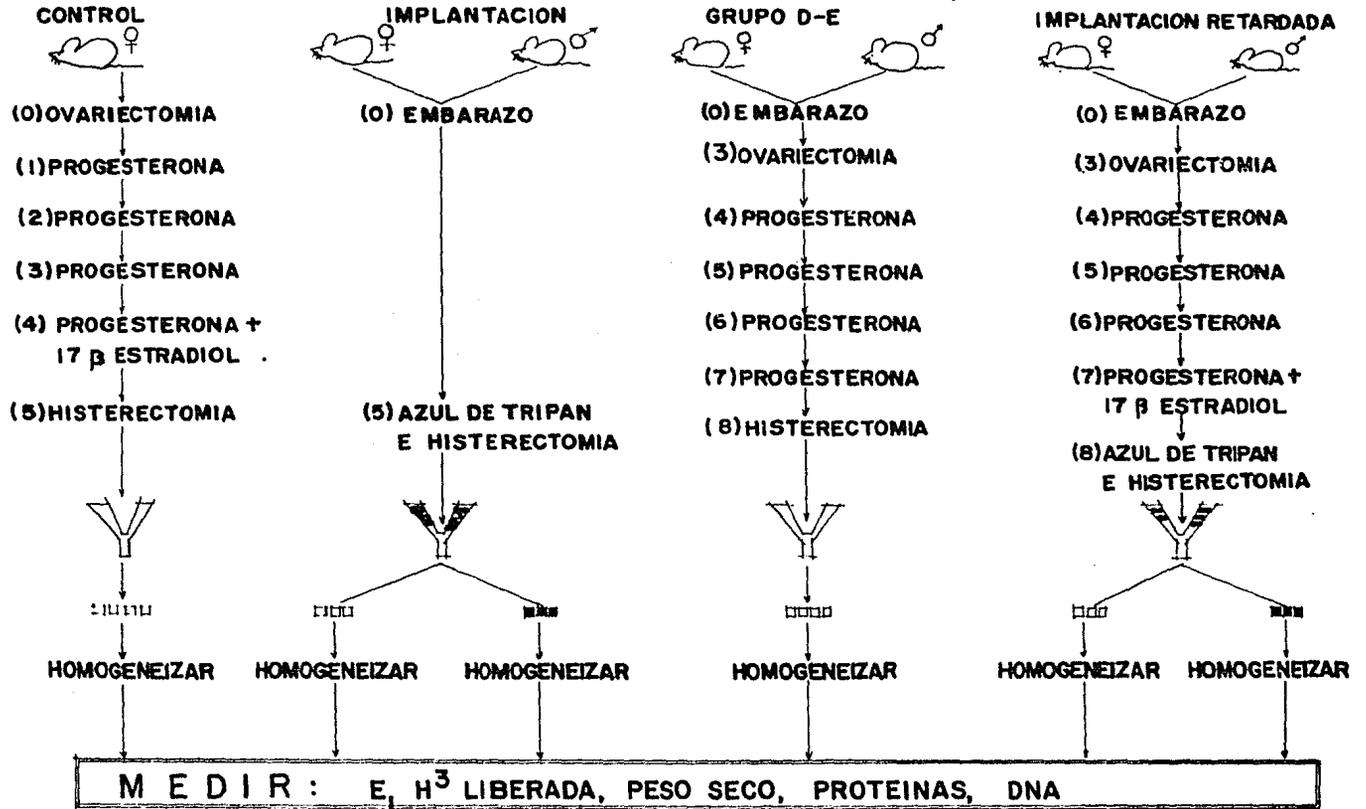
II. Para la segunda fase experimental se utilizaron 77 ratas, las cuales fueron separadas en cuatro grupos (fig. 11):

IIa). Las ratas de este grupo fueron apareadas colocando dos hembras y un macho por jaula (10). Diariamente se les determinó citología vaginal. El día en que se encontraron espermatozoides en los frotis se consideró como día 0 de embarazo. En la mañana del quinto día se les aplicó una inyección de -- 1 ml de azul de tripan al 1.5% en solución salina fisiológica (NaCl 0.15 M). Después de 30 minutos las hembras fueron sacrificadas, se aislaron los úteros, se contó el número de sitios de implantación (S.I.), los cuales fueron visuali zados como áreas azules a lo largo del útero, y se separaron éstos del tejido adyacente o intersitio de implantación (I.S.I.). Los sitios de implantación y el resto del útero fueron pesados y homogeneizados por separado.

IIb). En este grupo se sigue el mismo sistema de apareamiento que fue utilizado en el grupo IIa. Al tercer día de embarazo las hembras fueron sometidas bajo anestesia a ovariectomía bilateral, respetando en este caso los ovi-- ductos. A partir del siguiente día a la ovariectomía se les administró, durante tres días 5 mg de progesterona (0.1 ml de una solución de progesterona en propilenglicol a una concentración de 50 mg/ml) vía intraperitoneal. Un día después los animales fueron sacrificados, y los úteros fueron pesados y homogeneiza dos.

IIc). Las ratas se aparearon de acuerdo al método ya explicado, al

FIGURA 11. ESQUEMA METODOLOGICO.



() DIA

tercer día de embarazo fueron sometidas a ovariectomía bilateral, respetando el oviducto. Durante los tres días posteriores a la ovariectomía se les aplicó, intraperitonealmente 5 mg de progesterona a cada hembra. Al cuarto día se les administraron 5 mg de progesterona por vía intraperitoneal y 50 ng de 17β estradiol por vía intravenosa. Al cabo de 24 hrs. se les inyectó 1 ml de la solución de azul de tripán en la vena caudal. Después de 30 minutos los animales fueron sacrificados, se contó el número de sitios de implante y se aislaron éstos del recto del útero. Los S.I. e I.S.I. fueron pesados y homogeneizados por separado.

Grupo II d). Control; se usaron ratas vírgenes a las que se les sometió a ovariectomía bilateral. A partir del día siguiente al de la ovariectomía y durante tres días se les administraron 5 mg de progesterona por vía intraperitoneal. Al cuarto día se les inyectaron 5 mg de progesterona vía intraperitoneal, y 50 ng de 17β estradiol, contenidos en 1 ml de solución salina fisiológica, vía intravenosa. Al cabo de 24 hrs. las ratas fueron sacrificadas por dislocación cervical, y se les disectó el útero, el cual fue homogeneizado.

Determinación de la actividad de la estrógeno sulfatasa uterina activa.

Para determinar la actividad de la estrógeno sulfatasa uterina activa se utilizó el método descrito por Burstein & Dorfmann (24), modificado por Domínguez, et al. (55). Este método que se utiliza, en general, para estimar la actividad de la esteroide sulfatasa (enzima que hidroliza al grupo sulfato unido a los esteroides) consiste en incubar a 37°C una alícuota del homogeneizado que contiene la sulfatasa con una cantidad conocida de esteroide sulfato radiactivo, que es el sustrato de la enzima. El producto de la reacción enzimática es el esteroide radiactivo libre, el cual es extraído del medio de reacción por medio de una partición simple con líquido de centelleo; el esteroide que no se

transforma permanece en la fase acuosa. Se mide la radiactividad presente en el líquido de centelleo y a partir de éste, se calcula la actividad de la sulfatasa.

En nuestros experimentos se tomaron por quintuplicado, (fig. 12) 0.3 ml de cada homogeneizado (10 mg de tejido) y se colocaron por separado en tubos de centrifuga (los cuales fueron mantenidos sobre hielo). A cada tubo se le agregó, como cofactores, 0.2 ml de una solución de ATP y NAD (Sigma Chem. Corp.) en 1.5 ml de amortiguador (dicha solución contenía 9.929 μ g de ATP y 22.015 μ g de NAD/ml de amortiguador KRBN, pH 7.2, de modo que al agregar los 0.2 ml de esta solución en el medio de incubación se obtuvo una concentración de 1.6 mM de cofactores). Como sustrato se utilizó 0.1 ml de una solución etanólica de estrona sulfato radiactiva (E_1SH^3), sal de amonio de estrona sulfato [6,7³ H (N)] (New England Nuclear Corporation), equivalentes a 30,000 dpm. Se ajustó su masa a 40 nmolas adicionando estrona sulfato fría (E_1S), contenida en 0.1 ml de etanol. Tres de los cinco tubos de cada homogeneizado se colocaron en un incubador metabólico Dubnoff a 37°C durante 120 minutos. Inmediatamente después se detuvo la reacción enzimática calentando los tubos en baño maría a temperatura de ebullición durante 5 minutos. Los tubos restantes, los cuales se utilizaron como control, se colocaron en baño maría a temperatura de ebullición durante 5 minutos, sin haber sido incubados, con el objeto de impedir que la reacción enzimática se llevara a cabo.

Cuando los tubos alcanzaron la temperatura ambiente, se les adicionaron 20 ml de líquido cintilante (50 mg de POPOP y 4 gr de PPO en 1 litro de tolueno bidestilado), se agitaron en un ciclo mixer durante dos minutos y se centrifugaron a 3,000 rpm, durante 10 minutos. Durante la centrifugación, la fase orgánica se separa completamente de la fase acuosa, que permanece en la parte

FIGURA 12. DETERMINACION DE E. H³ LIBERADA

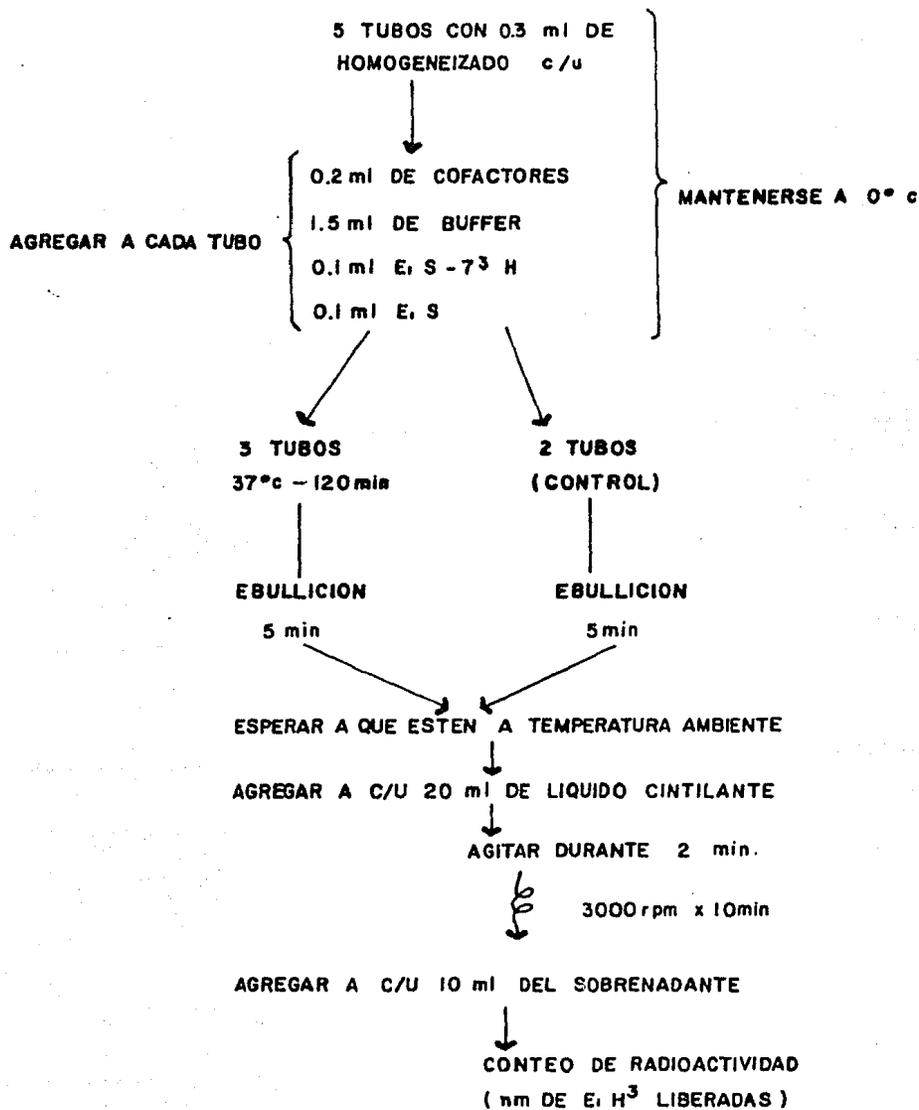
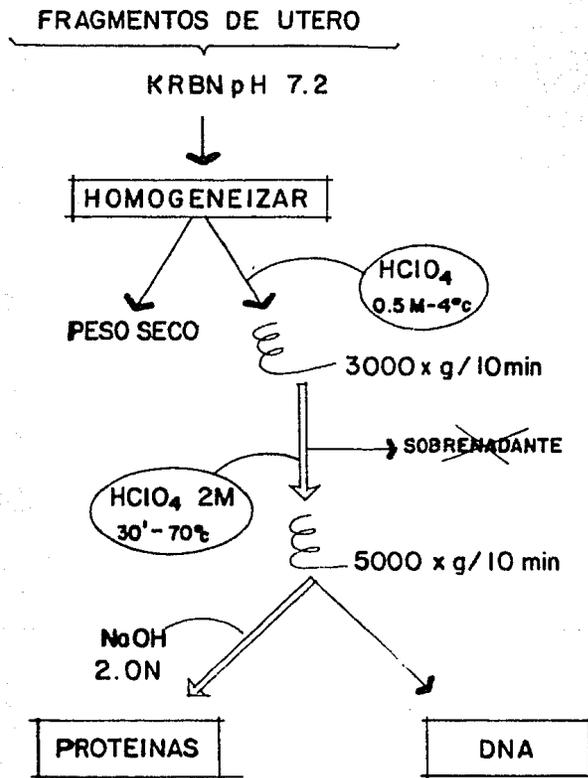


FIGURA 13 ESQUEMA METODOLOGICO



inferior. Esencialmente todo el esteroide sulfato que no reacciona se mantiene en la fase acuosa, en tanto que el esteroide liberado por la acción de la sulfatasa permanece en la fase orgánica. De cada tubo se tomó una alícuota de 10 ml de la fase orgánica que contiene la estrona libre radiactiva (E_1H^3) y se midió la radiactividad presente en un espectrofotómetro de centelleo líquido. En base a la radiactividad medida se calculó la cantidad de E_1H^3 formada, la cual proviene de la E_1SH^3 , y es proporcional a la actividad de la estrógeno sulfatasa uterina.

