

31960



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**EFFECTO DE LOS ESPERMATOZOIDES Y
DEL LÍQUIDO SEMINAL SOBRE LA
RECEPTIVIDAD ENDOMETRIAL**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

(BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN)

P R E S E N T A :

ARMANDO JUÁREZ BENGOA

TUTOR:

DR. CARLOS ARTURO VILLANUEVA DÍAZ

MÉXICO, D.F.

2005

339741



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A mi esposa Esther
Por compartir la mayor parte de mi vida

A mis hijos Karla, Armando y Cynthia
Porque han sido el objeto de mi vida

A mi madre
Porque me dio la vida

Al Dr. Carlos Villanueva
Porque ha sabido ser un maestro y un amigo

A la Dra. Susana González
Por su asesoría y sus conocimientos que fueron parte esencial en la elaboración de este estudio

A todos los que han contribuido de alguna forma a la realización de este trabajo

A todos ellos
Gracias

ÍNDICE

	PÁGINA
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	8
HIPÓTESIS	8
OBJETIVO	9
MÉTODO	9
RESULTADOS	18
DISCUSIÓN	27
CONCLUSIONES	36
BIBLIOGRAFÍA	37

EFFECTO DE LOS ESPERMATOZOIDES Y DEL LÍQUIDO SEMINAL SOBRE LA RECEPTIVIDAD ENDOMETRIAL

RESUMEN

El semen induce cambios endometriales post-cópula, pero se desconoce su importancia en la secuencia de eventos que culminan en la implantación. El objetivo es saber si la receptividad endometrial en el período de implantación es diferente entre hembras expuestas y no expuestas a los componentes seminales.

Método. Tres grupos de ratas fueron sometidas a oclusión tubaria bilateral. A cada grupo se indujo un pseudoembarazo con estímulos diferentes: estímulo mecánico del cérvix, cópula con macho normal y cópula con macho vasectomizado. Después se aplicó un estímulo deciduogénico en diferentes momentos y se midió el incremento de peso uterino para valorar receptividad. Adicionalmente se midió la concentración de prostaglandina E2 en el quinto día de pseudoembarazo con los tres estímulos mencionados.

Resultados. La máxima receptividad fue a las 14 horas del quinto día, 8 horas del día 6 y 22 horas del día 6 en los grupos con estímulo mecánico, macho normal y macho vasectomizado respectivamente. La intensidad de la respuesta en el primer grupo fue menor que en los otros dos, sin diferencia entre estos últimos. La concentración uterina de prostaglandina E2 fue mayor en el grupo del macho vasectomizado, y no hubo diferencia entre los otros dos.

Conclusiones. La presencia de espermatozoides o de líquido seminal durante la cópula incrementó la receptividad uterina y prolongó su duración. El líquido seminal indujo un incremento de la concentración de prostaglandina E2 en el quinto día de pseudoembarazo.

INTRODUCCIÓN

La reproducción de los mamíferos es un proceso complejo que involucra una serie de fenómenos secuenciales que se inician con el desarrollo de las células germinales en las gónadas y continúan una vez que el semen es depositado en el tracto genital femenino. Tanto las células endometriales como el espermatozoide parecen entablar una interrelación a lo largo de este proceso. Por un lado el espermatozoide adquiere su capacidad fertilizante mediante una serie de cambios que en conjunto reciben el nombre de capacitación. Durante esta transformación el espermatozoide cambia su metabolismo así como la estructura de su membrana celular, desarrolla un patrón de movimiento diferente al mostrado hasta entonces y adquiere la capacidad de presentar la reacción acrosomal cuando hace contacto con la zona pelúcida. Más tarde se une a la membrana celular del ovocito para fusionarse con éste dando origen a su activación lo que permite que reanuda la meiosis que hasta ese momento estaba detenida. El DNA del espermatozoide se descondensa haciendo posible la mezcla de los cromosomas de ambos gametos permitiendo posteriormente la segmentación y el ulterior desarrollo embrionario¹.

Las células espermáticas son completamente ajenas al organismo femenino, por lo que se esperaría que su presencia en el tracto genital femenino causara una respuesta. De hecho, poco después del apareamiento aparece en el endometrio de la rata una infiltración de leucocitos polimorfonucleares similar a la que se observa en una reacción inflamatoria aguda^{2,3}. La cantidad de estas

células disminuye posteriormente y entonces predominan las células monocíticas, las que a su vez también desaparecen gradualmente hasta que se presenta en el día 3 un estado similar al que existía previamente al contacto con el semen².

