

00346

3  
Lij



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

ESTUDIO HISTOLOGICO DE ORGANOS DEL APARATO  
REPRODUCTOR FEMENINO DE LA CONEJA, DURANTE EL  
TRATAMIENTO CON ANTIPROGESTAGENOS: ANALISIS  
INMUNOHISTOQUIMICO DE LOS RECEPTORES A PROGESTERONA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS (BIOLOGIA CELULAR)

P R E S E N T A

M.V.Z. SANTIAGO RENE ANZALDUA ARCE

DIRECTOR DE TESIS: DR. MARCO ANTONIO CERBON CERVANTES

1986

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



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.

MIEMBROS DEL JURADO :

PRESIDENTE:

DRA. OLGA MARGARITA ECHEVERRIA MARTINEZ.

PRIMER VOCAL:

DR. LUIS FELIPE JIMENEZ GARCIA.

SEGUNDO VOCAL:

DR. MARCO ANTONIO CERBON CERVANTES.

TERCER VOCAL:

DR. IGNACIO CAMACHO ARROYO.

SECRETARIO:

M. EN C. MARIO PEREZ MARTINEZ.

SUPLENTE:

DRA. JULIETA IVONE CASTRO ROMERO.

SUPLENTE:

M. EN C. ANA MARIA PASAPERA LIMON.

## AGRADECIMIENTOS

Doy mi más sincero agradecimiento :

A la F.M.V.Z. (Departamento de Morfología), al PUIS , DGAPA de la U.N.A.M. y al OMS por su apoyo en la realización de la presente investigación.

A los miembros del jurado por sus valiosos comentarios y observaciones

A mi tutor el Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes por su confianza, colaboración y sobretodo su paciencia para conmigo.

A los doctores : M.V.Z. Martha Beatriz Trajo Salas y M. Sc. Rafael Hernández González por las facilidades y su apoyo en la realización de la presente tesis.

Al Dr. Horacio Merchant Larios por su ayuda en la implementación de la técnica inmunohistoquímica.

Al M. en C. José Ramírez Lezama por su ayuda en la interpretación histopatológica.

Al M. en C. Raúl Ulloa Arvizu por su colaboración en el trabajo estadístico.

Al la Sra. Josefina López Andrade por su paciencia y dedicación para la realización del trabajo mecanográfico, pero sobretodo por su sincera amistad.

A los laboratoristas : Francisco López López y José Luis Romero Morales por su colaboración en el procesamiento histológico de las muestras

Dedico la presente tesis :

A la memoria de la persona que me dió todo su amor hasta el último día de su vida , mi madre la Maestra Nidia Arce Aguilar.

A mi esposa Claudia con gratitud por darme la oportunidad de valorar y conocer lo maravilloso que es la paternidad y atestiguar el inmenso amor que le prodiga a nuestros hijos.

A mis hijos Nydia Carolina y Alan Andres por regalarme sus sonrisa cada día.

A mi padre Enrique Anzaldúa Rodriguez por su compañía y el amor que nos demuestra.

A mi hermano Raúl y su hija Dafne con cariño.

Al Sr. Alfonso Torres y a la Sra. Raquel Díaz con sincero afecto.

A mis amigos de siempre : Eduardo, Pepe y David.

A mis compañeros y amigos del Departamento de Morfología y especialmente a la sección de Histología.

A mi maestro que nunca olvidaré el Dr. Jorge Tolosa Sánchez

## ABREVIATURAS UTILIZADAS

DAB: Diamino Bencidina

EPF: Factor de Gestación Temprana.

E2 : Estradiol.

K : Relación entre el tejido glandular y el estroma.

NET: Noretisterona.

5 $\alpha$ -NET: 5 $\alpha$ - Dihidronoretisterona.

3 $\beta$ -5 $\alpha$ -NET: 3 $\beta$ -5 $\alpha$ - Tetrahidronoretisterona.

P4: Progesterona.

PBS: Solución Amortiguadora de Fosfatos.

PPG: Propilenglicol.

PAF: Solución de ácido pícrico y paraformaldehido.

PAP : Peroxidasa-Antiperoxidasa

I.A. : Índice de apoptosis.

I.M.: Índice de mitosis.

IRS: Puntaje inmunoreactivo.

LTB4: Leucotrienos B4.

RG: Receptor a glucocorticoides.

RE: Receptor a estrógenos.

RP: Receptor a progesterona.

RIT: Prueba de Roseta de Inhibición.

RU-486 : Mifepristona , antiprogestágeno sintético

RIA: Radio inmuno Análisis.

UTG: Uteroglobina.

## CONTENIDO

I. RESUMEN	3
SUMMARY	5
II. INTRODUCCION	7
III.-ANTECEDENTES GENERALES	10
1.-RECEPTOR A PROGESTERONA	10
1.1.- MECANISMO GENERAL DE ACCION DE HORMONAS ESTEROIDES.	10
1.2.-CARACTERISTICAS GENERALES DEL RECEPTOR Y SU REGULACION.	13
2.-LA UTEROGLOBINA	17
2.1. ESTRUCTURA Y CARACTERISTICAS	19
2.2. REGULACION DE SU SECRECION EN EL ENDOMETRIO	19
2.3. LA UTEROGLOBINA EN OTROS TEJIDOS	20
3.-LA NORETISTERONA Y SUS METABOLITOS	22
3.1-EFECTOS HORMONALES	22
3.2.-INTERACCION DE LA NORETISTERONA Y SUS METABOLITOS CON RECEPTORES INTRACELULARES DE HORMONAS ESTEROIDES.	24
IV.-JUSTIFICACION E HIPOTESIS.	25
OBJETIVOS	27
V.-MATERIALES Y METODOS	28
1.-ANIMALES	28
2. ESTEROIDES	28
3. EXPERIMENTOS Y TRATAMIENTOS REALIZADOS	28
4.-RECOLECCION DE TEJIDOS	30
5. ESTUDIOS HISTOLOGICOS	30
5.1 OVARIOS	30
5.2 TUBAS UTERINAS	31
5.3 UTERO	32
5.3.1. MORFOMETRIA	32
5.3.2.INDICES DE MITOSIS Y APOPTOSIS	34
6. TECNICA INMUNOHISTOQUIMICA	35
6.1 CONTROLES	36

6.2. ANTICUERPOS	36
6.3. EVALUACION INMUNOHISTOQUIMICA	37
VI. RESULTADOS.	39
1.-TECNICAS HISTOLOGICAS RUTINARIAS Y TINCIONES ESPECIALES.	39
1.1.-OVARIOS	39
1.2.-OVIDUCTOS (TUBAS UTERINAS).	39
1.3.-UTERO	45
2.-INMUNOHISTOQUIMICA DEL UTERO	52
2.1.-UTEROGLOBINA	52
2.2.-RECEPTOR A PROGESTERONA.	54
VII. DISCUSION	58
VIII. CONCLUSIONES	83
IX. RECOMENDACIONES	84
X. LITERATURA CITADA	87

## I. RESUMEN.

Estudios recientes han demostrado que la administración de un metabolito reducido en el anillo "A" de la Noretisterona (NET) conocido como 5 $\alpha$  dihidronoretisterona (5 $\alpha$  NET) a conejas prepúberes no muestra un efecto progestacional a pesar de tener afinidad por el receptor a progesterona. Cuando este compuesto se usa en forma combinada con progesterona se observa un potente efecto antiprogestacional al inhibir la expresión del gen de uteroglobina (una proteína de secreción uterina en la coneja regulada por progesterona).

Con el propósito de determinar los efectos de la 5 $\alpha$  NET sobre la estructura histológica de órganos del aparato reproductor en conejas gestantes, se realizaron las siguientes determinaciones morfológicas en ovarios, oviductos y útero en el día 8 de la gestación después de una semana de tratamiento con 5 $\alpha$ -NET (1.5 mg /Kg/día): presencia de cuerpo lúteo; cuantificación de células secretoras (PAS+) y no secretoras (PAS-) en el tejido epitelial de dos porciones de las tubas uterinas infundíbulo-ámpula e istmo; determinación planimétrica del tejido glandular uterino en relación con el estroma, cuantificación del índice mitótico (I.M.) y apoptótico (I.A.) en el tejido epitelial (luminal y glandular), así como la determinación inmunohistoquímica de uteroglobina (UTG); y el análisis inmunohistoquímico de los receptores a progesterona en el epitelio, estroma y miometrio.

Se utilizó un grupo de animales tratados con RU-486 como controles de la actividad antiprogestacional y otro grupo de conejas gestantes (tratadas con el vehículo propilenglicol, PPG) como controles normales.

La 5  $\alpha$ -NET (1.5 mg/Kg/día/7 días) ejerció efectos morfológicos similares a los del RU-486 (1 mg/Kg/día/7 días). Ambos compuestos indujeron modificaciones semejantes en el comportamiento de las poblaciones celulares del oviducto: a) En la región infundíbulo-ámpula, el número de células PAS - se incrementó ligeramente con respecto a las células PAS +.

b) En el istmo ocurrió lo contrario , dichas variaciones no fueron estadísticamente significativas cuando se compararon con el grupo control (PPG). En el útero tanto la 5  $\alpha$ -NET como el RU-486 redujeron en más del 50 % la proporción del tejido glandular/estroma. La 5  $\alpha$ -NET y el RU-486 también disminuyeron significativamente el índice mitótico de las glándulas uterinas comparado con las conejas no gestantes , mientras que el índice de apoptosis no se modificó con los tratamientos empleados. En el estudio inmunohistoquímico se observó en el útero que el RU-486 y la 5 $\alpha$ -NET produjeron una marcada disminución en el contenido de UTG y provocaron regulación a la baja del receptor a progesterona.

Los datos obtenidos en el presente estudio histológico sugieren que la 5  $\alpha$ -NET ejerce efectos antiprogestacionales y de anti-implantación , lo cual corrobora los datos bioquímicos y moleculares descritos previamente por nuestro laboratorio y proporciona mayor información sobre los mecanismos moleculares involucrados en la acción anticonceptiva post coito de la Noretisterona.

## SUMMARY.

It has been demonstrated that the administration of the A-ring 5 alpha reduced metabolite of norethisterone (5 alpha NET) to prepubertal rabbits, precludes the progestational effects of norethisterone (a potent synthetic progestin). Furthermore when 5 alpha NET is used in combination with progesterone, it displays a potent antiprogestational effect, inhibiting uteroglobin gene expression (a progesterone-regulated protein in the rabbit uterus).

The antiprogestational effects of 5 alpha NET at the morphological level have not been previously examined. In order to determine the effects of 5 alpha NET on the morphology of the rabbit female reproductive tract, adult fertilized female rabbits were treated with 5 alpha NET 1.5 mg/Kg/day during 7. After treatments : a) the presence of corpus luteum was evaluated in the ovarium; b) the number of secretory cells (PAS positive), and non secretory cells (PAS negative) were quantified in the infundibulo-ampula and istmo ; c) In the uterus ,glandular tissue in relation to stroma was determined by planimetry, the mitotic and apoptotic indexes were quantified in epithelial tissue (luminal and glandular). Uteroglobin and progesterone receptor were determined by immunohistochemistry in the epithelium, stroma and miometrium of the uterus. Animals treated with RU-486 (1 mg/Kg/day during 7 days) were used as controls of antiprogestational activity in all procedures. Normal adult pregnant rabbits were used as normal controls.

5 alpha NET (1.5 mg/Kg/day) exerted similar effects to those of RU-486 (1 mg/Kg/day). Both compounds induced similar modifications in cell populations in the oviduct: a) In infundibulo-ampula the number of PAS negative stained slightly increased, whereas PAS positive cells slightly diminished, although these changes were not statistical significantive as compared with those observed in normal pregnant rabbits. b) In the itsmo the number of PAS positive stained cells increased, while that of PAS negative cells

decreased however, but these differences were not statistical significantive as compared with normal pregnant animals. In the uterus both RU-486 and 5 alpha NET reduced 50% the proportion endometrium/ stroma 5 alpha and RU-486 also significantly diminished the mitotic index in the glandular uterine tissue, but not the apoptotic index. Immunohistochemical studies showed that RU-486 and 5 alpha NET reduced uteroglobin content and produced a down regulation of progesterone receptor .

The overall results suggest that 5 alpha NET exerts antiimplantation and antiprogestational effects at the morphological level that are in line with the previous biochemical and molecular data reported by our group, and provide further explanation of the molecular mechanisms involved in the post coital contraceptive action of norethisterone.

## II. INTRODUCCION.-

El crecimiento poblacional que ha experimentado la especie humana ha sido notable a lo largo de la historia y sólo se ha visto detenido gracias a sequías, guerras, epidemias y desastres naturales.

Todo el florecimiento y desarrollo tecnológico alcanzado por el hombre propició que a mediados del siglo pasado la humanidad llegara a 1,000 millones de individuos; para 1930, tan sólo 80 años más tarde la población se duplicó a 2,000 millones. Lo anterior demuestra indudablemente entre otras cosas un incremento en el promedio de vida del ser humano; para 1961 (30 años después) se alcanzaría el tercer milenio de millones y el cuarto milenio se alcanzó en la mitad del tiempo anterior (es decir en 15 años). Actualmente, la población mundial aumenta a un ritmo de 175,000 personas por día (Pasapera y Gutiérrez-Sagal, 1989), por lo que de acuerdo con algunas predicciones en el inicio del siglo XXI existirán 7,000 millones de seres humanos. y entre la segunda y tercera década se logrará la cifra récord de 8,000 millones de habitantes (Warshofsky, 1974)

Por todo lo anterior, sin duda alguna, uno de los retos y preocupaciones de ésta y las futuras generaciones es el crecimiento acelerado de la población humana, ya que este fenómeno limita y disminuye la disponibilidad esencial de espacio, alimento y satisfactores mínimos de los individuos.

El problema del control natal no es exclusivo de nuestra especie, ya que en algunos animales domésticos (como los perros y gatos ) así como con otras especies se han convertido en fauna nociva, precisamente por su sobrepoblación , por lo que representan no sólo un hacinamiento sino también un importante riesgo de salud pública, de tal forma que todos los esfuerzos encaminados al estudio de métodos contragestacionales y de regulación de la natalidad son de primordial importancia para poder afrontar los retos que el futuro inmediato nos plantea.

El complejo proceso reproductivo presenta diversas oportunidades y niveles de intervención, que van desde la obtención de los gametos hasta la implantación del óvulo fecundado en la pared uterina y su normal manutención en este sitio.

Una de las estrategias más eficaces y mayormente empleadas consisten en la regulación hormonal de la fertilidad mediante el empleo de múltiples compuestos sintéticos de naturaleza esteroide con gran actividad biológica de diversa índole, como son los efectos estrogénicos y progestacionales; estos compuestos han permitido implementar diversas estrategias de terapia hormonal anticonceptiva que se emplean cada día con mejores resultados y con un gran margen de seguridad, abatiendo riesgos y efectos indeseables. En la actualidad el estudio de progestinas y estrógenos sintéticos constituyen un pilar preponderante en la investigación biomédica, que permite diseñar nuevos métodos de planificación así como optimizar los ya existentes. Igualmente el estudio de procedimientos contragestacionales postcoito ocupan un sitio relevante en la investigación biomédica en este campo (Díaz y col., 1982).

Dentro de los esteroides sintéticos con los que se cuenta en la actualidad destacan las progestinas; las que se clasifican en dos grupos de acuerdo a su composición bioquímica: a) los derivados de la 17 alfa-hidroxi-progesterona como son: los acetatos de clormadinona y de medroxiprogesteronona y b) los derivados de la 19-nor testosterona entre los que encontramos a la noretisterona, noretinodrel y el levonorgestrel. Dentro de este último grupo se encuentran los compuestos más frecuentemente empleados y de ellos un lugar relevante lo ocupa la noretisterona (NET) que se emplea en diversas presentaciones anticonceptivas (inyecciones, comprimidos, en dispositivos intrauterinos medicados, implantes subdérmicos, anillos vaginales, entre otros). A pesar de haber sido la primera progestina sintética utilizada con éxito en la clínica su mecanismo de acción a

nivel molecular y celular no se comprende aún del todo, por lo que actualmente las investigaciones encaminadas a su completa dilucidación son de gran importancia. (Rudel y col. 1965).

### III. ANTECEDENTES GENERALES.

#### 1. RECEPTOR A PROGESTERONA (RP).

##### 1.1 MECANISMO DE ACCION DE LAS HORMONAS ESTEROIDES.

En 1968, fué propuesto de manera independiente por Gorski et. al. (Gorski, 1968) y por Jensen et. al. (Jensen, 1968) el "modelo de las dos etapas", en el cual se plantea que las hormonas esteroides se introducen a la célula por difusión simple y posteriormente se unen a un receptor citosólico específico. Una vez ocurrido esto, el complejo hormona-receptor es translocado al núcleo por un proceso de activación dependiente de temperatura; dicha activación es inferida a partir de un cambio en el coeficiente de sedimentación. En este modelo los receptores citosólicos pueden encontrarse unidos al esteroide o bien libres de éste; este modelo planteaba que los receptores en el núcleo únicamente estaban unidos a la hormona.

Sonnenschein (1976) observó posteriormente que en el núcleo existían receptores libres (no unidos al esteroide), tanto en células normales como tumorales. En estos estudios se procuró evitar la contaminación del núcleo con receptores citosólicos; y por diversos estudios fisicoquímicos se concluyó que el tipo de receptores estudiados correspondían a los no unidos al esteroide.

En experimentos autorradiográficos realizados en úteros de ratas, se ha observado que el estradiol tritiado se localiza en el núcleo de las células después de un corto período de incubación *in vitro* a bajas temperaturas, condiciones que minimizan la traslocación de los complejos hormona-receptor a partir del citoplasma (Sheridan, 1979). Estas observaciones han llevado a plantear un modelo en el que los receptores libres pueden existir en un estado de equilibrio entre el citoplasma y el núcleo (Clarck, 1984), este equilibrio es reversible y rápido. Según el modelo no existe barrera para la transferencia del receptor a través de la envoltura nuclear. La ocupación del receptor por la hormona cambia el equilibrio de tal manera que se favorece su

interacción con diversos componentes del núcleo por lo que no se encuentran libres en la fase soluble.

Welshons y colaboradores en 1984 describieron un novedoso procedimiento empleando citocalasina B, mediante el cual se induce la enucleación celular, por lo que se pueden obtener fracciones del citoplasma y el núcleo por separado, tanto de células normales como tumorales. Se ha observado que las fracciones citoplásmicas contienen poca actividad de unión a los estrógenos y la mayor parte de los receptores libres están en la fracción nuclear, por lo que los autores proponen que en las células intactas no hay translocación de receptores como parte de la respuesta esteroidea (Welshons y col., 1984), o bien existe un incremento en la afinidad del receptor por los elementos nucleares.

Las diferencias en la localización subcelular de distintas especies de receptores se explica por variaciones en la afinidad del receptor por los componentes nucleares y porque es una propiedad molecular de cada proteína de un receptor dado. La transformación de un receptor al ser ocupado por la hormona produce un aumento en la afinidad de este por regiones específicas de la cromatina, por lo tanto tiene una distribución intracelular diferente. Este cambio en afinidad induce los efectos genéticos mediados por el receptor.

El uso de anticuerpos monoclonales por técnicas inmunohistoquímicas para el receptor a estrógenos (King y Greene, 1984), progesterona (Perrot-Applanat y col. 1985) entre otros, demuestra su localización confinada únicamente al núcleo de células de tejidos sensibles a estas hormonas (como son el útero, tubas uterinas, cuerpo lúteo, glándula mamaria y pituitaria entre otros), por lo que se ha planteado el modelo nuclear.

El primer receptor altamente purificado y que mostró unión con el DNA fué el de los glucocorticoides (RG) y su interacción con el genoma nuclear pudo visualizarse con el microscopio electrónico (Darnell, 1989); experimentos con

DNAasa han mostrado que el complejo hormona-receptor se unen en 4 a 6 sitios en una región que va de 84 a 305 nucleótidos río arriba a partir del sitio inicial de la transcripción (Darnell, 1989).

En la actualidad se conocen los sitios de unión del complejo hormona-receptor con el DNA; dichas regiones receptoras se les denomina **elementos de respuesta hormonal**, las cuales son diferentes para cada hormona, así se ha identificado la constitución de estos elementos específicos de la progesterona en el humano (Lieberman y col., 1993); tienen una longitud aproximada de 15 pares de bases y exhiben una simetría específica (aunque las repeticiones invertidas son imperfectas), esto sugiere que los receptores pudieran unirse como dímeros.

En la actualidad se ha planteado que la hormona difunde libremente a través de la membrana entrando a la célula por difusión. El receptor hormonal se encuentra acompañado con un inhibidor el cual se desplaza después de la interacción: hormona-receptor (Darnell, 1989).

Un dímero del receptor, se acopla a la hormona y se une a los elementos de respuesta hormonal, activando la transcripción de los genes dependientes de esta región; esta unión puede favorecer la expresión génica (Díaz-Zagoya y Juárez-Oropeza, 1987; Darnell, 1989).

En resumen podemos sintetizar los principales eventos de la siguiente manera: las hormonas circulan en la sangre, ya sea libres o como complejos con proteínas presentes en el plasma, las hormonas se difunden dentro y fuera de las células y son retenidas únicamente por las células blanco en complejos con proteínas intranucleares llamados receptores, formando el complejo hormona receptor (H-R), posteriormente el receptor se vuelve más pequeño (de 8s a 4s) y se separan las proteínas hsp 90 ("heat shock protein" P.M. 90,000) y p 59 que están presentes en forma heterooligomérica (el "inhibidor" para Darnell, 1989) (Green and Chambon, 1988; Beato, 1989), esta transformación permite aumentar su

afinidad por los elementos reguladores del ADN, a través de su dominio de unión. Antes de la unión a la hormona el receptor no tiene afinidad por la cromatina ya que su conformación únicamente le permite tener alta afinidad por su ligando específico. Una vez que el complejo H-R se une al DNA, se provoca un cambio en la conformación de la cromatina con lo que se modifica el acceso de los factores de la transcripción de manera positiva para que se active la transcripción (Tsai y col. 1989), en el caso del receptor a glucocorticoides se ha demostrado que se altera la estructura de la cromatina en particular la región que contiene sus elementos de respuesta específicos a nivel de la región del promotor (Pasapera, 1994). Los factores de transcripción son diferentes desde el punto de vista cualitativo y cuantitativo dependiendo del tipo celular al que correspondan, en todos los casos son factores limitantes para la actividad que los receptores puedan desencadenar al unirse al DNA; de esta manera los receptores se convierten en activadores transcripcionales que pueden interactuar con otros factores de transcripción con lo que se ensambla todo el complejo molecular necesario para el inicio de la transcripción de un gen que contienen dentro de sus secuencias aledañas al promotor elementos de respuesta específicos a los receptores en cuestión (Tsai y col. 1988).

#### 1.2. CARACTERISTICAS GENERALES DE LOS RECEPTORES A HORMONAS ESTEROIDES Y SU REGULACION:

Los receptores a hormonas esteroideas son una variedad de receptores nucleares que pertenecen a una familia de proteínas que actúan como factores de transcripción y que se activan por el ligando; estos receptores se han implicado con un gran número de procesos fisiológicos como: diferenciación, desarrollo y respuestas a estímulos hormonales (Cunha *et. al*, 1991, Jansan, 1991). La familia comprende a los receptores a esteroideas: progesterona, estrógenos, andrógenos, glucocorticoides, mineralocorticoides y a la

vitamina D; así mismo involucra a los receptores a hormonas tiroideas y los retinoides (Evans, 1988; Beato, 1989; Jensen, 1991; Lazar, 1993; Giguere, 1994); en esta familia se incluyen también un grupo de receptores para los cuales no se ha identificado aún ningún ligando fisiológico por lo que se les ha denominado genericamente como receptores "huérfanos", en este grupo está el receptor de la dioxina, receptores activados por los proliferadores de peroxisomas y un número de factores transcripcionales (Dension y col. 1986; Hapgood y col. 1989; Isseman y Green 1990; Dreyer y col. 1992; Zhu y col. 1993)..

El RP en mamíferos es una fosfoproteína, con un peso molecular de 100,000 daltons, en su composición no participan, carbohidratos, lípidos ni ácidos nucleicos ya que sólo es digeridos por enzimas proteolíticas y no son sensibles a la exposición de DNAasa y RNAasa. Las moléculas son termolábiles y aparentemente no presentan actividad enzimática (aunque se ha sugerido una cierta actividad similar al de una cinasa). En los mamíferos el RP corresponde a un oligómero, a diferencia de las aves en el cual está formada por dos subunidades (de 79,000 y 108,000 daltons). Es factible disociar el receptor a progesterona de los mamíferos aumentando la fuerza iónica del medio, a pesar de no estar formada por subunidades. En humanos se han descrito dos isoformas (A y B) del RP (Vegeto y col. 1993).

Presenta alrededor de 800 aminoácidos que pueden dividirse en tres distintos dominios: a) en el extremo amino terminal es la porción menos conservada entre la familia de receptores, presenta algunas características antigénicas que permiten su identificación inmunológica, esta región también es activa en la transcripción de genes (Groyer-Picard y col., 1990); b) el dominio de la porción central que presenta una estructura parecida a "dedos de zinc", que implica el reconocimiento de los elementos de respuesta hormonal del ADN funcionan como potenciadores (o "enhancers") de la transcripción de los genes regulados hormonalmente por el

esteroide y c) un dominio en el extremo carboxilo terminal por el cual se une a la hormona, esta porción también se une a algunas otras proteínas como las de choque térmico, además cumple funciones de: dimerización y actividad transactivadora ligando-dependiente.

El mecanismo de activación del receptor por el ligando se realiza en varias etapas: unión de la hormona a su receptor específico, translocación nuclear (que no se lleva a cabo en todos los miembros de la familia de receptores), la dimerización, la fosforilación y por último la unión al ADN.