1). Determinación de Peso Seco.

La determinación se hizo por el método de Bernal (12).

Reactivos:

- A). Solución de dicromato de potasio (Merck) al 2% en H_2SO_4 - concentrado (Merck). Calentar entre 70 - 80°C hasta que se disuelva.
- B). Solución Estándar: Manitol (Merck) 20 mg en 10 ml de agua destilada.

Método:

Por duplicado: se toman 200 μ l de cada homogenizado y se llevan a un volúmen de 1.0 ml con agua destilada. Los tubos se colocan en baño de hielo y se les agregan 2.0 ml de solución A, dejando resbalar el líquido por las paredes. En seguida se agitan los tubos, manteniéndolos dentro del hielo para evitar un sobrecalentamiento de la solución y se ponen en baño maría a temperatura de ebullición durante 20 minutos.

Se dejan enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente y se leen a 660 nm en un espectrofotómetro UV Pye Unicam sp6-500.

Para construir la curva patrón, se lee la absorbancia de seis concentra-

clones diferentes de manitol en agua destilada (las cuales se preparan por dupli-
cado de acuerdo a la tabla 2) en el espectrofotómetro UV Pye Unicam sp6-500.

2). Determinación de DNA.

La reacción entre la ribosa y la difenilamina, es probablemente la más -
usada para la determinación de DNA. Dische (42) describió este método que
utiliza una mezcla de ácido sulfúrico, difenilamina y ácido acético. Burton (25)
en 1956 propuso una modificación a este método basado en la adición de acetal-
dehído, y señala que esta determinación es 3.5 veces más sensible que el método
original descrito por Dische. En 1965, Giles y Hyers (82) publicaron una
modificación al método de Burton que lo hace aún más específico; estos autores
encontraron que puede reducirse la lectura del blanco omitiendo el ácido sulfúrico
e incorporando el acetaldehído al final de la reacción, aunque después men-
cionan que ésto no es requisito indispensable. Comunicaron también que la -
sensibilidad del método es incrementada al aumentar la concentración de dife--
nilamina al 4%.

Reactivos:

Reactivo a). Acido Perclórico 2 M (Baker).

Reactivo b). Acetaldehído (Merck). Se prepara una solución de --
16 mg/ml, la cual se mantiene congelada y al momento
de usarse se diluye 1:10 con agua destilada.

Reactivo c). Difenilamina (Merck). Se prepara una solución al 4% en
ácido acético glacial. (Debe prepararse al momento de -
su uso).

Método:

A partir de cada homogeneizado se toma 1 ml, se le agrega 1 ml de ácido
perclórico (HClO_4) 0.5 M frío (-4°C) se centrifuga a 3,000 rpm por 10 minutos,

TABLA 2.- CURVA PATRON DE PESO SECO

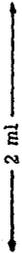
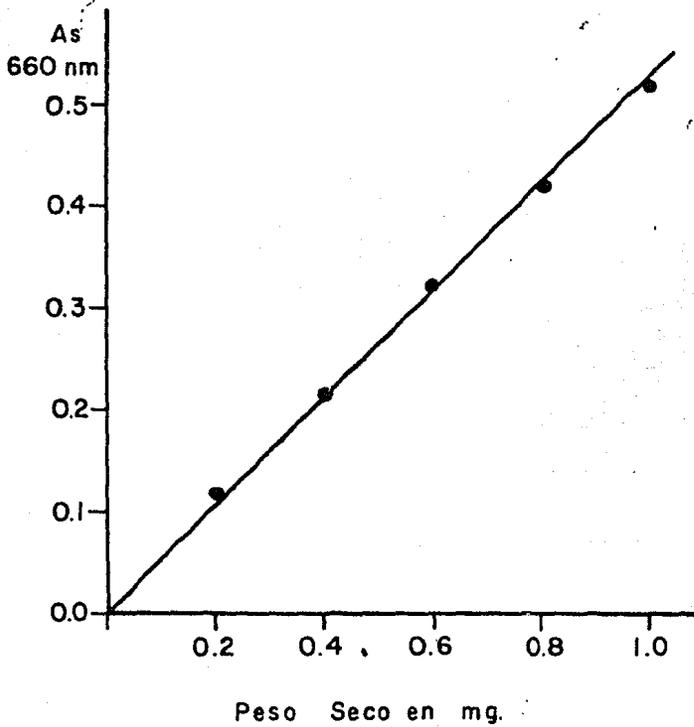
TUBO	SOLUCION ESTANDAR DE MANITOL (ml)	H ₂ O DESTILADA (ml)	SOLUCION A
blanco	0	1.0	
1	0.2	0.8	
2	0.4	0.6	
3	0.6	0.4	
4	0.8	0.2	
5	1.0	0	

FIGURA 14 CURVA PATRON PARA LA DETERMINACION DE PESO SECO.



el sobrenadante se desecha y al precipitado se le agrega 1 ml de HClO_4 2 M, - se coloca en un temp block a 70°C durante 30 minutos, se deja enfriar hasta - que alcance la temperatura ambiente, se centrifuga a 5,000 rpm durante 10 minu- tos y del sobrenadante se toma 100 μl (0.1 ml) por triplicado, para hacer la determinación del DNA.

Se toman 100 μl del sobrenadante (fig. 15) se lleva a un volúmen fi- nal de 500 μl con el reactivo a, adicionándose 50 μl del reactivo b, y final- mente 500 μl de la solución de difenilamina; se mezclan y se tapan los tubos, dejando incubar a 37°C durante un lapso de 18-24 hrs., leyendo posteriormente la absorción a 600 nm en un espectrofotómetro UV Pye Unicam sp6-500.

Curva Estándar:

Se prepara una solución patrón de DNA en HClO_4 2 M, que contenga - 1 mg de DNA/ml de HClO_4 , hidrolizándola a 70°C durante 30 minutos. Esta - se guarda congelada hasta el momento de usarse; al utilizarse se diluye 1:10 para tener una concentración final de 0.1 mg/ml.

Para construir la curva patrón de DNA se lee la absorvancia de seis con- centraciones de DNA, por duplicado (tabla 3) a 600 nm en un espectrofotómetro UV Pye Unicam sp6-500.

3). Determinación de Proteínas.

La determinación se hizo por el método de Lowry (112), el cual se -- basa en el complejo colorido formado por el cobre del reactivo de Bluret (106) con los enlaces peptídicos de las proteínas.

Reactivos:

Solución a: Na_2CO_3 al 2%, tartrato de sodio al 0.02% en NaOH 0.1 M.

Solución b: CuSO_4 al 0.5% en agua desionizada.

Solución c: 50 ml de la solución a, más 1.0 ml de la solución b. --

TABLA 3.-CURVA PATRON DE DNA

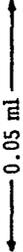
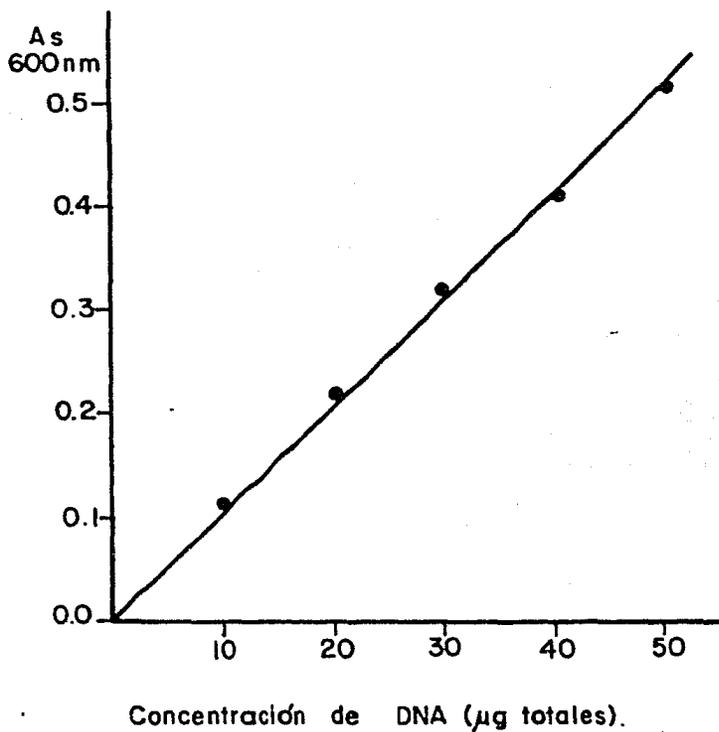
TUBO	SOLUCION ESTANDAR DE DNA (ml)	SOLUCION A (ml)	SOLUCION B	SOLUCION C
blanco	0	0.5		
1	0.1	0.4		
2	0.2	0.3		
3	0.3	0.2		
4	0.4	0.1		
5	0.5	0		

FIGURA 15 CURVA PATRON PARA LA DETERMINACION DE DNA .



Preparar al momento de usarse.

Solución d: reactivo de Folín Cicaltey diluido en una relación de 1.1 ml de reactivo con 1.4 ml de agua desionizada.

Método:

Se tomaron 100 μ l de la fracción protéica y se llevaron a un volúmen - final de 500 μ l con agua destilada, adicionándose 2.0 ml del reactivo c. Se dejó reposar 10 minutos, agregando después 0.2 ml de la solución d, mezclando y dejando reposar 20 minutos, para después leer la absorción a 550 nm en un espectrofotómetro UV Pye Unicam sp6-500.

Curva Estándar:

Se prepara una solución de albúmina bovina (Difco) al 30% en agua destilada. Para construir la curva patrón, se lee la absorvancia de seis concentraciones de albúmina bovina, por duplicado (tabla 4) a 550 nm en un espectrofotómetro UV Pye Unicam sp6-500.

Evaluación estadística.

Para comparar las medias muestrales de los diferentes grupos experimentales, se utilizó la prueba de t para aquellas muestras que tuvieran menos de 30 datos y la prueba de d para los que tenían 30 datos o más. Se consideró - que las medias muestrales eran significativamente diferentes cuando $p < 0.05$ (124, 134).

TABLA 4.-CURVA PATRON DE PROTEINAS

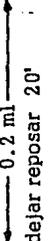
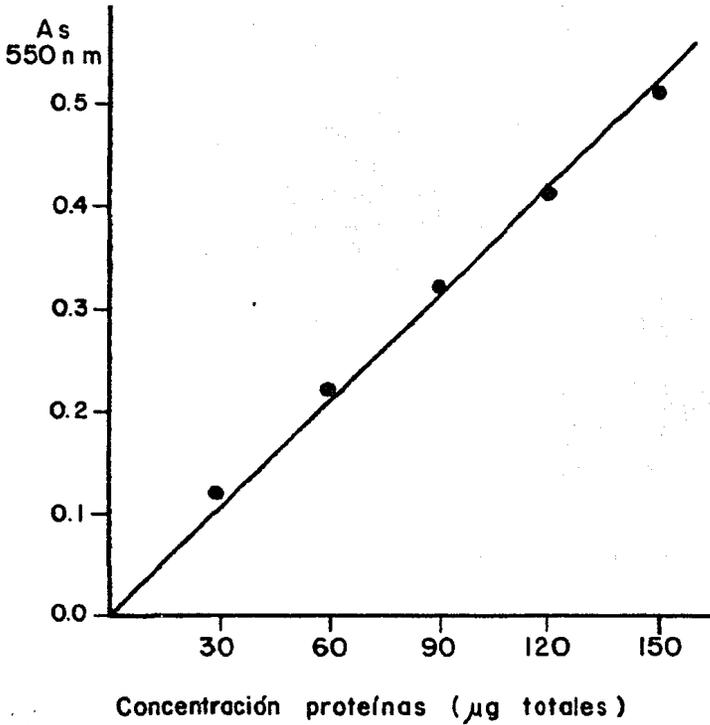
TUBO	SOLUCION ESTANDAR DE ALBUMINA (ml)	H ₂ O DESTILADA (ml)	SOLUCION C	SOLUCION D
blanco	0	0.5		
1	0.1	0.4		
2	0.2	0.3		
3	0.3	0.2		
4	0.4	0.1		
5	0.5	0		

FIGURA 16 CURVA PATRON PARA LA DETERMINACION DE PROTEINAS.