Este fenómeno de infiltración leucocitaria endometrial se ha observado también en otras especies como el ratón⁴, en el cerdo después de una inseminación intrauterina⁵ y en el conejo en suspensiones espermáticas recuperadas de la hembra para capacitación^{6,7}. Aunque este fenómeno fue interpretado en un principio como un mecanismo de defensa contra las bacterias, se ha observado la misma respuesta cuando se depositan suspensiones espermáticas libres de bacterias en el lumen uterino⁸ lo que demuestra que los componentes seminales son el origen de la respuesta. Por lo tanto, es probable que los leucocitos jueguen un papel en la fisiología local endometrial con repercusión en etapas posteriores del proceso reproductivo.

En el tiempo en que la mórula de la rata alcanza la cavidad uterina también se observa en el endometrio una reacción similar a la inflamación, pero en este caso los eosinófilos se concentran en el endometrio basal y las células monocíticas en el estroma subepitelial². Otra etapa en la que también hay un influjo de un gran número de células, aunque en este caso de células semejantes a las NK, es durante la transformación del endometrio humano no gestante en decidua⁹.

En suma, la interacción entre el endometrio y el espermatozoide induce cambios tanto en uno como en otro. La infiltración de leucocitos en el útero es desencadenada por la presencia de moléculas de origen espermático. Dada la

compleja serie de eventos que se dan posteriormente, este fenómeno puede representar el inicio de otros cambios que finalmente permiten la implantación.

Por otro lado, cuando el blastocisto hace contacto con el endometrio, la receptividad de éste se manifiesta por un aumento en la permeabilidad de los capilares subepiteliales en el endometrio que lo rodea. El incremento de permeabilidad vascular ocurre en todas las especies estudiadas y es una respuesta universal del endometrio a señales del blastocisto aún no identificadas¹⁰.

Algunas de las sustancias involucradas en la reactividad vascular endometrial y la subsecuente decidualización son las prostaglandinas¹¹. Estos cambios endometriales son inhibidos si se remueve el epitelio¹² por lo que éste debe ser la fuente de algún producto que induzca y amplifique la reactividad endometrial¹¹. La concentración de prostaglandinas es mayor en los sitios de implantación en la rata¹³ y en el ratón¹⁴, siendo el epitelio luminal la principal fuente de prostaglandinas. En éste se ha detectado también actividad de sintetasa de prostaglandinas en el quinto día de embarazo en la rata, misma que declina posteriormente¹⁵. En el humano, la producción de prostaglandina E₂ en el epitelio glandular también es significativamente mayor que en el estroma¹⁶.

Otras evidencias de la importancia de las prostaglandinas en la implantación son la existencia de receptores para PGE₂ en el período receptivo en la rata^{17,18}, el ratón¹⁹ y el humano²⁰, así como la reducción de la permeabilidad vascular¹³, inhibición de la reacción decidual²¹ y reducción de la tasa de implantación al aplicar indometacina²².

Un mecanismo probable que explica la intervención de la PGE₂ epitelial en esta etapa²³ es la inducción de esta sustancia por el factor de activación plaquetaria (PAF) de origen embrionario^{24,25,26}. La PGE₂ epitelial induce a su vez la producción de PAF en el estroma¹¹ creando un mecanismo amplificador de señalización celular que pudiera favorecer la implantación.

La complejidad de los eventos que se dan durante la reproducción se refleja muy probablemente por el gran número de pérdidas que se presentan en las fases iniciales de la gestación. Aproximadamente 15% de las gestaciones humanas terminan en un aborto reconocido^{27,28}, sin embargo hasta 55% de las pérdidas ocurre en etapas muy tempranas²⁸ incluso antes de la ausencia de la siguiente menstruación^{29,30,31,32}. La pérdida gestacional temprana también se ha documentado en otras especies tales como el mono rhesus, el cerdo y el conejo²⁷.

Cuando se realizan procedimientos de fertilización *in vitro* (FIV) y transferencia de embriones la tasa de fertilización es de 70 a 90%³³, mientras que la tasa de embarazo es de 15 a 30%^{33,34}. La mayor pérdida embrionaria también parece ser antes del reconocimiento del embarazo³⁵. Considerando que en estos casos la transferencia suele ser de 3 o más embriones³⁴ la tasa de aborto preclínico debe ser aún mayor.