La activación del receptor involucra cambios en la molécula del receptor, posiblemente como resultado de la fosforilación del receptor (Denner, 1990). Otra forma de explicar la función de los receptores indica que en estado inactivo una proteína inhibidora bloquea el dominio donde se une al ADN. La unión de la hormona al receptor causa la disociación de esta proteína inhibidora y por lo tanto ocasiona la activación del receptor. La proteína inhibidora al parecer corresponde a un grupo de 90,000 daltons que corresponde al grupo de proteínas del choque térmico (Schuh, 1985; Pratt, W.B.1987; Alberts, 1989).

La unión del complejo esteroide-receptor a sitios aceptores nucleares, resulta en la alteración de la transcripción genética. La progesterona regula el nivel de la transcripción del gen de uteroglobina en el endometrio de la coneja (Loosfelt y col., 1981; Cerbón y col. 1990a; Cerbón y col 1991). Se ha estudiado la interacción que se establece del receptor con el gene de uteroglobina mediante el empleo de enzimas de restricción y se han observada contactos principalmente en la región del promotor (Atger y col., 1983) que corresponde a un fragmento que abarca desde el nucleótido -395 al +14 . Se desconoce si los sitios de alta afinidad del receptor con el DNA, estan involucrados con la regulación del la expresión del gene de UTG.

Se han observado gran cantidad de RE y RP en diversas circunstancias en las que predominan los estrógenos como son:

aplicación directa de  $17\beta$  estradiol ( $17\beta$ -E2) (Brenner and West, 1975), o durante la fase folicular del ciclo menstrual (Bouchard y col. 1988) , o bien en una coneja en estro (Hegele-Hartung y col. 1992) como resultado de la expresión de los genes que codifican para estas proteínas; cuando se aplica progesterona (o compuestos con actividad similar) disminuyen los RP, mecanismo conocido como "regulación a la baja" (down regulation), que se refiere a la disminución de la sensibilidad del órgano blanco ante niveles hormonales elevados de un agonista, lo inverso ocurre con bajos niveles del agonista, así la "regulación a la alta" (up regulation ) tiene por objeto incrementar la sensibilidad de las células blanco en el tejido al contar con un mayor número de receptores (Ruckebusch y col. 1991); molecularmente la "down regulation" se explica por la síntesis de enzimas que degradan al receptor a progesterona, y que son expresadas gracias al efecto progestacional. (Ruckebusch y col. 1991).

Se han llevado a cabo diversos estudios inmunohistoquímicos de los receptores (RE y RP) en el útero (Bouchard, y col.1988; García E., 1988; Bouchard y col. 1991; y Hegele-Hartung,1992; Dunselam y col., 1992) y la vagina de distintas especies (Perrot-Appianat y col.,1985) a fin de determinar su participación fisiológica en estos órganos.

Se ha realizado la localización de los RE y RP en células de la granulosa ( de folículos y cuerpo lúteo) en el ovario de la coneja, con diversos tratamientos hormonales (Iwai y col., 1990); Cuando se elevan los niveles de LH (o progesterona en el ovario de la mujer ) no pueden detectarse los RE y aparecen RP, persistiendo éstos en las células de la granulosa luteinizadas (Iwai,1990; Iwai,1991). Los receptores localizados en las tecas no presentan variaciones aparentes (Iwai,1990).

En las tubas uterinas de la coneja también se han monitoreado a los RE y RP, encontrándose una regulación distinta en el ampulla y el istmo (Hyde y col., 1989); cuando se administra  $17\beta$ -E2 aumenta el número de RP en el

conjuntivo y músculo del ampulla; y se incrementa igualmente los RP en el epitelio del istmo en ausencia del E2 (Hyde y col., 1989).

## 2. UTEROGLOBINA.

La identificación de los componentes macromoleculares de las secreciones uterinas y oviductales, sólo fué posible hasta el desarrollo de técnicas especializadas que permitieron una identificación y separación de los elementos proteínicos de estas secreciones (Lippes y col. 1981).

La uteroglobina (UTG), también llamada blastocinina (Kirshnan and Daniel, 1967) es una proteína pequeña identificada inicialmente como el mayor componente en la secreción uterina (del 40 al 60% de las proteínas totales del fluido uterino) de conejas durante las primeras etapas de la gestación.

La secreción de UTG se realiza en las células epiteliales y con mayor preferencia en las glandulares; aunque mediante hibridización in situ se ha comprobado su ARNm en prácticamente todas las células epiteliales; lo cual sugiere un mecanismo de regulación postranscripcional para que finalmente se secrete (Warembourg y col., 1986).

Esta proteína ha sido objeto de numerosos estudios ya que se ha probado su utilidad como un excelente marcador de acción progestacional en el útero de algunos mamíferos (Kopu y col., 1981; Loosfelt y col., 1981), ya que su secreción es estimulada por progesterona (P4) (Fridlasky and Milgrom, 1976). Otros estudios han demostrado que la progesterona no es la única hormona que estimula la secreción de UTG sino que los estrógenos tienen efectos específicos sobre la síntesis de UTG y su RNAm; así mismo se ha identificado la presencia de una proteína idéntica a la UTG en otros tejidos como son: las tubas uterinas (oviducto), el blastocisto y el pulmón donde su síntesis se expresa en forma constitutiva (Kay and Flegelson, 1974; Kirchner, 1976). Debido a que algunos investigadores han propuesto que la UTG ejerce un efecto

sobre el blastocisto y facilita su implantación se le ha denominado "blastocinina". La secreción de UTG en la coneja es detectable al tercer día de la gestación, presenta un pico alrededor del cuarto y quinto día disminuyendo drásticamente al décimo día, se mantiene en niveles muy bajos durante el resto de la gestación (Miele y col.1987), pese a que esta proteína es dependiente de la acción de P4 los niveles séricos más elevados de esta hormona se observan entre los días 12 y 15 tanto en animales gestantes como pseudogestantes (Challis y col. 1973; Browning y col. 1980). La implantación en la coneja se presenta en promedio en el día 7 (Hafez, 1980; Tolosa y Ochoa,1984), resulta muy interesante su coincidencia con los altos niveles de UTG observados en la secreción uterina en esta etapa y por lo tanto se han propuestos diversos mecanismos de acción de la UTG, entre ellos: la interacción con antígenos de histocompatibilidad del blastocisto para prevenir el rechazo por linfocitos maternos, así como la inhibición de proteasas (Beier, 1968; Kirchner 1976; Miele y col. 1987).

Se ha demostrado la presencia de UTG en el fluido seminal, en el árbol bronquial, en los neumocitos tipo II de los alveolos pulmonares (Guy y col. 1992) y en el tracto digestivo por los que no es exclusiva de un determinado sexo; igualmente por estudios inmunohistoquímicos se concluye que en todos los órganos que secretan UTG siempre es producida únicamente por células epiteliales.

La UTG tiene gran capacidad para unirse a la P4 (Beato and Beier 1975; Fridlansky and Milgrom, 1976; Dannhorn and Kirchner,1990), pero tiene poca capacidad para interactuar con las progestinas sintéticas.

Algunas investigaciones en mujeres (Wolf D.P. and Luigi M. 1975; Cowan y Col. 1986) han demostrado la presencia de glucoproteínas PAS + secretadas en las etapas secretoras del ciclo menstrual (Sylvan et. al., 1981) dichas proteínas no están presentes en el suero; se ha identificado una proteína con características inmunológicas y electroforéticas

similares a la UTG en el fluido uterino de las mujeres; sin embargo existen muchas controversias al respecto (Voss and Beato, 1977), por lo anterior la UTG uterina no se ha podido demostrar fehacientemente en otros mamíferos ajenos al orden Lagomorpha

## 2.1 ESTRUCTURA Y CARACTERISTICAS:

La molécula de UTG tiene un peso molecular de 16 Kd, está formada por dos subunidades de 70 aminoácidos cada una, unidas por dos puentes disulfuro, que pueden estar en un estado oxidado o reducido, únicamente en esta última forma es capaz de interaccionar con la P4.

Se ha podido cristalizar en varias formas y se ha estudiado mediante difracción con rayos X obteniéndose una resolución de 1.34 A (Warembourg y col., 1986). Se ha observado la presencia de una cavidad hidrofóbica que actúa como sitio de unión con la P4.

El RNAm de la UTG ha sido aislado y purificado a partir del endometrio uterino de conejas. El gen contiene aproximadamente 600 nucleótidos, de los cuales sólo 273 son necesarios para la codificación de los 91 aminoácidos de una de las subunidades de la preuteroglobina, un péptido más grande que la subunidad madura de la UTG.

Se ha sintetizado también el cDNA de la UTG el cual hibridiza con el RNAm puro (Warembourg y col., 1986).

## 2.2 REGULACION ENDOCRINA DEL ENDOMETRIO:

Cuando se inyecta P4 sola o después de un tratamiento previo con estrógenos, se produce un incremento discreto en la secreción de UTG, esto se conoce como estímulo primario; la cantidad mínima producida ocasionada por el estímulo primario se ha estudiado en otros sistemas como son el de la vitelogenina y proteínas de la clara de huevo por los estrógenos, la explicación que se ha dado a este fenómeno es que se produce inicialmente una diferenciación celular y estas células son las responsables de la secreción primaria

(en bajas cantidades); una segunda estimulación actúa sobre las células recién desarrolladas, las cuales responden secretando la proteína específica en grandes cantidades. En el caso de UTG el comportamiento secretor es similar al descrito, sin embargo se sabe que la primera inyección con P4 provoca un incremento en el número de células en el endometrio (con o sin tratamiento previo con estrógenos); por lo que no es necesario un proceso de diferenciación celular.

Diversos experimentos indican que la expresión del gen de UTG en el endometrio de conejas adultas está regido probablemente por un control hormonal dual ejercido por el estradiol (E2) y P4 a través de sus receptores (Miele y col., 1987). Experimentos llevados por el grupo de Milgrom utilizando conejas inmaduras (Loosfelt et. al., 1981) han demostrado un incremento en el efecto de P4 sobre el RNAm de UTG con dosis moderadas de E2. Sin embargo cuando se aplica en grandes cantidades el estradiol conjuntamente con la P4, incrementa los niveles de UTG, pero este aumento no fué proporcional con los niveles del RNAm correspondiente, por lo que se podría pensar en un efecto postranscripcional de la P4 y que las dosis elevadas de estradiol (E2) con P4 inhibe este efecto postranscripcional. Otros investigadores reportan que el E2 inhiben el efecto estimulador de P4 sobre la transcripción del RNAm de UTG en el endometrio de conejas adultas; esta heterogeneidad de resultados pueden ser atribuidos a la utilización de animales adultos y prepúberes así como a las técnicas empleadas por cada uno de ellos.

### 2.3 LA UTEROGLOBINA EN OTROS TEJIDOS:

Se han descrito en diversos tejidos distintos al endometrio uterino la presencia de proteínas con características similares al de la UTG, entre los tejidos en los cuales se han identificado dichas proteínas se encuentra el tracto respiratorio, así como porciones del sistema digestivo de conejos de ambos sexos. Esto indica que en el conejo la secreción de esta proteína (o proteínas similares a

ella ) cumple diversas funciones que van más allá de las que se han postulado para el inicio de la gestación, muchas de estas funciones están aún por ser dilucidadas así como la forma específica en la cual se regula su secreción ya que existen tejidos en los cuales la secreción es constante (constitutiva).

En el oviducto la síntesis de UTG es estimulada en forma moderada por el E2 ya que la P4 es totalmente ineficaz (Goswami and Feigelson, 1974). Aunque otros autores atribuyen a este órgano una secreción constitutiva (Miele y col. 1987).

La UTG ha sido identificada en el tejido pulmonar como una proteína secretada con el fluido traqueo-bronquial y secretada por los neumocitos tipo II donde pudiera cumplir funciones de surfactante, para evitar el colapso alveolar durante la espiración (Guy y col. 1992), sus características moleculares son aparentemente muy similares a las de su contraparte uterina, según lo demuestran estudios inmunológicos y fisicoquímicos. De manera similar por procedimientos de cinética de hibridización ha demostrado que el ARNm encontrado en el pulmón y el uterino son prácticamente indistinguible en cuanto a su secuencia y tamaño; sin embargo su secreción es completamente autónoma a la estimulación de hormonas esteroides ováricas; por el contrario los glucocorticoides estimulan la secreción pulmonar de UTG alrededor de tres veces (Torkkeli y col. 1978), este efecto parece ser postranscripcional ya que el aumento de la secreción no va aunado a una modificación en el nivel del RNAm.

Un aspecto interesante es sin duda el hecho de que los niveles basales de la secreción de UTG por parte del pulmón se modifican a lo largo de la vida de la coneja, ya que ocurre un incremento dos veces mayor después de la pubertad y se ha responsabilizado al control de la maduración del tejido pulmonar por efecto de los glucocorticoides.

A pesar de que no se ha observado control regulador de la UTG pulmonar por parte de la progesterona se han

identificados receptores para esta hormona (Camacho-Arroyo y col. 1994), en cambio ha quedado demostrada la regulación de UTG por medio de los glucocorticoides; sin embargo no se conoce con precisión la función de la UTG en el pulmón.

La secreción de UTG por el tracto digestivo al igual que la producida por conductos genitales del tracto reproductor masculino de los conejos no ha sido estudiada (Miele y col., 1987).

### 3. LA NORETISTERONA (NET) Y SUS METABOLITOS.

La NET es un esteroide sintético que se deriva químicamente de la testosterona en la que se le han efectuado dos modificaciones consistentes en la pérdida de un metilo angular en el C 19 (por lo que se convierte en un derivado de la 19 nor) y la incorporación de un grupo etinilo en C 17, con ordenación alfa por lo que su fórmula química es :17 alfa-etinil-17 beta hidroxil-4-estreno-3 ona (Pérez- Palacios y col. 1991); con estas modificaciones pierde la actividad androgénica y adopta actividad progestacional.

Este compuesto se ha empleado como anticonceptivo, ya que además de tener actividad progestacional es capaz de inhibir la ovulación al evitar la liberación cíclica de gonadotropinas hipofisiarias. Por otro lado posee un efecto directo sobre el endometrio, debido a que durante la terapia con este compuesto se origina un desequilibrio en los niveles hormonales de estrógenos-progesterona, en consecuencia se afecta el crecimiento y maduración idónea del endometrio (Goodman y Gilman, 1988).

#### 3.1.-EFECTOS HORMONALES.

En experimentos realizados en mujeres postmenopáusicas se ha demostrado que la NET tiene un efecto antigonadotrópico, pues inhibe la liberación de LH y FSH, sin necesidad aparente de la participación del receptor a progesterona; lo anterior plantea que el mecanismo por el cual la NET tiene un efecto antigonadotrópico es diferente al

de la progesterona. Entre las hipótesis que se han propuesto para explicar esto destaca que la NET pudiera emplear el receptor a estrógenos para mediar sus acciones. La NET es incapaz *per se* de unirse al receptor a estrógenos, sin embargo, en tejidos como hipotálamo, hipófisis anterior y próstata ventral de rata es capaz de biotransformarse en un metabolito, el  $3\beta$ - $5\alpha$ -tetrahidronoretisterona ( $3\beta$   $5\alpha$  NET) (Larrea, *et.al.*, 1987) y éste interactúa con el receptor a estrógenos. Así pues, la actividad estrogénica de la  $3\beta$ - $5\alpha$ -NET se ha comprobado ya que acelera la pubertad en roedores e induce la síntesis del receptor a progesterona (fenómeno estrógeno regulado) (Pérez-Palacios y col. 1991).

El oviducto es un órgano en el cual la población celular del epitelio varía de manera predecible a lo largo del ciclo estral debido a la influencia de hormonas esteroides de origen ovárico, predominando las células secretoras (no ciliadas) en las etapas luteínicas, la cual esta determinada por la acción de P4 tras que las células no secretoras (PAS - ) muchas de ellas ciliadas predominan en las etapas foliculares o estrogénicas del ciclo estral, proceso conocido con el nombre de ciliogénesis (Patek, 1974; Brenner and West, 1975 ; Fawcett, 1989). El estudio de la predominancia de estas poblaciones celulares permite inferir algunos efectos hormonales sobre este órgano ; debido a que se desconoce si los metabolitos reducidos de la NET tienen efectos específicos sobre las tubas uterinas , es decir si los oviductos son órgano blanco de estos compuestos se consideró conveniente estudiarlos, a fin de dar una idea sobre sus posibles efectos. Para lo anterior se consideraron dos áreas: el infundíbulo-ámpula y el istmo ; el infundíbulo y el ámpula se consideraron como una misma porción ya que desde el punto de vista morfológico son prácticamente indistinguibles.

### 3.2. INTERACCION DE LOS METABOLITOS DE LA NET CON LOS RECEPTORES INTRACELULARES DE HORMONAS ESTEROIDES.

Las modificaciones estructurales efectuados en las moléculas de las progestinas sintéticas pueden generar efectos mayores que la hormona nativa, esto se puede explicar debido a que los cambios en la molécula modifican el catabolismo normal del compuesto por lo que se incrementa su vida media en el plasma, así como su actividad biológica, o bien incrementa su afinidad por su receptor putativo. Sin embargo cuando actúa en el órgano blanco pueden formarse metabolitos que interactúan con receptores diferentes, lo que explica el hecho de que un esteroide sintético presente efectos hormonales sinérgicos, agonistas o antihormonales (Cerbón y col. 1990a ).

Los metabolitos de la NET son: la 5 $\alpha$  dihidronoretisterona (5 $\alpha$ -NET), la 3 $\beta$ -5 $\alpha$  tetrahidronoretisterona (3 $\beta$ -5 $\alpha$  NET).

La 5 $\alpha$  NET presenta una afinidad por el receptor a progesterona (RP) relativamente alta ( $K_i=2.6 \times 10^{-7}$  M), sin embargo no es tan grande como el de la NET; estos estudios comparativos se lograron utilizando ratas ovariectomizadas tratadas con estrógenos (E2), en las que se realizó pruebas de desplazamiento con ORG-2058 una progestina de alta afinidad. (Pérez-Palacios y col. 1991).

La 5 $\alpha$  NET interactúa también con el receptor para andrógenos, de hecho es un competidor potente del sitio activo del receptor; estudios de análisis de desplazamiento para andrógenos en ratas machos castrados han demostrado que la NET también interacciona con estos receptores pero con una potencia inferior. (Loza y col. 1988; Pérez-Palacios y col. 1991).

## II.-JUSTIFICACION E HIPOTESIS:

La uteroglobina (UTG) es una proteína sintetizada por las células endometriales de la coneja, constituye un buen marcador para estudiar los mecanismos reguladores hormonales por lo que puede utilizarse como un modelo adecuado. La síntesis de dicha proteína es regulada por P4, así como su gran afinidad para unirse a esta hormona. Por esta razón ha sido propuesta como un agente protector del embrión contra la respuesta inmune e inflamatoria, así como el daño ocasionado por las altas concentraciones de P4 presentes al momento de la implantación del blastocisto. El hecho de que ciertos agentes antiprogestacionales inhiban la síntesis de esta proteína en esta especie, permite el estudio de agentes reguladores de la fertilidad principalmente respecto a su mecanismo de acción. Los hallazgos experimentales sugieren que la 5 $\alpha$  NET pudiera tener un efecto antiprogestacional, por lo que se requiere determinar por procedimientos inmunohistoquímicos la presencia *in situ* de la UTG en el útero, pues su secreción es regulada directamente por la P4 en el endometrio de la coneja (Bowers, 1958; Krishnan, 1967, Krichner, 1967); por otro lado resulta necesario realizar un estudio histológico del endometrio y de algunos órganos del aparato reproductor de la coneja, con el fin de correlacionar sus características con el estudio inmunohistoquímico de los RP a progesterona en el endometrio, para permitir inferir el efecto antiprogestacional de los metabolitos de la NET, comparado con el efecto ya conocido de RU-486.

El advenimiento de agentes con actividad antiprogestacional y contragestacional ha marcado una nueva era en el desarrollo de estrategias en la regulación de la fertilidad en el humano y ciertas especies de animales domésticos. La posibilidad de contar con agentes anticonceptivos (como sería el caso de agentes antiprogestacionales) poscoito de alta efectividad y seguridad añade una nueva dimensión en la endocrinología molecular, que contribuirá sin duda alguna a alcanzar algunas

metas deseadas en salud reproductiva; así como dar una nueva visión sobre la interrupción temprana del embarazo. Esta área de la investigación científica ampliará el panorama del mecanismo de acción hormonal a nivel genómico, así como sus consecuencias morfológicas y funcionales, permitiendo el desarrollo de nuevos agentes farmacológicos para la regulación de la fertilidad.

#### HIPOTESIS:

Los productos de conversión de la Noretisterona (NET), reducidos en su anillo A, se unen específicamente a sitios de alta afinidad de los RP, por lo que es capaz de alterar la expresión del gen progesterona-regulado de UTG. Se propone a la 5 $\alpha$  NET como un inhibidor de la síntesis endometrial de UTG. Esta actividad antiprogestacional puede inferirse a través del estudio histológico e inmunohistoquímico de los animales tratados con 5 $\alpha$  NET así como sus efectos sobre la implantación en hembras gestantes tratadas con este antiprogestivo.

## OBJETIVOS:

1.-Evaluar la actividad anti-progestacional de la 5 $\alpha$  NET mediante el estudio histológico e inmunohistoquímico de órganos del aparato reproductor de la coneja.

2.-Comparar los efectos anti-progestacionales de la 5 $\alpha$  NET con la anti-progestina sintética RU-486, por medio del estudio histológico e inmunohistoquímico de órganos del aparato reproductor de la coneja.

## V. MATERIALES Y METODOS

### 1. ANIMALES:

Se utilizaron conejas Nueva Zelanda, adultas de 3.5 - 4.5 Kg de peso; los animales se mantuvieron en condiciones convencionales de bioterio y alimentación *ad libitum* con alimento comercial (Purina Chow) y se alojaron en jaulas individuales.

Los animales se cruzaron con sementales probados; el día de la crusa se designó como día 0 y al día siguiente (día 1 de la gestación) se inició el tratamiento mediante la inyección subcutánea del esteroide o bien del vehículo (propilenglicol) según el caso.

### 2. ESTEROIDES:

La NET fué proporcionada por Shering Mexicana S.A. (México). La 5 $\alpha$  NET se sintetizó por reducción de la NET por litio en amoniaco como fué descrito por Bowers (Bowers, 1958). La pureza química de la NET y sus derivados se corroboró por su punto de fusión y su comportamiento en el análisis de cromatografía líquida de alta presión, así como por su análisis espectrométrico de resonancia magnética nuclear (Still, W.C. 1978) realizado por el Dr. García de la Mora en la Facultad de Química de la U.N.A.M.

El RU-486 se obtuvo de Russell-Uclaf (París, Francia).

El estradiol provino de Steraloids (Pauling, N.Y.).

### 3. EXPERIMENTOS Y TRATAMIENTOS REALIZADOS

#### Experimento 1:

Conejas adultas gestantes se dividieron en grupos (n=3) y se trataron mediante inyección subcutánea a partir del día 1 (día posterior a la crusa) con dosis crecientes de 5 $\alpha$ -NET, estas dosis fueron: 0.5 mg/Kg, 1 mg/Kg, 1.5 mg/Kg, 2.5 mg/Kg y 5 mg/Kg. Este experimento tuvo como finalidad evaluar la dosis mínima efectiva de la progestina sintética.

Se tomaron muestras de: ovarios, oviductos y útero, se fijaron para su estudio histológico y en algunos casos úteros de animales tratados con 1 y 1.5 mg/Kg para su estudio inmunohistoquímico.

Experimento 2:

Conejas adultas gestantes se dividieron en grupos (n=3) y se inyectaron diariamente a partir del primer día de la gestación por vía subcutánea de acuerdo con el siguiente protocolo:

GRUPO	TRATAMIENTO
I	5 $\alpha$ NET 1.5 mg/Kg
II	5 $\alpha$ NET 1 mg/Kg
III	RU-486 1mg/Kg
IV	Propilenglicol

Los animales se sacrificaron por dislocación cervical y desangrado en el día 8 de la gestación.

Se evaluó visualmente la existencia y el número de sitios donde ocurrió la implantación.

Se tomaron muestras de ovarios, oviductos y útero de los diversos animales para su estudio histológico e inmunohistoquímico (el cual sólo se llevó a cabo en el útero)

Las muestras de los animales de los grupos I y II fueron los mismos empleados en el experimento 1.

Este experimento tuvo como finalidad comparar el efecto anti-progestacional de la 5 $\alpha$  NET (en las dosis de 1 y 1.5 mg/Kg) con el antiprogestágeno de referencia RU-486 (1mg/Kg) y un grupo control de conejas gestantes (tratado con propilenglicol).

Existe un procedimiento para verificar si las hembras cruzadas están efectivamente gestantes, en este procedimiento se obtiene el suero de los animales y se identifica el factor de gestación temprana (Early Pregnancy Factor: EPF), por medio del ensayo de la roseta de inhibición (Orozco *et. al.* 1986), en este análisis el título de inhibición (RIT) de 12 indica la ausencia de la señal de

gestación temprana, mientras que en las muestras con RIT 16 o más indican la fertilización exitosa de los animales (Orozco et. al. 1990). Las muestras sanguíneas de nuestras conejas fueron analizadas por este procedimiento como parte del trabajo doctoral de la M.en C. Ivone Castro R. y han sido ya previamente publicadas (Castro, et. al. 1995). Se obtuvieron títulos (RIT: rosette inhibition titer) de 28 en el día 1, lo que indica el hecho de una fertilización exitosa, en los animales no cruzados que sirvieron como control el RIT obtenido fué de 12, lo que demuestra ausencia del EPF. Los animales con EPF mayores a 16 , se incluyeron en el estudio. Estos datos fueron proporcionados por la Dra. Ivone Castro y se resumen en la tabla 3 (Castro, I. et. al 1995).

#### 4. RECOLECCION DE TEJIDOS:

De los animales sacrificados se obtuvieron los ovarios el oviducto y el cuerno uterino derecho, ya que el izquierdo se destinó a estudios bioquímicos, así como la determinación por radioinmunoanálisis (RIA) de la UTG en el fluido uterino (datos no mostrados).

Las muestras de ovarios se analizaron exclusivamente desde el punto de vista histológico por lo que se fijaron en formol amortiguado (pH de 7.4) al 3%.