RESULTADOS

1). Efecto del 17β estradiol sobre la actividad de la Estrógeno Sulfatasa uterina, en ratas vírgenes.

En las ratas a las que se administró 17β estradiol se observó que la actividad de la estrógeno sulfatasa uterina (pmolas de E_1 liberadas tanto por mg de tejido como por mg de proteína o de DNA/hora, es inversamente proporcional a la cantidad de 17β estradiol (0.5, 5 y 10 μ g) que se les administró (cuadros 1, 3 y 4). Con respecto al efecto del 17β estradiol sobre la actividad de la estrógeno sulfatasa uterina, medida en términos de pmolas de E_1 liberada/mg de peso seco/hr., se observó que ésta disminuyó en los tres grupos experimentales (0.5, 5 y 10 μ g de 17β estradiol) al compararlos con el control ($p < 0.005$). Sin embargo, al comparar la actividad de la enzima de los tres grupos experimentales entre sí, no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$), (cuadro 2).

2). Efecto de la progesterona sobre la actividad de la Estrógeno Sulfatasa uterina, en ratas vírgenes.

No se observó un efecto evidente de la progesterona (5 y 10 mg) sobre la actividad de la estrógeno sulfatasa, debido a que: a) Expresada/mg de tejido/hr. parece tender a disminuir, siendo significativamente diferente al control únicamente el grupo de ratas a las que se les suministraron 10 mg de progesterona (cuadro 5); b) Cuando se expresó en pmolas de E_1 liberada/mg de peso seco/hr., no hubo diferencias significativas entre la actividad registrada para los dos grupos experimentales (progesterona 5 y 10 mg) y el grupo control (cuadro 6); c) En el caso en el que se expresó en pmolas de E_1 liberada/mg de proteína/hr., la actividad enzimática de los dos grupos experimentales --

resultó menor que la del grupo control ($p < 0.005$), (cuadro 7); d) Cuando la actividad enzimática fue expresada por mg de DNA/hr., se encontró que solo la dosis de 10 mg la hizo disminuir significativamente con respecto al control -- (cuadro 8).

3). Actividad de la Estrógeno Sulfatasa uterina en el proceso de Implantación.

La actividad de la estrógeno sulfatasa uterina expresada en pmolas de E_1 liberada/mg de tejido húmedo/hr., durante la implantación, se encontró disminuída en el sitio de Implantación, con respecto al control ($p < 0.025$) y al intersitio ($p < 0.005$), en tanto que resultó aumentada en el I.S.I. cuando se le comparo con el control ($p < 0.05$), (cuadro 9).

Cuando la actividad enzimática se expresó por mg de peso seco/hr., no hubo diferencias significativas.

En el caso en el que se le expresó tanto por mg de proteína como por mg de DNA/hr. resultó significativamente mayor tanto en el S.I. como en el I.S.I cuando estos se compararon con el control ($p < 0.005$). La actividad de la - estrógeno sulfatasa fue menor en el S.I. que en el I.S.I. con una $p < 0.005$ - cuando se le expresó por mg de proteína/hr. (cuadro 11), y con una $p < 0.05$ cuando fue expresada por mg de DNA (cuadro 12).

4). Actividad de la Estrógeno Sulfatasa uterina en el proceso de Implantación retardada.

Fue menor (expresada/mg de peso húmedo/hr) en el S.I. de Implantación retardada (S.I. - R) que en el grupo control, el I.S.I. de Implantación retardada (I.S.R. - R) y el grupo (d-e); al que se le produjo diápausa mediante la administración de progesterona y finalmente no se le administró el pico de - estrógenos, impidiendo así que se implantaran los blastocistos (fig. 11), --

($p < 0.005$ en los tres casos). Las diferencias entre los otros grupos no fueron significativas ($p > 0.05$), (cuadro 13).

La actividad de la estrógeno sulfatasa uterina, expresada por mg de peso seco/hr., fue mayor tanto en el S.I.-R como en el I.S.I.-R, (por mgde peso -- seco) que en el grupo control. En el grupo d-e la actividad de la enzima no varió significativamente con respecto al control. La actividad enzimática resultó incrementada en el S.I.-R cuando se le comparó con el I.S.I.-R y contra el grupo d-e ($p < 0.005$), (cuadro 14).

Cuando se le expresó en pmolas de E_1 liberada/mg de proteína/hr., se vió incrementada ($p < 0.005$) en el I.S.I.-R y en el S.I.-R, con respecto al control y al grupo d-e (cuadro 15).

En el caso en el que la actividad de la estrógeno sulfatasa uterina se midió en términos de cantidad de E_1 liberada/mg de DNA/hr., ésta resultó incrementada en el S.I.-R con respecto a lo observado para el control y el I.S.I.-R con una $p < 0.005$, y con respecto al grupo d-e con una $p < 0.01$ (cuadro 16).

5). Relación entre los diferentes parámetros medidos.

En el cuadro 17 se presentan los valores obtenidos del cociente de los diferentes parámetros de referencia utilizados. Se observa que las proteínas expresadas por mg de DNA, están aumentadas en el S.I. con respecto al I.S.I. con una $p < 0.005$, pero disminuidas con respecto al S.I.-R, con una $p < 0.005$.

En cuanto al DNA expresado por mg de peso seco, su concentración fue mayor en el S.I., que en el I.S.I., con una $p < 0.025$, y menor cuando se le comparó con el S.I.-R, con una $p < 0.005$.

La concentración de proteínas expresada por mg de peso seco, fue mayor en el S.I. que en el I.S.I. ($p < 0.005$), pero menor cuando se le comparó en el S.I.-R ($p < 0.025$). Por otro lado, se encuentran aumentadas en el

I.S.I.-R cuando éste se compara contra el I.S.I., con una $p < 0.005$.

Se observa que cuando las proteínas son expresadas por mg de peso húmodo, su concentración es mayor en el I.S.I.-R que en el S.I.-R, con una $p < 0.05$, y que en el I.S.I., con una $p < 0.025$.

Con respecto a la relación mg de peso húmedo por mg de peso seco, se observa que el S.I. está más hidratado (en un 21.10%) que el I.S.I., con una $p < 0.005$; el S.I.-R también presentó una mayor hidratación (44.9 %) que el -- I.S.I.-R ($p < 0.005$); a su vez, el S.I.-R presentó un mayor contenido de agua (42.13 %) que el S.I., $p < 0.005$; finalmente el grado de hidratación del -- I.S.I.-R resultó mayor (18.29 %) que el del I.S.I. con una $p < 0.005$.

6). Número de sitios de implantación en el proceso de implantación normal y retardada.

El promedio del número de sitios de implantación que presentaron 91 ratas con implantación normal fue de 10.475, con un error estandar de ± 0.250 , en tanto que en 31 ratas a las que se les produjo un retardo de 3 días en el proceso de implantación, el promedio fue de 4.935, con un error estándar de -- ± 0.422 ($p < 0.005$), (histograma 1).

CUADRO 1

EFFECTO DEL 17 β ESTRADIOL SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA ESTROGENO SULFATASA UTERINA.
(expresada en E₁ pmolas/mg de tejido/hr.)

CONTROL	E ₂ (0.5 μ g)	E ₂ (5 μ g)	E ₂ (10 μ g)
$\bar{x} \pm E.E$	$\bar{x} \pm E.E$	$\bar{x} \pm E.E$	$\bar{x} \pm E.E$
372.39 \pm 16.42	219.78 \pm 11.77 ^a	177.86 \pm 7.45 ^{ab}	168=48 \pm 9.95 ^{ab}
(18)	(9)	(19)	(9)

\bar{x} Promedio

E.E Error estandar

a p < 0.005 Cuando se compara con Control

b p < 0.005 Cuando se compara con E₂ (0.5 μ g)

() Número de experimentos

CUADRO 2

EFFECTO DEL 17 β ESTRADIOL SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA ESTROGENO SULFATASA UTERINA
(expresada en E₁ pmolas/mg de peso seco/hr.).

CONTROL	E ₂ (0.5 μ g)	E ₂ (5 μ g)	E ₂ (10 μ g)
$\bar{x} \pm E.E$	$\bar{x} \pm E.E$ _a	$\bar{x} \pm E.E$ _a	$\bar{x} \pm E.E$ _a
2.18 \pm 0.18	1.17 \pm 0.04	1.08 \pm 0.06	1.07 \pm 0.10
(18)	(9)	(19)	(11)

\bar{x} Promedio

E.E Error estandar

a p < 0.005 Cuando se compara con Control

() Número de ex perimentos

CUADRO 3

EFEECTO DEL 17 β ESTRADIOL SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA ESTROGENO SULFATASA UTERINA
(expresada en E₁ pmolas/mg de protefna/hr.)

CONTROL	E ₂ (0.5 μ g)	E ₂ (5 μ g)	E ₂ (10 μ g)
$\bar{x} \pm E.E$	$\bar{x} \pm E.E$	$\bar{x} \pm E.E$	$\bar{x} \pm E.E$
19.50 \pm 0.98	13.92 \pm 1.02 ^a	9.95 \pm 0.71 ^{a b}	7.57 \pm 0.36 ^{a b c}
(12)	(9)	(16)	(14)

\bar{x} Promedio

E.E Error estandar

a p < 0.005 Cuando se compara con Control

b p < 0.005 Cuando se compara con E₂ (0.5 μ g)

c p < 0.005 Cuando se compara con E₂ (5 μ g)

() Número de experimentos

C U A D R O 4

EFEECTO DEL 17 β ESTRADIOL SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA ESTROGENO SULFASA UTERINA
(expresada en E₁ pmolas/mg de DNA/hr.)

CONTROL	E ₂ (0.5 μ g)	E ₂ (5 μ g)	E ₂ (10 μ g)
$\bar{x} \pm E.E$	$\bar{x} \pm E.E$	$\bar{x} \pm E.E$ ^{a b}	$\bar{x} \pm E.E$ ^{a c d}
48.88 + 1.59	43.23 + 2.92	36.32 + 2.12	30.71 + 0.95
(15)	(9)	(18)	(6)

\bar{x} Promedio

E. E Error estandar

a $p < 0.005$ Cuando se compara con Control

b $p < 0.05$ Cuando se compara con E₂ 0.5 μ g

c $p < 0.005$ Cuando se compara con E₂ 0.5 μ g

d $p < 0.025$ Cuando se compara con E₂ 5 μ g

() Número de experimentos

C U A D R O 5

EFFECTO DE LA PROGESTERONA SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA ESTROGENO SULFATASA UTERINA
(expresada en E, pmolas/mg de tejido/hr.)

CONTROL	PROGESTERONA (5 mg)	PROGESTERONA (10 mg)
$\bar{x} \pm E.E$	$\bar{x} \pm E.E$	$\bar{x} \pm E.E$
372.39 + 15.42	349.93 + 11.76	326.39 + 17.47 ^a
(18)	(24)	(14)

\bar{x} Promedio

E.E Error estandar

a p < 0.05 Cuando se compara con Control

() Número de experimentos

CUADRO 6

EFFECTO DE LA PROGESTERONA SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA ESTROGENO UTERINA
(expresada en E, pmolas/mg de peso seco/hr.)

CONTROL	PROGESTERONA (5 mg)	PROGESTERONA (10 mg)
$\bar{x} \pm E.E$	$\bar{x} \pm E.E$	$\bar{x} \pm E.E$
2.18 \pm 0.18	1.90 \pm 0.10	2.02 \pm 0.15
(18)	(24)	(12)

\bar{x} Promedio
 E.E Error estándar
 () N úmero de experimentos

CUADRO 7

EFFECTO DE LA PROGESTERONA SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA ESTROGENO SULFATASA UTERINA
(expresada en E_i pmolas/mg de protefna/hr.)

CONTROL	PROGESTERONA (5 mg)	PROGESTERONA (10 mg)
$\bar{x} \pm E.E$	$\bar{x} \pm E.E$	$\bar{x} \pm E.E$
19.50 \pm 0.98	16.08 \pm 0.58	15.85 \pm 1.00 ^a
(12)	(15)	(17)

\bar{x} Promedio

E.E Error estandar

a p < 0.005 Cuando se compara con Control

() Número de experimentos

C U A D R O 8

EFFECTO DE LA PROGESTERONA SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA ESTROGENO SULFATASA UTERINA
(expresada en E₁ pmolas/mg de DNA/hr.)

CONTROL	PROGESTERONA (5 mg)	PROGESTERONA (10 mg)
$\bar{x} \pm E.E$	$\bar{x} \pm E.E$	$\bar{x} \pm E.E$
48.88 \pm 1.59	51.30 \pm 1.88	45.64 \pm 2.60 ^a
(15)	(17)	(14)

\bar{x} Promedio

E.E. Error estandar

a p < 0.05 Cuando se compara con Progesterona (5 mg)

() Número de experimentos

C U A D R O 9

ACTIVIDAD DE LA ESTROGENO SULFATASA UTERINA (expresada en E₁ pmolas/mg de tejido/hr).
DURANTE LA IMPLANTACION NORMAL.

CONTROL	I. S. I.	S. I.
$\bar{x} \pm E.E$	$\bar{x} \pm E.E$	$\bar{x} \pm E.E$
274.611 \pm 11.768	307.556 \pm 11.308 ^a	242.110 \pm 8.056 ^{bc}
(9)	(12)	(12)

\bar{x} Promedio

E.E Error estandar

a p < 0.05 Cuando se compara con Control

b p < 0.025 Cuando se compara con Control

c p < 0.005 Cuando se compara con I.S.I.