La explicación a esta situación no parece simple. Si bien es cierto que en un gran número de los abortos humanos existen anomalías cromosómicas que explican el rechazo materno, en los abortos sin alteraciones cromosómicas debe haber otra explicación. Es probable que el óvulo fertilizado no se implante o si hay implantación ésta es transitoria³¹, ya sea por defectos fisiológicos maternos o por

defectos en la interacción materno-embriónica³³. Por lo tanto, dentro de las etapas que se dan en la reproducción, la implantación parece representar la principal limitante, tanto en la reproducción natural como en los métodos de reproducción asistida. Además, el hecho de que haya una tasa de implantación disminuida en la fertilización *in vitro*, que se caracteriza por la ausencia de espermatozoides en el tracto genital femenino al tiempo en que debería ocurrir la cópula, apoya el argumento de que los cambios endometriales inducidos por los espermatozoides favorecen la implantación. Ésta se presenta en un momento en que el cigoto en desarrollo ha alcanzado el estado de blastocisto y las células estromales del endometrio se transforman en células deciduales en un proceso que se conoce como reacción decidual, necesaria para la formación de la futura placenta. Los blastocistos inducen cambios locales que adquieren inicialmente un carácter nodular, con focos que se extienden gradualmente hasta abarcar el eje longitudinal completo del endometrio³⁶. Esta respuesta celular decidual es una reacción del tejido conectivo a la presencia del blastocisto o al trauma³⁷.

En los roedores el endometrio puede ser estimulado para producir células deciduales aún en ausencia de un blastocisto si la hembra se encuentra en un estado de pseudoembarazo. Éste puede ser obtenido por una cópula en la que no haya gestación o por estimulación mecánica del cérvix uterino, lo que permite la persistencia del cuerpo lúteo por 12 ó 14 días, a diferencia de lo que ocurre en un embarazo normal en el que el cuerpo lúteo es viable por 20 a 22 días³⁸.

La colocación de ciertas sustancias en el lumen uterino de una rata pseudoembarazada induce la multiplicación de las células estromales y su transformación en células deciduales, en una respuesta similar a la

decidualización que ocurre durante la implantación de un embarazo normal¹⁰. El aceite de sésamo y diversos polisacáridos son ejemplos de estos inductores. Aunque se cree que estos compuestos actúan inicialmente sobre la superficie apical del epitelio uterino³⁶ no se conoce en realidad la cadena de eventos que conducen a la transformación de las células estromales en células deciduales³⁹. Cuando el estímulo queda localizado a una extensión corta se desarrolla un nódulo único de células deciduales, pero si es extenso puede obtenerse una serie de nódulos o una masa única continua. Cada cuerno uterino responde independientemente³⁶.

El tejido resultante se denomina deciduoma y es producido por el desarrollo masivo de células deciduales en el estroma endometrial. Su origen es el tejido conectivo y la fuente más probable son las células mesenquimatosas perivasculares indiferenciadas. Esta multiplicación es efectiva solamente cuando el útero está bajo dominio de la progesterona con algún requerimiento de estrógeno. El proceso es análogo a la reacción decidual natural, porque el tejido es similar en ambos casos y los requerimientos hormonales para su formación son también similares a los requeridos para la implantación³⁷. Como consecuencia del desarrollo del deciduoma, producto de una proliferación celular extremadamente rápida, el útero puede incrementar su peso en poco tiempo³⁷. La inducción del desarrollo de este tejido ha sido un modelo utilizado para investigar factores en la iniciación de la respuesta decidual y de fenómenos relacionados con la implantación^{37,40,41,42}.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se reconoce que la implantación representa la etapa con mayor impacto cuantitativo en la falla de la gestación, ya sea que ésta ocurra naturalmente o mediante procedimientos de reproducción asistida. La presencia de semen en el tracto genital femenino induce una movilización de leucocitos en el endometrio. Posteriormente se presentan cambios secuenciales tanto en el tracto genital femenino como en el cigoto que permiten que una vez que éste se ha transformado en blastocisto, haya una implantación exitosa. Sin embargo, hay un vacío en el conocimiento acerca de los eventos que permiten esta continuidad. Aunque se ha reconocido que los componentes del semen inducen cambios endometriales, no se ha estudiado si estos cambios tienen alguna repercusión en el momento de la implantación. De aquí que el problema en cuestión sea saber si la receptividad endometrial, medida por el incremento de peso uterino y la concentración de prostaglandina E_2 , es diferente entre hembras sometidas al estímulo del semen y hembras no expuestas.