Los oviductos y úteros se destinaron tanto a estudios histológicos como inmunohistoquímicos por lo cual se fijaron en una solución de ácido pícrico saturada (150 ml) con paraformaldehído (20 g) amortiguada con solución de fosfatos (PBS) a pH 7.4 (solución de PAF) (Stefanine, 1967).

#### 5. ESTUDIOS HISTOLOGICOS

##### 5.1 OVARIOS:

Los ovarios fueron fijados en formol amortiguado al 3% pH 7.4. Se procesaron rutinariamente por medio de un histoquinette automático (American Optical p 800) y se incluyeron en parafina (Paramex S.A., México).

Las muestras fueron teñidas con hematoxilina y eosina (H-E) con la finalidad de evaluar la presencia de cuerpos lúteos en el parénquima de la corteza ovárica, se empleó igualmente la tinción de ácido Peryódico de Schiff (PAS) esta última tinción se utilizó a fin de observar con mayor claridad ciertas estructuras PAS + como lo son la zona pelúcida.

#### 5.2 TUBAS UTERINAS (OVUDUCTOS):

Los oviductos se fijaron en PAF y se destinaron a su estudio histológico: se procesaron rutinariamente mediante histoquinete automático (American Optical p 800) para su inclusión en parafina, las muestras se cortaron mediante un microtomo (Spenser 820) a 5-7  $\mu\text{m}$  de grosor y se utilizaron tinciones de H-E y tinción de P.A.S., esta última permitió determinar la proporción de células secretoras (P.A.S. positivas) y no secretoras (P.A.S. negativas) en el epitelio de revestimiento del oviducto en dos regiones: a) infundíbulo-ámpula (ya que estas porciones son esencialmente idénticas desde el punto de vista histológico) y b) istmo.

Las muestras teñidas con PAS se observaron en un microscopio de campo claro "Zeiss" para cuantificar la proporción entre células secretoras y no secretoras, un ocular retículo micrométrico "Zeiss 19" y el objetivo 40x. De un campo microscópico dividido en 25 segmentos se tomaron 10 de ellos al azar con la ayuda de una tabla de números aleatorios, siendo elegibles únicamente las terminaciones del 01 al 25; se realizaron un total de 30 conteos por cada grupo de animales considerados en los experimentos 1, 2 (es decir, 10 por cada animal).

Las laminillas fueron cubiertas por una identificación numérica y al azar, de tal forma que no se conoció su procedencia durante el conteo, se obtuvo la media y desviación estandar de las dos poblaciones celulares (secretoras y no secretoras) para las dos regiones consideradas. Para determinar la existencia de diferencias

estadísticas se empleó el procedimiento de Análisis de Varianza (ANDEVA) para el experimento 1 y de Tukey (Diferencia Mínima Significativa Honesta: DMSH) (Grill, 1981) para el experimento 2.

### 5.3 UTERO:

Se procesaron mediante la fijación en PAF y se procesaron mediante la inclusión en parafina (Technicon Paracut), se realizaron cortes seriados de 5-7  $\mu$ m de grosor y se destinaron cortes para su estudio histológico con tinciones de: H.E., tricrómica de Gomori; y cortes alternados para el estudio inmunohistoquímico y sus controles.

Los cortes teñidos con H.E. y tricrómica de Gomori sirvieron para analizar los cambios morfológicos y o patológicos en las muestras.

#### 5.3.1. MORFOMETRIA

Los cortes teñidos con la técnica tricrómica también se utilizaron para proyectar la imagen de cada laminilla sobre papel con el empleo de un proyector (Leitz, modelo Prado 80), con adaptador para revólver y lentes objetivas de microscopio. La distancia que se estableció entre la pantalla y la base del proyector fué de 1.40 m y el lente objetivo que se utilizó fue el panorámico (3.2x).

De esta manera se delimitaron por medio de un lápiz la superficie ocupada por el límite entre el endometrio y miometrio; el lumen de útero y las glándulas presentes en los cortes.

Posteriormente se realizó el estudio de su imagen delineada sobre el papel mediante la técnica de planimetría y se obtuvieron valores numéricos representativos del endometrio (restando a la superficie total el ocupado por el lumen y las glándulas). Así mismo se obtuvo el valor numérico correspondiente al de las glándulas; esos valores de superficie (endometrio, tejido glandular ) sirvieron para hacer la estimación de la actividad antiprogestacional, utilizando el ensayo de Mc Phail (1934), este método consiste en medir el porcentaje del tejido glandular (G) y el estroma

(o lámina propia del útero) (S). Se emplearon las siguientes fórmulas de acuerdo con los trabajos de Low y Kurischko (1982).

$$K (\%) = \frac{G}{G+S} (100)$$

Donde:

K= Relación entre el tejido glandular y el estroma (lámina propia).

G= Medida numérica que representa el tejido glandular en la sección microscópica

S= Medida numérica que representa el estroma.

Los valores obtenidos por este método corresponden al ensayo de Mc Phail como sigue: K 25 % ~ ED Mc Phail 1; K 60% ~ ED Mc Phail 4.

A partir de los valores obtenidos, se procedió a calcular el porcentaje de inhibición de la transformación del endometrio mediante la siguiente fórmula (Low, Kurischko 1982).

$$IE (\%) = \left(1 - \frac{K_t}{K_s}\right) (100).$$

Donde:

IE: Efecto de inhibición de la transformación del endometrio (a mayor porcentaje mayor efecto antiprogestacional de la sustancia empleada).

K<sub>t</sub>= Promedio K del grupo de prueba.

K<sub>s</sub>= Promedio K del grupo control (animal gestante tratado con propilenglicol).

Estos cálculos permitieron determinar el efecto y la potencia antiprogestacional de la sustancia utilizada.

Este procedimiento unicamente se realizó para el Experimento 2, ya que con las dosis elevadas de 5 $\alpha$ -NET (2.5 y 5 mg/Kg) se observaron cambios patológicos en el endometrio que impidieron su estudio planimétrico.

### 5.3.2. DETERMINACION DE LOS INDICES MITOTICO Y APOPTOTICO EN LAS CELULAS EPITELIALES DEL UTERO.

Se empleó un microscopio fotónico (Carl Zeiss) utilizando un aumento total de 400x para la observación de 10 campos microscópicos al azar contando 100 células epiteliales del lumen y 100 células epiteliales glandulares por cada campo en cada sección. Se determinaron aproximadamente 2,000 células por animal de cada grupo (n=3).

Se realizó el análisis de las células glandulares contra las luminales de acuerdo con los trabajos de Nawaz, *et. al.* (Nawaz, 1987) y Conti, *et. al.* (Conti, 1981).

Los conteos se expresaron como porcentajes de células en mitosis (índice mitótico, I.M.) del total de células epiteliales y como porcentaje de células en apoptosis (índice apoptótico, I.A.).

La cuantificación de las muestras en todos los experimentos se realizó ocultando la procedencia de los cortes mediante la asignación aleatoria por números.

Se efectuó un análisis de varianza de una clasificación por rangos de Krukal Wallis (Siegel, 1980). Dicho análisis no paramétrico se utilizó debido a que los valores obtenidos del conteo mostraron gran dispersión.

Con la finalidad de determinar la influencia del RU-486 (1 mg/Kg) y la 5 $\alpha$ -NET (dosis de 1 y 1.5 mg/Kg) sobre el I.M. y el I.A. a los ocho días de la gestación (Experimento 2), se determinaron los valores de la manera descrita anteriormente. Se realizó igualmente el análisis estadístico y los resultados se compararon con el I.M. y I.A. de animales con ocho día de gestación tratados con propilenglicol (PPG) y conejas no gestantes, este ultimo grupo se empleó debido a que por ser animales considerados en estro presentaron una actividad mitótica importante.

## 6. TECNICA INMUNOHISTOQUIMICA

El método empleado fue adaptado de Perrot-Applanat (1985). Se realizó la inmunohistoquímica de los úteros tanto para el RP como para UTG.

En este estudio se realizó exclusivamente para el Experimento 2.

En ambos casos se siguió la siguiente metodología:

Las muestras se fijaron 8 horas en una solución de PAF (Stefanine, 1967); posteriormente las muestras permanecieron 12 horas en una solución PBS 7.4 y se procesaron mediante el uso del histoquinette con la modificación de deshidratación rápida e inclusión en parafina (Paracut) de bajo punto de fusión (52-55 ° c). Se realizaron cortes seriados de 5-7  $\mu\text{m}$  de espesor y se destinaron cortes consecutivos para la realización inmunohistoquímica con anticuerpo primario y su control (sin el primer anticuerpo).

Las secciones fueron tratadas primeramente en una solución de 0.5% de peróxido de hidrógeno (al 30%) en metanol absoluto durante 15 minutos con la finalidad de inactivar las peroxidases inespecíficas presentes en los glóbulos rojos (Perrot-Applanat 1985). Se aplicó sobre las muestras destinadas a identificar el RP suero normal de conejo (1:1000) y suero normal de cabra (misma dilución) para UTG como suero bloqueador durante 10 minutos; para minimizar la unión inespecífica de reactivos en etapas subsiguientes se lavaron posteriormente con PBS por 30 minutos.

Se coloca el anticuerpo primario: anticuerpo Let 126 (desarrollado en el ratón) (Groyer-Picard y col., 1990) anticuerpo monoclonal para el RP, y el anticuerpo policlonal (desarrollado en cabra) para UTG en la dilución de 12.5  $\mu\text{l}$  en 1 ml de PBS.

Los tejidos se dejaron con el anticuerpo primario 18 horas a 4<sup>0</sup> c (durante toda la noche en un cuarto frío) en una charola húmeda.

Los cortes se lavaron con una solución PBS-Tween (1 ml de Tween 20 en 1 lt de PBS 0.01 M) durante 3 veces por 5 minutos cada una.

Se colocó el segundo anticuerpo: conejo contra ratón para RP y conejo contra cabra para UTG durante 45 minutos en dilución de 12.5  $\mu$ l por ml.

Se lavaron con PBS-Tween como se señaló anteriormente.

Se colocó posteriormente el complejo: peroxidasa-antiperoxidasa (PAP) durante 45 minutos en la cámara húmeda a una dilución de 1: 100 en PBS 0.01 M. Para el RP desarrollado en el ratón y para UTG desarrollada en cabra. Las muestras se lavaron con TBS 0.1 M dos veces durante 5 minutos cada una.

La unión específica de los anticuerpos fueron visualizados a través de la incubación por 5 minutos en una solución de 3'3-diaminobencidina (0.5 %) y peróxido de hidrógeno (Merk, México) 0.1 % en una solución Tris-HCl amortiguado (pH 7.6).

#### 6.1 CONTROLES DE LA INMUNOHISTOQUIMICA:

Secciones adyacentes a las empleadas a la inmunotinción descritas en el párrafo anterior de cada bloque de tejido fueron sometidos al mismo método de inmunoperoxidasa indirecta con la excepción de que el primer anticuerpo (ratón anti-RP o cabra anti-UTG) fué reemplazado por suero normal de ratón o de cabra respectivamente, utilizando la misma concentración empleada para el primer anticuerpo y el mismo tiempo de incubación.

Otros controles incluyeron la aplicación de la diaminobencidina (DAB) sola en los tejidos.

#### 6.2 ANTICUERPOS:

Anticuerpo primario:

Anticuerpo monoclonal de ratón Let 126 (Groyer-Picard y col., 1990) contra el RP , fué obtenido del Dr. E. Milgrom (Kremlin-Bicetré, Francia).

Anticuerpo policlonal de cabra contra UTG de coneja.

Anticuerpo secundario:

Anticuerpo anti-ratón Laboratorios Dakopatts A / S).

Anticuerpo anti-cabra Laboratorios Cappel, Cochrenviller P.A.

Complejo Peroxidasa -Antiperoxidasa (PAP): desarrollado en cabra (Laboratorios Sigma), desarrollado en coneja (Laboratorios Dakopatts).

### 6.3 EVALUACION INMUNOHISTOQUIMICA.

La evaluación inmunohistoquímica se realizó mediante el Puntaje inmunoreactivo (IRS:immunorreactive score) señalado por Remmele et.al. (Remmele et.al. 1986) y modificado por Chwalisz (Chwalisz, 1991). Para obtener el puntaje inmunorreactivo debe considerarse en primer lugar la intensidad de la marca, considerada en una escala del 0 al 3, de acuerdo con el siguiente criterio: 0 = ausente, 1 = (+) ligera, 2 = (++) moderada y 3 = (+++) intensa.

Se debe considerar también el porcentaje de células positivas dando valores del 1 al 4 de acuerdo con el siguiente esquema:

1 = 1-10% de células con marca, 2 = 11-50 %, 3 = 51-80% y 4 = 81-100%

Para el cálculo anterior las muestras de úteros se sometieron al proceso del conteo descrito para cuantificar las células secretoras y no secretoras de las tubas uterinas señalado anteriormente; para el caso de las muestras uterinas se realizaron igualmente 10 conteos por muestra procesadas para inmunohistoquímica y los cortes adyacentes se tiñeron con Hematoxilina férrica a fin de facilitar el conteo de los núcleos celulares, comparando ambos conteos se obtuvo el porcentaje de células positivas a la marca de los RP en tres regiones distintas del útero: epitelio y glándulas endometriales, lámina propia y miometrio.

Se determinó el porcentaje de células inmunoreactivas del RP de tres capas histológicas del útero: epitelio (lumen

y glándulas endometriales), conjuntivo (estroma o lámina propia) y músculo (miometrio) y se correlacionó con la intensidad de la marca (estimada subjetivamente) para obtener el Puntaje Inmunoreactivo (IRS)

El puntaje inmunoreactivo (IRS) se obtuvo multiplicando los valores estimados para la intensidad de la marca por los valores correspondientes al porcentaje de células marcadas positivamente en el procedimiento inmunohistoquímica. Este método trata en lo posible de eliminar el subjetivismo de señalar únicamente con cruces los resultados obtenidos por inmunohistoquímica ya que es un procedimiento semicuantitativo que varía mucho de una sesión a otra.

## VI. RESULTADOS.

### 1. TECNICAS HISTOLOGICAS RUTINARIAS Y TINCIONES ESPECIALES.

#### 1.1. OVARIOS.

Se observó la presencia de cuerpos lúteos en todos los animales tratados con las diversas dosis de  $5\alpha$ -NET (Experimento 1). En las muestras de los animales tratados con  $5\alpha$  NET (en dosis de 1, 2.5 y 5 mg/Kg) se detectaron 2 o más cuerpos lúteos.

Los animales tratados con RU-486 y  $5\alpha$ -NET (Experimento 2), se identificó igualmente el cuerpo lúteo. En los animales no gestantes tomados como control no se identificó esta estructura.

En todos los casos no se observaron cambios patológicos aparentes en la morfología del parénquima ovárico.

Las glándulas intersticiales fueron muy notables y abundantes en todos los casos; siendo una característica de especie (Ver figura 1).

#### 1.2 TUBAS UTERINAS (OVIDUCTOS):

a) Empleo de diversas dosis de  $5\alpha$ -NET (Experimento 1).

En la porción infundíbulo-ámpula el grupo control de conejas gestantes tratadas con el vehículo (PPG) mostró un marcado predominio de células no secretoras (PAS -) en relación con las células secretoras (PAS +), de tal forma que de cada tres células, 2 fueron PAS - (Ver Tabla 1).

Las hembras fertilizadas tratadas con  $5\alpha$ -NET en las dosis de 0.5, 2.5 y 5 mg/Kg/día / 7 días mostraron una menor cantidad de células PAS- en relación con el grupo control (tratadas con PPG) esta diferencia fué significativa ( $p < 0.05$ ) en el análisis estadístico (ANDEVA)..

Los animales tratados con  $5\alpha$ -NET en dosis de 1 y 1.5 mg/Kg/día / 7 días en esta misma porción (infundíbulo-ámpula) mostraron una cantidad de células PAS - similar a las del grupo control, no observándose diferencias significativas entre estos grupos (Ver Tabla 1); se compararon estas dosis

de 5 $\alpha$ -NET (1 y 1.5 mg/Kg) con las demás dosis de este metabolito, y se observó mayor cantidad de células PAS - , esta diferencia fué significativa ( $p < 0.05$ ) en el Análisis de Varianza (ANDEVA) (Ver Figura 2).

En el istmo de las conejas gestantes (tratadas con PPG) se observó un patrón inverso a la región anterior, ya que el número de células PAS - fué aproximadamente la mitad del número de células PAS+ (Ver Tabla 1). No se observaron diferencias estadísticas con las dosis de 0.5 , 1, 1.5 y 2.5 mg/Kg /día/7 días y el grupo tratado con PPG cuando se comparó el número de células PAS -. Con la dosis de 5 $\alpha$ -NET de 5 mg/Kg/día/ 7 días en esta misma porción se observó un número de células PAS- significativamente menor ( $p < 0.05$ ) en relación con el grupo control (PPG) y las dosis de 5 $\alpha$ -NET (Ver Tabla 1). La cantidad de células no secretoras fué en la mayoría de los casos inversamente proporcional a las dosis de 5  $\alpha$ -NET.

En forma complementaria a los resultados antes descritos puede señalarse que en el infundíbulo y ámpula el menor número de células secretoras (PAS +) se observó en los animales tratados con PPG (Ver Tabla 1). La cuantificación de células PAS + fué más homogéneo con las diversas dosis de 5  $\alpha$ -NET, sin embargo con las dosis de 1 y 1.5 mg/Kg/día/7 días se observó al igual que con el grupo tratado con PPG una menor proporción de células PAS + que PAS -; no se observaron diferencias estadísticas entre estos grupos cuando se comparó el número de células PAS +.

En el istmo predominaron marcadamente las células PAS + sobre las PAS - en todos los grupos (Ver figura 3). Cuando se empleó la 5  $\alpha$ -NET en dosis de 5 mg/Kg/día/7 días se obtuvo un número de células PAS + significativamente superior ( $p < 0.05$ ) en relación con las demás dosis de 5 $\alpha$ -NET y el grupo control (PPG).

**TABLA 1: PROMEDIO DE CELULAS SECRETORAS (PAS +) Y NO SECRETORAS (PAS -) DEL EPITELIO DE LAS TUBAS UTERINAS, EN CONEJAS FERTILIZADAS TRATADAS CON DIVERSAS DOSIS DE 5 ALFA NET**

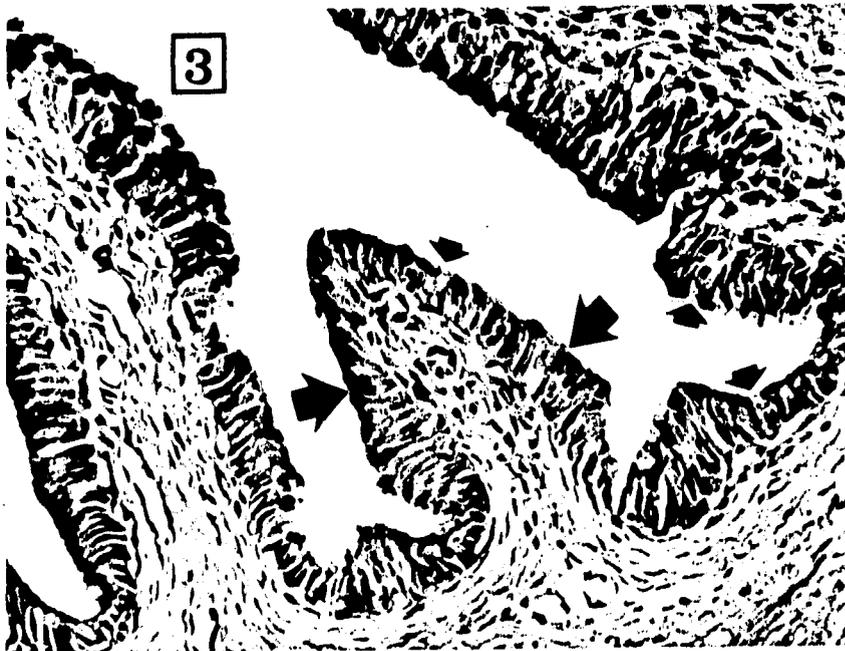
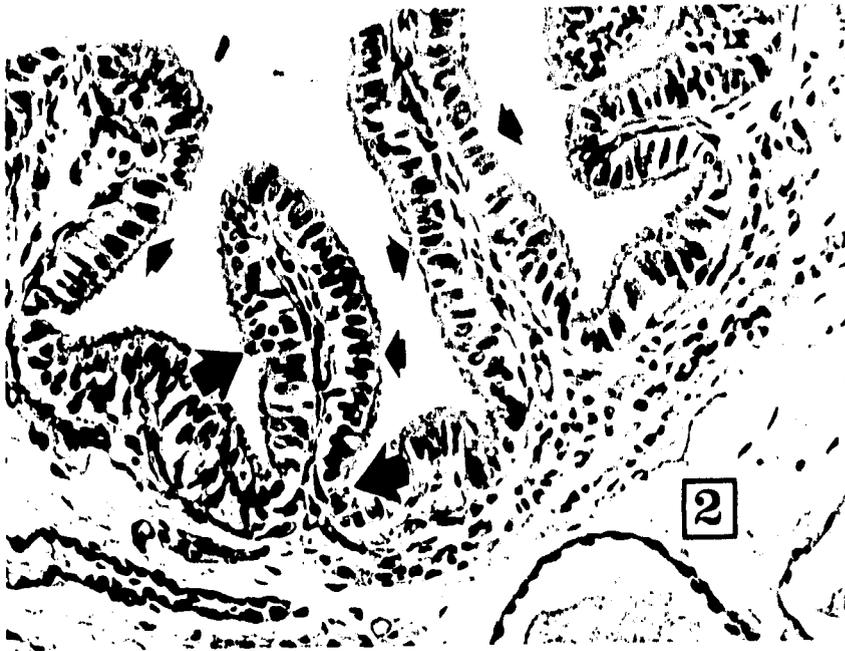
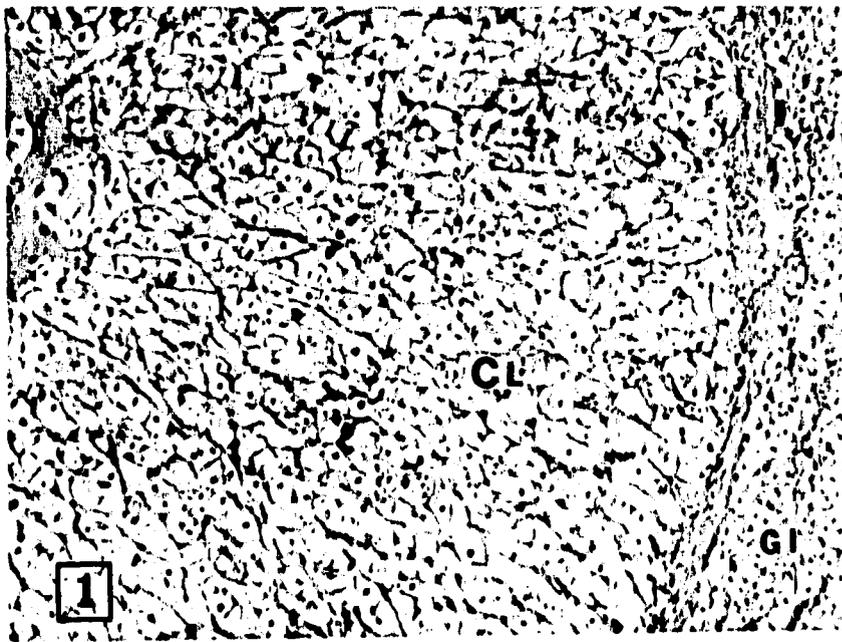
<b>INFUNDIBULO-AMPULA TRATAMIENTOS</b>	<b>NO SECRETORAS (PAS -) <math>\bar{X} \pm D.E.</math></b>	<b>SECRETORAS (PAS +) <math>\bar{X} \pm D.E.</math></b>
<b>PPG</b>	<b>6.275 <math>\pm</math> 2.187*</b>	<b>3.000 <math>\pm</math> 2.278</b>
<b>5<math>\alpha</math>-NET 0.5mg/Kg</b>	<b>3.000 <math>\pm</math> 1.414</b>	<b>5.150 <math>\pm</math> 1.694</b>
<b>5<math>\alpha</math>-NET 1 mg/Kg</b>	<b>4.475 <math>\pm</math> 2.565*</b>	<b>4.325 <math>\pm</math> 2.048</b>
<b>5<math>\alpha</math>-NET 1.5 mg/Kg</b>	<b>5.857 <math>\pm</math> 2.080*</b>	<b>3.809 <math>\pm</math> 1.887</b>
<b>5<math>\alpha</math>-NET 2.5 mg/Kg</b>	<b>2.129 <math>\pm</math> 1.024</b>	<b>4.225 <math>\pm</math> 2.552</b>
<b>5<math>\alpha</math>-NET 5 mg/Kg</b>	<b>2.047 <math>\pm</math> 1.342</b>	<b>5.071 <math>\pm</math> 2.052</b>
<b>ISTMO</b>		
<b>PPG</b>	<b>2.950 <math>\pm</math> 1.153</b>	<b>5.750 <math>\pm</math> 1.463</b>
<b>5<math>\alpha</math>-NET 0.5 mg/Kg</b>	<b>2.300 <math>\pm</math> 1.719</b>	<b>5.800 <math>\pm</math> 1.576</b>
<b>5<math>\alpha</math>-NET 1 mg/Kg</b>	<b>2.100 <math>\pm</math> 1.392</b>	<b>5.300 <math>\pm</math> 2.232</b>
<b>5<math>\alpha</math>-NET 1.5 mg/Kg</b>	<b>2.155 <math>\pm</math> 1.298</b>	<b>5.282 <math>\pm</math> 2.115</b>
<b>5<math>\alpha</math>-NET 2.5 mg/Kg</b>	<b>2.040 <math>\pm</math> 1.228</b>	<b>5.200 <math>\pm</math> 1.399</b>
<b>5<math>\alpha</math>-NET 5 mg/Kg</b>	<b>1.400 <math>\pm</math> 1.173 *</b>	<b>6.700 <math>\pm</math> 1.567 *</b>

**Los tratamientos se realizaron diariamente del día 1 al 7 de la gestación  
Los valores señalados con \* indican diferencia estadística (p < 0.05) por ANDEVA  
con respecto a los demás**

Figura [1] : Ovario de coneja fertilizada tratada con 5 $\alpha$ -NET (1 mg/Kg) . Cuerpo Lúteo (C.L.) y Glándulas intersticiales (G.I.) H.E. Aumento 100x.