() Número de experimentos

CUADRO 10

ACTIVIDAD DE LA ESTROGENO SULFATASA UTERINA (expresada en E, pmolas/mg de peso seco/hr.)
DURANTE LA IMPLANTACION NORMAL.

CONTROL	I.S.I.	S.I.
$\bar{x} \pm E.E$	$\bar{x} \pm E.E$	$\bar{x} \pm E.E$
1.387 \pm 0.154	1.369 \pm 0.079	1.355 \pm 0.073
(12)	(12)	(12)

\bar{x} Promedio
E.E Error estandar
() Número de experimentos

CUADRO 11

ACTIVIDAD DE LA ESTROGENO SULFATASA UTERINA (expresada en E₁ pmolas/mg de proteína/hr)
DURANTE LA IMPLANTACION NORMAL.

CONTROL	I.S.I.	S.I.
$\bar{x} \pm E.E$	$\bar{x} \pm E.E$ ^a	$\bar{x} \pm E.E$ ^{a b}
12.60 \pm 0.99	31.93 \pm 0.62	22.43 \pm 1.15
(9)	(12)	(12)

- \bar{x} Promedio
- E.E Error estandar
- a p < 0.005 Cuando se compara con Control
- b p < 0.005 Cuando se compara con I.S.I.
- () Número de experimentos

CUADRO 12

ACTIVIDAD DE LA ESTROGENO SULFATASA UTERINA (expresada en E₁ pmolas/mg de DNA/hr).
DURANTE LA IMPLANTACION NORMAL.

CONTROL	i.S.I.	S.I.
$\bar{x} \pm E.E$	$\bar{x} \pm E.E$ ^a	$\bar{x} \pm E.E$ ^{a b}
48.04 \pm 2.57	76.09 \pm 1.55	68.81 \pm 3.32
(12)	(12)	(12)

\bar{x} Promedio

E.E Error estandar

a p < 0.005 Cuando se compara con Control

b p < 0.05 Cuando se compara con I.S.I.

() Número de experimentos

CUADRO 13

ACTIVIDAD DE LA ESTROGENO SULFATASA UTERINA (expresada en E, pmolas/mg de tejido/hr.)
DURANTE LA IMPLANTACION RETARDADA.

CONTROL	PROGESTERONA + E ₂ I.S.I.	PROGESTERONA + E ₂ S.I.	D - E PROGESTERONA
$\bar{x} \pm E.E$	$\bar{x} \pm E.E$	$\bar{x} \pm E.E$	$\bar{x} \pm E.E$
274.61 ± 11.77	294.06 ± 14.72	207.28 ± 10.11 ^{a b}	266.78 ± 11.42 ^c
(9)	(12)	(11)	(12)

\bar{x} Promedio

E.E. Error estándar

a p < 0.005 Cuando se compara con Control

b p < 0.005 Cuando se compara con I.S.I.

c p < 0.005 Cuando se compara con S.I.

() Número de experimentos

CUADRO 14

ACTIVIDAD DE LA ESTROGENO SULFATASA UTERINA (expresada en E₁ pmolas/mg de peso seco/hr.)
DURANTE LA IMPLANTACION RETARDADA.

CONTROL	PROGESTERONA + E ₂ I.S.I.	PROGESTERONA + E ₂ S.I.	D - E PROGESTERONA
$\bar{x} \pm E.E$	$\bar{x} \pm E.E$ _a	$\bar{x} \pm E.E$ _{a b}	$\bar{x} \pm E.E$ _c
1.387 ± 0.154	1.720 ± 0.101	2.300 ± 0.102	1.569 ± 0.056
(12)	(15)	(14)	(12)

\bar{x} Promedio

E.E. Error estandar

a p < 0.05 Cuando se compara con Control

b p < 0.005 Cuando se compara con I.S.I.

c p < 0.005 Cuando se compara con S.I.

() Número de experimentos

CUADRO 15

ACTIVIDAD DE LA ESTROGENO SULFATASA UTERINA (expresada en E, pmolas/mg de protefna/hr.)
DURANTE LA IMPLANTACION RETARDADA.

CONTROL	PROGESTERONA + E ₂ I.S.I.	PROGESTERONA + E ₂ S.I.	D - E PROGESTERONA
$\bar{x} \pm E.E$	$\bar{x} \pm E.E$	$\bar{x} \pm E.E$	$\bar{x} \pm E.E$
12.60 ± 0.99	21.02 ± 0.82	19.65 ± 1.96 _a	11.26 ± 0.67 _{b c}
(9)	(15)	(14)	(12)

\bar{x} Promedio

E.E. Error estandar

a p < 0.005 Cuando se compara con Control

b p < 0.005 Cuando se compara con I.S.I.

c p < 0.005 Cuando se compara con S.I.

() Número de experimentos

C U A D R O 1 6

ACTIVIDAD DE LA ESTROGENO SULFATASA UTERINA (expresada en E₁ pmolas/mg de DNA/hr.)
DURANTE LA IMPLANTACION RETARDADA.

CONTROL	PROGESTERONA + E ₂ I.S.I.	PROGESTERONA + E ₂ S.I.	D - E PROGESTERONA
$\bar{x} \pm E.E$	$\bar{x} \pm E.E$	$\bar{x} \pm E.E.$ a b	$\bar{x} \pm E.E$ c
48.04 + 2.57	50.63 + 2.06	80.23 + 4.46	56.68 + 7.41
(12)	(11)	(12)	(12)

\bar{x} Promedio

E.E. Error estandar

a p < 0.005 Cuando se compara con Control

b p < 0.005 Cuando se compara con I.S.I.

c p < 0.01 Cuando se compara con S.I.

() Número de experimentos

CUADRO 17

RELACION ENTRE LOS DIFERENTES PARAMETROS MEDIDOS.

PARAMETROS DETERMINADOS	IMPLANTACION NORMAL		IMPLANTACION RETARDADA	
	S.I. $\bar{x} \pm E.E$	I.S.I. $\bar{x} \pm E.E$	S.I. $\bar{x} \pm E.E$	I.S.I. $\bar{x} \pm E.E$
mg de Proteína/mg de DNA	2.9224 ± 0.1165 (8)	2.6404 ± 0.1112 ^a (8)	4.1836 ± 0.3880 ^a (6)	4.3742 ± 1.3166 (7)
mg de DNA/mg de Peso Seco	0.0212 ± 0.0012 (8)	0.0167 ± 0.0004 ^b (8)	0.0297 ± 0.0017 ^a (6)	0.0254 ± 0.0036 (8)
mg de Proteína/mg de Peso Seco	0.0613 ± 0.0023 (8)	0.0428 ± 0.0023 ^a (8)	0.0946 ± 0.0137 ^b (8)	0.841 ± 0.0127 ^c (7)
Mg de DNA/mg de Peso Húmedo	3.7004 ± 0.0912 (6)	3.8592 ± 0.1072 (6)	3.3287 ± 0.3853 (6)	4.5660 ± 0.6393 (8) ^{d e}
Mg de Proteína/mg de Peso Húmedo	10.6932 ± 0.5325 (6)	10.2925 ± 0.5538 (6) ^a	10.6049 ± 1.4050 (8) ^a	15.3543 ± 2.1129 (7) ^{e f}
mg de Peso Húmedo/mg de Peso Seco	5.6290 ± 0.2287 (8)	4.4410 ± 0.1371 (8)	9.7285 ± 1.2273 (5)	5.4349 ± 0.2910 (7)

\bar{x} Promedio

E.E. Error estándar

a p < 0.005 Cuando se compara con S.I. de Implantación Normal

b p < 0.025 Cuando se compara con S.I. de Implantación Normal

c p < 0.005 Cuando se compara con I.S.I. de Implantación Normal

d p < 0.05 Cuando se compara con S.I. de Implantación Retardada

e p < 0.025 Cuando se compara con I.S.I. de Implantación Normal

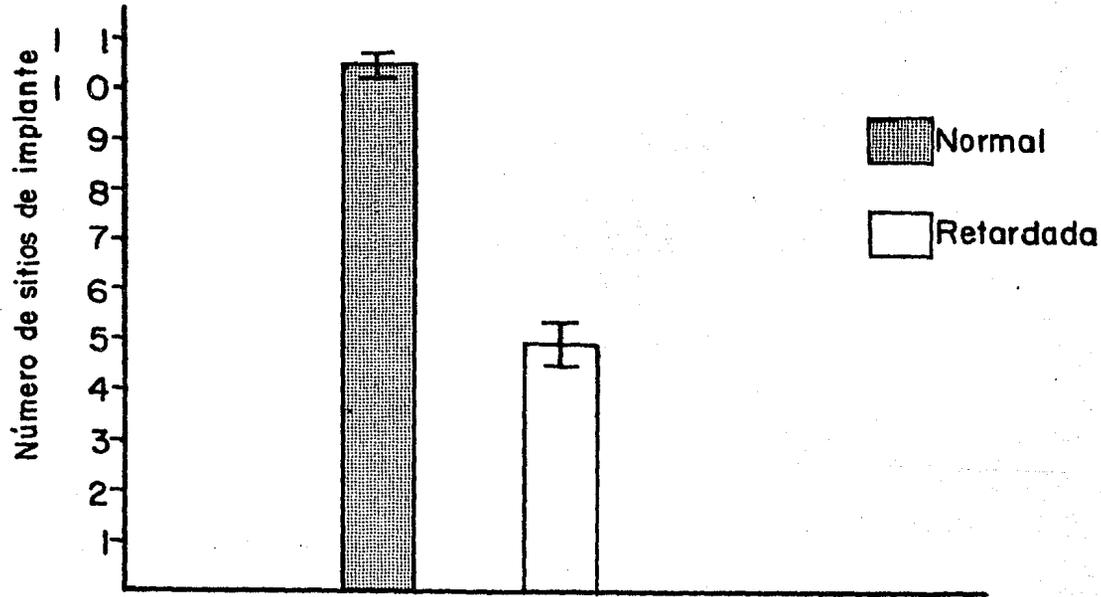
f p < 0.005 Cuando se compara con S.I. de Implantación Retardada

() Número de experimentos

NOTA: Las comparaciones fueron hechas entre los cocientes de un mismo renglón.

HISTOGRAMA I

NUMERO DE SITIOS DE IMPLANTE EN EL PROCESO DE IMPLANTACION NORMAL Y RETARDADA.



DISCUSION Y CONCLUSIONES

Esta bien establecido que los eventos morfológicos y bioquímicos que ocurren durante el proceso de implantación del blastocisto varían considerablemente entre las diferentes especies de mamíferos.

Dos son los componentes básicos requeridos para que se lleve a cabo la implantación: un blastocisto maduro, libre de la zona pelúcida y un útero acondicionando debidamente. El acondicionamiento del útero resulta de la estimulación con progesterona seguida de un pico de estrógenos.

En los futuros sitios de implante se presenta una reacción semejante a una inflamación que se caracteriza por un incremento en la permeabilidad capilar. Ya que ha sido demostrado que la progesterona puede actuar como un agente anti-inflamatorio, puede ser postulado que mientras la dominancia de la progesterona es obligatoria para el útero como un todo, ésta puede actuar como un inhibidor de la reacción de inflamación local. Por lo tanto es necesario nulificar o reducir localmente la dominancia de la progesterona para permitir esta respuesta. Una sustancia que actúe contrarestando el efecto de la progesterona localmente tendría que provenir de una fuente local, debido a que su llegada al útero por medio de la circulación general, lo afectaría en su totalidad. Debido a que los estrógenos tienen un efecto antagónico al de la progesterona y que los blastocistos de rata cuentan con los sistemas metabólicos necesarios para producir estrógenos, se ha pensado que el responsable de la reacción de inflamación local es el blastocisto.

Ya que en la fase inicial del presente estudio se demostró que los estrógenos inhiben la actividad de la estrógeno sulfatasa uterina (cuadros 1-4), podemos concluir que el haber demostrado que la actividad de ésta enzima se

encuentra disminuida localmente en los S.I., tanto en la implantación normal - como en la implantación retardada, inducida experimentalmente, (cuadros 9-16) es una sólida evidencia indirecta de la producción de estrógenos por el blastocisto de rata.

Originalmente se pensó que la progesterona, debido a su efecto antagónico al de los estrógenos, estimularía la actividad de la esteroide sulfatasa - uterina. Sin embargo, nuestros resultados experimentales (cuadros 5-8) nos hacen pensar que la progesterona también inhibe, aunque en menor grado, la - actividad de ésta enzima.

El hecho de que la concentración de proteínas y DNA se encuentre aumentada en el S.I., tanto durante la implantación normal como en la implanta-- ción retardada (cuadro 17), nos indica que la actividad metabólica es mayor en el S.I. que en el tejido adyacente.

Por otro lado, el hecho de que las concentraciones de proteínas y DNA - en los S.I. sean mayores en la implantación retardada que en la implantación - normal (cuadro 17), nos indica que la actividad metabólica del blastocisto no cesa durante la diapausa.