HIPÓTESIS

1. La receptividad endometrial medida por el incremento de peso uterino después de la aplicación de un estímulo deciduogénico es mayor en hembras expuestas previamente a los componentes seminales que en hembras tratadas de manera similar pero no expuestas al semen.

2. La receptividad endometrial, evaluada por la concentración uterina de prostaglandina E_2 en el pseudoembarazo, es mayor en hembras expuestas previamente a los componentes seminales que en hembras no expuestas.

OBJETIVO GENERAL

Analizar el efecto de la presencia de los componentes seminales sobre la receptividad endometrial en la rata.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Comparar la receptividad del útero de la rata con pseudoembarazo en hembras expuestas y no expuestas a los componentes seminales midiendo el peso uterino después de aplicar un estímulo decidualogénico.

2. Comparar la concentración endometrial de PGE₂ el día 5 de pseudoembarazo en hembras expuestas y no expuestas a los componentes seminales.

MÉTODO

Se utilizaron machos con fertilidad comprobada y hembras vírgenes de la cepa Wistar de 10-12 semanas, con un peso promedio de 180-220 gramos, los cuales se alojaron bajo condiciones de temperatura ambiental de 22 °C y 45-50 % de humedad relativa, con ciclos luz-oscuridad de 12 por 12 horas, agua filtrada y tratada con luz ultravioleta y alimento comercial LAB PRODUCTS PMI 5001 administrados *ad libitum*.

Previo al estudio las hembras fueron sometidas a cirugía para realizar una oclusión tubaria bilateral, empleando para la anestesia hidrocloreto de xilacina (Rompun) y ketamina (Imalgen). Una vez anestesiadas se procedió al rasurado y embrocado del área abdominal donde se realizó una incisión en piel sobre la línea media, para posteriormente ingresar a la cavidad abdominal, donde se localizó el

útero y se expusieron los oviductos. Una vez expuestos se hizo un nudo quirúrgico con sutura sintética absorbible de poliglactina 910 violeta 5-0 (Vicryl 5-0) en la unión del oviducto con el cuerno uterino derecho, repitiendo la técnica en el cuerno uterino izquierdo. Después se cerró la cavidad abdominal por planos y se dio un período de dos semanas para su recuperación.

Los machos se dividieron en dos grupos, uno de los cuales permaneció íntegro, por lo que se denominaron machos normales. El segundo grupo fue sometido a cirugía para realizar una vasectomía. Se empleó para la anestesia hidrocloruro de xilacina (Rompun) y ketamina (Imalgen). Una vez aplicada la anestesia se procedió al rasurado y embrocado del área abdominal e inguinal donde se realizó una incisión prepúbica paramedia sobre la piel y después sobre la aponeurosis del músculo recto abdominal. Posteriormente se amplió la incisión con disección roma cuidando de no lesionar vasos sanguíneos u otro órgano interno. Se incidió el peritoneo para buscar y exponer el cordón espermático. Una vez expuesto se realizaron dos nudos quirúrgicos con sutura sintética absorbible de poliacrilamida violeta 5-0 (Vicryl 5-0) con una separación de 4 a 5 mm entre los cuales el cordón fue seccionado. Se repitió el procedimiento en la parte opuesta para ocluir el otro conducto deferente. Se hizo un cierre quirúrgico por planos y se permitió un período de dos semanas para su recuperación.

Una vez preparados los animales se procedió al desarrollo del estudio que se programó en dos partes. La primera consistió en aplicar un estímulo deciduogénico a ratas con pseudoembarazo para cuantificar el incremento de peso uterino como medida de receptividad uterina³⁷. Para ello se hicieron tres grupos de 45 hembras cada uno designados como grupo A, grupo B y grupo C,

divididos a su vez en subgrupos de cinco. Dados los resultados observados durante el desarrollo de los experimentos, el grupo C debió ampliarse con seis subgrupos más por lo que este grupo consistió de 75 hembras, en tanto que el grupo A y el B consistieron sólo de 45.

A todas las hembras se les provocó un estado de pseudogestación, para lo cual se determinó previamente que se encontraran en estro por medio de un frotis vaginal. A cada grupo se le provocó pseudogestación con un estímulo diferente. Las ratas del grupo A fueron inducidas con un estímulo mecánico, produciendo irritación del cérvix con una pipeta Pasteur estéril de acrílico transparente desechable. Las hembras del grupo B tuvieron cópula con machos normales. Finalmente las del grupo C tuvieron cópula con machos vasectomizados. El día 1 de pseudogestación correspondió al día de aplicación del estímulo mecánico para el grupo A en tanto que para los grupos B y C el primer día fue aquel en que se observó el tapón vaginal.