Figura [2] : Oviducto . Infundíbulo-ámpula . Se observan las células secretoras (PAS +) flechas gruesas y células no secretoras (PAS -) flechas delgadas. Tinción PAS Aumento 400x

Figura [3] : Oviducto. Istmo. Se observan células PAS + (flechas gruesas) y células PAS - (flechas delgadas) . Aumento 400x.



El promedio de células totales varió en las dos porciones y entre los diversos grupos (datos no mostrados). En el infundíbulo-ámpula el mayor número de células totales se presentó en el grupo de 5  $\alpha$ -NET 1.5 mg/Kg seguido por el el grupo control (PPG) y 5  $\alpha$ -NET 1 mg/Kg , los demás grupos mostraron cantidades menores, siendo en algunos casos (como el de 2.5 mg/Kg) la diferencia de hasta 3 unidades menos. En el istmo el mayor número de células totales fué para el grupo control (PPG) seguida por la dosis más baja (0.5 mg/Kg) y la más alta (5 mg/Kg) de 5  $\alpha$ -NET, el resto presentó un ligero descenso de células totales.

b) Empleo de diversas progestinas sintéticas a los 8 días de la gestación (Experimento 2).

Los resultados se resumen en la Tabla 2.

El mayor número de células PAS - en las dos porciones consideradas (infundíbulo-ámpula e istmo) se detectó en el grupo de la hembras gestantes (PPG) sin embargo no existieron diferencias significativas cuando se compararon con los animales tratados con RU-486 (1 mg/Kg) o bien las que recibieron 5  $\alpha$ -NET (1 , 1.5 mg/Kg).

En la porción infundíbulo-ámpula se observó menor cantidad de células PAS + en relación con las PAS - . Al comparar la cantidad de células PAS + entre el grupo control (PPG) y los tratados con progestinas sintéticas (RU-486 y 5 $\alpha$ -NET) no se observaron diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.05$ ) por la prueba de Tukey.

El istmo mostró un marcado predominio de las células PAS + en relación con las PAS -, esta tendencia se observó en todos los casos.

El istmo muestra en general poca variación celular, por lo que la consideramos muy estable y poco sensible a los compuestos probados.

En el istmo no se determinaron diferencias estadísticas entre el grupo control (PPG) y las progestinas utilizadas (5 $\alpha$ -NET y RU-486) cuando se compararon entre sí el número de células PAS - o bien PAS + (Ver Tabla 2).

**TABLA 2: PROMEDIO DE CELULAS SECRETORAS (PAS +) Y NO SECRETORAS (PAS -) DEL EPITELIO DE LAS TUBAS UTERINAS , EN CONEJAS FERTILIZADAS TRATADAS CON 5 ALFA NET, RU-486 Y CON PPG.**

<b>INFUNDIBULO-AMPULA TRATAMIENTOS</b>	<b>NO SECRETORAS (PAS -) <math>\bar{X} \pm D.E.</math></b>	<b>SECRETORAS (PAS +) <math>\bar{X} \pm D.E.</math></b>
<b>PPG</b>	<b>6.275 <math>\pm</math> 2.187</b>	<b>3.000 <math>\pm</math> 2.278</b>
<b>5<math>\alpha</math>-NET 1 mg/Kg</b>	<b>4.475 <math>\pm</math> 2.565</b>	<b>4.325 <math>\pm</math> 2.048</b>
<b>5<math>\alpha</math>-NET 1.5 mg/Kg</b>	<b>5.857 <math>\pm</math> 2.080</b>	<b>3.809 <math>\pm</math> 1.887</b>
<b>RU-486 1mg/Kg</b>	<b>5.150 <math>\pm</math> 1.460</b>	<b>3.450 <math>\pm</math> 1.538</b>
<b>ISTMO</b>		
<b>PPG</b>	<b>2.950 <math>\pm</math> 1.153</b>	<b>5.750 <math>\pm</math> 1.463</b>
<b>5<math>\alpha</math>-NET 1 mg/Kg</b>	<b>2.100 <math>\pm</math> 1.392</b>	<b>5.300 <math>\pm</math> 2.232</b>
<b>5<math>\alpha</math>-NET 1.5 mg/Kg</b>	<b>2.155 <math>\pm</math> 1.298</b>	<b>5.282 <math>\pm</math> 2.115</b>
<b>RU-486 1 mg/Kg</b>	<b>2.100 <math>\pm</math> 1.032</b>	<b>5.575 <math>\pm</math> 0.957</b>

**Los tratamientos se realizaron diariamente del día 1 al 7 de la gestación.**

**No se observaron diferencias significativas entre los diversos grupos por el método de Tukey.**

Cuando se cuantificaron el número de células totales, se observó en el infundíbulo-ámpula el mayor número en los animales tratados con 5 $\alpha$ -NET (1.5 mg/Kg), seguida por PPG y finalmente RU-486. En el istmo, en cambio la máxima cantidad se detectó en las conejas gestantes (PPG), seguidas por el grupo tratado con RU-486 y finalmente 5 $\alpha$ -NET.

La dosis de 1.5 mg/Kg de 5  $\alpha$ -NET se consideró la idónea pues presentó la máxima actividad antiprogestacional y de implantación sin provocar alteraciones patológicas, como se verá más adelante.

### 1.3 UTERO

#### a) Efecto de diversas dosis de 5 $\alpha$ -NET (Experimento 1).

La evaluación al microscopio de luz es acorde con la observación macroscópica de presencia o ausencia de implantación (Tabla 3).

TABLA 3. EFECTOS DE NET Y SUS METABOLITOS EN LA IMPLANTACION Y SEÑAL DEL FACTOR DE GESTACION TEMPRANA (FGT).

Tratamientos	Dosis diaria* (mg/kg)	No.conejas gestantes/ cruzadas	Sitios de Implantación	Señal EPF
Vehiculo		6/6	9-10	+
NET	1.0	6/6	9-10	+
5 $\alpha$ -NET	1.0	7/9	3-4	+
	1.5	0/6	0	-
	2.5	0/6	0	-
	5.0	0/6	0	-
3 $\beta$ , 5 $\alpha$ -NET	1.0	0/6	0	-
17 $\beta$ -E2	1.0	0/6	0	-
RU-486	1.0	0/6	0	-

\* Días consecutivos. Todas las muestras fueron analizadas en el día 8 después de la cruce. Tomado de Castro *et. al.* 1995.

Se observó implantación y presencia de sincitios en el endometrio de conejas tratadas con PPG (animales control) (Ver figura 4); también se observó en las conejas tratadas con 5 $\alpha$ -NET en las dosis bajas de 0.5 mg/kg (100% de los animales fertilizados) y 1 mg/kg (77%), en este último caso en el que no se logró impedir la implantación disminuyeron marcadamente el número de implantaciones observadas por cada animal comparadas con las presentes en las hembras tratadas con PPG (Ver Tabla 3).

Se impidió la nidación en el 100% de las conejas tratadas con las demás dosis de 5 $\alpha$ -NET (1.5, 2.5 y 5 mg/kg) (Ver Tabla 3); en estos animales no se identificó la presencia de sincitios.

Se observó necrosis coagulativa del endometrio en las conejas tratadas con 2.5 y 5 mg/kg, en estos últimos además se distinguieron fibrosis del miometrio. (Ver figura 5).

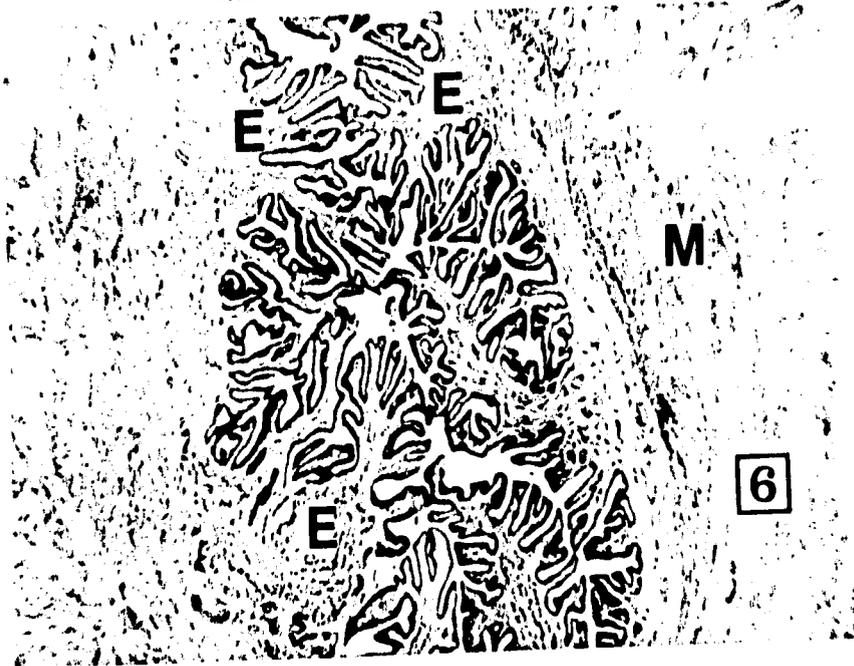
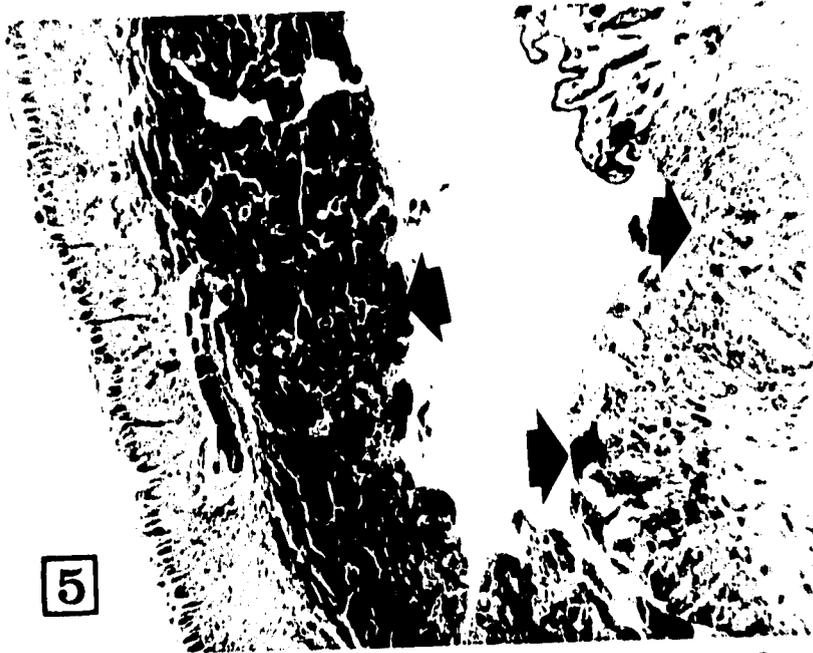
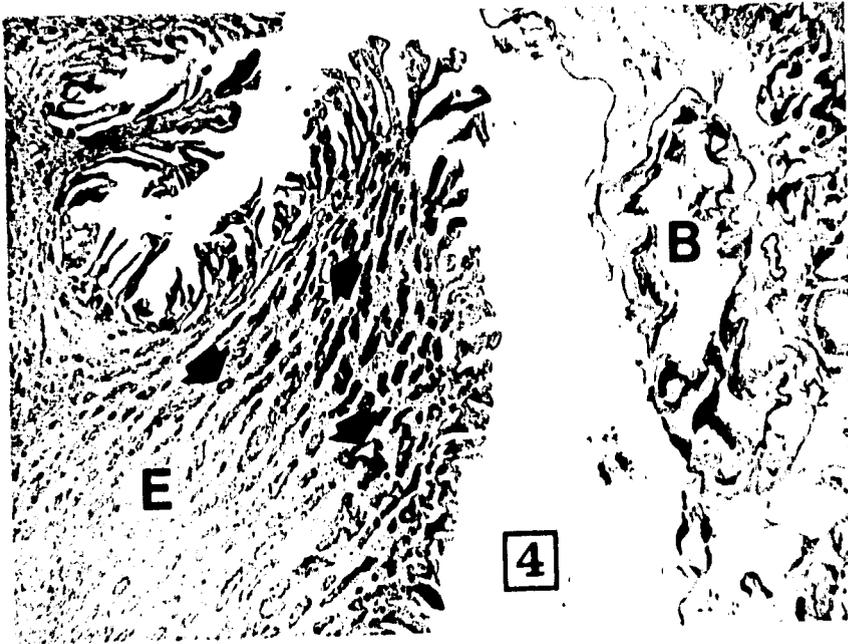
b) Empleo de diversas progestinas sintéticas durante los primeros 7 días de gestación (Experimento 2).

Los tratamientos que inhibieron la implantación fueron: 5 $\alpha$ -NET: 1, 1.5 mg/Kg y RU-486: 1 mg/kg. No se observaron sincitios en las hembras tratadas con 5 $\alpha$ -NET 1.5 mg/Kg/día/7 (Ver figura 6) días y con el antiprogestágeno de referencia RU-486 1 mg/Kg/día/7 días. En ninguna de estas muestras se distinguieron cambios patológicos en las diversas capas de histológicas del útero.

Figura [4] : Utero de conejas a los 8 días de la gestación tratadas con el vehículo (PPG). Se observa el endometrio (E) con gran número de glándulas endometriales (flechas) y Blastocisto (B). H.E. . Aumento 31.25x.

Figura [5]: Utero de coneja tratada con 5 $\alpha$ -NET (2.5 mg/Kg) .Se observa necrosis coagulativa del endometrio (flechas). H.E. Aumento 31.25 x.

Figura [6]: Utero de coneja tratada con 5 $\alpha$ -NET (1.5 mg/Kg). Se muestran diversas capas histológicas: endometrio (E) y miometrio (M). H.E. Aumento 31.25x.



#### MORFOMETRIA

En el estudio morfológico por planimetría. (Tabla 4) se compararon los animales gestantes (PPG) con los animales que recibieron 5 $\alpha$ -NET (1 y 1.5 mg/Kg) y RU-486 (1 mg/Kg); en el estudio planimétrico del tejido glandular y el estroma, se observó mayor superficie glandular en los animales gestantes (tratados con PPG) en comparación con los grupos que recibieron alguna progestina sintética.

La 5 $\alpha$ -NET (1 mg/kg/día/7 días) presentó una inhibición de la transformación endometrial (I.E.) de 20% , sin embargo cuando se utilizó la dosis de 1.5 mg/Kg/día /7 días se eleva a más del doble el efecto inhibitorio de la transformación endometrial (I.E. de 54%) (Ver Tabla 4) ; al comparar esta dosis idónea de 5  $\alpha$ -NET con RU-486 (1 mg/Kg/día/7 días) los valores de I.E. son ligeramente inferiores (aproximadamente en 7 %).

En el ensayo de Mc-Phail (1934) es importante destacar que el RU-486 logra valores a ED 1 (Ver Material y Métodos), la 5 $\alpha$ -NET (1.5 mg/Kg) se sitúa entre ED 1 y 2 y las conejas gestantes tratadas con PPG valores de ED de 4 (superiores al 60% de K%). Ver tabla 4.

#### INDICES DE MITOSIS Y APOPTOSIS

En el Experimento 2 se obtuvieron los valores que se resumen en la Tabla 5. En el análisis estadístico (Kruskall-Wallis) del I.M. no se observaron diferencias significativas en las células del lumen para los diversos tratamientos con 5 $\alpha$ -NET (1 y 1.5mg/Kg) y RU-486.

El tratamiento con 5 $\alpha$ -NET 1 mg/Kg abate por completo el I.M. de las glándulas (Ver Tabla 5) por lo que se observó una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre este grupo y los demás (tratados con progestinas sintéticas o bien el vehículo). En cambio no se determinaron diferencias en el I.M. del tejido glandular de los animales tratados tanto con 5  $\alpha$ -NET (1.5 mg/Kg) y RU-486 (1 mg/Kg) en comparación con las hembras gestantes (tratadas con PPG) (Ver figura 7).

**TABLA 4: ACTIVIDAD ANTIPROGESTACIONAL DE LA 5ALFA NET (ENSAYO DE Mc PHAIL)**

\*Mediciones realizadas por planimetría.

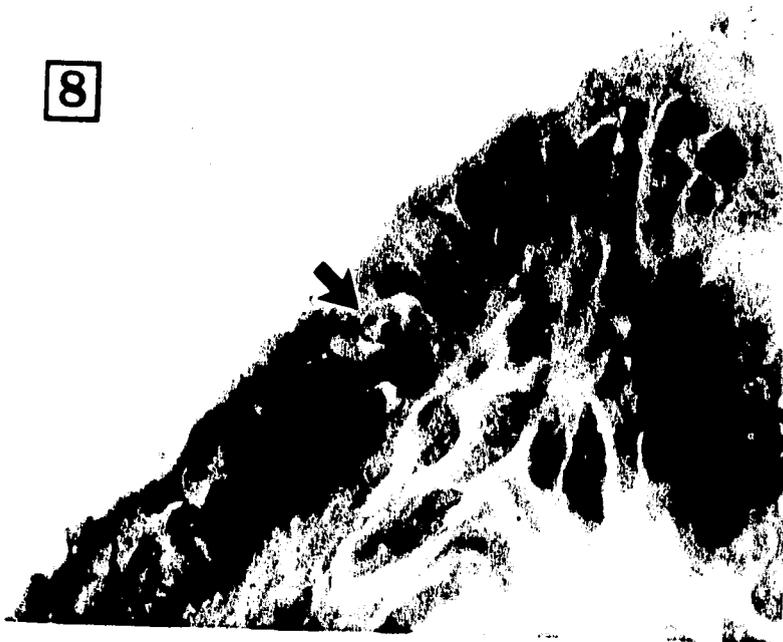
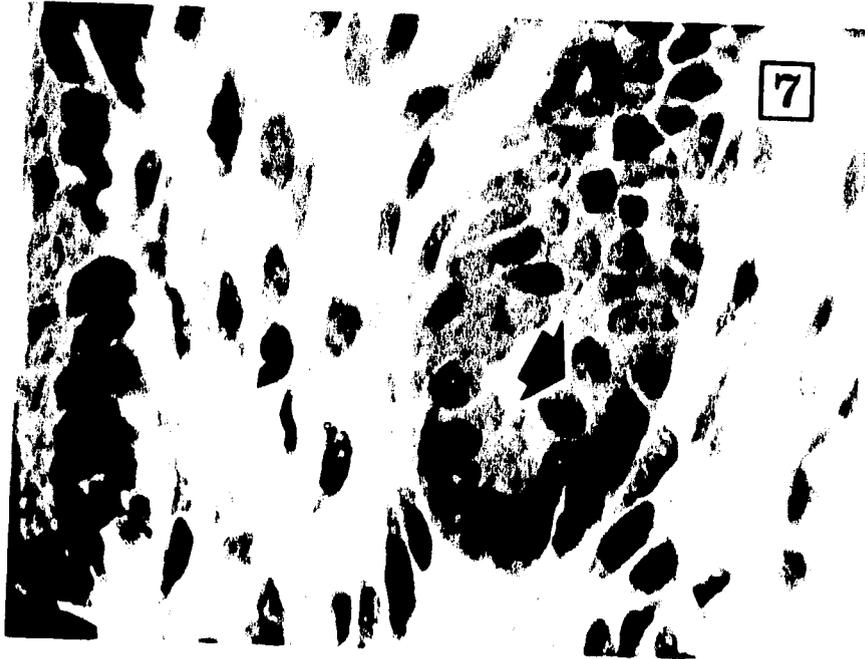
\*\*Los valores de K corresponden al ensayo de Mc Phail como sigue:25%=ED 1, 60%=ED 4.

<b>COMPUESTOS</b>	<b>DOSIS</b>	<b>* G</b>	<b>* S</b>	<b>**K(%)</b>	<b>I.E. (%)</b>
<b>PPG</b>	<b>-</b>	<b>2284</b>	<b>1136</b>	<b>66.78%</b>	<b>00.00%</b>
<b>RU-486</b>	<b>1 mg/Kg</b>	<b>479</b>	<b>1385</b>	<b>25.70%</b>	<b>61.52%</b>
<b>5 <math>\alpha</math>-NET</b>	<b>1 mg/Kg</b>	<b>697</b>	<b>1315</b>	<b>53.00%</b>	<b>20.63%</b>
<b>5 <math>\alpha</math>-NET</b>	<b>1.5 mg/Kg</b>	<b>619</b>	<b>1430</b>	<b>30.21%</b>	<b>54.76%</b>

**G=Tejido glandular S=Tejido conjuntivo (estroma) K(%) Relación entre el tejido glandular y el estroma I.E.= Efecto inhibitor de la transformación endometrial**

Figura 7: Mitosis en glándula endometrial (flecha) . Coneja no gestante . Hematoxilina Férrica . Aumento 1250x.

Figura 8: Apoptosis en el epitelio de revestimiento del lumen uterino (flecha) . Coneja no gestante . H.E. Aumento 1250x.



No se observaron diferencias significativas entre los animales tratados con PPG y los animales tratados con las diversas progestinas sintéticas.

En el estudio del I.A. de los animales tratados con progestinas sintéticas y conejas gestantes se obtuvieron resultados que se resumen en la Tabla 5. Los valores más altos de I.A. en las células epiteliales del lumen se observaron en los animales tratados con 5 $\alpha$ -NET 1.5 mg/Kg con valores cercanos al 3%, sin embargo en análisis estadístico no se observaron diferencias significativas ya sea entre los animales tratados con PPG , o bien los demás grupos (5 $\alpha$ -NET 1mg/Kg, RU-486 1mg/Kg). Para las células glandulares se obtuvieron I.A. siempre mayores a los de las células luminales, fluctuando entre un 2 y un 3 % aproximadamente. Los índices más bajos se observaron en las conejas gestantes (PPG); mientras que en los animales tratados con progestinas sintéticas (RU-486 y 5 $\alpha$ -NET) el I.A. fué ligeramente superior al de los animales gestantes, sin embargo al igual que en el caso anterior las diferencias no fueron significativas desde el punto de vista estadístico por la prueba de Kruskal Wallis (Siegel, 1980) (Ver figura 8).

En conclusión a los 8 días de la gestación no se observaron variaciones drásticas en la mitosis y en la apoptosis en los animales gestantes y en los animales tratados; excepción hecha del I.M. de las células glandulares.

**TABLA 5 : INDICES DE MITOSIS Y APOPTOSIS DE LAS CELULAS EPITELIALES  
DEL UTERO DE CONEJAS FERTILIZADAS TRATADAS CON DIVERSAS PROGESTINAS SINTETICAS  
A LOS 8 DIAS DE LA GESTACION**

<b>INDICE DE MITOSIS TRATAMIENTOS</b>	<b>LUMEN <math>\bar{X} \pm SEM</math></b>	<b>GLANDULAS <math>\bar{X} \pm SEM</math></b>
<b>C.N.</b>	<b>0.200 <math>\pm</math> 0.074</b>	<b>1.00 <math>\pm</math> 0.91 *</b>
<b>PPG</b>	<b>0.235 <math>\pm</math> 0.136</b>	<b>0.294 <math>\pm</math> 0.142</b>
<b>RU-486 1mg/Kg</b>	<b>0.208 <math>\pm</math> 0.084</b>	<b>0.208 <math>\pm</math> 0.084</b>
<b>5<math>\alpha</math>-NET 1 mg/Kg</b>	<b>0.043 <math>\pm</math> 0.043</b>	<b>0 <math>\pm</math> 0 **</b>
<b>5<math>\alpha</math>-NET 1.5 mg/Kg</b>	<b>0.125 <math>\pm</math> 0.095</b>	<b>0.125 <math>\pm</math> 0.095</b>
<b>INDICE DE APOPTOSIS</b>		
<b>C.N.</b>	<b>1.138 <math>\pm</math> 0.285</b>	<b>4.067 <math>\pm</math> 0.786</b>
<b>PPG</b>	<b>1.529 <math>\pm</math> 0.569</b>	<b>2.176 <math>\pm</math> 0.625</b>
<b>RU-486 1mg/Kg</b>	<b>1.333 <math>\pm</math> 0.286</b>	<b>2.958 <math>\pm</math> 0.644</b>
<b>5<math>\alpha</math>-NET 1mg/Kg</b>	<b>1.444 <math>\pm</math> 0.338</b>	<b>3.091 <math>\pm</math> 0.580</b>
<b>5<math>\alpha</math>-NET 1.5 mg/Kg</b>	<b>2.750 <math>\pm</math> 0.622</b>	<b>3.375 <math>\pm</math> 0.943</b>

PPG= PROPILENGLICOL (VEHICULO), C.N.=CONEJA NO GESTANTE

$\bar{X}$  = MEDIA    S.E.M. = ERROR ESTANDAR DE LA MEDIA.

\* o \*\* indican diferencia significativa (p < 0.05) con respecto a los demás grupos por Kruskal Wallis

## 2. INMUNOHISTOQUIMICA DEL UTERO

### 2.1 UTEROGLOBINA

La presencia de UTG, se observó exclusivamente en el tejido epitelial de revestimiento y/o en el glandular del endometrio.

En los animales no gestantes (control negativo), la detección fue escasa y localizada, a diferencia de las conejas gestantes tratadas con el vehículo (PPG), en las que se observa gran desarrollo glandular y arborización, así como una localización extensa de la marca tanto en el epitelio de revestimiento como en el glandular, pudo observarse inmunoreactividad en la luz de regiones adyacentes a las células epiteliales denotando no únicamente el almacenamiento intracelular de UTG, sino también su secreción activa hacia la luz (Ver figura 9).

Experimento 2 : Utilización de diversas progestinas sintéticas durante los primeros días de la gestación.