El haber encontrado que el S.I., tanto de implantación normal como -- retardada, se encuentra más hidratado que el resto del útero confirma que éste está siendo estimulado localmente por una sustancia antagónica a la progesterona. Nosotros pensamos que dicha estimulación se debe al efecto de los - estrógenos producidos y secretados por el blastocisto. El hecho de que el -- efecto de inflamación local sea mayor en los S.I. de las ratas a las que se les indujo diapausa (cuadro 17) que en las de implantación normal, nos hace pen - sar que el blastocisto permanece muy localizado en el útero y sigue produciendo estrógenos durante el período de retardo. Sin embargo, el que sea necesario

administrar sistémicamente 17β estradiol para que los blastocistos se implanten (como fue demostrado con el grupo d-e) Indica que el blastocisto de la rata no tiene la capacidad de secretar cantidades suficientes de estrógenos para contrarrestar la dominancia de la progesterona . Por lo tanto, podemos concluir que la función de los estrógenos sistémicos podrían ser la de reducir la acción de la progesterona a un nivel en el cual los estrógenos del blastocisto puedan llevar a cabo su función local. Esta explicación es apoyada por el hecho de que durante la implantación la concentración de progesterona en el suero de las ratas es relativamente alta, $90 \mu\text{g/ml}$, mientras que en la coneja, que no requiere del pico sistémico de estrógenos, la concentración es de sólo $5 \mu\text{g/ml}$ (53).

Sin embargo, según Dickmann (53) el nivel de progesterona en la sangre no es el único factor que determina el balance de la acción estrógeno/progesterona en el sitio de implantación. Otros factores son: la tasa de irrigación sanguínea en el útero, la concentración de estrógenos en la sangre, la concentración de receptores a estrógenos y progesterona en el sitio de implante, y la tasa de producción y liberación de estrógenos por el blastocisto.

A partir de lo anterior surge una pregunta muy interesante: ¿Por qué los estrógenos sistémicos no pueden controlar la implantación por si mismos? Está bien establecido que en la rata un exceso de estrógenos sistémicos previenen la implantación ya que producen una orientación anormal del blastocisto en el lumen del útero e incluso pueden ocasionar su expulsión. Es posible que en el curso de la evolución, el cuerpo haya encontrado difícil regular los niveles de estrógenos sistémicos con un grado de precisión tal que satisficieran las necesidades del sitio de implante y al mismo tiempo no sobre estimularan el resto del útero. La aparición de una segunda fuente de estrógenos que regulase su concentración en el microambiente del futuro S.I., sin afectar los niveles de estrógenos

sistémicos, representaría una valiosa adaptación en este sentido. La fuente local obvia es el blastocisto.

Por otro lado, es posible que el blastocisto fuese originalmente la única fuente de estrógenos para regular la implantación y que en el curso de la evolución ésta fuente se hubiese hecho insuficiente y los ovarios compensaran la deficiencia.

Cualesquiera que hayan sido los procesos evolutivos por los cuales se desarrolló un mecanismo fisiológico tan interesante, es obvio que los estrógenos producidos por el blastocisto son un factor clave para la regulación de la implantación en la rata.

Por otro lado, pensamos que el hecho de que el número de sitios de implante haya sido menor en las ratas a las que se les indujo la diapausa podría deberse al traumatismo local causado por la ovariectomía.

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que la estrógenos sulfatasa uterina tiene un papel esencial en la regulación de la concentración local de estrógenos biológicamente activos, dentro de los límites precisos para permitir que los procesos de implantación se lleven a cabo.

BIBLIOGRAFIA

- 1). Aitken, R.J. (1977). Embryonic Diapause. En: Development in Mammals (Johnson, M.H. ed.), Vol. 1, North Holland Publishing Co., Netherlands, pp. 307-360.
- 2). Aitken, R.J. (1979). The Hormonal Control of Implantation. En: Maternal Recognition of Pregnancy, Excerpta Medica, Netherlands, pp. 53-83.
- 3). Allais, C., Martinet, L. (1978). Relation Between Daylight Ratio, Plasma Progesterone Levels and Tuning of Nidation in Mink (Mustela vison). J. Reprod. Fert. 54, pp. 133-136.
- 4). Anderson, C.B., Gustafsson, O.T. (1979). Delayed Implantation in Lactating Bank Voles, Clethrionomys glareolus. J. Reprod. Fert. , pp. 349-352.
- 5). Baevsky, U.B. (1963). The Effect of Embryonic Diapause on the Nuclear and Mitotic Activity of Mink and Rat Blastocysts. En: Delayed Implantation (Enders, A.C. ed.), University of Chicago Press, U.S.A., pp. 141-154.
- 6). Baird, D.T. (1972). Reproductive Hormones. En: Reproduction in Mammals (Austin, C.R. ed.), Vol. 3, Cambridge University Press, England, pp. 1-28.
- 7). Barrington, E.J.W. (1977), Introducción a la Endocrinología General y Comparada. 2ª ed., H. Blume Ediciones, España, pp. 122-123, 132-134, 145-146.
- 8). Bazer, F.W., Thatcher, W.W. (1977). Theory of Maternal Recognition of Pregnancy in Swine Based on Estrogen Controlled Endocrine versus Exocrine Secretion of Prostaglandin F_2 by the Uterine Endometrium. Prostaglandins 14, pp. 397-401.
- 9). Bellringer, J.F., Pratt, H.P., Keverne, E.B. (1980). Involvement of the Vomeronasal Organ and Prolactin in Pheromonal Induction of Delayed Implantation in Mice. J. Reprod. Fert. 59, pp. 223-228.
- 10). Bennet, J., Vickery, B. (1970). Rats and Mice. En: Reproduction and Breeding Techniques for Laboratory Animals (Hafez, E. S.E. ed.), Lea & Febiger, U.S.A., pp. 299-315.
- 11). Bergstrom, S. (1972). Shedding of the Zona Pellucida of the Mouse Blastocyst in Normal Pregnancy. J. Reprod. Fert. 31:275. En: Hicks, J.J. - Gil Recasens, M.E. (1980), Ginec. Obstet. Mex. 47:282.
- 12). Bernal, A., Méndez, J.D. Rosado, A. (1981). Determinación Rápida del Peso por Colorimetría. Arch. Invest. Med. México, 12, pp. 83-88.

- 13). Bhatt, B.M., Bullock, D.W. (1974). Binding of Oestradiol to Rabbit -- Blastocysts and its Possible Role in Implantation. *J. Reprod. Fert.* 39, pp. 65-70.
- 14). Bischoff, T.L.W. (1854). Entwicklungsgeschichte des Rehes. En: *Development in Mammals* (Johnson, M.H. ed). Vol. 1, North Holland Publishing Co., Netherlands, pp. 303-350.
- 15). Bland, K.P. (1969), Reproduction in the Female Indian Gerbil (Tatera indica), *J. Zool. Lond.* 157, pp. 47-61. En: *Development in Mammals --* (Johnson, M.H. ed.) Vol. 1, North Holland Publishing Co., Netherlands, pp. 303-360.
- 16). Blandau, R.J. (1961). Biology of Eggs and Implantation. En: *Nuevos - Conceptos Relacionados con la Implantación. 11: Reacción Decidual.* Gil Recasens, M.E. Collado, M.L., Hicks, J.J. (1978). *Ginec. Obstet. - Mex.*, 47:263.
- 17). Bonnin, M., Canivenc, R., Ribes, C. (1978). Plasma Progesterone Levels During Delayed Implantation in the European Bagder (Meles meles). *J. Reprod. Fert.* 52, pp. 55-58.
- 18). Borland, R.M. (1977). Transport Processes in the Mammalian Blastocyst En: *Development in Mammals* (Johnson, M.H. ed.). Vol. 1, North Holland Publishing Co., Netherlands, pp. 303-360.
- 19). Boshier, D.P. (1970). The Pontamine Sky Blue Reaction in Pregnant -- Sheep Uteri. En *Maternal Recognition of Pregnancy, Excerpta Medica*, - Netherlands, pp. 209-259.
- 20). Bowman, P., McLaren, A. (1970). Cleavage Rate of Mouse Ova In Vivo and In Vitro. *J. Embryol. Exp. Morph.* 24, pp. 203-207, En: *Development in Mammals* (Johnson, M.H. ed). Vol. 1, North Holland Publishing Co., Netherlands, pp. 307-360.
- 21). Brambell, F.W.R., Rowlands, I.W. (1936). Reproduction of the Bank -- Vole (Evotomys glareolus, Scheber). En: *Development in Mammals* (Johnson, M.H. ed.). Vol. 1, North Holland Publishing, Co., Netherlands, - pp. 307-360.
- 22). Brown, R.L. (1970). Human Food Production as a Process in the Biosphere Freeman, W.H. and Company, U.S.A. pp. 95-103.
- 23). Bullock, D.W. (1977). Steroids from the Pre-Implantation Blastocyst. En: *Development in Mammals* (Johnson, M.H. ed) Vol. 2, North Holland - - Publishing Co., Netherlands, pp. 199-236.
- 24). Burstein, S.J. Dorfman, R.I. (1963). Determination of Mammalian Steroid Sulfatase with $7\alpha - H^3 - 3 -$ Hidroxyandrost-5- en 17 ones- sulfate. - *J. Biolchem.* 238, pp. 1556-1560.

- 25). Burton, K.J. (1930). A Study of the Conditions and Mechanism of the --
Diphenylamine Reaction for the Colorimetric Estimation of Desoxyri--
bonucleic Acid. Biochem. 62, pp. 315.
- 26). Canivenc, R., Laffargue, M. (1956). Présence de Blastocystes Libres --
Intra Utérus au Cours de la Lactation chez le Blaireau Européen, Meles
meles. Soc. Biol. 150 pp. 1193-1196. En: Plasma Progesterone Levels
During Delayed Implantation in the European Badger (Meles meles), Bon--
nin, M. et al. (1978). J. Reprod. Fert. 52, pp. 55-58.
- 27). Canivenc, R., Bonnin-Laffargue, M. (1963). Inventory of Problems Rai--
sed by the Delayed Ova Implantation in the European Badger (Meles me--
les), En: Delayed Implantation. (Enders, A.C. ed.), University of Chico
go Press, U.S.A., pp. 115-128.
- 28). Clark, M.J. (1966). Blastocyst of the Red Kangaroo During Diapause. --
Aust. J. Zool. 14, pp. 19-25. En: Development in Mammals (Johnson, --
M.H. ed.), Vol. 1, North Holland Publishing Co., Netherlands, pp.307--
360.
- 29). Clark, M.J. Poole, W.E. (1967). The Reproductive System and Embryonic
Diapause in the Female Grey Kangaroo, Macropus giganteus. Aust. J. Zool.
15, pp. 441-459.
- 30). Clark, M.J. (1968). Termination of Embryonic Diapause in the Red Kanga--
roo, Megalela rufa by Injection of Progesterone or Oestrogen. J. Reprod.
Fert. 15, pp. 347-355. En: Development in Mammals (Johnson, M.H.ed)
Vol. 1, North Holland Publishing Co., Netherlands, pp. 307-360.
- 31). Collado, M.L., Gil-Recasens, M.E., Castro, O.G., Hicks, J.J.(1978)
Nuevos Conceptos Relacionados con la Implantación. I: Período de Prelim--
plantación. Ginec. Obstet. Mex., 44:261 pp. 63-84.
- 32). Cook, B., Hunter, R.H.F. (1978). Systemic and Local Hormonal Require--
ments for Implantation in Domestic Animals. J. Reprod. Fert. 54, pp.471--
482.
- 33). Copp, A.J. Rossant, J. (1978). Effect of Implantational Delay on Trans--
fer of Rat Embryos to Mice. J. Reprod. Fert. 52, pp. 119-121.
- 34). Daniel, J.C., Krishnan, R.S. (1969). Studies on the relationship bet--
ween Uterine Fluid Components and the Diapausing State of Blastocysts
from Mammals Having Delayed Implantation. J. Exp. Zool. 172, pp.267--
281. En: Maternal Recognition of Pregnancy, Excerpta Medica, Nether--
lands, pp. 141-172.
- 35). Dass, C.M., Mohla, S., Prasad, M.R. (1969). Time Sequence of Action
of Estrogen on Nucleic Acid And Protein Synthesis in the Uterus and Blag
tocyst during Delayed Implantation in the Rat. Endocrinology, 85, pp. --
528-536. En: Development in Mammals (Johnson, M.H. ed.) Vol. 1, --
North Holland Publishing Co., Netherlands, pp. 307-360.