Posteriormente todas las hembras fueron sometidas en diferentes momentos a un estímulo deciduogénico¹⁰. Para esto se requirió someter nuevamente a cirugía con la técnica descrita anteriormente para exponer los cuernos uterinos y aplicar en uno de ellos 100 μ L de aceite de sésamo con una jeringa de insulina estéril con aguja 27G x 13 mm, a 2 mm de la unión del oviducto y el cuerno uterino. El procedimiento provocó una distensión uterina suficiente para comprobar a simple vista que la aplicación fue adecuada. Posteriormente se suturó por planos hasta la piel. El tiempo en que se aplicó el estímulo en cada uno de los subgrupos de 5 hembras se muestran en la Tabla 1. El día se refiere al

tiempo de pseudoembarazo al momento de la aplicación y el horario de aplicación del estímulo corresponde a la hora del día respectivo. Se hizo una sola aplicación a cada animal.

DÍA	HORARIO	SUBGRUPOS DEL GRUPO A	SUBGRUPOS DEL GRUPO B	SUBGRUPOS DEL GRUPO C
4	8:00	1	1	1
	14:00	2	2	2
	22:00	3	3	3
5	8:00	4	4	4
	14:00	5	5	5
	22:00	6	6	6
6	8:00	7	7	7
	14:00	8	8	8
	22:00	9	9	9
7	8:00	----	----	10
	14:00	----	----	11
	22:00	----	----	12
8	8:00	----	----	13
	14:00	----	----	14
	22:00	----	----	15

Tabla 1. Tiempo de aplicación del estímulo deciduogénico con 100 microlitros de aceite de sésamo intrauterino en cada uno de los tres grupos de ratas. La primera columna indica el día de aplicación. La segunda columna indica la hora. La tercera, cuarta y quinta columnas se refieren a los grupos experimentales de pseudoembarazo inducido por estímulo mecánico (grupo A), macho normal (grupo B) y macho vasectomizado (grupo C).

En todos los casos las ratas fueron sacrificadas por dislocación cervical, de acuerdo a la técnica descrita en la Norma Oficial Mexicana 062-ZOO-1999, al quinto día de aplicado el estímulo deciduogénico para extraer el útero. Se separaron ambos cuernos incidiendo en el sitio de unión al cérvix, pesándose por separado en una balanza analítica (Sartorius tipo 1702, Germany) registrando hasta décimas de miligramo. La diferencia de peso entre el cuerno que recibió el estímulo deciduogénico y el que no lo recibió de la misma hembra, fue considerada para el análisis estadístico. Se aplicó un análisis de varianza para comparar los tres grupos mencionados.

La segunda parte del estudio consistió en la cuantificación de la concentración uterina de prostaglandina E₂ en el quinto día de pseudoembarazo. Se eligió este día por los reportes previos de que en este tiempo se había registrado una actividad máxima de síntesis de prostaglandina E₂. Para ello se utilizaron 3 grupos de 10 ratas cada uno designados como grupos D, E y F. Las ratas fueron sometidas a oclusión bilateral de los oviductos de acuerdo a la técnica descrita anteriormente dejando también un período de recuperación de dos semanas. Se indujo un pseudoembarazo con un estímulo diferente en cada uno de los grupos. En los animales del grupo D se aplicó un estímulo mecánico en el cérvix uterino como ya se describió. En el grupo E el pseudoembarazo fue inducido por cópula con machos normales y en el grupo F la cópula fue con machos vasectomizados. El día 1 de pseudoembarazo correspondió al día en que se aplicó el estímulo mecánico en el grupo D o el día en que se observó por la mañana un tapón vaginal en los grupos E y F.

Todos los animales fueron sacrificados por dislocación cervical al quinto día de pseudoembarazo de acuerdo a la norma mencionada previamente. El útero fue extraído y se colocó inmediatamente en solución salina fría con indometacina (20 µg/mL) por un mínimo de 2 minutos para bloquear la síntesis endógena de prostaglandinas. El útero se pesó y se colocó en etanol absoluto (50 mg de tejido por mililitro). El tejido fue homogeneizado en frío y centrifugado a 750 x g a 4°C por 15 minutos. El líquido sobrenadante se almacenó a -20°C hasta el momento del análisis¹⁴. La cuantificación de PGE₂ se realizó con estuches comerciales (New England Nuclear, Life Science Products, Boston MA) que está basado en la técnica de un solo anticuerpo.