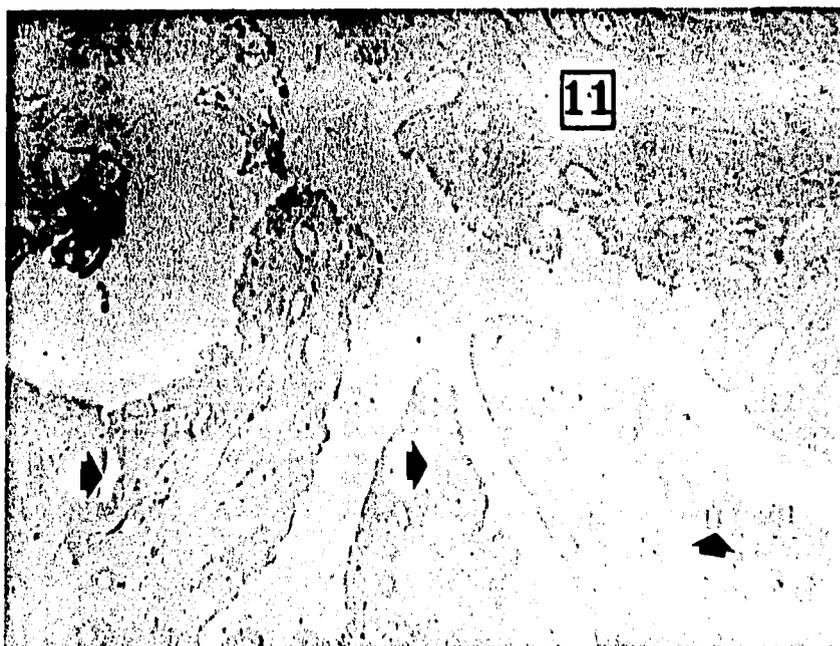
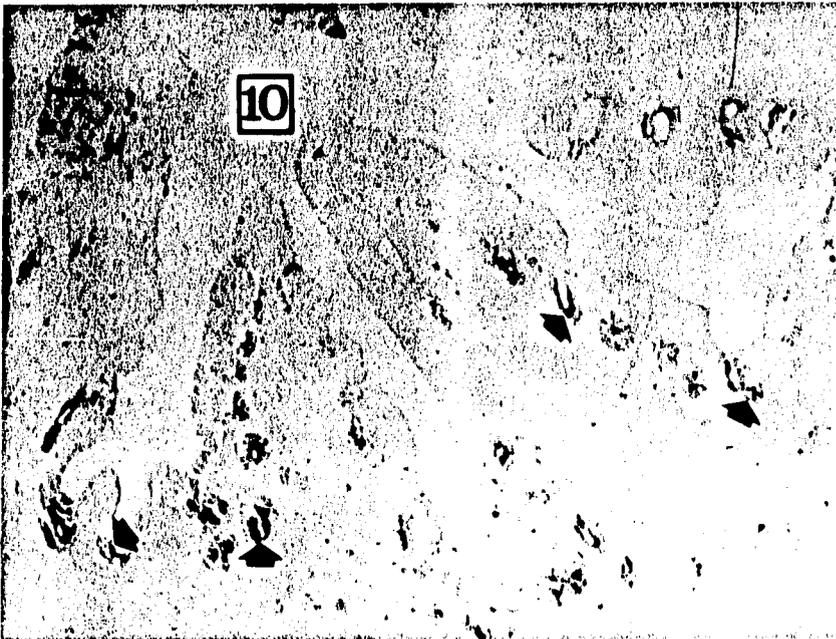
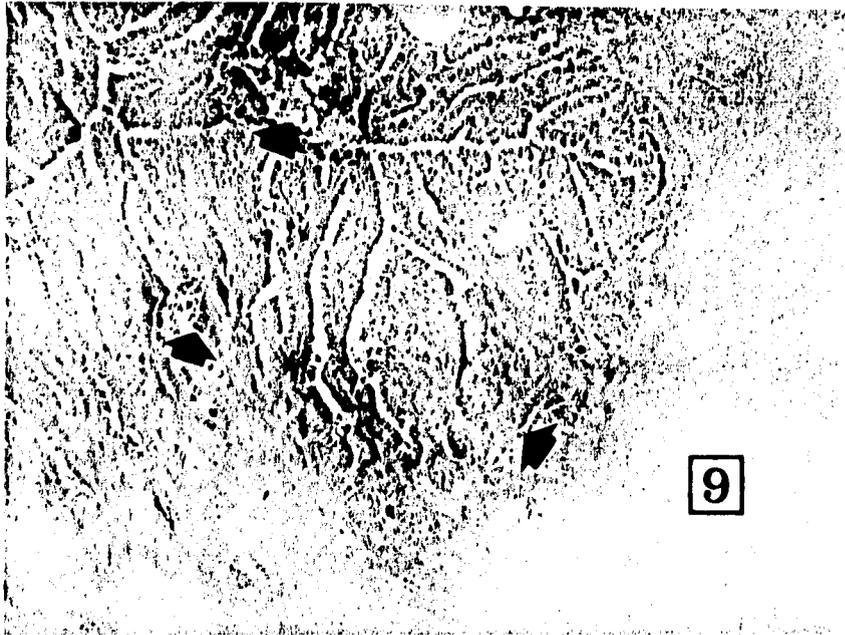
La observación con el microscopio fotónico en los animales tratados con RU-486 y 5 $\alpha$ -NET ( dosis de 1 y 1.5 mg/Kg/día/7días ) mostró una disminución en la marca al día 8 de la gestación en relación con el grupo control ( PPG ).

En el estudio inmunohistoquímico se observó UTG inmunorreactiva exclusivamente en la porción apical de las células epiteliales situadas en el fondo de las glándulas endometriales de conejas tratadas con 1mg/Kg por 7 días de 5 $\alpha$ -NET. (Ver figura 10 y 11).

Figura **9**: Localización inmunohistoquímica (Peroxidasa-Antiperoxidasa) de UTG en el endometrio y lumen (flechas) de la coneja a los 8 días de gestación. Aumento 31.25x.

Figura **10**: Localización inmunohistoquímica (Peroxidasa-Antiperoxidasa) de UTG (flechas) en la porción apical de las células glandulares del útero. Coneja tratada con 5 $\alpha$ -NET (1.5 mg/Kg). Aumento 31.25x.

Figura **11**: Control de la Inmunohistoquímica de UTG. Se substituyó el primer anticuerpo por suero normal de cabra (ver Materiales y Métodos) . Se observan glándulas endometriales (Flechas) Aumento 125x.



## 2.2 RECEPTOR A PROGESTERONA.

Se obtuvo el Puntaje Inmunoreactivo (IRS), estos valores se resumen en la Tabla 6.

La marca del RP se observó invariablemente en el núcleo de las células blanco (Ver figura 12).

El mayor puntaje inmunoreactivo para las tres porciones histológicas analizadas se obtuvo en las hembras no gestantes (en estro), estas muestras se utilizaron como control positivo a fin de determinar por comparación la intensidad de la marca; los animales gestantes tratados con el vehículo (PPG) mostraron una marcada disminución en el número de células con RP y menor intensidad de la marca por lo que los puntajes inmunoreactivos fueron bajos para las tres capas; cuando disminuye la cantidad de células con un receptor específico se presenta el efecto conocido como "regulación a la baja" ("down regulation").

Se evaluaron los RP de animales tratados diariamente por 7 días con dos dosis de RU-486: 0.5 y 1 mg/Kg, a fin de conocer posibles variaciones entre ellos. En las conejas que recibieron la dosis baja de RU-486 (0.5 mg/Kg) se observó un porcentaje bajo de células con RP en las tres capas histológicas (down regulation), sin embargo para el tejido epitelial se determinó gran intensidad de la marca (+++ = 3) por lo que se elevó su IRS; para el conjuntivo y músculo la intensidad fue media (++ = 2) por lo que los valores de IRS fueron los mismos, el comportamiento en estas dos últimas capas fué inusual en comparación con los demás animales. Las conejas que recibieron dosis mayores de RU-486 (1 mg/Kg) presentaron mucha mayor cantidad de células con el RP pero con intensidad de la marca de + ó ++, sus puntajes fueron mayores en el conjuntivo y músculo pero menores en el epitelio en comparación con 0.5 mg/Kg de RU-486; el RP sólo se observó en las células glandulares y no en las del lumen de los animales que recibieron RU-486 1 mg/Kg (Ver figura 13 Y 14). El miometrio de los animales tratados con RU-486 1 mg/Kg presentó el mayon número de células con marca para el

RP, pero con intensidad de la marca baja por lo que su puntaje inmunoreactivo (IRS) fué menor al de los animales no gestantes.

Estos datos indican que el RU-486 aplicado por 7 días consecutivos provocó disminución en el I.R.S. del RP con las dos dosis utilizadas: 0.5 y 1 mg/Kg. El porcentaje de células con el RP fué directamente proporcional a la dosis empleada.

Se estudiaron también dos dosis de 5  $\alpha$ -NET: 1 mg/Kg/día/7 días y 1.5 mg/Kg/día /7 días, como ya ha sido señalado estas dosis mostraron capacidad antiprogestacional y antiimplantación. Con la dosis menor de 5  $\alpha$ -NET el porcentaje y la intensidad de la marca del epitelio fué menor a los de las hembras no gestantes, es decir se observó regulación a la baja; estos valores fueron similares al del RU-486 a la misma dosis, el conjuntivo presentó también regulación a la baja del receptor e intensidad de marca menor que el RU-486 1 mg/Kg. Con la dosis idónea de 5  $\alpha$ -NET (1.5 mg/Kg) no se observó el RP en el epitelio y el músculo, siendo este tratamiento aplicado por 7 días el único que logró este efecto; el conjuntivo mostró un porcentaje mínimo de células, pero con intensidad de marca media, por lo que su puntaje se asemejó al del RU-486 (0.5 mg/K)g.

Los datos muestran que el 5  $\alpha$ -NET provoca regulación a la baja, los puntajes inmunoreactivos fueron inversamente proporcionales a la dosis empleada.

Se observó una mayor porcentaje de células con el RP en el tejido conjuntivo en todos los casos cuando se comparó con los RP del epitelio y miometrio, excepto para el RU-486 (0.5 mg/Kg).

El puntaje inmunoreactivo del miometrio tuvo un comportamiento semejante al del tejido epitelial en la mayoría de los casos, exceptuando nuevamente el RU-486 0.5 mg/Kg/día /7 días (Ver Tabla 6).

**TABLA 6: VALOR DE INMUNORREACTIVIDAD DEL RECEPTOR A PROGESTERONA EN LAS DIVERSAS CAPAS HISTOLOGICAS DEL UTERO DE CONEJAS A LOS 8 DIAS DE GESTACION TRATADAS CON RU-486 Y 5 ALFA NET.**

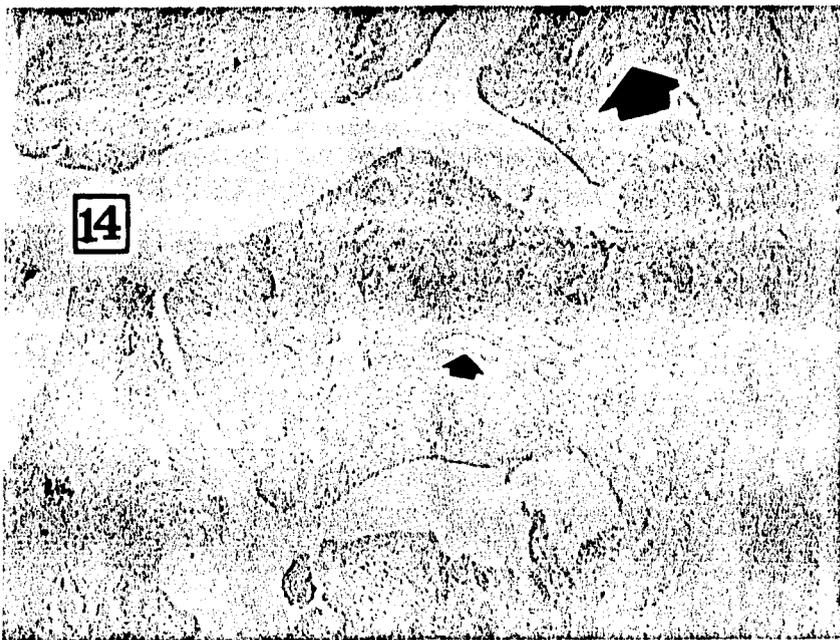
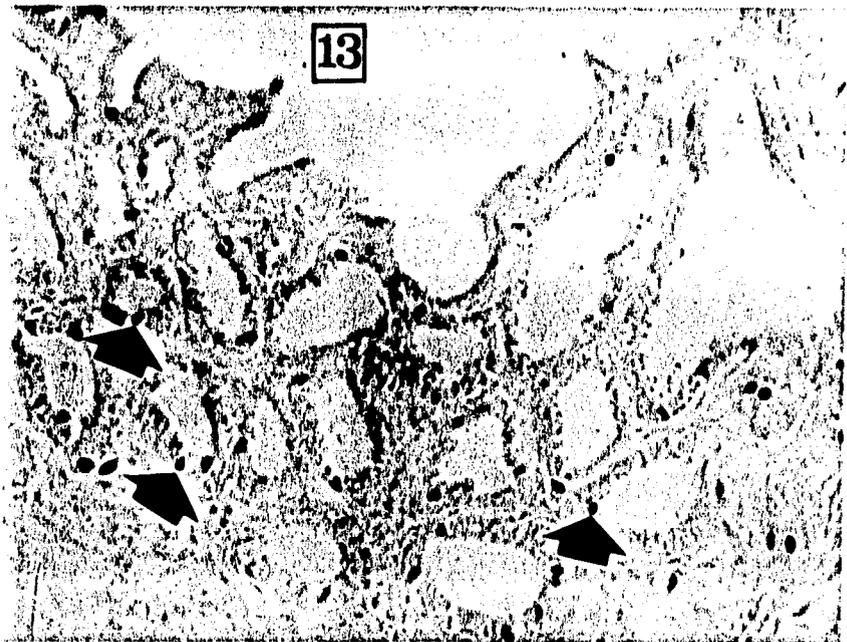
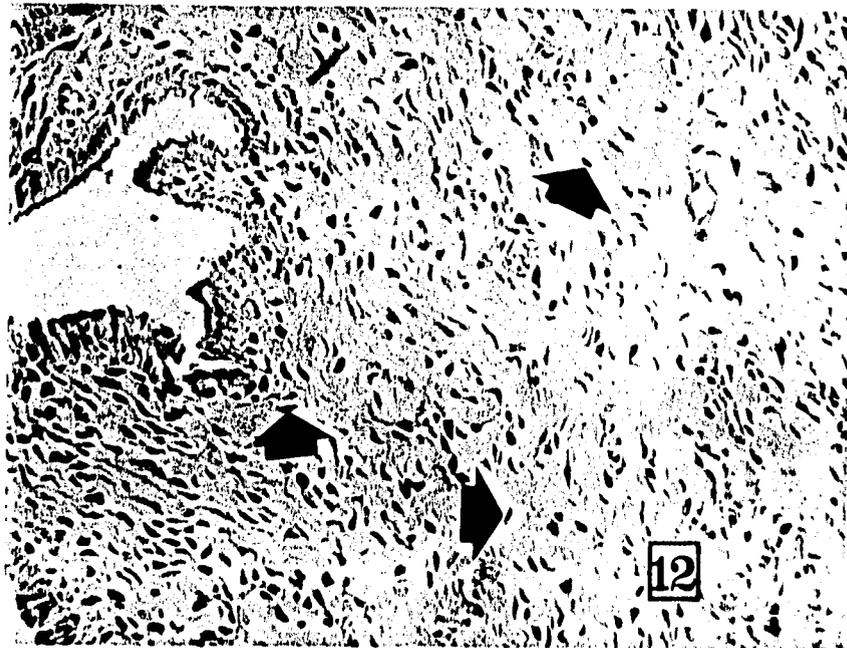
TRATAMIENTO	GLAND. Y EPIT.			ESTROMA			MIOMETRIO		
	I	%	IRS	I	%	IRS	I	%	IRS
NO GEST.	(++)	(88.63)	8	(+++)	(100.00)	12	(++)	(28.27)	4
GEST. PPG	(+)	(5.51)	1	(++)	( 22.9)	4	(+)	( 2.55)	1
RU-486 0.5 mg/Kg	(+++)	(14.63)	6	(++)	( 6.45)	2	(++)	( 5.61)	2
RU-486 1 mg/Kg	(+)	(42.28)	2	(++)	( 81.00)	8	(+)	(61.73)	3
5 $\alpha$ -NET 1 mg/Kg	(+)	(46.3)	2	(+)	( 53.85)	3	(+)	(31.22)	2
5 $\alpha$ -NET 1.5 mg/Kg	(-)		0	(++)	( 1.29)	2	(-)		0

**VALOR DE INMUNORREACTIVIDAD (IRS) ES EL PRODUCTO DE LA INTENSIDAD DE LA MARCA (0=NO MARCA , +=1 , ++= 2 , +++= 3) POR EL PORCENTAJE DE CELULAS POSITIVAS COMO SIGUE: 1-10%=1, 11-50%=2, 51-80%=3 Y 81-100%=4. LAS DOSIS MARCADAS SE APLICARON DIARIAMENTE POR 7 DIAS.**

Figura 12: Localización inmunohistoquímica del RP (flechas oscuras) en el endometrio uterino de conejas no gestantes . Aumento 312.5 x

Figura 13: Localización inmunohistoquímica del RP (flechas oscuras) en las células glandulares del endometrio uterino. Coneja tratada con RU-486 (1 mg/Kg). Aumento 12.5x.

Figura 14: Control de RP. Se sustituyó el anticuerpo primario con suero normal de ratón. (Ver Materiales y Métodos). Se observan glándulas endometriales (flechas oscuras) Aumento 125 x.



## VII DISCUSION

## OVARIOS

La presencia de cuerpos lúteos sólo es detectable en conejas cruzadas previamente ya que en esta especie la ovulación es inducida (Mc Donald, 1982) por lo que se requiere de la cópula para que posterior a la ovulación se forme el cuerpo lúteo a partir del cuerpo hemorrágico mediante el proceso de luteinización (Banks, 1986).

No se han estudiado a los metabolitos de la NET en relación con sus efectos sobre el parénquima ovárico y en particular sobre el cuerpo lúteo, por lo que además del Experimento 1 y 2 se analizaron ovarios de conejas tratadas con  $3\beta,5\alpha$ -NET (1mg/Kg/día/7 días) a fin de conocer sus efectos morfológicos sobre este órgano, en estos animales existió menor número de cuerpos lúteos y se encontraron poco desarrollados; en cambio se distinguieron 2 cuerpos lúteos con ciertas dosis de  $5\alpha$ -NET (1, 2.5 y 5 mg/Kg).

La NET es capaz de disminuir la concentración plasmática de LH, este efecto es considerado como estrogénico, debido a que también se observa cuando se aplica  $17-\beta$ -E2 y no así cuando se emplea P4 (Pérez-Palacios y col.1991). Las variaciones observadas en el desarrollo y cantidad de cuerpos lúteos no pueden explicarse de manera inmediata pues no se han descrito efectos específicos de los metabolitos de la NET sobre el ovario; sin embargo es factible pensar que los metabolitos modifiquen las concentraciones sanguíneas de gonadotropinas hipofisiarias (LH principalmente) y que esto influya con el grado de desarrollo y el número de cuerpos lúteos observados con los diversos tratamientos.

Ha sido descrito la atrofia del cuerpo lúteo en mujeres tratadas con RU-486 cuando se provoca aborto (Ulmann y col. 1990), estos efectos no fueron observados por nosotros, quizás por tratarse de experimentos en los primeros días de la gestación.

## OVIDUCTOS.

Existen diversos tipos celulares en el epitelio de las tubas uterinas, sin embargo dado que utilizamos la tinción especial de PAS (Ver Material y Métodos), nosotros la dividimos unicamente en dos poblaciones: secretoras (PAS +) y no secretoras (PAS -), por lo que al cuantificarlas se observa que el predominio de unas origina en forma concomitante la disminución en el número de las otras.

El empleo de diversas dosis de  $5\alpha$ -NET ocasiona variaciones importantes en las poblaciones epiteliales de las tubas uterinas. Cuando se utilizaron dosis de 1 y 1.5 mg/Kg se observó un mayor número de células no secretoras (ciliadas en su mayoría) en la porción del infundíbulo-ámpula, lo que aparentemente indicaría un efecto estrogénico, sin embargo lo mismo sucede con un animal tratado con 1 mg/Kg de RU-486 y con un animal gestante que recibió PPG, por lo que no puede concluirse que fuese este un efecto antiprogestacional; resulta interesante que estos resultados se hayan obtenido con las mismas dosis efectivas que pudieron impedir con éxito la implantación, sin provocar cambios patológicos en el endometrio uterino. Con las demás dosis de  $5\alpha$ -NET se observó predominio de células PAS +; es importante resaltar que con dosis 5 o 10 veces mayores de 0.5 mg/Kg se obtengan resultados similares, pero no así con dosis intermedias (de 1 y 1.5); estos resultados no pueden explicarse aún debido a que se desconoce mucho sobre la acción de este metabolito sobre el órgano.

Para las tubas uterinas además de utilizar el grupo control (PPG), animales tratados con  $5\alpha$ -NET (1.5 mg/Kg) y RU-486 (1 mg/Kg) (Experimento 2), se emplearon conejas tratadas con NET y  $3\beta$ - $5\alpha$ -NET (1 mg/Kg/día /7 días) a fin de dilucidar si ejercían algún efecto sobre este órgano y conocer el comportamiento de la progestina original (NET) en relación con sus metabolitos reducidos en el anillo "A" a las mismas dosis (datos no mostrados).

En las dos regiones utilizadas (infundíbulo-ámpula e istmo) se observó una marcada disminución en el número de células PAS - del grupo tratado con NET en relación con: el grupo control (PPG) para la porción infundíbulo-ámpula , o bien en el istmo con respecto a los demás grupos (tratados con metabolitos de la NET, RU-486 o bien el grupo tratado con PPG). Estas diferencias fueron significativas ( $p < 0.05$ ) al emplear la Prueba de Tukey (datos no mostrados). Por lo que la NET muestra la tendencia a disminuir la población de células PAS - en las dos porciones estudiadas. Así mismo se observó tanto en el infundíbulo -ámpula un predominio de células PAS + cuando los animales se trataron directamente con NET o el metabolito  $3\beta$ - $5\alpha$ -NET, lo cual contrasta con cantidades menores de estas células cuando se emplean dosis de  $5\alpha$ -NET (1 y 1.5 mg/Kg), RU-486 (1 mg/Kg), o bien en las grupo control (PPG), estas diferencias también fueron significativas ( $p < 0.05$ ) al utilizar la prueba de Tukey.

En el istmo se observó una tendencia similar de tal forma que el grupo que recibió 1.5 mg/Kg de  $5\alpha$  NET tubo el menor número de células PAS + siendo esta diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) cuando se compararon con los dos grupos: NET y  $3\beta$   $5\alpha$ -NET (datos no mostrados).

Estas variaciones indican que al realizar pequeñas variaciones en la molécula de la NET, se inducen cambios en las poblaciones celulares del oviducto en las dos porciones estudiadas, dicha variación es más marcada en la porción infundíbulo-ámpula que en el istmo; estas diferencias pueden explicarse posiblemente por las funciones reproductivas que se llevan a cabo en cada una de estas regiones, dichas funciones se discutirán más adelante. También se demuestra que los diversos efectos de una progestina pueden explicarse a través de los efectos individuales de sus metabolitos producidos en el órgano blanco.

Las diferencias encontradas entre la NET y sus metabolitos posiblemente indique que la progestina original

no es biotransformada en el oviducto, o bien que dicha biotransformación sea escasa.

Durante la gestación temprana en la coneja nosotros observamos en el infundíbulo ámpula un predominio de células PAS - (alrededor del 75% del total), en el día 2 de la gestación , seguida de una marcada disminución (menos del 50%) en los días 3 y 4, por consiguiente el número de células PAS+ se incrementó notablemente en este período; posteriormente las células PAS- paulatinamente aumentan en número hasta el día 8 en el que ocupan dos terceras partes del total (66%); en el istmo no se observó gran variación predominando invariablemente las células PAS + (datos no mostrados). Las variaciones con las diversas progestinas y dosis observadas con respecto al grupo control (PPG) son el reflejo de posibles modificaciones ejercidas en el número de células en los primeros días de gestación, dichas variaciones probablemente influyan en el transporte y maduración del producto impidiendo que al llegar al útero lo haga en las condiciones de desarrollo óptimo, o bien en el período idóneo para su implantación. Lo anterior supone que el efecto de anti-implantación no se deba exclusivamente a su acción sobre el útero sino también a sus efectos sobre las tubas uterinas.

En estudios realizados en humanos sobre los RE y RP en las trompas de Falopio, demuestran una gran cantidad en la región ampular (tanto en el epitelio como en el tejido conjuntivo o lámina propia), en comparación con el infundíbulo y el istmo, en estas últimas porciones los receptores se localizan en mayor cantidad en el músculo (Pollow, 1981; Punnonen and Lukola, 1981). En las tubas uterinas de la coneja se han realizado estudios que determinan a los RP y RE en la coneja y se ha determinado una regulación distinta en el ámpula y en el istmo (Hyde y col., 1989); cuando se administra 17-beta estradiol se eleva el número de receptores inmunoreactivos de progesterona en el conjuntivo y músculo del ámpula, por otro lado se incrementan los RP en el epitelio del istmo en ausencia de estradiol

(Hyde y col., 1989). Con base en estos hallazgos es fundamental el estudio en el futuro de los RP y RE en las tubas uterinas a fin de conocer más detenidamente el efecto de los metabolitos reducidos de la NET en este órgano.