- 36). Deanesly, R. (1967). The Role of the Fertilized Egg: Reaction in the -- Guinea-Pig Uterus at Ovulation and After Thread Traumatization. *J. Reprod. Fert.* 14, pp. 243-248.
- 37). De Feo, U.J. (1967). Decidualization. En: *Cellular Biology of the Uterus*. (Wynn, R.M. ed.), Appleton-Century Crofts. U.S.A.
- 38). Dey, S.K., Dickmann, Z. (1974). ⁵ - ³ - Hydroxysteroid Dehydrogenase Activity in Rat Embryos on Days 1 through 7 of Pregnancy. - *Endocrinology*. 95: 1, pp. 321-322.
- 39). Dey, S.K., Dickmann, Z. (1974), 7th Annu. Meet., Soc. Study Reprod. Abstract. 150 En: A new Concept: Control of Early Pregnancy by Steroid Hormones Originating in the Preimplantation Embryo. Dickmann et al -- (1976) *Vitam. Horm.* 34 pp. 215-242.
- 40). Dey, S.K., Dickmann, Z. (1974). *Steroids* 24, 57. En: A New Concept: Control of Early Pregnancy by Steroid Hormones Originating in the Preimplantation Embryo. Dickmann et al (1976). *Vitam. Horm.* 34 pp. 215-242.
- 41). Dey, S.K., Dickmann, Z., Sen Gupta J. (1976). Evidence that the Maintenance of Early Pregnancy in the Rabbit Requires "Blastocyst Estrogen". *Steroids*. pp. 481-485.
- 42). Diche, (1930) *Microchemie* 8:4.
- 43). Dickmann, Z., De Feo, V. J. (1967) The Rat Blastocyst During Normal - Pregnancy and During Delayed Implantation Including Observation on the Shedding of the Zona Pellucida. *J. Reprod. Fert.* 13 pp. 3-9. En: *Development in Mammals* (Johnson, M.H. ed.), Vol. 1, North Holland Publishing Co., Netherlands, pp. 307-60.
- 44). Dickmann, Z. (1970). *Fertil. Steril.* 21, 541. En: A new Concept: Control of Early Pregnancy by Steroid Hormones Originating in the Preimplantation Embryo. Dickmann et al (1976) *Vitam. Horm.* 34 pp. 215-242.
- 45). Dickmann, Z., (1973). *J. Reprod. Fert.* 32, 65. En: A New Concept: - Control of Early Pregnancy by Steroid Hormones Originating in the Preimplantation Embryo. Dickmann et al (1976). *Vitam. Horm.* 34 pp. 215-242.
- 46). Dickmann, Z., Dey, S.K., (1974) Steroid Genesis in the Preimplantation Rat Embryo and Its Possible Influence on Morula-Plastocyst Transformation and Implantation. *J. Reprod. Fert.* 37 pp. 91-93.
- 47). Dickmann, Z. and Sen Gupta, J. (1974). *Rev. Biol.* 40, 196. En: A New Concept: Control of Early Pregnancy by Steroid Hormones Originating in the Preimplantation Embryo. Dickmann et al. (1976) *Vitam. Horm.* 34 pp. 215-242.

- 48). Dickmann, Z. (1975). Res. Reprod. 7, 3. En: A New Concept: Control - of Early Pregnancy by Steroid Hormones Originating in the Preimplantation Embryo. Dickmann et al (1976). Vitam. Horm. 34 pp. 215-242.
- 49). Dickmann, Z., Dey, S.K. Sen Gupta, J. (1975). Steroidogenesis in Rabbit Preimplantation Embryos. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 72:1 pp.298-300.
- 50). Dickmann, Z., and Spillman, C.H. (1975). Since 190, 197. En: A new Concept: Control of Early Pregnancy by Steroid Hormones Originating in - the Preimplantation Embryo. Dickmann et al. (1976). Vitam. Horm. 34 pp. 215-242.
- 51). Dickmann, Z., Dey, S.K. Sen Gupta, J. (1976). A New Concept: Control of Early Pregnancy by Steroid Hormones Originating in the Preimplantation Embryo. Vitam. Horm. 34 pp. 215-242.
- 52). Dickmann, Z., Sen Gupta, J. Dey, S.K. (1976). Does "Blastocyst Estrogen" Initiate Implantation? Science 195 pp. 687-688.
- 53). Dickmann, Z. (1979). Blastocyst Estrogen: an Essential Factor for the - - Control of Implantation. J. Steroid. Biochem. 11 pp. 771-773.
- 54). Dickson, A.D. (1966). Form of the Mouse Blastocyst. J. Anat. 100 pp. - 335-348. En: Development in Mammals (Johnson, M.H. ed), Vol. 1, -- North Holland Publishing Co., Netherlands, pp. 307-360.
- 55). Dominguez, O.V., Loza, C.A., Valencia, A.S. (1973). Archs. Invest. Clin. 25 pp. 100-105.
- 56). Ducibella, T. (1977). Changes in Cell Surface and Cortical Cytoplasmic Organization During Early Embryogenesis in the Implantation Mouse - - Embryo. J. Cell. Biol. 74; 153. En: Hicks, J. J., Gil Recasens, M.E., Ginec. Obstet. Mex., 47: 282.
- 57). Ealey, E.H.M. (1963). The Ecological Significance of Delayed Implantation in a Population of Hill Kangaroo (Macropus robustus). En: Delayed Implantation (Enders, A.C. ed.), University of Chicago Press, U.S.A., pp. 33-48.
- 58). Edwards, M.J. Mulley, R., Shiela Ring, Wanner, R.A. (1974). Mitotic - Cell Death delay of Mitotic Activity in Guinea Pig Embryos Following -- Brief Maternal Hyperthermia. J. Embryol. Exp. Morph. 32 pp. 593-602.
- 59). Egert, D. (1978). Progesterone in the Uterus. Dependence of the Vitro - Progesterone Metabolism on Progesterone Binding in Rat Uterus. Steroids 31:2 pp. 269-287.
- 60). Eley, R.M. Thalcher, W.W. Bazer, F.W. (1979), Lutheolytic Effect of Estrone Sulphate on Cyclic Beef Helpers J. Reprod. Fert. 55 pp.191-193.

- 61). Enders, A.C. (1962). The Structure of the Armadillo Blastocyst. *J. Anat.* 96, pp. 39-48. En: *Development in Mammals* (Johnson, M. H., ed). - Vol. 1, North Holland Publishing Co., Netherlands, pp. 307-360.
- 62). Enders, A.C. Shlafke, S. (1969). Cytological Aspects of Trophoblast - uterine Interaction in Early Implantation. *Amer. J. Anat.* 125.
- 63). Enders, A.C. (1970). Fertilization, Cleavage, and Implantation. En: - *Reproduction and Breeding Techniques for Laboratory animals*, (Hafez, E. ed.), Lea & Febiger, U.S.A. pp. 137-155.
- 64). Enders, A.C., Shlafke, S. (1972). Implantation in the Ferret: Epithelial penetration. *Amer. J. Anat.*, 133:291. En: *Nuevos Conceptos Relacionados con la Implantación. II: Reacción Decidual*. Gil Recasens, M.E. - et al. *Ginec. Obstet. Mex.* 44: 273.
- 65). Enders, A.C. Shlafke, S. (1974). Surface Coats of the Mouse Blastocyst and Uterus During the Preimplantation Period. *Anat. Rec.* 180 pp: 31-46 En: *Development in Mammals* (Johnson M.H. ed.), Vol. 1, North Holland Publishing Co., Netherlands, pp. 307-360.
- 66). Enders, A.C. (1976). Anatomical Aspects of Implantation. *Reprod. Fertil. Suppl.* 25:1. En: *Nuevos Conceptos Relacionados con la Implantación. - Período de Preimplantación*. Collado, M.L. et al. *Ginec. Obstet. Mex.* - 44:261.
- 67). Everett, J.W. (1948). Progesterone and Estrogen in the Experimental Control of Ovulation and other Features of the Estrus Cycle in the Rat. *Endocrinology* 43. En: *The Hormonal Interplay Controlling Egg Implantation in the Rat* Psychoyos, A.
- 68). Everett, J.W. (1956). The Time of Release of Ovulating Hormone from the Rat Hypophysis. *Endocrinology* 59. En: *The Hormonal Interplay Controlling Egg Implantation in the Rat*. Psychoyos, A.
- 69). Flinn, C.A., Mc Laren, A. (1967). A Study of the Early Stages of Implantation in Mice. *J. Reprod. Fertil.* 13 En: *Blastocyst Estrogen Synthesis and the Maternal Recognition of Pregnancy* Flint, R.D. et. al.
- 70). Flinn, C.A., Porte, D.G. (1975). Implantation of the Ova. En: *Nuevos Conceptos Relacionados con la Implantación. II: Reacción Decidual*. Gil Recasens, M.E., et al. *Ginec. Obstet. Mex.* 44- 263.
- 71). Flinn, C.A., Porter D.G. (1975). The Decidual Cell Reaction. En: *Nuevos Conceptos Relacionados con la Implantación. II: Reacción Decidual* Gil Recasens, M.E., et al. *Ginec. Obstet. Mex.* 44: 263.
- 72) Flinn, C.A., Porter D.G. (1976). In *The Uterus* (Handbooks in Reproductive Biology, Vol. 1) Elek Science, England. En: *Blastocyst Estrogen - Synthesis and the Maternal Recognition of Pregnancy*. Flint, A.P.F., et al.

- 73) Flechon, J.E., Renard J.P. (1978). A Scanning Electron Microscope -- Study of the Hatching of Bovine Blastocyst in Vitro. J. Reprod. Fert. - 53:9. En: Hicks, J.J., Gil Recasens, M.E., Ginec. Obstet. Mex., - 47:282.
- 74) Fleming, H.T. (1970). Atibeus Jamaicensis: Delayed Embryonic Deve--- lopment in a Neotropical Bat. Science 171 pp. 402-404.
- 75) Flint, A.P.F., Burton, R.D., Gadsby, J.E., Sanders, P.T.K., Hearp, R.B. (1979). Blastocyst Estrogen Synthesis and the Maternal Recognition of Pregnancy. En: Maternal Recognition of Pregnancy. Excerpta Medica, Netherlands, pp. 209-259.
- 76) Forsyth, J.A., Hayden, T.J. (1977). Comparative Endocrinology of -- Mammary Growth and Lactation. Symp. Zool. Soc. 41. En: Blastocyst - Estrogen Synthesis and the Maternal Recognition of Pregnancy. Flint, A. P.F., et. al.
- 77) Fox, R.J., Lair, C. (1970). Sexual Cycles. En: Reproduction and Breeding Techniques for Laboratory Animals (Hafez, E.S.E. ed.), Lead Feblger, U.S.A., pp. 107-122.
- 78) George, F.W., Wilson, J.D. (1978). Estrogen Formation in the Early -- Rabbit Embryo Since 199, pp. 200-201.
- 79) Gil-Recasens, M.E., Collado M.L., Hicks, J.J. (1978). Nuevos Con--- ceptos Relacionados con la Implantación. II: Reacción Decidual. Ginec. Obstet. Mex., 44:263, pp. 211-212.
- 80) Gil-Recasens, M.E. (1978). Nuevos Conceptos Relacionados con la -- Implantación. III: Características Bioquímicas; Ginec. Obstet. Mex. - 44:491. En: Hicks, J.J., Gil Recasens, M.E., Ginec. Obstet. Mex.- 47:282.
- 81) Gil-Recasens, M.E., et al. A Fluorometric Method to Detect the Im--- plantation Site. Fertil Steril. (Sometido a publicación). En: Hicks J.J. Gil Recasens, M.E., Ginec. Obstet. Mex., 47:282. -
- 82) Giles, K.W. and Myers, A. (1965). An Improved Diphenylamine Method for the Estimation of Desoxyribonucleic Acid. Nature 206, 93.
- 83) Gould, L.A. (1965). Delayed Implantation in the Mustelidae. M. Sc.- Thesis, University of Wales. En: Development in Mammals (Johnson, - M.H. ed.), Vol. 1, North Holland Publishing Co., Netherlands, pp. - 307-360. -
- 84) Gulyas, B.J., and Daniel, J.C. (1969). Incorporation of Labelled Nu--- cleic Acid and Protein Precursors by Diapausing and non Diapausing -- Blastocysts. Biol. Reprod. 1, pp: 11-16. En: Development in Mammals (Johnson, M.H. ed.), Vol. 1, North Holland Publishing Co., Nether--- lands, pp. 307-360.-

- 85) Gurpide, E., Gusberg, S.P., Tseng L. (1976). Estradiol Binding and - Metabolism in Human Endometrial Hyperplasia and Adenocarcinoma. *J. ST. Biochem.* 7, pp. 891-896.
- 86) Gwatkin, R.B.L., (1966). Aminoacid Requirements for Attachment and - Outgrowth of the Mouse In Vitro. *J. Cell. Physiol.* 68, pp. 335-343. - En: *Development in Mammals* (Johnson, M.H. ed.), Vol. 1, North - - Holland Publishing Co., Netherlands, pp. 307-360.
- 87) Hall, K. (1968). Disappearance of Histochemically-Demonstrable Adenosine Triphosphate and of Pos-Reactive Basement Membranes in Blood Vessels in the Decidua during Ovum Implantation in Mice. *J. Endocr.* - 44:91. En: *Nuevos Conceptos Relacionados con la Implantación. II: - Reacción Decidual.* Gil-Recasens, M.E. et. al. *Ginec. Obstet. Mex.*, 44:263.
- 88) Hall, K. (1969). Uterine Mitosis, Alkaline Phosphatase and Adenosine Triphosphatase During Development and Regression of Desiduomata In - Pseudopregnant Mice. *J. Endocr.* 44:91. En: *Nuevos Conceptos Relacio nados con la Implantación. II: Reacción Decidual.* Gil-Recasens, M.E. et. al. *Ginec. Obstet. Mex.*, 44:263.
- 89) Harper, H.A., Martin, D.W., Mayer, P.A., Rodwell, V.W. (1981). -- Harper's Review of Biochemistry. Lange Medical Publications, U.S.A. pp. 462, 468, 497, 504, 507, 510.
- 90) Heap, R.B., Flint, A.P.F. (1979). Progesterone. En: *Mechanisms of - Hormone Action. Reproduction in Mammals* (7), (Austin, C.R., and - - Short, R.V., eds), England, pp.; 185-188.
- 91) Hedlund, K., et al. (1972). Attachment reaction: Light and Electron -- Microscopy of the Hamster, Guinea-pig, Rabbit, and Mink. *J. Reprod. Fert.* 29:131. En: *Nuevos Conceptos Relacionados con la Implantación. II reaccion Decidual.* Gil-Recasens, M.E., et al. *Ginec. Obstet. Mex.* 44; 263.
- 92) Hensleigh, H.C. (1971). Dry Weight and Lipid Content of Normal and - Delayed Implanting Mouse Blastocysts. *Anat. Rec.* 169; pp. 338-339. En: *Development in Mammals* (Johnson, M. H., ed.), Vol. 1, North - Holland Publishing Co., Netherlands, pp. 307-360.
- 93) Heuser, C.H. (19-40). The Chimpanzee Ovum in the Early Stages of - Implantation. (About 10 1/2 days). *J. Morphol.* 66: 155. En: *Nuevos - Conceptos Relacionados con la Implantación. II: Reacción Decidual,* Gil-Recasens, M.E., et al. *Ginec. Obstet. Mex.*, 44:263.
- 94) Hicks, J.J., Collado, M.L. (1979). *Nuevos Conceptos Relacionados con la Implantación. IV: Función del Moco Cervical y el Fluido Endometrial.* *Ginec. Obstet. Mex.*, 46; 273, pp. 51-65.