Determinación de PGE₂

El radioinmunoanálisis (RIA) para la determinación de prostaglandina E₂ en los extractos de tejido uterino se hizo en muestras por duplicado diluidas 1:2.5 que se corrieron contra una curva patrón en el rango de 1 a 100 pg/0.1 mL (Tabla 2), usando como diluyente una solución amortiguadora que contenía cloruro de sodio al 0.9%, EDTA 0.01 M, 0.3% de γ globulina de bovino, 0.005% Triton-X-100, 0.05% de azida de sodio, 0.0255 M NaH₂PO₄•H₂O, 0.0245 M Na₂HPO₄•7H₂O, pH 6.8. La precipitación del complejo antígeno-anticuerpo se realizó con una solución de polietilenglicol al 16% con azida de sodio al 0.05% en amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 6.8.

El procedimiento se hizo como sigue: en una gradilla con hielo se agregaron los reactivos en tubos de polipropileno como se especifica en la Tabla 3.

Tubo		Concentración (pg / 0.1 mL)
a	0.1 mL estándar concentrado + 1.9 mL sol. amortiguadora	500
b	0.5 mL de la dilución a + 2.0 mL de sol. amortiguadora	100
c	1.0 mL de la dilución b + 1.0 mL de sol. amortiguadora	50
d	1.0 mL de la dilución c + 1.0 mL de sol. amortiguadora	25
e	1.0 mL de la dilución d + 1.5 mL de sol. amortiguadora	10
f	1.0 mL de la dilución e + 1.0 mL de sol. amortiguadora	5
g	1.0 mL de la dilución f + 1.0 mL de sol. amortiguadora	2.5
h	1.0 mL de la dilución g + 1.0 mL de sol. amortiguadora	1

Tabla 2. Curva estándar para radioinmunoanálisis de PGE₂. Se hicieron diluciones consecutivas a partir del tubo "a". Los tubos b-h se utilizaron para la curva.

	Tubos número	Amortiguador (μL)	Estándar (μL)	Muestras (μL)	Marcador PGE ₂ (μL)	Anticuerpo (μL)
Cuenta total	1 - 2	---	---	---	100	---
Blanco	3 - 4	200	---	---	100	---
"0" estándar	5 - 6	100	---	---	100	100
Concentración estándar	7 - 20	---	100	---	100	100
Muestra	21 - 80			100	100	100

Tabla 3. Preparación de los tubos para análisis de PGE₂. Los tubos 7-20 se utilizaron para la curva estándar. Los tubos 21-80 se utilizaron para las muestras por analizar.

Posteriormente se incubaron durante 24 horas a 4°C y se adicionó 1 mL de solución precipitante fría en cada tubo. Éstos se agitaron durante 4 segundos y se incubaron en una gradilla con hielo durante 30 minutos. Terminado este periodo, los tubos se centrifugaron a 2000 x g durante 30 minutos a 4°C. Finalmente el sobrenadante se separó por decantación en papel absorbente durante un minuto y se secaron los tubos para remover el líquido residual.

El conteo se hizo en un contador de radiaciones gamma (Abbott Laboratories modelo 7040J). Los cálculos de las cuentas netas (cuentas por minuto, CPM) se hicieron sustrayendo el valor de las muestras y los estándares de la unión no específica (tubos 3 y 4). Los valores del porcentaje de unión se graficaron contra

la concentración de PGE₂ en pg / muestra. Para obtener los valores por mg de tejido extraído los valores se calcularon usando la siguiente fórmula: PGE₂ (pg) / mg de tejido = (concentración) (10) (2.5) / 50.

La sensibilidad del ensayo es de 0.44 pg y los coeficientes de variación intra e interensayo de 6% y 8% respectivamente. Los porcentajes de reacción cruzada en el punto de 50% de unión con diferentes analitos se presenta en la tabla 4.

Para controlar la variación interensayo en la determinación de PGE₂, todas las muestras obtenidas de este experimento se analizaron en el mismo ensayo.