El efecto antiprogestacional de la 5 $\alpha$ -NET sobre las tubas uterinas debe evaluarse con mayor detenimiento, mediante futuros estudios inmunohistoquímicos de los receptores a progesterona y estrógenos y su localización en las células PAS+ o -; lo cual daría mayores indicios de los mecanismos de acción de los metabolitos de la NET; por otro lado es conveniente considerar que dichos estudios se realicen como un seguimiento durante los primeros 3 días de la gestación, pues en este breve lapso se llevan a cabo eventos de importancia trascendental desde el punto de vista reproductivo como son: transporte de gametos, fecundación, inicio del desarrollo embrionario y transporte del producto hacia el útero.

En relación con el transporte del producto se conoce que los estrógenos incrementan la contracción de la musculatura lisa de este órgano e igualmente aceleran la velocidad del transporte del óvulo, la progesterona tiene un efecto antagónico (Hafez, 1980). El movimiento ciliar es muy importante para la captación del óvulo, pero una vez que esto ha sucedido, la contracción muscular es el factor más importante para su transporte en la mayor parte de las especies, exceptuando al gato y a los primates en las que se registra una baja actividad muscular (Hafez, 1980). La tasa de transporte es mayor en el infundíbulo y ámpula, siendo mucho menor en el istmo, la razón de esta marcada diferencia se supone que se debe a una mayor inervación adrenérgica de la musculatura en el istmo. El hecho de que en esta porción el producto avance lentamente, pudiera explicar por qué se observó a los 8 días de la gestación un predominio de células PAS+ con poca variación en su número, esto implica que la actividad secretora en esta región es importante para el producto ya que su permanencia es mayor que la de los dos

tercios anteriores, puede pensarse que permanezca la población secretora en forma predominante hasta el día 8 de la gestación. En las conejas la unión útero-tubárica ejerce una influencia de regulación en la entrada del huevo o cigoto al útero, esta porción se abre únicamente durante los días 3, 4 y 30 de la gestación, considerando que 72 horas (3 días) después del coito la mayor parte de los productos ya se encuentran en el útero (Hafez and Tsutsumi, 1966), podemos concluir que la apertura ocurre únicamente durante el transporte del huevo hacia el útero y al momento del parto (que ocurre entre los 30 y 32 días después de la ovulación, ver Tabla 7).

El estudio del fluido en las tubas uterinas ha permitido determinar compuestos característicos de acción progestacional como la deshidrogenasa láctica en la rata (Patterson, 1970), o bien ciertas proteínas moduladas por estrógenos en conejas. Aunque para el caso de la UTG, la secreción es constitutiva (o constante) es factible que el estudio bioquímico sobre la composición de la secreción permitiría encontrar algunos marcadores moleculares de efecto hormonal, que también ayuden a dilucidar el efecto de las progestinas derivadas de la NET.

TABLA 7: PRINCIPALES EVENTOS REPRODUCTIVOS EN EL CONEJO.

<u>EVENTO</u>	<u>DURACION</u>
VIDA FERTIL: ESPERMATOZOIDE	30-36 HORAS
OVULO	6-8 HORAS
PRODUCTO:	
PERIODO DE 2 BLASTOMEROS	1 DIA *
PERIODO DE 4 BLASTOMEROS	1 - 1 Y MEDIO DIAS*
PERIODO DE 8 BLASTOMEROS	2 Y MEDIO DIAS *
TRANSPORTE EN EL OVIDUCTO	LOS PRIMEROS 3 DIAS*
PRESENCIA EN EL UTERO	3 DIAS
BLASTOCISTO	4 DIAS
IMPLANTACION	6-7 DIAS
NACIMIENTO	30-32 DIAS
* DIAS POSTERIORES A LA OVULACION (POSTCOITO)	
Datos tomados de Collado y col. 1978 y Hafez, 1981	
BLASTOCISTO	4 DIAS*
TRANSPORTE EN EL OVIDUCTO	LOS PRIMEROS 3 DIAS*
IMPLANTACION	6-7 DIAS*
PRESENCIA EN EL UTERO	3 DIAS *
NACIMIENTO	30-32 DIAS*

\*DIAS POSTERIORES A LA OVULACION (POSTCOITO) Datos tomados de Collado y col. 1978 y Hafez, 1981.

## UTERO:

En el útero uno de los hallazgos histológicos más sobresalientes es la necrosis coagulativa, cuando se emplearon dosis elevadas de 5 $\alpha$ -NET.

La necrosis coagulativa observada con dosis de 2.5 y 5 mg/kg de 5 $\alpha$ -NET implica un origen vascular, probablemente ocasionada primariamente por congestión y posteriormente hipoxia, anoxia tisular y finalmente necrosis; esta hipótesis se ve reforzada por el hecho de la existencia del RP en las células musculares de las arterias uterinas de humanos (Bouchard y Col. 1988) y conejas (Perrot-Applanat y col. 1988), lo cual plantea la posibilidad que la 5 $\alpha$ -NET actúe sobre estos receptores y provoque los cambios vasculares precursores de la necrosis.

Ha sido demostrado que la producción de prostaglandinas está determinado hormonalmente, así en la fase secretora del ciclo menstrual se incrementa la cantidad de PGE<sub>2</sub> y PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  llegando a un nivel máximo en el momento de la menstruación (Downie y col., 1974); El RU-486 incrementa la producción de PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  de una manera dosis dependiente (Elder y col., 1988), estos compuestos son vasoactivos y promueven la vasodilatación por lo que se implican en la menorragia. Otros compuestos como los Leucotrienos B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) causan constricción arteriolar y subsecuente incremento en la permeabilidad vascular con extravasación de fluidos, este efecto es potencializado por la PGE<sub>2</sub> y PGD<sub>2</sub>. Los LTB ocasionan un incremento en la liberación de las enzimas lisosomales en los tejidos, antes de la menstruación aumenta el número de estos organelos, con lo que también la presencia de sus enzimas hidrolíticas (Henzl y col. 1972), entre las que destaca la fosfolipasa A<sub>2</sub>, esta enzima es importante para la liberación del ác. araquidónico a partir de las membranas celulares y así incrementar la síntesis de eicosanoides; dado que la UTG es un inhibidor de la fosfalipasa A<sub>2</sub> (*in vitro*) (Miele y col. 1987) es posible que también participe en la regulación de la síntesis de los eicosanoides (Elder y col.

1988), dado que el RU-486 y la 5 $\alpha$ -NET disminuyen la expresión del gene de UTG y su secreción, puede suponerse que altere la producción de diversos compuestos vasoactivos, y de esta manera se propicie por esta vía cambios circulatorios que provoquen la necrosis coagulativa

La apariencia histológica es muy similar en los animales tratados con RU-486 (1 mg/kg) y 5 $\alpha$ -NET (1.5 mg/mg) y sin ocasionar cambios patológicos aparentes, por lo que es la dosis idónea para impedir la gestación temprana, sin embargo estos resultados se obtienen si se aplican desde el primer día, si la aplicación subcutánea comienza el día 4, la 5 $\alpha$ -NET (1 mg/Kg) es incapaz de revertir los procesos fisiológicos existentes en este período y no es capaz de impedir la gestación al día 8, a pesar de que el puntaje inmunoreactivo sea muy similar para ambos..

Otro metabolito reducido en el anillo "A" de la NET, el 3 $\beta$ 5 $\alpha$ -NET a una dosis de 1 mg/kg es capaz de inhibir la implantación aplicada desde el primer día, de manera similar como lo hace el 17 $\beta$ -Estradiol (17 $\beta$ -E2). En este caso se debe probablemente a la actividad estrogénica propia del 3 $\beta$ -5 $\alpha$ -NET.

#### PLANIMETRIA:

En humanos se han diseñado una serie de consideraciones morfológicas muy bien definidas, a fin de determinar el momento de la fase lútea (Noyes, 1950, Tin-Chiu Li y col. 1988; Sitrak-Ware y col., 1988). En conejas se han estudiado los cambios estructurales del endometrio durante la gestación temprana (Hafez and Tsutsumi, 1966), o bien la seudogestación (Davies and Hoffman, 1975).

En el estudio morfológico realizado en conejas por Davies y Hoffman (Davies y Hoffman, 1975) describe los días 6-8 de la gestación como la " fase de fusión" con la subsiguiente formación de sincitios, pues como ya se ha mencionado la implantación ocurre en el día 7 (Hicks, 1979; Hicks y Recasens, 1980) y en esta especie la nidación se da por el proceso de fusión del trofoblasto al endometrio

(Tolosa y Ochoa, 1984), lo cual plantea un reto desde el punto de vista inmunológico.

Se probaron además de la 5 $\alpha$ -NET y RU-486, los efectos planimétricos de 3 $\beta$ 5 $\alpha$ -NET y 17 $\beta$ -E2 en dosis de 1 mg/kg , aplicado por 3 días o 5 días cada uno (a partir de día 1 de la gestación); a fin de conocer las similitudes en el efecto morfológico del endometrio de estos compuestos dado que ambos interactúan con el RE y poder hacer comparaciones entre la 5 $\alpha$ -NET y el 3 $\beta$ -5 $\alpha$ -NET puesto que no se conoce la tasa de biotransformación de 5 $\alpha$ -NET en 3 $\beta$ -5 $\alpha$ -NET en el órgano blanco y determinar si el efecto antiprogestacional observado se debe a la 5 $\alpha$ -NET como tal o bien en realidad lo es el 3 $\beta$ -5 $\alpha$ -NET.

En los animales que recibieron 17 $\beta$  E2 por 5 días se observó el mayor efecto inhibitor de la transformación endometrial (I.E. cerca del 90%), cuando este compuesto se aplica tan sólo durante los primeros 3 días alcanza un I.E. que rebaza el 75%; la 3  $\beta$  5 $\alpha$ -NET en las mismas dosis y durante el mismo tiempo presenta una actividad antiprogestacional marcadamente inferior al 17- $\beta$ E2 siendo de 58% y 39% de I.E. respectivamente , por lo que su efecto estrogénico es menor en comparación con la hormona de referencia (datos no mostrados). La I.E lograda por 3 $\beta$ -5 $\alpha$ -NET es muy superior a 5 $\alpha$ -NET aplicada por 7 días a la misma dosis (1mg/Kg), de tal forma que es casi el doble cuando se aplica 3 $\beta$ -5 $\alpha$ -NET por 3 días y casi el triple cuando se aplica durante los primeros 5 días; lo cual hace suponer que el efecto observado posiblemente sea generado por cada metabolito en forma individual, o bien que la tasa de biotransformación de 5 $\alpha$ -NET en 3 $\beta$ -5 $\alpha$ -NET es baja. Esto deberá comprobarse con un mayor número de evidencias experimentales. Cuando se emplean dosis de 5  $\alpha$ -NET 1.5 mg/kg se obtienen valores de I.E más próximos al de 3 $\beta$ -5 $\alpha$  por 5 días.

Se concluye que el comportamiento antiprogestacional de 5 $\alpha$ -NET a la dosis de 1.5 mg/kg es similar aunque ligeramente inferior al del RU-486 al día 8 de la gestación.

El escaso valor de I.E de 5 $\alpha$ -NET 1mg/kg puede ayudar a explicar por qué su falla en la inhibición de la implantación en algunos casos, aunque como ya se ha mencionado logra disminuir el número de los sitios donde ocurrió la implantación.

El estudio de la actividad antiprogestacional de la 5 $\alpha$ -NET, demuestra que con I.E. de tan sólo 20% (5 $\alpha$ -1 mg/kg) ya hay disminución en el porcentaje de animales con implantación y del número de sitios donde se observó la misma, es decir, efectos de anti-implantación; lo que se refleja igualmente en la determinación del ARNm de UTG y la proteína. Schubert y col. (1983) utilizaron conejas prepúberes y administraron 5 $\alpha$ -NET oralmente conjuntamente con P4 y compararon con animales que recibieron P4 únicamente, o bien E2+P4; realizaron estudios morfológicos similares al que efectuamos: área de tejido glandular y estroma, K% y ED%; la conclusión de estos investigadores es que 5 $\alpha$ -NET es capaz de inhibir la transformación del endometrio, (mecanismo regulado por progesterona) de una manera dependiente de la dosis, lo cual concuerda con nuestros hallazgos; y que el E2 fue cerca de 4 veces más efectivo que la 5 $\alpha$ -NET a este respecto; lo que nosotros mostramos es que 17 $\beta$ -E2 (por 3 días) logra prácticamente cuadruplicar el efecto de IE en relación con la 5 $\alpha$ -NET (a la misma dosis: 1mg/kg) y logra valores de 80% de ED. aplicado por 5 días; comparado con el metabolito 3 $\beta$ 5 $\alpha$ -NET que duplica el efecto logrado por 5 $\alpha$ -NET (aplicado por menos de la mitad del tiempo: 3 días) y casi triplica su efecto cuando se aplica por 5 días; en conclusión el efecto inhibitor es mucho mayor para E2 y 3 $\beta$ -5 $\alpha$ -NET. No debemos perder de vista que Schubert utilizó otra vía de administración (oral), animales prepúberes y sus dosis son mucho mayores que las utilizadas en nuestros experimentos (Schubert, 1983).

Koering y Col. (Koering y col., 1986) realizaron estudios en hembras (monas) castradas que fueron tratadas con RU-486, como parte de su estudio morfológico se determinó el porcentaje ocupado por las glándulas y el lumen, mediante un sistema analizador de imágenes, a diferencia de nuestro estudio que determina por planimetría el porcentaje glandular y del estroma, así como la relación entre ambos; Koering obtiene porcentajes para el tejido glandular alrededor del 8% como en el presente estudio, en animales tratados con estradiol, en dosis de 1 mg/kg; de manera similar cuando los monos fueron tratados con progesterona RU-486 (1 mg/kg por vía intramuscular diariamente), el porcentaje glandular fue entre el 25 y el 30%, comparado con el 25% de nuestro estudio de conejas fertilizadas; es interesante marcar estas semejanzas tratándose de especies distantes filogenéticamente como son los primates y los lagomorfos; así mismo resultó interesante las similitudes al utilizar técnicas diferentes (sistema analizador de imágenes v.s. planimetría) y en condiciones experimentales distintas (animales ovariectomizados tratados con RU-486 + P y animales gestantes + RU-486); en ambos casos se trata de determinar los efectos morfológicos agudos del RU-486 (Koering y col., 1986). El efecto antiprogestacional del RU-486 se manifiesta evitando la proliferación del endometrio, lo cual se evidencia por la disminución del área ocupada por el tejido glandular. Lo anterior impide la transformación del endometrio proliferativo a secretor como lo describe Ullmann (Ullmann y col., 1990). Nuestro estudio demuestra un efecto similar al aplicar 5 $\alpha$ -Net (1.5 mg/Kg).

El escaso desarrollo glandular del endometrio observado con las diversas progestinas sintéticas (equiparable al presente en una coneja gestante normal, pero de varios días previos), provoca un desfasamiento entre la maduración del producto y la del útero, o quizás en ambos, lo cual ocasiona que el momento idóneo de la implantación se pierda.

La capacidad reguladora de la gestación del RU-486 es mucho mayor que el de la 5 $\alpha$ -NET, ya que se ha llegado a utilizar en humanos hasta el día 49 como un método encaminado a la terminación voluntaria de la gestación empleando en humanos la dosis de 600 mg de RU-486 más prostaglandinas para facilitar la contracción uterina y la expulsión del producto (Castadot, 1986; Ulmann y col., 1990).

La 5 $\alpha$ -NET debe aplicarse al día siguiente de la cruce y por 7 días consecutivos para impedir la gestación; la dosificación del RU-486 es más flexible y sin efectos adversos en la morfología, pues probamos dosis desde 0.5 mg/kg hasta 2.5 mg/kg y son capaces de impedir la implantación sin ocasionar daños patológicos aparentes (datos no mostrados).

En la actualidad se han implementado diversas aplicaciones prácticas a RU-486 además de la interrupción de la gestación como son: píldora "de la mañana siguiente", mediante su utilización el día 27 del ciclo, en monos ha demostrado su utilidad al facilitar la labor del parto, pues en estos animales sensibiliza al útero a la acción de la oxitocina y estimula la lactancia (Chillik y col.1986; Ulmann y col., 1990; Winer y col.1993; ).

Es conveniente determinar si tienen aplicación los metabolitos de la NET en alguno de estos aspectos. El estudio de un metabolito con probable efecto antiprogestacional es de gran relevancia en medicina veterinaria ya que en la actualidad no existen métodos reguladores de la fertilidad post-ovulatorios, o bien compuestos contragestacionales de eficiencia probada y sin riesgos para los animales (perros y gatos principalmente). Con este fin se ha empleado el cipionato de estradiol (E.C.P), un estrógeno que sólo puede usarse durante los primeros 5 días posteriores a la cruce y con diversos riesgos como hemorragias severas (Lara y col., 1988), ya que la médula ósea de la perra es muy sensible a los estrógenos al disminuir el número de plaquetas (Spinelli y Enos,1982). La utilización de progestinas (incluso con débil efecto progestacional) como la proligestona, puede

ocasionar tumores mamarios y el desarrollo de hiperplasia endometrial quística. A pesar de ello este compuesto se utiliza frecuentemente para el control del ciclo estral en las perras y gatas (Evans and Sutton, 1989).

A este respecto se ha empleado la NET en estos animales por vía oral. Es eficaz en posponer el celo aplicado pocas semanas antes del celo esperado, pero no es eficiente en revertir los signos del estro cuando se aplica tardíamente en el proestro. La fertilidad de los animales es normal en el estro siguiente al tratamiento. Se han descrito deformaciones congénitas y retardo en la fecha esperada de parto cuando se aplica inadvertidamente durante la gestación (Evans, 1989).

En nuestro estudio con dosis de 1 mg/kg logramos disminuir en un 60% los sitios donde se observó implantación y el número de animales con implantación (ver tabla 3); Schubert y col. (Schubert y col., 1983), realizaron estudios similares en ratas y ratones, obteniendo dosis efectivas de 25 mg/kg con 86% de inhibición de la implantación y 30 mg/kg con 89% de inhibición respectivamente; lo cual indica una marcada diferencia entre las especies utilizadas con dosis desde 2.5 mg/kg en las conejas se obtienen cambios patológicos indeseables; a este respecto Schubert no hace mención sobre hallazgos similares.

La inhibición de la transformación endometrial observada en animales tratados con RU-486 y 5 $\alpha$ -NET (1.5 mg/kg) es el resultado de los procesos de proliferación (I.M.) y muerte celular (I.A.) del útero; el I.M. observado en estos animales, es muy similar para las células del lumen y glandulares, sin embargo, sólo en este último caso se observaron diferencias estadísticamente significativas entre algunos tratamientos, (Tabla 5); resulta destacable que la 5 $\alpha$ -NET abate por completo el I.M. a los 8 días de la gestación.

El hecho de no encontrar diferencias estadísticamente significativas entre los animales tratados con progestinas sintéticas y los animales con PPG se explica considerando que

a los 8 días de la gestación no hay gran actividad mitótica como lo demuestran otros trabajos (Nawaz y col., 1982).

En la coneja la P4 induce proliferación del lumen uterino (Conti et. al., 1981), la cual es seguida por diferenciación y formación de tejido glandular, posterior a este proceso ocurre la síntesis de UTG.; posiblemente todos estos procesos fisiológicos se ven obstaculizados por efecto del RU-486 ya que estudios en mujeres durante la fase lútea, indican una prematura involución del endometrio y apoptosis (Sitrak-Ware y col., 1988); posiblemente la 5 $\alpha$ -NET ocasione efectos similares, según lo demuestran los estudios por planimetría e inmunohistoquímica del UTG.

#### DISCUSION:MITOSIS Y APOPTOSIS

El epitelio uterino presenta 4 diferentes mecanismos en la regulación del crecimiento: 1) proliferación celular, 2) migración celular, 3) diferenciación y 4) pérdida por descamación o muerte. (Conti, et. al., 1984).

Es conocido el efecto de los estrógenos sobre el incremento del peso húmedo del útero durante la fase estrogénica del ciclo estral y la inducción del crecimiento y proliferación del endometrio en mamíferos (Brenner and West, 1975), esto ha sido demostrado en cultivos celulares del endometrio de la coneja (Gerschenson y col. 1977) y directamente en experimentos *in vivo* en el ratón (Martin y Col. 1976). Conti et. al sostienen la hipótesis de que los estrógenos modifican la cinética de las células epiteliales del endometrio que consiste en la migración de las células glandulares hacia el lumen y ahí su pérdida; el efecto estrogénico se manifiesta por la disminución en el rango de pérdida de las células luminales (Conti y col. 1984); nosotros observamos en las conejas no gestantes (animales considerados en estro) una marcada diferencia en el I.M. de las células glandulares en comparación con las luminales de los animales control (PPG) y con diversos tratamientos; esto sugiere que la proliferación celular se inicie posiblemente

en las glándulas lo cual concuerda con la hipótesis de Conti y Col.

En la gestación temprana es común el observar picos mitóticos; en el ratón se presenta al tercer día en el lumen y las glándulas, seguido de un incremento en el día 4 y 5 en el estroma (Finn and Martin, 1967); en la gata el pico de células epiteliales se presenta en el día 2 después de la cruce (West y col., 1977). Estos días de máximos incrementos mitóticos forman parte del proceso fisiológico de transformación y diferenciación celular, a fin de contribuir a la maduración necesaria para que el endometrio se convierta en un tejido secretor y pueda recibir al producto, propiciar su nutrición antes de la implantación y anidarlo posteriormente.

Durante la gestación temprana y en animales sin ningún tratamiento nosotros observamos los niveles máximos de I.M. en el día 2 y un segundo pico aunque menos marcado en el día 4 (datos no mostrados), estos valores han sido similares en conejas ovariectomizadas y tratadas con hCG (seudogestantes) (Conti et.al 1984; Nawaz y col. 1987). Tanto en nuestro estudio como los experimentos de Nawaz y col. se observa una disminución marcada del I.M. entre los días 5 y 8.

Los valores del I.M. en los animales tratados (con 5 $\alpha$ -NET y RU-486) y gestantes (que recibieron únicamente PPG) son muy bajos e incluso nulos con 5 $\alpha$ -NET 1 mg/kg y muy similares para todos en el día 8 de la gestación, esto implica que en este lapso la actividad mitótica es mínima, sin embargo no pueden hacerse señalamientos concluyentes sobre la modificación de la actividad mitótica con base en el I.M., por otro lado el hecho de observar E.D. por arriba del 50% para el RU-486 y 5 $\alpha$ -NET (1.5 mg/kg) sugiere que los picos mitóticos de los días 2 y 4 posiblemente se vieran disminuídos, esto debe corroborarse en futuros estudios que contemplen dichos días. Es importante también destacar el hecho de que la predominancia marcada del I.M. de las células glandulares V.S. las luminales de las conejas no gestantes

fué único pues en ninguno de los demás animales gestantes (PPG) y animales con algún tratamiento con progestinas se presentó, lo que sugiere que la actividad mitótica es muy baja a los 8 días de la gestación.

Se compararon los resultados de la I.M: con los animales no gestantes (en estro) y se observó diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre el I.M. de las células glandulares de los animales no gestantes en comparación con los demás grupos del Experimento 2

Para las conejas no gestantes se observó un mayor número de células en mitosis en relación con los animales gestantes o tratados, esta diferencia fué significativa ( $p < 0.05$ ).

La muerte celular se ha revalorado en la actualidad como un importante fenómeno fisiológico, particularmente en tejidos de continuo reciclamiento celular como son la piel, el intestino o el epitelio uterino, Finn and Publicover, 1981, (Nawaz y col. 1987; Willie, 1987; tradicionalmente la muerte celular había sido considerada como un proceso patológico; en varias circunstancias es un proceso normal y fisiológico que participa en procesos como metamorfosis, desarrollo embrionario, renovación tisular y atrofia inducida hormonalmente, en diversos tejidos entre ellos el testículo (Tapanainen, *et al.*, 1993); este tipo de muerte celular es denominado apoptosis o muerte celular programada (Wyllie y col. 1980), y se distingue morfológicamente de la necrosis, otro tipo de muerte celular, por las siguientes características: citoplasma basófilo y halos claros alrededor de las células, fragmentación de la cromatina nuclear (Wyllie y col., 1987), esta fragmentación puede identificarse tanto con el Microscopio óptico y electrónico como por procedimientos bioquímicos y corresponden a nucleosomas (Wyllie y col. 1984, Rotello y col. 1989; Rotello *et al.*, 1992).

Durante la gestación temprana nosotros observamos una disminución del I.A. entre el día 2 y 5 en una gestación normal (datos no mostrados), de una manera similar a lo

observado en conejas seudogestantes (Nawaz y col. 1987), que coincide con los períodos de máxima proliferación (I.M) en los días 2 y 4, por lo que esto sugiere una coordinación entre proliferación celular y apoptosis, probablemente regulados de manera independiente (Nawaz y col., 1987). Existe la hipótesis de la existencia de un factor de muerte celular y un factor de proliferación celular producido por las células endometriales de la coneja, la P y E2 pueden modular la producción local de estos factores, por lo que probablemente estas hormonas no regulen directamente el I.M. y el I.A. (Lynch y col., 1986; Nawaz y col., 1987).

Experimentos en conejas ovariectomizadas señalan un incremento de I.A. de hasta 124 veces en relación con los animales control, este fenómeno es prevenido significativamente por la aplicación de P4 (Nawaz y col., 1987); por otro lado cuando se aplica RU-486 a conejas seudogestantes se dispara la apoptosis, alcanzando niveles similares al de las hembras ovariectomizadas, por lo que la P4 suprime la apoptosis (Rotello *et. al.*, 1992). Por lo anterior la apoptosis puede considerarse como un rasgo antiprogestacional en el epitelio uterino; resulta interesante el hecho que en las tubas uterinas de monos (Odor, 1978) y gatas (Verhage y col. 1984) la P4 induce la apoptosis en el epitelio de este órgano y los E2 los procesos de mitosis (Bariether y col. 1981), es decir, la P4 induce apoptosis en las tubas uterinas y de manera inversa en el útero.