- 95) Hicks, J.J., Gil-Recasens, M.E. (1980). Características Morfológicas y Funcionales del Cigoto de Mamífero Durante la Preimplantación. *Ginec. Obstet.* Vol. 47:282, pp. 275-91.
- 96) Hicks, J.J., Gil-Recasens, M.E., González Zamudio, J. (1980). Fluorometric Detection of Implantation Sites in Rats. *J. Expert. Zoology* 214: 49, pp. 49-52.
- 97) Holst, P.A., Plemister, R.D. (1971). The Prenatal Development of - the Dog: Preimplantation Events. *Biol. Reprod.* 5:194. En: *Nuevos Conceptos Relacionados con la Implantación. II: Reacción Decidual.* Gil-Recasens, M.E., et al. *Ginec. Obstet. Mex.* 44:263.
- 98) Holinka, C.R., Gurside, E. (1980). In Vivo Uptake of Estrone Sulphate by Rabbit Uterus. *Endocrinology* 106:4. pp. 1193-1197.
- 99) Huff, R.L., Elknes, K.B. (1966). Metabolism In Vitro of Acetate and - Certain Steroids by Six Day Old Rabbit Blastocysts. *J. Reprod. Fert.* 11, pp. 57-63.
- 100) Hughes, R.L. (1974). Morphological Studies on Implantation in Marsupials. *J. Reprod. Fert.* 39 pp: 173-186. En: *Development in Mammals* (Johnson, M.H. ed.), Vol. 1, North Holland Publishing Co., Netherlands pp. 307-360.
- 101) Hytten, F.E. (1976). Is Viviparity the best Means of Reproduction *Acta Paedr. Acad. Sci. Hing.* 17. En: *Blastocyst Estrogen Synthesis and the Maternal Recognition of Pregnancy.* Flint, A.P.F., et al.
- 102) Jensen, E.V. (1979). The Estrogens. En: *Mechanisms of Hormone Action.* *Reproduction in Mammals* (7), (Austin, C.R., and Short, R.V., eds.), England, pp. 157-161.
- 103) Johnson, M., Everett, B. (1980). *Essential Reproduction.* Blackwell -- Scientific Publishing, Co., England, pp. 1-5, 18-32, 247-267.
- 104) Karla, P.S., Karla, S.P. (1977). Temporal Changes in the Hypothalamic and Serum Luteinizing -Hormone- Releasing (LH-RH) Levels and the -- Circulating Ovarian Steroids During the Rat Estrus Cycle. *Acta Endocrinologica* 85, pp. 449-455.
- 105) Kiebel, F. (1902). Die Entwicklung des Rehes bis zur Anlage des -- Mesoblast. *Arch. Anat. Physiol. Suppl.* 24, 293-314. En: *Development in Mammals* (Johnson, M.H. ed.), Vol. 1, North Holland Publishing -- Co., Netherlands, pp. 307-360.
- 106) Kingsley, G.R. (1940). *J. Biol. Chem.* 133:731.
- 107) Kwum, J.K. and Enmens, C.W. (1974). *Aust. J. Biol. Sci.* 27:275.

- 108) Langman, J. (1976). *Embrulogfa Médica*, 3a. ed. Interamericana, -- México, pp. 18-19.
- 109) Lahninger, L.A. (1978). *Bloquímica*. 2a. ed. Omega, S.A., España. pp. 304, 833-834, 817-820.
- 110) Ljungkult, J., Nilsson, O. (1974). Blastocyst-Endometrial Contact and Pontamine Blue Reaction, During Normal Implantation in the Rat. - *J. End.* 60, pp. 149-154.
- 111) Lodge, G.A. (1972). Energy and Nutrient Requirements for Pregnancy En: Blastocyst Estrogen Synthesis and the Maternal Recognition of -- Pregnancy. Flint, A.P.F., et al.
- 112) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951) Protein Measurement with the Folin-Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* -- 193, pp. 265-275.
- 113) Lutwak-Mann, C. (1971). En: *The Biology of the Blastocyst* (Blandau, R.J. ed.), The University of Chicago Press, U.S.A., pp. 252.
- 114) Mc Donald, G.J., Armstrong, D.T., Greep, R.O. (1976). Stimulation of Estrogen Secretion from Normal Rat Corpora Lutea by Luteinizing - Hormone. *Endocrinology* 79, pp. 289-293.
- 115) Marshall, A.J. (1967), Origin of Delayed Implantation in Marsupials. *Nature* 216, pp. 192-193. En: *Development in Mammals* (Johnson, M. H. ed.), Vol. 1, North Holland Publishing Co., Netherlands, pp.307-360.
- 116) McLaren, A. (1968). Study of Blastocyst During Delayed and Subse-- cquent Implantation in Lactating Mice. *J. Endocr.* 42, pp. 453-463. -- En: *Development in Mammals* (Johnson, M.H. ed.), Vol. 1, North -- Holland Publishing Co., Netherlands, pp. 307-360.
- 117) McLaren, A., Menke, T.M. (1971). CO₂ Output of Mouse Blastocysts In-Vitro, in Normal Pregnancy and in Delay. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 14, pp. 23-29. En: *Development in Mammals* (Johnson, M.H. ed.), Vol.1, North Holland Publishing Co., Netherlands, pp. 307-360.
- 118) McLaren, A. (1972). The Embryo Reproduction in Mammals. En: -- Embryonic and Fetal Development. Cap. 2, (Austin, C.R., Short, R.V. eds.), Cambridge University Press. En: *Nuevos Conceptos Relaciona-- dos con la Implantación. II: Reacción Decidual.* Gil-Recasens, M.E. et. al. *Ginec. Obstet. Mex.*, 44:263..
- 119) McLaren, A. (1973). Blastocyst Activation. En: *The Regulation of -- Mammalian Reproduction.* (Segal S.J., Crozier, R., Corfman, P. A., - Condliffe, P.G. eds.), Thomas, Springfield Illinois, U.S.A., pp. 321-328. En: *Development in Mammals* (Johnson, M.H. ed.), Vol. 1, North Holland Publishing Co., Netherlands, pp. 307-360.

- 120) Mead, R.A. (1963). Reproduction in Western Forms of the Spotted Skunk (genus Spilogale). *J. Mammal.* 49, pp. 373-390. En: *Development in Mammals* (Johnson, M.H. ed.), Vol. 1, North Holland Publishing Co., - Netherlands, pp. 307-360.
- 121) Menke, T.M., McLaren, A. (1970). Mouse Blastocysts Grown In Vivo and In-Vitro: Carbon Dioxide Production and Trofoblast Outgrowth. *J. - Reprod. Fert.* 23, pp. 117-127. En: *Development in Mammals* (Johnson, M.H. ed.), Vol. 1, North Holland Publishing Co., Netherlands, pp. - 307-360.
- 122) Mossman, H.W. (1937). Comparative Morphogenesis of Fetal Membranes and Accessory Uterine Structures. *Contr. Embriol.*, 26: 129. En: - *Nuevos Conceptos Relacionados con la Implantación. II: Reacción Decidual.* Gil-Recasens, M.E. et. al., *Ginec. Obstet. Mex.*, 44:263.
- 123) Müller, R.E., Wotiz, H.H. (1979). Kinetics of Estradiol Entry into -- Uterine Cells. *Endocrinology*, 105:5, pp. 1107-1114.
- 124) Murray, R.S. (1970). *Estadística.* Mc. Graw-Hill. México. pp. 188-190, 344.
- 125) Neal, E.G., Harrison, R.J. (1958). Reproduction in the European Badger (Meles meles), *Trans. Zool. Soc. Inglaterra* 29, pp. 67-130. En: *Development in Mammals* (Johnson, M.H. ed.), Vol. 1, North Holland Publishing Co., Netherlands, pp. 307-360.
- 126) Nilsson, P., et. al. (1975). Blastocyst Surface Change and Implan---tation in the Mouse. *Contraception*, 11:441. En: *Características Morfológicas y Funcionales del Cigoto de Mamífero Durante la Preimplantación.* *Ginec. Obstet. Mex.*, 47: 282.
- 127) Odor, D.L., Blandau, R.S. (1951). Observation of Fertilization and - the First Segmentation Division in Rat Ova. *Amer. J. Anat.*, 89. En: *The Hormonal Interplay Controlling Egg-Implantation in the Rat.* *Psychos, A.* (1973). *Vitam. Horm.* 31, pp. 201-256.
- 128) O'Grady, J.E., Bell, S.C. (1977). The Role of the Endometrium in -- Blastocyst Implantation. En: *Development in Mammals* (Johnson, M.H. ed.), Vol. 1, North Holland Publishing Co., Netherlands, pp.307-360.
- 129) Orsini, M.W. (1963). Morphological Evidence on the Intrauterine Carcer of the Ovum. En: *Maternal Recognition of Pregnancy, Excerpta -- Medica*, Netherlands, pp. 209-259.
- 130) Oxberry, B.A. (1979). Female Reproductive Patterns in Hibernating -- Bats, *J. Reprod. Fert.* 56, pp. 359-367.
- 131) Pack, B.A., Brooks, S.C. (1970). Metabolism of Estrogens and Their Sulfates in Rat Uterine Mincas. *Endocrinology.* 87, pp. 924-933.

- 132). Pack, B.A., Brooks, S.C. (1974). Cyclic Activity of Estrogen Sulfo-Transferasa in the Gilt Uterus. *Endo.* Vol. 95, 4, pp. 1680-1690.
- 133) Papkoff, H. (1966). Glycoproteins with Biological Activity. En: - - Glycoproteins. (Gottschalk, A. ed.), 5a. ed. Elsevier Publishing - Company, Netherlands, pp. 532-537.
- 134) Parker, R.E. (1976). Estadística para Biólogos. Omega, S.A., España, pp. 18-25, 131.
- 135) Patten, B.M. (1974). Embriología Humana. 5a. ed. El Ateneo, Argentina, pp. 43-45.
- 136) Perry, I.S., Heap, R.B., Amoroso, E.C. (1973). Steroid Hormone -- Production by Pig Blastocysts. *Nature* 245, pp. 45-47.
- 137) Perry, I.S., Heap, R.B., Burton, R.D., Gadsby, I.E. (1976). Endocrinology of the Blastocyst and its Role in the Establishment of Pregnancy. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 25:85. En: Nuevos Conceptos Relacionados con la Implantación. II: Reacción Decidual. Gil-Recasens et al. (1978). *Ginec. Obstet. Mex.*, 44:263, pp. 211-221.
- 138) Pollard, R.M., Fuin, C.A. (1974). Influence of the Trophoblast upon Differentiation of the Uterine Epithellum During Implantation in the Mouse *J. Endocr.* 62:669.
- 139) Prasad, M.R.N., Dass, C.M.S., Dass, C.M.S., & Mohila, S. (1968), Action of Estrogen on the Blastocyst and Uterus in Delayed Implantation. An Autoradiographic Study. *J. Reprod. Fert.* 16, pp. 97-103. En: - - Development in Mammals (Johnson, M.H. ed.), Vol. 1., North Holland Publishing Co., Netherlands, pp. 307-360.
- 140) Psychoyos, A. (1960). Nouvelle Contribution a l'etude de la induction de l'oeuf chez la Ratte. *C.R. Hebd. Seances Acad. Sci. Sér. D. Sci. - Nat.* 251. En: Blastocyst Estrogen Synthesis and the Maternal Recognition of Pregnancy. Flint, A.P.F., et al. *Excerpto Medica*, Netherlands, pp. 209-259.
- 141) Psychoyos, A. (1961). Permeabilité Capillaire et Decidualisation Uterine. *C.R. Hebd. Seances Acad. Sci. Sér. D. Sci. Nat.* 252 En: Blastocyst Estrogen Synthesis and the Maternal Recognition of Pregnancy. Flint, A.P.F., et al., *Excerpta Medica*, Netherlands, pp. 209-259.
- 142) Psychoyos, A. (1966). Etude des Relations de l'oeuf de l'endometre au Cours du Retard de la Nidation on des Premieres Phases du Processus de Nidation chez la Ratte. *C.R. Hebd. Seances Acad. Sci. Sér. D. -- Sci. Nat.* 263. En: Blastocyst Estrogen Synthesis and the Maternal - Recognition of Pregnancy. Flint, A.P.F., et al. *Excerpto Medica*, -- Netherlands, pp. 209-259.