Compuesto	%
PGE ₁	30
DHKPGE ₂	0.02
PGA ₂	0.8
PGF _{1α}	0.7
Tromboxano B ₂	0.01
PGF _{2α}	0.9
Ácido araquidónico	0.01

Compuesto	%
DHKF _{2α}	0.005
PGA ₁	0.08
PGB ₂	0.07
6KPGF _{1α}	1
Ácido linoleico	0.002
PGD ₂	0.3

Tabla 4. Porcentaje de reacción cruzada con la PGE₂ en el punto de 50% de unión con diferentes analitos.

RESULTADOS

Los resultados se presentan en dos partes. La primera corresponde al incremento de peso uterino provocado por un estímulo deciduogénico y se designa como experimento I. La segunda parte corresponde a la concentración uterina de prostaglandina E_2 durante el estado de pseudoembarazo y se designa como experimento II.

RESULTADOS DEL EXPERIMENTO I

En la figura 1 se muestra el aspecto de los cuernos uterinos, a la izquierda el control y a la derecha el que recibió el estímulo deciduogénico.

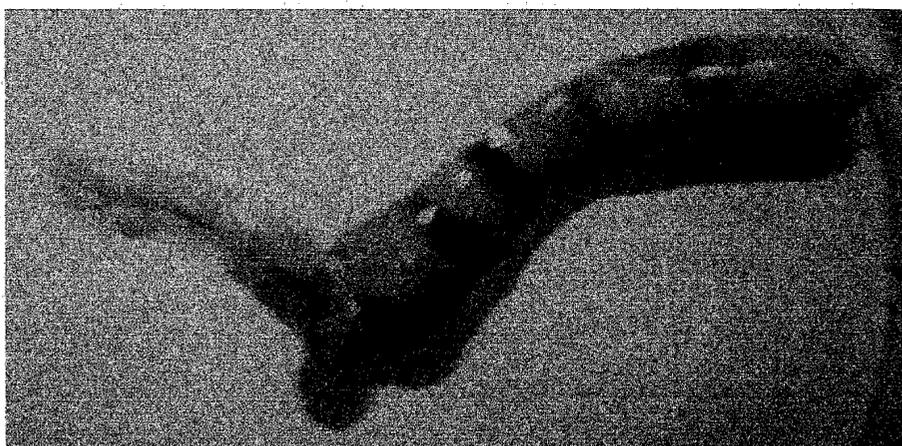


Figura 1. Aspecto del útero extraído cinco días después de haber aplicado un estímulo deciduogénico. El cuerno uterino del lado derecho recibió el estímulo con aceite, en tanto que el del lado izquierdo sirvió como control.

Puede observarse el aumento de volumen y el aspecto edematoso del cuerno uterino que fue estimulado comparado con el cuerno que no recibió el estímulo. En algunos casos la diferencia observada entre ambos cuernos uterinos

fue pequeña, mientras que en otros prácticamente no hubo diferencia. Ésta se hizo más evidente a medida que la diferencia de peso fue más grande. La figura corresponde a un caso en el que la diferencia de peso fue muy grande.

La diferencia de peso registrado (promedio \pm DE) en cada uno de los grupos experimentales y la hora a la que se aplicó el estímulo deciduogénico se presentan en la Tabla 5.