El efecto del RU-486 es homogéneo a lo largo de los cuernos uterinos (Chillik y col., 1986), el incremento de la apoptosis en el epitelio uterino ha sido demostrado por procedimientos bioquímicos (Rotello y col. 1989). Con la utilización de 5 $\alpha$ -NET (1,1.5 mg/kg) se observa una posible tendencia de efecto antiprogestacional, pues los valores más altos de I.A. del lumen se presentaron en animales tratados con 1.5 mg/kg de 5 $\alpha$ -NET, y los más bajos en las conejas gestantes, efectos similares se observaron para las células

glandulares, los valores de apoptosis de las células glandulares son practicamente el doble que el observado para las conejas gestantes tratadas con PPG (ver Tabla 5), siempre se observó mayor apoptosis en las células glandulares. Los resultados no son concluyentes, aunque no existieron diferencias significativas se observa que la apoptosis de 5 $\alpha$ -NET 1.5 mg/kg fue ligeramente superior a la del RU-486, a los 8 días de gestación. Esta tendencia pudiese ser más marcada en días previos pues lo que se observa al día 8 es sólo un reflejo de un proceso ya estabilizado.

Los valores de RU-486 (1 mg/kg) y 5 $\alpha$ -NET (1 mg/kg) son muy similares (tanto para las células luminales como glandulares), sin embargo el efecto anti-implantación de la 5 $\alpha$ -NET fué debil comparado con las mismas dosis del RU-486. Estos resultados demuestran que el día 8 de la gestación no permite evaluar la actividad apoptótica real de los compuestos en la gestación temprana.

No hay que perder de vista el hecho de encontrar una disminución en la marca inmunohistoquímica de UTG a los 8 días, puede estar vinculada con un incremento en la apoptosis en las células glandulares; por lo que no sólo influye en el proceso antiprogestacional que inhibe la secreción de UTG, sino la muerte y pérdida de las células encargadas de esta secreción. Esta hipótesis deberá ser validada experimentalmente.

La determinación simultánea de la fragmentación del ADN por procedimientos bioquímicos y mediante el microscopio fotónico, demuestra que no existe una correspondencia de los hallazgos bioquímicos con los porcentajes de la apoptosis morfológica, por lo que se piensa que un gran número de células con fragmentación nuclear son fagocitadas antes de mostrar las características clásicas de apoptosis al microscopio de luz, (Rotello y col.1992), por lo que se hace muy importante considerar los procedimientos bioquímicos en futuros experimentos para evaluar la apoptosis a los 8 días de gestación y en los días anteriores (Rotello y col. 1989).

La disminución del marcaje inmunohistoquímico de UTG; implica una menor síntesis de esta proteína dependiente de la acción progestacional, esto muestra un efecto antiprogestacional bien establecido (Miele y col. 1987).

El efecto antiprogestacional de los metabolitos reducidos de la NET, fue corroborado por la disminución en la expresión del gen de UTG; en el estudio inmunohistoquímico, que aquí se ha descrito y en la identificación por RIA de la UTG en el fluido uterino, o bien de su mensajero (Castro et al. 1995.) mediante el análisis por Northern Blot. Es muy importante destacar que en todos nuestros estudios el comportamiento de la 5 $\alpha$ -NET y el RU-486 fue muy similar a la misma dosis (1mg/Kg ) y para 1.5 mg/Kg de 5 $\alpha$ -NET abate por completo el contenido del ARNm detectable en el endometrio a los 8 días post-coito; lo cual indica que la regulación de la expresión del gen de UTG se realiza en el nivel transcripcional por 5 $\alpha$ -NET (aunque la degradación postranscripcional no puede ser descartada) (Castro, et al., 1995).

En los animales tratados con 5 $\alpha$ -NET y 3 $\beta$ 5 $\alpha$ -NET (1mg/Kg/día/3días) a partir del día 4 de la gestación se observó la implantación del blastocisto y en el estudio inmunohistoquímico no se observó disminución importante de la marca UTG.

Estudios realizados en nuestros laboratorios han demostrado que la 5 $\alpha$ -NET ( 1mg/Kg/día/5días ) es capaz de eliminar por completo el contenido de UTG en el fluido uterino de conejas prepúberes tratadas con P4; la potencia antiprogestacional mostrada por la 5 $\alpha$ -NET es similar a la del RU-486 ( 1mg/Kg/día/5días) ( Cerbón y col., 1990 b ). Recientemente ha sido demostrado mediante un modelo molecular que la 5 $\alpha$ -NET posee propiedades antiprogestacionales , ya que es capaz de inhibir la expresión de la actividad de la cloranfenicol acetil transferasa inducida por progesterona en líneas celulares transfectadas con los elementos de respuesta hormonal que median los efectos de la progesterona. Esta

inhibición fué similar a la producida por el antiprogestágeno de referencia RU-486 (Pasapera y col. 1995 b).

La secreción de UTG durante la gestación temprana produce niveles máximos en el día 5 lo cual nosotros hemos podido demostrar por inmunohistoquímica (datos no mostrados) o por procedimiento bioquímico (Gutiérrez- Sagal y col.1993); la cantidad de UTG posteriormente decrece hasta prácticamente desaparecer en los días 9 - 10; la disminución prematura o el bloqueo de la expresión del gene de UTG es considerado un efecto antiprogestacional, como ha ya sido mencionado.

Diversos estudios preliminares indican que durante el período de preimplantación, la maduración uterina implica un incremento en la capacidad de la eucromatina de las células para servir como molde para la síntesis de nuevas moléculas de ARN y subsecuentemente su traducción a diversas proteínas específicas (Glasser and McCormack, 1979), algunas de ellas presentes en el fluído uterino, tal es el caso de la UTG, por lo que la disminución que observamos es probable que esté involucrada con la falla en la implantación del producto.

Utilizando los mismos animales de nuestro experimento, se realizó la determinación de UTG por RIA, a los 8 días post-coito, obteniéndose resultados similares al del estudio inmunohistoquímico: en conejas gestantes tratadas con RU 486 (1 mg 1 Kg) se observó una disminución de UTG del 73%; animales fertilizados tratados con 5 $\alpha$ -NET produjeron una disminución del 50% y el 85% del contenido de UTG en relación con los animales control (PPG) con dosis de 1 y 1.5 mg/kg respectivamente, con dosis de 2.5 y 5 mg/kg provocaron una disminución tan grande de UTG que fueron muy similares al de los animales no gestantes (Castro et.al 1995); sin embargo para estas dos últimas dosis no se realizó el estudio inmunohistoquímico debido a la necrosis coagulativa observada en el análisis morfológico de las muestras.

En los animales tratados con 3 $\beta$  5 $\alpha$  NET (1mg 1Kg) durante los 3 o 5 primeros días posteriores a la cruce ocasionaron al igual que el estradiol una depleción del contenido de UTG a

los 3 días de tratamiento ( Castro et al, 1995). Esto contrasta con el resultado de inmunohistoquímica en la cual no se observa una disminución de la marca de UTG si el tratamiento se inicia el día 4 de la gestación, tanto con 5 $\alpha$ -NET y 3 $\beta$ 5 $\alpha$ -NET (1mg/Kg).

En ese mismo estudio se determinó ARNm de UTG por Northern Blot en las células endometriales; obteniéndose una disminución significativa en animales que recibieron dosis de 5 $\alpha$ -NET, RU-486 de 1mg /Kg o 17 $\beta$ -E2 ( 1mg/Kg/3 o 5 días ) y 3 $\beta$ -5 $\alpha$ -NET ( 1mg/Kg/día/5 días ) comparado con los animales gestantes ( PPG ); no se detectó ARNm de UTG en las hembras tratadas con 1.5mg/Kg de 5 $\alpha$ -NET tratados por 7 días (1mg/Kg).

Los estrógenos pueden suprimir parcialmente la expresión del gen de UTG en el lumen; sin embargo esta respuesta antiprogestacional de los E2, se presenta en forma aguda y rápida (Kopu y col. 1981).

#### RECEPTORES A PROGESTERONA

Un gran número de investigaciones encaminadas a la detección inmunohistoquímica del RP, determinan la presencia de la marca exclusivamente en el núcleo de las células (Bouchard y col. 1988; Perrot-Applanat y col., 1987; García y col. 1988; Hyde y col. 1989; Iway, 1991; Iway, 1991; Hegele-Hartung y col. 1992; Hild-Petito y col. 1992), este hecho fue observado también en nuestro experimento; sin embargo, es conveniente realizar futuras observaciones ultramicroscópicas con inmuno oro en el útero, tubas uterinas y ovario para su identificación al M.E.; además de identificar más claramente la apoptosis del epitelio uterino y del oviducto.

Isotalo y col. (1981) realizaron experimentos con el RP en el útero de la coneja con tratamiento previo de P4 y no de E; sugiriendo una saturación del RP y puede ser el mecanismo por el cual se garantiza la continuación de la respuesta biológica de la P4, a pesar de la desaparición del RP en diversas células.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

En la hembras no gestantes (en estro) se observó una gran cantidad de RP, por lo que fueron utilizadas como controles positivos, ya que es una característica estrogénica la presencia de RP y RE (Pollow y col. 1981)

El efecto progestacional es detectable por la disminución del receptor, fenómeno conocido como "down regulation" (regulación a la baja); en la cual la presencia de altas concentraciones de la hormona, disminuyen la cantidad del receptor específico a fin de modular sus efectos fisiológicos (Ruckebusch-Phaneuf and Dunlop, 1991); existen evidencias indirectas de que el RU-486 ocasione "dawn regulation", ya que al emplear anticuerpos contra RU-486, se observa una menor cantidad de marca después de aplicar el RU-486 (Sitruk-Ware y col., 1988), esto posiblemente implica la disminución de los RP, pues se ha comprobado que la acción del RU-486 esta mediado por estos receptores, por lo que podemos suponer que la cantidad de estos receptores en el tejido disminuyen, así mismo se ha determinado que la acción de RU-486 provoca apoptosis en el útero (Rotello y col. 1990), por lo que la disminución en la cantidad de células posiblemente implique la disminución de los RP tisulares; este anti-progestágeno realiza su acción mediante la intervención del R.P.; nosotros comprobamos la "dawn regulation" tanto de RU-486 como de la 5 $\alpha$ -NET. Estos resultados permiten suponer que la 5 $\alpha$ -NET medie sus efectos a través del RP.

El mecanismo de down-regulation ha sido también observado para el R.E., con compuestos con actividades antiestrogénica (como el ICI 164, 384); la actividad antagónica del ICI puede ser causada por esta rápida desaparición del R.E. en los tejidos blanco, resultando en una cantidad insuficiente para el ligando nativo (E2) y impidiendo así sus respuestas agonistas (Gibson y col., 1991).

En estudios realizados previamente en nuestro laboratorio durante la gestación temprana la P4 provoca la

disminución del RP hacia el día 4, no pudiéndose detectar ni el receptor ni su ARN mensajero por métodos bioquímicos al 5o. día post-coito (Gutiérrez-Sagal y col. 1993). Esto permite suponer que la  $5\alpha$ -NET actuó a través del RP localizado en las células blanco.

Si se aplica 1 mg/Kg de  $5\alpha$ -NET a partir del cuarto día de la gestación en lugar del día 1 no se logra impedir la implantación (datos no mostrados). Cuando se aplicó la dosis de 1 mg/Kg/día de  $5\alpha$ -NET a partir del día 4 de la gestación se obtuvieron en las tres capas IRS idénticos al de los animales tratados con la dosis de  $5\alpha$ -NET 1.5/Kg/día pero desde el día 1 de la gestación (día posterior a la cruce); en el tejido conjuntivo se obtuvo un mayor porcentaje de células inmunoreactivas con 1 mg/Kg pero con una intensidad baja, mientras que para 1.5 mg/Kg los resultados fueron inversos (datos no mostrados).

Con el epitelio y miometrio nosotros observamos regulació a la baja cuando se aplica  $5\alpha$ -NET/mg/Kg a partir del cuarto día de la gestación y  $5\alpha$ -NET 1.5 mg/Kg a partir del día 1 de la gestación los puntajes inmunorreativos fueron los mismos, lo que parecería indicar que al igual que la P4 in vivo al interactuar con su receptor provoca una disminución de éste a partir de los 4 días manteniéndose este proceso cuando se utiliza la dosis de 1.5 mg/Kg, no así se emplea una dosis menor (1 mg/Kg) por el mismo tiempo (datos no mostrados).

Los RP de el tejido epitelial (células glandulares y luminales) y del muscular (miometrio) presentaron variaciones paralelas en la mayor parte de los casos; este fenómeno ha sido ya descrito anteriormente (Isomaa, 1981) lo que refuerza la suposición de que sus mecanismos reguladores son comunes.

La persistencia de un gran número de los RP en el estroma, con los diversos tratamientos empleados, también ha sido informado con anterioridad (Hegele-Hartung y col. 1992; Dunselman y col. 1992; Hild-Petito y col, 1992); se piensa que las células del estroma tienen un mecanismo regulador

autocrino y paracrino sobre el tejido glandular del endometrio y tener un comportamiento diferente en comparación con otras capas del útero.

Resulta muy interesante la disminución tan marcada del RP en el conjuntivo y músculo en dosis bajas de RU-486 (0.5 mg/Kg), en comparación con las dosis mayores (1mg/Kg), excepción de los receptores presente exclusivamente en las glándulas; a pesar de estas diferencias el patrón de localización de los RP fue similar para ambos casos; el comportamiento del RU-486 (0.5mg/Kg) es muy peculiar y no se asemeja al 5 $\alpha$ -NET (1mg/Kg), su potencia anti-implantación y antiprogestacional es mayor ya que estas dosis bajas impiden la gestación (no así para la 5 $\alpha$ -NET). Resulta interesante igualmente la respuesta de la UTG y su mensajero cuando se dan dosis elevadas de RU-486 (2.5mg/Kg), estos efectos paradójicos no corresponden al esquema clásico de "dosis respuesta" y deben ser explicados en un futuro. La relación entre los receptores a progesterona y la uteroglobina han sido ya realizadas por otros autores (Isomaa y col., 1979).

En el proceso de diferenciación y maduración del endometrio inducido por la P4 ya sea la gestación temprana o la seudogestación, se inician diversos procesos en forma temprana, como son el pico mitótico al día 2, la disminución marcada del RP al día 5, la máxima secreción de UTG en esta misma fecha (Nawas, Gutiérrez, Sagal y col. 1995), por lo que la participación de la 5 $\alpha$ -NET antes de estos eventos, son al parecer cruciales para poder alterar negativamente los procesos; si se aplica tardíamente (día 4 de la gestación), no es capaz de revertir los mecanismos fisiológicos previamente desencadenados (no así el RU-486), por lo que su potencia antiprogestacional es menor a la de este último.

## VIII CONCLUSIONES

1. La dosis idónea de  $5\alpha$ -NET para impedir la implantación en hembras adultas fertilizadas fué de 1.5mg/Kg/día/7 días. Dosis inferiores fueron ineficaces para detener la implantación (0.5 mg/Kg/día/ 7 días) o bien únicamente disminuyeron el porcentaje de los animales en los que ocurrió la implantación, así como el número de implantaciones por animal (1 mg/Kg/ día /7 días). Dosis mayores provocaron necrosis coagulativa del endometrio.

2. El efecto del RU-486 (1mg/kg) sobre las poblaciones celulares de las tubas uterinas, inhibición de la transformación endometrial, proporción de I.M. e I.A. fue similar para el  $5\alpha$ -NET (1.5mg/Kg) a los 8 días de la gestación, después de 7 días de tratamiento.

3. Dosis de 1.5 mg/kg de  $5\alpha$ -NET mostraron un efecto antiprogestacional similar al del RU-486 al inhibir de manera similar la expresión del gen de UTG evaluado por inmunohistoquímica.

4. Los efectos de RU-486 y  $5\alpha$ -NET, son mediados por el RP ya que su administración provocó regulación a la baja ("down regulation").

#### IX RECOMENDACIONES

Es muy conveniente que en futuros experimentos se evalúe el efecto de la 5 $\alpha$ -NET entre los 2 y 5 días de la gestación a fin de determinar si es capaz de contrarrestar la disminución normal del I.A. o los picos de I.M: en los días 2 y 4 en animales gestantes, pues el grado de arborización glandular observada a los 8 días de gestación es casi nula con 5 $\alpha$ -NET, lo cual podría ayudar a explicar el mecanismo antiprogestacional y de anti-implantación de esta progestina sintética.

Durante la gestación temprana se desencadena un gran número de procesos fisiológicos que deben ser evaluados y dilucidados, ya que el transporte del producto y su implantación parece ser un fenómeno multifactorial; de entre la gran diversidad de mecanismos estudiados cabe mencionar la participación de la histamina; producida por embriones de ratones durante el 4o. día de gestación (Dey and Johnson, 1980), respecto a esta amina biógena, se han informado variaciones en el número de las principales células del conjuntivo que la producen: las células cebadas (o mastocitos); ya sea durante el ciclo estral (Gibbons y Chang, 1972) y durante la gestación temprana en varias especies (Brandon y Bibby, 1979; Brandon y Evans, 1984), dichas variaciones sugieren la influencia de las hormonas ováricas y la presencia de los receptores respectivos, en los mecanismos que originan la degranulación (en el cual el número de células detectables al M.O. disminuye), con la subsiguiente liberación de histamina. La histamina puede estar involucrada en los mecanismos vasculares que posiblemente contribuyan a ocasionar la necrosis coagulativa observada en el presente estudio.

Cabe mencionar que se ha comprobado la importancia de la histamina en la ovulación de la coneja (Espey, 1980; Krishna and Terranova, 1985), puesto que los antihistamínicos son inhibidores de la ovulación en esta especie (Knox and Beck, 1976); por lo que es muy conveniente el dilucidar el

comportamiento de los mastocitos en el ovario inicialmente y posteriormente en el útero y tubas uterinas, durante la gestación temprana y las posibles variaciones provocadas tanto por el RU-486 como los metabolitos reducidos de la NET.

El comportamiento de otros compuestos vasoactivos como los leucotrienos y la prostaglandinas serán muy útiles para tratar de dilucidar el mecanismo de necrosis coagulativa observada con ciertas dosis de 5  $\alpha$ -NET.

Se ha observado la presencia de relaxina en la placenta y en el endometrio (pero no en el ovario) por pruebas de inmunohistoquímica entre los días 4-9 de la gestación y 2-5 de la lactancia (Vaughan and Fields, 1990). Su inmunolocalización se circunscribe a las glándulas uterinas durante el período de peri-implantación (días 4-9) y exclusivamente en los sitios de implantación (posteriormente entre los días 11-23 se localiza en glándulas y células luminales en general); en esta época también comienzan a detectarse niveles hormonales en el suero (determinados por RIA), alcanzando un pico en el día 15, que se mantiene hasta el parto (día 32). Dichos niveles no están presentes en las hembras pseudogestantes (Vaughan and Fields, 1991) ni en su endometrio (Vaughan and Fields, 1990); estos experimentos sugieren la posible participación del blastocisto en el inicio de la producción de relaxina y su posterior mantenimiento, además, puesto que esta hormona está presente en el período de peri-implantación puede tener un papel relevante en la preparación del útero de la coneja para la nidación del producto. Por lo anterior sería de gran utilidad el monitorear la relaxina durante la gestación temprana de animales tratados con RU-486 y metabolitos derivados de la NET a fin de conocer si es capaz de interferir con su secreción y posible acción en este período (4-9 días postcoito); pues es un marcador exclusivamente gestacional.

Se recomiendan realizar estudios sobre los posibles cambios patológicos de los productos de la concepción, ya que

el RU-486 llega a ocasionar necrosis de diversas capas del embrión (Sitruk-Ware y col. 1988).

Es muy conveniente conocer también la localización in situ de la 5 $\alpha$ -NET y su distribución intracelular mediante inmunohistoquímica o radioautografía, como ya ha sido estudiado para el antiprogestágeno de referencia RU-486 (Sitruk-Ware y col. 1988).

En relación con los diversos metabolitos de la NET, pueden realizarse estudios a fin de conocer la tasa de biotransformación de NET en 5 $\alpha$ -NET y de esta en 3 $\beta$ -5 $\alpha$ -NET tanto en el útero como en las tubas uterinas, a fin de ayudar a explicar los diversos hallazgos morfológicos descritos en el presente trabajo.

## X LITERATURA CITADA

1. Alberts, B.; Bray, D.; Lewin, J.; Raff, M.; Roberts, K. and Watson J. D.: "Cell Signaling" in Molecular Biology of the Cell. Second Edition. Garland Publishing Inc. New York, & London 1989.
2. Atger B.A., Atger P., Cerbón M.A., Alison M., Hai M.T., Logeat F. and Milgrom E.: The rabbit uteroglobin gene: structure and interaction with the progesterone receptor. J. Biol. Chem. 258:10384 (1983).
3. Avers, Ch. J.: Biología Celular. Segunda Edición. Iberoamericana, México, 1987.
4. Banks J.W.: Histología Veterinaria Aplicada. El Manual Moderno, México, D.F., 1986.
5. Bariether M.L. and Verhage H.G.: Control of the secretory cell cycle in cat oviduct by estradiol and progesterone. Am. J. Anat. 162: 107-118 (1981).
6. Beato M. and Beier R.: Binding of progesterone to the proteins of the uterine luminal fluid. Identification of uteroglobin as the binding protein. Biochim. Biophys. Acta 392: 346-356 (1975).
7. Beato M.: Gene regulation by steroid hormones. Cell. 56: 335 (1989).
8. Beier H.M.: A hormone-sensitive endometrial protein in blastocyst development. Biochim. Biophys. Acta 160:239-291 (1968).
9. Bouchard P., Schaison G., Marraqui J., Frydman R., García E., Milgrom E. and Perrot-Appianat M.: Evaluation of endometrial maturation with the immunocytochemical localization of estradiol and progesterone receptors. WHO/OMS. Geneva (1988).
10. Bouchard, P.; Marroui, J.; Massai, M.R.; Medalie, D.A.; De Ziegler, D., Perrot-Appianat, M.; Frydman, R. and Bergeron, C.: Immunocytochemical localization of oestradiol and progesterone receptor in human endometrium: a tool to assess endometrial maturation. Baillieres Clin. Obstet. Gynecol., 5: 107-115 (1991).
11. Bowers, A., Ringold H. J. and Denot H.: Steroids C.I. 19-Nordihydrotestosterone derivatives J. Am. Chem. Soc. 80: 6115-6121 (1958).

12. Brandon J.M. and Bibby M.C.: A study of uterine mast cells during early pregnancy in the rat. Biol. Reprod. 20: 977-980 (1979).

13. Brandon J.M. and Evans J.E.: Observations on uterine mast cells during early pregnancy in the vole. (*Microtus agrestis*). The Anatomy Record. 208: 515-520 (1984).

14. Brenner, R.M. and West N.B.: Hormonal Regulation of the reproductive tract in female mammals. Annual Review of Physiology. 37: 273-303 (1975).

15. Browning J. Y., Keyes P.L. and Wolf R.C.: Comparison of serum progesterone, 20  $\alpha$ -dihydroprogesterone and estradiol-17 B in pregnant and pseudopregnant rabbit: evidence for postimplantation recognition of pregnancy. Biol. Reprod. 23: 1014-1019 (1980).

16. Camacho-Arroyo I., Ruiz A., Gamboa Domínguez A. Pérez-Palacios G. and Cerbón M.A.: Immunohistochemical localization of intracellular progesterone and glucocorticoid receptor in the rabbit lung. J. Endocrinol. 142: 311-316 (1994).

17. Castadot R.G.: Pregnancy termination: techniques, risks, and complications and their management. Fertil. Steril. 45. 5-16 (1986).

18. Castro I., Cerbón M.A., Pasapera A. M., Gutiérrez-Sagal R., Orozco C., García G.A., Camacho-Arroyo I., Anzaldúa R. and Pérez-Palacios G.: Molecular mechanisms of the anti-hormonal and anti-implantation effects of norethisterone and its a ring reduced metabolites. Molecular Reproduction and Development 40: 157-163 (1995).

19. Cerbón M.A., Pérez-Palacios G., Castro I., Gutiérrez-Sagal R. and Pasapera A.: The task force on post-ovulatory methods for fertility regulation. Special programme of research training in human reproduction. Progress Report. World Health Organization México City, (1990 a).

20. Cerbón M.A., Pasapera, A.M., Gutiérrez-Sagal R., García, G.A. and Pérez-Palacios G.: Variable expression of the uteroglobin gene following the administration of norethisterone and its A-ring reduced metabolites. J. Steroid Biochem. 39: 1-6 (1990 b)

21. Cerbón, M.A.; Gutiérrez-Sagal, R.; Pasapera, A. Y Hernández A.: "El receptor de la progesterona en el útero de la coneja: Biosíntesis, estructura y propiedades de unión al

ADN " Cap. II p.41-47 en Tópicos Selectos de Biología de la Reproducción. UNAM-Miguel Angel Porrúa Grupo Editorial, México, 1991

22. Challis J.R., Davies I.J. and Ryan K.J.: The concentrations of progesterone, estrone and estradiol-17 B in the plasma of pregnant rabbit. Endocrinology 93: 971-976 (1973).

23. Chillik C.F.; Hsiu J.G., Acosta A.A. van Vem J.F. and Hodgen G.D.: RU-486 induced menses in cynomolgus monkeys: Uniformity of endometrial sloughing. Fertil. Steril. 45: 708-712 (1986).

24. Chwalisz.K., Hegele-Hartung Ch., Fritzeimer K.H., Beier H.M. and Elger W.: Inhibition of the estradiol-mediated endometrial gland formation by the antigestagen onapristone in rabbits: relationship to uterine estrogen receptors. Endocrinology 129: 312-322 (1991).

25. Clark C.R.: The cellular distribution of steroid hormone receptors: have we got it right?. TIBS 7: 207-208 (1984).

26. Conti,C.J.; Gimenez-Conti,I.B.; Zerbe, G.O.; Gerschenson, L.E.: "Diferential effects of estradiol-17 beta and progesterone on the proliferation of glandular and luminal cells of rabbit uterine epithelium". Biol. Reprod. 24: 643-648 (1981).

27. Conti,J.; Gimenez-Conti, I.B.; Conner, E.A.; Lehman, J.M. and Gerschenson,E.: Estrogen and Progesterone Regulation of Proliferation, Migration, and Loss in Different Target Cells of Rabbit Uterine Epithelium". Endocrinology 114: 345-351 (1984).