- 143) Psychoyos, A. (1969). Hormonal Requirements for Egg Implantation. *Adv. Biol. Sci.* 4, pp. 275-290. En: *Induction of Implantation by Androgen in Mice with Delayed Implantation*. Gupta, R.K. R., *J. Reprod. Fert* (1980) 58, pp. 339-343.
- 144) Psychoyos, A. Bitton-Casimiri, V. (1969). Caption In-Vitro d'un Precursur d'acide Ribonucléique (ARN) (uridine-5-³H) par le Blastocyste Normal et Blastocyste en Diapause. *C.R. Acad. D Sci., Francia*, 268, pp. 188-192. En: *Development in Mammals* (Johnson, M.H. ed.), Vol. 1, - North Holland Publishing Co., Netherlands, pp. 307-360.
- 145) Psychoyos, A. (1973). Hormonal Control of Ovoimplantation. *Vitam. -- Horm.*, 31, pp. 201-256.
- 146) Psychoyos, A. (1976). Hormonal Control of Uterine Receptivity for Nidation. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 25:17. En: Gil-Recasens, M.E., Collado, M.L., Hicks, J.J. (1978). *Nuevos Conceptos Relacionados con la Implantación. II: Reacción Decidual*. *Ginec. Obstet. Mex.*, 44:263.
- 147) Rasweiler, J.J. (1977). Preimplantation Development, Fate of the Zona -- Pellucida and Observations on the Glycogen-rich Oviduct of the Little -- Bulldog Bat, *Noctillo albigentis*, *Am. J. Anat.* 150:269, En *Características Morfológicas y Funcionales del Cigoto de Mamífero Durante la Preimplantación*. *Ginec. Obstet. Mex.*, 47:282.
- 148) Roblero, L.S., Gavagno, A.C. (1979). Effect of Oestradiol-17 and -- Progesterone on Oviductal Transport and Early Development of Mouse -- Embryos. 57, pp. 91-95.
- 149) Sadler, R.M.F.S. (1969). The Ecology of Reproduction in Wild and Domestic Mammals. Menthnen, England. En: *Development in Mammals --* (Johnson, M.H. ed.), Vol. 1, North Holland Publishing Co., Netherlands pp. 307-360.
- 150) Salazar, R.M., High Resolution Citochemical Study of Uterine Epithelial Cell Surface of Uterine Epithelial Cell Surface of the Rat at Identified -- Sites Previous to Blastocyst-Endometrial Contact. *Arch. Invest.* (en -- prensa). En Hicks, J.J., Gil-Recasens, M.E. *Ginec. Ostet. Mex.* 47: 282.
- 151) Sanyal, M.K., Meyer, R.K. (1972). Deoxyribonucleic Acid Synthesis -- in Vitro in Normal and Delayed Nidation Preimplantation Blastocysts of Adult Rats. *J. Reprod. Fert.* 29, pp. 439-442. En: *Development in -- Mammals* (Johnson, M.H. ed.), Vol. 1, North Holland Publishing Co., Netherlands, pp. 307-360.
- 152) Schlafke, S., Enders, A.C. (1963). Observation on the Fine Structure of the Rat Blastocyst. *J. Anat.* 97, pp. 353-360. En: *Development in -- Mammals* (Johnson, M.H. ed.), Vol. 1, North Holland Publishing Co., - Netherlands, pp. 307-360.

- 153) Seamark, R.F., Lutwak Mann, C. (1972). J. Reprod. Fert. 29, 147. -- En: Steroid Hormone Production by Plg Blastocysts. Perry., J.S. -- Nature. 245, pp. 45-47.
- 154) Sen Gupta, S.K.R., Manchanda, S.K. (1980). Induction of Implantation by Androgens in Mice with Delayed Implantation. J. Reprod. Fert. 58, pp. 339-343.
- 155) Sharman, G.B. (1954). Reproduction in Marsupials. Nature. 173, 302. En: Development in Mammals (Johnson, M.H. ed.), Vol. 1, North -- Holland Publishing Co., Netherlands, pp. 307-360.
- 156) Sharman, G.B., Berger, P.J. (1969). Embryonic Diapause of Marsupials. En: Advances in Reproductive Physiology, (McLaren, A. ed.), Vol. 4, Logos Press, England, pp. 212-240. En: Development in -- Mammals (Johnson, M.H. ed.), Vol. 1, North Holland Publishing Co., Netherlands, pp. 307-360.
- 157) Sharman, G.B. (1970), Reproductive Physiology of Marsupials. Science 167, pp. 1221-1228. En: Development in Mammals (Johnson, M.H.ed.) Vol. 1, North Holland Publishing, Co., Netherlands, pp.307-360.
- 158) Shalgi, R., Sherman, M.I. (1979). Scanning Electron Microscopy of -- the Surface of Normal and Implantation-Delayed Mouse Blastocysts -- during Development in Vitro, J. Exp. Zool. 210, pp. 69-80.
- 159) Sherman, M.I., Barlow, P.W. (1972). Deoxyribonucleic Acid Content in Delayed Mouse Blastocysts. J. Reprod. Fert. 29, pp. 123-126. En: Development in Mammals (Johnson, M.H. ed.), Vol. 1, North Holland Publishing, Co., Netherlands, pp. 307-360.
- 160) Short, R.V., Hay, M.F. (1966). Delayed Implantation in the Roe Deer (Capreolus capreolus). En: Comparative Biology of Reproduction in -- Mammals (Rowlands, I.W. ed.), Academic Press, England, pp. 173-194. En: Development in Mammals (Johnson, M.H. ed.), -- Vol. 1, North Holland Publishing, Co., Netherlands, pp. 307-360.
- 161) Short, R.V. (1969). Implantation and Maternal Recognition of Preg--- nancy. Fetal Anatomy. En: Blastocyst Oestrogen Synthesis and the Maternal Recognition of Pregnancy. Flint, A.P.F., et al. (1979). -- Excerpto Medica, Netherlands, pp. 209-259.
- 162) Short, R.V. (1972) Role fo Hormones in Sex Cicles. (Austin, C.R., - Short, R.V. eds.), Vol. 3, Cambridge University Press, England pp. 42-72.
- 163) Short, R.V. (1972). Species Differences in Reproduction in Mammals (Austin, C.R., Short, R.V., eds.), Vol. 4, Cambridge University -- Press, England, pp. 1-12.

- 164) Singh, M.M., Booth, W.D. (1978). Studies on the Metabolism of Neutral Steroids by Preimplantation Rabbit Blastocysts In Vitro and the Origin of Blastocyst Oestrogen. *J. Reprod. Fert.* 53, pp. 297-304.
- 165) Singh, M.M., Booth, W.D. (1979). Origin of Oestrogen in Preimplantation Rabbit Blastocysts. *J. Steroid. Biochem.* 11, pp.-723-728.
- 166) Smith, M.J., Sharman, G.B. (1969). Development of Dormant Blastocysts Induced by Oestrogen in the Ovariectomized Marsupial, Macropus enginli. *Aust. J. Biol. Sci.* 22, pp. 171-180. En: *Development in Mammals* (Johnson, M.H. ed.), Vol. 1, North Holland Publishing, Co., Netherlands, pp. 307-360.
- 167) Surani, M.A.H. (1975). Zona Pellucida Denudation, Blastocyst Proliferation and Attachment in the Rat. *J. Embriol. Exp. Morph.* 33:343. En: *Características Morfológicas y Funcionales del Cigoto de Mamífero durante la Preimplantación*. Hicks, J.J., Gil-Recasens, M.E. (1980). *Ginec. Obstet. Mex.*, 47:282.
- 168) Surani, M.A.H. (1977). Cellular and Molecular Approaches to Blastocyst Uterine Interactions at Implantation. En: *Development in Mammals* (Johnson, M.H. ed.), Vol. 1, North Holland Publishing Co., Netherlands, pp. 307-360.
- 169) Svihla, A. (1932). A Comparative Live History Study of the Mice of the Genus Peromyscus. *Univ. Mich. Mus. Zool. Misc. Publ.* 24. En: *Development in Mammals* (Johnson, M.H. ed.), Vol. 1, North Holland Publishing Co., Netherlands, pp. 307-360.
- 170) Tseng, L. Stolee, A., Gupida, E. (1972). Quantitative Studies in the Uptake and Metabolism of Estrogens and Progesterone by Human Endometrium. *Endocrinology*, pp. 390-404.
- 171) Tyndale-Biscoe, C.H. (1963). The Role of Corpus Luteum in the Delayed Implantation of Marsupials. En: *Delayed Implantation* (Enders, A.C. ed), University of Chicago Press, U.S.A., pp. 15-32, En: *Development in Mammals* (Johnson, M.H. ed.), Vol. 1, North Holland Publishing Co., Netherlands, pp. 307-360.
- 172) Tyndale-Biscoe, C.H. (1979). Hormonal Control of Embryonic Diapause and Reactivation in the Tammar Wallaby. En: *Maternal Recognition of Pregnancy*, Excerpta Medica, Netherlands, pp. 173-208.
- 173) Tyndale-Biscoe, C.H. (1980). Reproduction and Post-Natal Development in the Marsupial Bettongia lesner (Quoy Gaimard). *Aust. J. Zool.* 16, pp. 577-602. En: *Development in Mammals* (Johnson, M.H. ed.), Vol. 1, North Holland Publishing Co., Netherlands, pp. 307-360.
- 174) Van Blerkom, J., Brockway, G.O. (1975). Qualitative Patterns of Protein Synthesis in the Preimplantation Mouse Embryo II During Release from - -

- Facultative Delayed Implantation. *Dev Biol.* 46, pp. 446-451. En: Maternal Recognition of Pregnancy, *Excerpta Medica*, Netherlands, pp. 141-172.
- 175) Van Blerkom, J., Chavez, D.J., Bell, H. (1979). Molecular and Cellular Aspects of Facultative Delayed Implantation in the Mouse. En: Maternal Recognition of Pregnancy, *Excerpta Medica*, Netherlands, pp. 173-208.
- 176) Wels, W.G., Kildmell, W.R. (1969). En: The Gonads (McKerns, K.W. - ed.), Appleton, U.S.A. En: Maternal Recognition of Pregnancy, *Excerpta Medica*, Netherlands, pp. 53-83.
- 177) Weithauf, H.M., Grenwald, G.S. (1965). Comparison of ^{35}S methionine Incorporation by the Blastocysts of Normal and Delayed Implantating Mice. *J. Reprod. Fert.* 10, pp. 203-208. En: Development in Mammals (Johnson M.H. ed.), Vol. 1, North Holland Publishing Co., Netherlands, pp. 307-360.
- 178) Weitlauf, H.M., Greenwald, G.S. (1968). Survival of Blastocysts in the Uteri of Ovariectomized Mice. *J. Reprod. Fert.* 17, pp. 515-520. En: Development in Mammals (Johnson, M.H. ed), Vol. 1, North Holland Publishing Co., Netherlands, pp. 307-360.
- 179) Weitlauf, H.M. (1973). Changes in the Protein Content of Blastocysts - from Normal and Delayed Implantating Mice. *Anat. Rec.* 176, pp. 121-124. En: Development in Mammals (Johnson, M.H. ed.), Vol. 1, North Holland Publishing Co., Netherlands, pp. 307-360.
- 180) Weitlauf, H.M. (1974). Effect of Actinomycin D on Protein Synthesis by Delayed Implantating Mouse Embryos In Vitro. *J. Exp. Zool.* 189, pp. 107-202. En: Maternal Recognition of Pregnancy, *Excerpta Medica*, Netherlands, pp. 141-172.
- 181) Weitlauf, H.M. (1978). Factors in Mouse Uterine Fluid that Inhibit the Incorporation of ^3H - Uridine by Blastocysts In Vitro. *J. Reprod. Fert.* 52, pp. 321-325. En: Induction of Implantation by Androgen in Mice with Delayed Implantation. *J. Reprod. Fert.* (1980). 58, pp. 339-343.
- 182) Wilmsatt, W.A. (1975). Some Comparative Aspects of Implantation. - *Biol. Reprod.* 12:1. En: Características Morfológicas y Funcionales del Cigoto de Mamífero durante la preimplantación.
- 183) Yasukawa, J.J., Meyer, R.K. (1966). Effect of Progesterone and Oestrone on the Preimplantation and Implantation Stages of Embryo Development in the Rat. *J. Reprod. Fert.* 11, pp. 245-255. En: Development in Mammals (Johnson, M.H. ed.), Vol. 1, North Holland Publishing Co., Netherlands pp. 307-360.
- 184) Yoshinaga, K., Fujino, M. (1979). Hormonal Control of Implantation in the Rat. Inhibition by Lutalizing Hormone-Releasing Hormone and Its -

Analogues. En: Maternal Recognition of Pregnancy, Excerpta Medica, -
Netherlands, pp. 85-109.

- 185) Young, J. Z. (1975). The Life of Mammals. 2^o ed. Clarendon Press.
England, pp. 304, 469-480.