28. Cowan B.D., North D., Witworth N.S., Fujita R.S., Shumacher E.K. and Mukherjee A.B.: Identification of uteroglobin-like antigen in human uterine washing Fertil. Steril. 45:820 (1986).

29. Cunha G.R., Cooke P.S. , Begsby R. and Brody J.R. : Ontogeny of sex steroid receptors in mammals. in Nuclear Hormone Receptors p 235-268 , Academic Press, New York 1991.

30. Dannhorn D.R. and Kirchner D.C.: Uptake of tritiated uteroglobin by endometrium of the rabbit during peri-implantation. Cell. Tissue Res. 259: 519-528 (1990).

31. Darnell, J; Lodish, H. and Baltimore, D.: "Gene control in animal cells " in Molecular Cell Biology, Second Edition Scientific American Books, New York, & London 1989.

32. Davies J. and Hoffman L.H.: Studies on the Progesterone endometrium of the rabbit. Light microscopy, day 0 to day 13 of gonadotrophin induced pseudopregnancy. Am. J. Anat. 137: 423-446 (1975).
33. Denison M.S., Vella L.M. and Okey A.B. : Structure and function of the Ah receptor for 2,3,7,8, tetrachlorodibenzo-p-dioxin. J. Biol. Chem. 261 : 3987-3995 (1986).
34. Denner, L.A.; Weiger, N. L.; Maxwell, B.; Schrader, B. and O'Malley: " Regulation of Progesterone Receptor-Mediated Transcription by Phosphorylation" Science 250: 1740-1743 (1990).
35. Dey S.K. and Johnson D.C.: Histamine formation by mouse preimplantation embryos. J. Reprod. Fert. 457-460 (1980).
36. Díaz S.V., Garza F. J., Onega M.C. y Cuéllar C: Las hormonas esteroides y su aplicación en el control de la fertilidad en el humano. Mensaje Bioquímico. Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 1982.
37. Díaz-Zagoya J.C. y Juárez-Oropeza M.A.: Control hormonal del metabolismo. Mensaje Bioquímico Vol. X: 259-298. Departamento de Bioquímica. Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, 1987.
38. Downie J., Poyser N. L. and Wunderlich: Levels of prostaglandins in human endometrium during the normal menstrual cycle. J. Physiol. 236: 465-472 (1974).
39. Dreyer C., Krey G., Keller H. , Givel F., Helflenbein G. and Whahli W. : Control of the peroxisomal  $\beta$ -oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. Cell 68: 879-887 (1992).
40. Dunselam G.A., Willebrand D. and Evers J.L.: Immunohistochemical analysis of oestrogen and progesterone receptors of eutopic and ectopic endometrium in the rabbit model of endometriosis: the effect of pregnancy. Hum.Reprod. 7:73-75 (1992)
41. Elder M.G., Patel L. and White O.: Effects of contraceptive progestogens on prostaglandins. WHO simposium, Geneva (1988)
42. Espey L.L.: Ovulation as an inflammatory reaction - a hypothesis. Biol. Reprod. 22: 73-106 (1980).

43. Evans R.M.: The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. Science 240: 889-895 (1988).
44. Evans J.M. and Sutton D.J.: The use of hormones especially progestagens, to control oestrus in bitches. J. Reprod. Fert. Suppl. 39: 163-173 (1989).
45. Fawcett, D.W.: "Tratado de Histología Bloom-Fawcett". 11a ed., Interamericana Mc.Graw-Hill, México, 1989
46. Finn, C.A.; Martin, L.: "Patterns of cell division in the Mouse Uterus During Early Pregnancy" J. Endocr. 39: 593-597. (1967).
47. Finn C.A. and Publicover M.: Hormonal control of cell death in the luminal epithelium of mouse uterus. J. Endocr. 91: 335-340 (1981).
48. Fridlansky, F. and Milgrom E.: Interaction of uteroglobin with progesterone 5-pregnane, 3,20-dione and estrogens. Endocrinology 99: 1244-1251 (1976).
49. García E.; Bouchard, P.; De Brox, J.; Berdah, R.; Frydman, R.; Schaison, G.; Milgrom, E. and Perrot-Applanat, M.: Use of immunocytochemistry of progesterone and estrogen receptors for endometrial dating. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 67: 80-86 (1988).
50. Gerschenson L., Conner E. and Murai J.T.: Regulation of the cell cycle by diethylstilbestrol and progesterone in cultured endometrial cells. Endocrinology 100: 1468-1471 (1977).
51. Gibbons A.F.E. and Chang, M.C.: Number of mast cells in the rat uterus with special reference to its relation to hormonal treatment and decidual response. Biol. Reprod. 6: 193-203 (1972).
52. Gibson M.K., Nemmeres L.A., Bechman W.C., Davis V. L., Curtis S.W. and Korach K.S.: The mechanism of ICI. 164, 384 antiestrogenicity involves rapid loss of estrogen receptor in uterine tissue. Endocrinology 129: 2000-2010, (1991).
53. Giguère V.: Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins : complex interplay in retinoid signaling. Endocrine reviews 15: 61-79 (1994).

54. Glasser S.R. and McCormack S.A.: Estrogen-modulated uterine gene transcription in relation to decidualization. Endocrinology 104: 1112-1118 (1979).

55. Goodman y Gilman: Bases Farmacológicas de la Terapéutica, ed. Interamericana Mc-Graw Hill, México, D.F. 1988.

56. Gorski, J. Toft, D.O.; Shylamala, G.; Smith, D. and Notides, A. Rec. Prog. Horm. Res. 24: 45-80 (1968). Citado por Clark

57. Goswami A., Feigelson, M.: Differential regulation of a low molecular weight protein in oviductal and uterine fluid by ovarian hormones. Endocrinology 95: 669 (1974).

58. Green S. and Chambon P.: Nuclear receptors enhance our understanding of transcription regulation. Trend in Genet. 4: 309 (1988).

59. Grill J. L.: Design and analysis of experiment in the animal and medical science. Iowa State University Press 2 Edition, Iowa, U.S.A. 1981.

60. Groyer-Picard M.T., Vu-Hai M.T., Jolivet A., Milgrom E. and Perrot-Appianat.: Monoclonal antibodies for immunocytochemistry of progesterone receptor (PR) in various laboratory rodents, livestock, humans and chickens: identification of two epitopes conserved in PR of all these species. Endocrinology 126: 1485-1491 (1990).

61. Gutiérrez-Sagal R., Pérez-Palacios G., Langley E., Pasapera A., Castro R. I., and Cerbón C. M.: Endometrial expression of progesterone receptor and uteroglobin genes during early pregnancy in the rabbit. Molecular Reproduction and Development 34: 244-249 (1993).

62. Guy J., Dhanireddy R. and Mukherjee A.B.: Surfactant-producing rabbit pulmonary alveolar type II synthesize and secrete an antiinflammatory protein, uteroglobin. Biochem. Biophys. Res. Commun. 189: 662-669 (1992).

63. Hafez E.S. and Tsutsumi t.: Changes in the endometrial vascularity during implantation an pregnancy in the rabbit. Am. J. Anat. 118: 249-282 (1966).

64. Hafez E.S.E.: Reproduction in farm animals. 4 th. edition. Lea & Febiger, Philadelphia, 1980.

65. Hapgood J., Cuthill S., Denis M., Poellinger L. and Gustafsson J.A. : Specific protein-DNA interactions at a

xenobiotic-responsive element: copurification of dioxin receptor and DNA-binding activity. Proc. Natl. Acad. Science USA 86 : 60-64 (1989).

66. Hegele-Hartung, C.; Chwalisz, K. and Beier, H.M.: Distribution of estrogen and progesterone receptors in the uterus: an immunohistochemical study in the immature and adult pseudopregnant rabbit. Histochemistry (Germany), 97:39-50 (1992).

67. Henzl M. Smith E., Boost G. and Tyler E.: Lysosomal concept of menstrual bleeding in humans J. Clin. Endocrinol. 34: 860-875 (1972).

68. Hicks, J.J.: Nuevos conceptos relacionados con la implantación. V. Función de los fluidos tubario y folicular. Ginec. Obstet. Méx. 46: 379-390 (1979).

69. Hicks J.J. y Gil. Recasens M.E.: Características morfológicas y funcionales del cigoto de mamífero durante la preimplantación. Ginec. Obstet. Mex. 47: 275-290 (1980).

70. Hild-Petito, Verhage H.G. and Fazleabas A.T.: Immunocytochemical localization of estrogen and progesterone receptors in the Baboon (Papio anubis) uterus during implantation and pregnancy. Endocrinology 130: 2343-2353 (1992).

71. Hyde, B.A.; Blaustein, J.D. and Black D. L.: "Differential regulation of progesterone receptor immunoreactivity in the rabbit oviduct". Endocrinology, 125: 1479-1483 (1989).

72. Isomaa V., Isotalo H., Orova M., Torkkeli T. and Janne O.: Changes in cytosol and nuclear progesterone receptor concentrations in the rabbit uterus and their relation of progesterone-regulated uteroglobin. Biochem. Biophys. Res. Comm. 88: 1237-1243 (1979).

73. Isomaa V.: In vitro binding to and in vivo effect on the cytosol and nuclear progesterone receptors of various progestins, and their relationship to synthesis of uteroglobin in rabbit uterus. Biochim Biophys. Acta 675: 9-16 (1981).

74. Isotalo H., Isomaa V. and Janne O.: Replenishment and properties of cytosol progesterone receptor in rabbit uterus after multiple progesterone administrations. Endocrinology 108: 868-873 (1981).

75. Issemann I. and Green S. : Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. Nature 347 : 645-650 (1990).

76. Iwai, T.; Nabu, Y.; Iwai, M.; Tau, S.; Funju, S. and Mori, T.: "Immunohistochemical localization of oestrogen receptors and progesterone receptors in human ovary throughout the menstrual cycle. Virchow Arch(A) 417:369-375 (1990 ). Citado por Iwai (1991).

77. Iwai T.; Funjii S.; Nabu, Y.; Norogaki, H.; Konishi, I.; Mori, T. and Okamura H.: "Effect of Human Chorionic gonadotropin on the expression of progesterone receptors and estrogen receptors in rabbit ovarian granulosa cells and the uterus. Endocrinology, 1129: 1840-1848 (1991).

78. Jensen, E.; Suzuki, T.; Kawashima, T.; Stumpf, W.E. Jungblut, P.W. and De Sombre, E.R. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 59: 632-638 (1968). Citado por Clark.

79. Jensen E.V. : Overview of the nuclear receptor family. in Nuclear hormone receptors M.G. Parker ed. ,p. 1-13, Academic Press, New York, 1991.

80. Kay, E.; Flegelson, M.: An estrogen modulated protein in rabbit oviductal fluid. Biochem. Biophys. Acta, 271: 436 (1974 ).

81. King W.J. and Greene G.L.: Nature 307: 745-747 (1984). Citado por Clark, 1984.

82. Kirchner C.: Uteroglobin in the rabbit I. Intracellular localization in the oviduct uterus and preimplantation blastocyst. Cell Tissue Res, 170:415-424 (1976).

83. Kirshnan R.S. and Daniel Jr. J. C.: "Blastyokinin" inducer and regulation of blastocyst development in the rabbit uterus. Science 158:490 (1967).

84. Knox G.E. and Beck L.R.: Prevention of ovulation in rabbit by antihistamine. Gynecol. Invest. 7: 30 (1976)

85. Koering M.J., Healy D.L. and Hodgen G.D.: Morphologic response of endometrium to a progesterone receptor antagonist, RU-486, in monkeys. Fertil Steril 45:280-287 (1986).

86. Kopu H.F., Kokkonen E.K. and Janne O.A.: Acute antiprogesterone action of estradiol in the rabbit uterus. Endocrinology 109: 1479-1483 (1981).
87. Krishna A. and Terranova P.F.: Alterations in mast cell degranulation and ovarian histamine in the proestrus hamster. Biol. Reprod. 32:1211-1217 (1985).
88. Lara S., Padilla, Castro, I.: Apuntes de Clínica Canina y Felina. Edición particular, 1988.
89. Larrea F.; Vilchis, F.; Chávez, B.; Pérez, A.E.; Garza-Flores, J.; Pérez-Palacios, G.: "The metabolism of 19-Nor contraceptive progestins modulates their biological activity at the neuroendocrine level". J. Steroid Biochem. 27:657-663. (1987).
90. Lazar M.A. : Thyroid hormone receptors. Multiple forms , multiple possibilities. Endocrine Reviews 14 : 184-193 (1993).
91. Lieberman B.A., Bona B.J., Edwards D.P. and Nordeen S.K.: The constitution of progesterone response element. Molecular Endocrinology 7: 515-527 (1993).
92. Lippes, J.; Krasner, J.; Alfonso, L.; Dacalos, E. Lucero, R.: "Human Oviductal Fluid Proteins". Fertil Steril. 36:623-629 (1981).
93. Loosfelt, H. Fridlansky, F.Savouret J., Atger, M and Milgrom, E.: "Mechanism of action of progesterone in the endometrium: induction of uteroglobin and its mRNA. J.Biol.Chem. 256: 3465 (1981).
94. Low and Kurischko: Acta histochem. Suppl. XXVI: 375-378 (1982) Citado por Schubert (1983).
95. Loza A.M., Lemus A.E. y Pérez-Palacios G.: Metabolismo de hormonas esteroides.en Bioquímica e Inmunología Cap. 5 Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. 1988
96. Lynch M.P, Nawaz S. and Gershenson L.E.: Evidence for soluble factors regulating cell death and cell proliferation in primary cultures of rabbit endometrial cells grown on collagen. Proc. Natl. Acad. Sci. 83: 4784-4788 (1986).
97. Martin L., Pollard J.W. and Barbara Fagg: Oestradiol, Oestradiol-17 B and the proliferation and death of uterine cells. J. Endocr. 69: 103-115 (1976).

98. Mc Donald, L.E.: Reproducción y Endocrinología Veterinarias. Segunda edición. Nueva Editorial Interamericana, México D.F. 1982.

99 Mc Phail, M.K. : The assay of progesterin. J. Physiol. 83 : 145-156 (1934).

100. Miele, L.; Cordella-Miele, E. and Murkherjee, B.: Uteroglobin: Structure, Molecular Biology, and New Perspectives on Its Function as a Phospholipase A2 Inhibitor. Endocrinology Reviews 8 (4): 474-490 (1987).

101. Nawaz, S.; Lynch, P.M.; Galand, P. and Gerschenson, L.E.: Hormonal Regulation of Cell Death in Rabbit Uterine Epithelium. Am. J. Pathol. 127: 51-59 (1987).

102. Noyes R.W, Hertig A.T. and Rock, J.: Dating the endometrial biopsy. Fertil. Steril. 1: 3 (1950).

103. Odor: Cyclic changes inciliation of the oviductal epithelium in pig-tailed macaque (Macaca nenistrina). Am. J. Anat. 153: 345-366 (1978).

104. Orozco C., Perkins T. and Clarke F.M.: Platelet activating factor the expression of early pregnancy factor activity in female mice. J. Reprod. Fert. 78: 549-555 (1986).

105. Orozco C., Cock I., Perkins AV and Clarke FM.: Platelet-activating factor and serum components from oestrus mice co-operate to mimic the activity of early pregnancy factor in the resette inhibition assay. J. Reprod. Fertil. 88: 447-457 (1990).

106. Parr E.L., Tung H.N. and Parr M.B.: Apoptosis as the mode of uterine epithelial cell death during embryo implantation in mice and rats. Biol. of Reproduc. 36: 211-225 (1987).

107. Pasapera L. A., Gutiérrez-Sagal R.: Efecto de la noretisterona y sus metabolitos 5 $\alpha$  dihidronoretisterona y 3 $\beta$  5 $\alpha$  tetrahidronoretisterona sobre la expresión de el gen de uteroglobina Tesis de Licenciatura ENEP-Iztacala-UNAM México, D.F. 1989.

108. Pasapera L.A.: Efecto antiprogestacional de los metabolitos reducidos en el anillo A de la noretisterona a nivel genómico. Tesis de Maestría Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM México, D.F. 1994

109. Pasapera L., Cerbón C.M., Castro I., Gutiérrez S. R., Camacho-Arroyo I., García A.G. and Pérez-Palacios G.: Norethisterone metabolites modulate the uteroglobin and progesterone receptor expression in prepuberal rabbits. Biol. Reprod. 52: 426-432 (1995a).
110. Pasapera L.A. , Camacho-Arroyo I., Savouret F. J., García A. G., Pérez-Palacios G., Pichon Ch. and Cerbón M.A. : In vitro molecular assessment of the mechanisms of action of 19-nor progestins used as contragestational agents. Archives of Molecular Research 26: Suppl. S203-S207 (1995b).
111. Patek E.: The epithelium of the human fallopian tube. Acta. Obstet. Gynecol. Scand. 53: Suppl. 31 (1974).
112. Patterson, C. and Masters, C.J.: The influence of Progesterone on the Lactate de Hydrogenase Isoenzymes of the Rat Reproductive Tract. FEBS Lett 12:69-71 (1970).
113. Pérez-Palacios G., Vilchis F., Chávez B., Larrea F., García G.A., Arreola G.A. y Pérez A.E.: Cap. XIII. Tópicos selectos de Biología de la Reproducción. UNAM-Miguel Ángel Porrúa. Grupo Editorial. México, 1991.
114. Perrot-Applanat, M.; Logeat, F.; Groyer-Picard, M.T. and Milgrom, E.: Immunocytochemical study of mammalian progesterone receptor using monoclonal antibodies. Endocrinology, 116: 1473-1484 (1985).
115. Perrot-Applanat M., Grayer-Picard M., Lorenzo F., Jolivet A., Haim., Pallud C., Spyrtos F. and Milgrom E.: Immunocytochemical study with monoclonal antibodies to progesterone receptor in human breast tumors. J. Cancer Research 47: 2652-2661 (1987).
116. Perrot-Applanat M., Groyer-Picard M., García E., Lorenzo F. and Milgrom E.: Immunocytochemical demonstration of estrogen and progesterone receptors in muscle cells of uterine arteries in rabbits and humans. Endocrinology 123: 1511-1519 (1988).
117. Pollow, K.; Intharaphuvasak, J.; Manz, B., Grill, H.; Pollow, B.: A Comparison of Cytoplasmic and Nuclear Estradiol and Progesterone Receptors in Human Fallopian Tube and Endometrial Tissue". Fert. Steril. 36: 615-622. (1981).
118. Pratt, W.B.: Transformation of glucocorticoid and progesterone to DNA-binding state. J. Cell. Biochem. 35:51-68 (1987).

119. Punnonen, R and Lukola, A.: "Binding of Estrogen and Progestatin in the Human Fallopian Tube" Fertil Steril, 36: 610-614 (1981).

120. Remmele, W.; Hildebrand, U.; Heitz, H. A.; Klein, P. J.; Vierbuchen, M.; Behnken, L. J.; Heicke, B.; Scheidt, E.: "Comparative histological, histochemical, immunohistochemical studies oestrogen receptors, lectin receptor and Barr bodies in human breast cancer". Virchows Arch. Pathol. Anat. 409:127-147 (1986). citado por Chwalisz et.al. 1991.

121. Rotello R.J., Hocker M.B. and Gerschenson L.E.: Biochemical evidence for programmed cell death in rabbit uterine epithelium. Rapid communication Am. J. Pathol. 134:491-495 (1989).

122. Rotello R.J., Liberman R.C., Lepoff R.B. and Gerschenson L.E.: Characterization of uterine epithelium apoptotic cell death kinetics and regulation by progesterone and RU-486- Am. J. Pathol. 140: 449-456 (1992).

123. Ruckebusch Phaneuf-Dunlop: Physiology of small and large animals. B.C. Decker Inc. Hamilton Ontario 1991.

124. Rudel, H.; Martínez-Manatou, J. and Maqueo-Topete, M.: Role of progestagens in the hormonal control of fertility. Fert. Steril. 16: 158-169 (1965).

125. Schubert, K., Stolzner, W., Freund R., Kurischko A., Koch M. and Freund H.: Endocrinological investigation of 5 $\alpha$ -dihydro-norethisterone (5 $\alpha$ -DH-NET). Interim Progreso Report. Central Institute of Microbiology and Experimental Therapy Academy of Sciences of the G.D.R. February 9, 1983.

126. Schuh, S. Yonemoto, W., Brugge, J.; Bauer, V. J.; Riehl, R.M.: A 90,000 dalton binding protein common to both steroid receptors and Rous sarcoma virus transforming protein. J. Biol. Chem. 260:14292-14296 (1985).

127. Sheridan P.J., Buchanan J.M., Anselmo V.C. and Martin P.M.: Nature 282: 579-582 (1979)

128. Siegel, S.: Estadística no paramétrica. Trillas, México D.F., 1980.

129. Sitruk-Ware R., Yaneva H. and Spitz I.M.: Antiprogestogens and endometrial morphology. Who Symposium on steroid effects on the endometrium Geneva, November 28, December 2, (1988).

130. Sonnenschein C., Soto A.M. Colofiore J. and Farookhi: Exp. Cell. Res. 101: 15-22 (1976). Citado por Clark 1984.

131. Spinelli J.S. y Enos L.: Farmacología y Terapéutica Veterinaria. Nueva Editorial Interamericana, México D.F. 1982.

132. Stefanine E.: Fijation of ejaculated spermatozoa for E.M. Nature 216: 173-174 (1967).

133. Still, W.C, Kahn, M. and Mitra A.: Rapid Chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. J.Org. Chem. 13: 2923-2925 (1978).

134. Sylvan P.E., Maclaughlin D.T., Richardson G.S., Scully R.E. and Nikrui N.: Human uterine fluid proteins associated with secretory phase endometrium: induced products?. Biol. Reproduct. 24: 423-429 (1981).

135. Tapanainen J.S., Tilly J.L., Vihko K.K. and Hsueh A.J.W.: Hormonal control of apoptotic cell death in the testis: gonadotropins and androgens as testicular cell survival factors Molecular Endocrinology 7: 643-650 (1993).

136. Tin-Chiu Li M.R.; Lenton E.A., Rogers A., W., Cooke I.D. and Dockery P.: A new method of histologic dating of human endometrium in the luteal phase. Fertil. Steril. 50: 52-60 (1988).

137. Tolosa J. y Ochoa V.: Morfología Veterinaria 1. Citología y Embriología General, Edición particular Jorge Tolosa Sánchez, México 1984.

138. Torkkeli T.K., Krusius T. and Janne O.: "Uterine and lung Uteroglobin in the rabbit: two identical proteins with differential hormonal regulation". Biochem. Biophys. Acta. 544:578 (1978).

139. Tsai S.Y., Caristede-Duke J., Weigel N.L., Dahlman K., Gustafsson J.A., Tsai M.J. and O'Malley B.W.: Molecular interactions of steroid hormone receptor with its enhancer element: evidence for receptor dimer formation. Cell 55; 361 (1988)

140. Tsai S.V., Tsai M. and O'Malley B.W.: Cooperative binding of steroid hormone receptors contributes to transcriptional synergism at target enhancer elements. Cell. 57: 443 (1989).

141. Ulmann. A., Teutsch G. and Philbert D.: RU-486. Scientific American 262: 42-48 (1990).

142. Vaughan H. L. and Fields P.A.: Rabbit endometrial relaxin. Immunohistochemical localization during preimplantation, pregnancy, and lactation. Biol. Reprod. 42:(1990).

143. Vaughan H.L. and Fields P.A.: Rabbit relaxin: the influence of pregnancy and ovariectomy during pregnancy on the plasma profile. Biol. Reprod. 45: 209-214 (1991).

144. Vegeto E., Shahbaz, M.M., Wen D.X., Goldman M.E, O'Malley B.W. and McDonnell D.P.: Human progesterone receptor A form is a cell-and promoter-specific repressor of human progesterone receptor B function Molecular. Endocrinology 7: 1244-1255 (1993)

145. Verhage H.G.; Beamer N.B. and Brenner R.M.; Plasma levels of estradiol and progesterone in the cat during polyestrus, pregnancy and pseudopregnancy. Biol. Reprod. 14: 579-585 (1976).

146. Verhage, H.G.: Murray M.K.; Boomsma, R.A.; Rehfeldt, P.A. and Jaffe R.C.: The postovulatory cat Oviduct and Uterus: Correlation of Morphological Features with Progesterone Receptor Levels The Anatomical Record 208:521-531 (1984).

147. Voss H. J. and Beato M.: Human uterine fluid proteins: gel electrophoretic pattern and progesterone binding properties. Fertil Steril. 28: 972 (1977).

148. Walters M.R. and Clark J.H.: Relationship between the quantity of progesterone receptor and the antagonism of estrogen-induced uterotrophic response. Endocrinology 105: 382-386 (1979).

149. Warembourg M, Tranchant O., Atger M. and Milgrom E.: Uteroglobin messenger ribonucleic acid: localization in rabbit uterus and lung by in situ hybridization. Endocrinology 119: 1632-1640 (1986).

150. Warshofsky, F.: El control de la vida. Plaza & James, S. A. España, 1974.

151. Welshons W.V., Lieberman M.E. and Gorski J.: Nature 307: 747-749 (1984).

152. West, N.B.; Verhage, H. G.; Brenner, MR.M.: "Changes in Nuclear Receptor and Cell Structure in the Oviductal and Uterus of Cats". Biology of Reproduction 17:138-143 (1977)

153 Willie A.H.: Apoptosis cell death in tissue regulation J. Pathol. 153: 313-316 (1987).

154. Wolf D.P. and Luigi M.J.: Protein composition of human-uterine fluid. Fertil. Steril. 26: 240-247 (1975).

155. Wyllie A.H.; Morris R.G., Smith A.LK. and Dunlop D.: Chromatin cleavage in apoptosis: Association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. Journal of Pathology 142: 67-77 (1984).

156. Zhu Y. , Alvares K., Huang Q., Rao M.M. and Reddy J.K. : Cloning of a new member of the peroxisome proliferator-activated receptor gene family from mouse liver. J. Biol.Chem. 268 : 26817-26820 (1993).