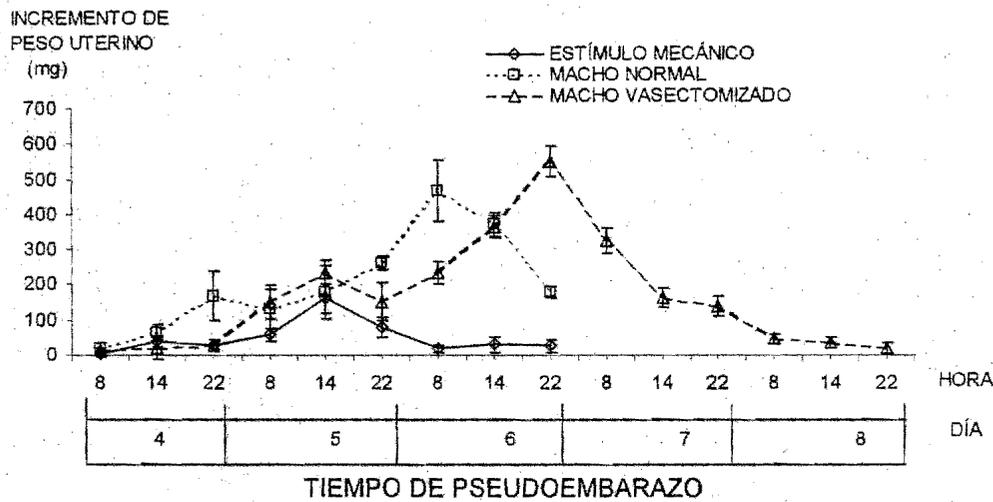
Día	Hora	GRUPO A Estímulo mecánico Media \pm DE	GRUPO B Macho normal Media \pm DE	GRUPO C Macho vasectomizado Media \pm DE
4	8	2.9 \pm 5.6	18.6 \pm 15.0	16.7 \pm 3.5
	14	38.5 \pm 15.9	65.0 \pm 23.3	20.0 \pm 31.2
	22	28.7 \pm 15.7	167.4 \pm 68.4	26.1 \pm 16.2
5	8	58.2 \pm 18.7	131.3 \pm 55.6	148.6 \pm 47.8
	14	160.9 \pm 41.6 *	177.7 \pm 76.3	234.8 \pm 33.0
	22	78.9 \pm 28.6	262.4 \pm 19.8	151.9 \pm 53.6
6	8	19.1 \pm 10.5	467.4 \pm 87.1 †	233.2 \pm 32.8
	14	29.7 \pm 23.1	370.1 \pm 33.9	363.3 \pm 32.7
	22	26.5 \pm 18.8	177.4 \pm 16.8	550.8 \pm 43.7 *
7	8	---	---	324.5 \pm 36.6
	14	---	---	162.2 \pm 28.8
	22	---	---	139.2 \pm 27.7
8	8	---	---	46.5 \pm 13.5
	14	---	---	36.9 \pm 16.3
	22	---	---	20.1 \pm 16.3

Tabla 5. Incremento de peso uterino cinco días después de la aplicación del estímulo deciduogénico a ratas con pseudoembarazo. Se indican los valores promedio \pm desviación estándar en miligramos.

* Estadísticamente diferente respecto a los demás valores de su grupo.

† Estadísticamente diferente respecto a los demás valores de su grupo, excepto el que corresponde al sexto día a las 14 horas.

El perfil de incremento del peso uterino en los tres grupos experimentales se presenta en la gráfica 1.



Gráfica 1. Incremento de peso uterino después del estímulo deciduogénico en tres condiciones diferentes para causar un pseudoembarazo. En el eje principal se presentan las horas a las que se aplicó el estímulo y en el secundario el día. Los valores se presentan como promedio de la diferencia de peso entre los cuernos estimulado y no estimulado. Las barras verticales representan a la desviación estándar de cinco mediciones. Se observa una receptividad máxima en momentos diferentes en cada grupo.

El incremento del peso uterino en el grupo con pseudoembarazo por estímulo mecánico fue de poca magnitud (2.9 mg) y con una desviación estándar grande (± 5.6) en el primer registro a las 8 horas del día 4. Sin embargo, desde el siguiente registro y a medida que se prolongaron los tiempos el incremento del peso uterino se hizo cada vez más evidente alcanzando un nivel máximo el día 5 a las 14:00 horas cuando el valor registrado fue de 160.9 mg. A partir de este

momento hubo una tendencia a diferencias de peso cada vez menores que se registraron hasta el día 6 a las 22:00 horas (26.6 mg).

En el grupo con pseudoembarazo inducido con un macho normal hubo también un incremento de peso de poca magnitud (18.6 mg) en el primer registro hecho el día 4 a las 8 horas, mismo que fue cada vez mayor a medida que el registro se prolongó, llegando a un valor máximo el día 6 a las 8:00 horas, que fue de 467.4 mg. Después de este momento la tendencia fue francamente a la disminución por lo que el último ensayo se hizo a las 22:00 horas del día 6 (177.4 mg). Aunque la tendencia de la curva fue similar al grupo de estímulo mecánico, las magnitudes registradas fueron claramente superiores en el grupo de pseudoembarazo con un macho normal, siendo también diferente el tiempo en que se dio la respuesta máxima.

En el grupo de pseudoembarazo inducido con un macho vasectomizado se observó un comportamiento parecido a los dos grupos anteriores, pero también con un desfase en el tiempo en el que se alcanzó la respuesta máxima. El primer registro a las 8 horas del día 4 en este grupo fue de 16.7 mg, con una tendencia al incremento en los siguientes registros, alcanzando un valor máximo el día 6 a las 22:00 horas (550.8 mg). El hecho de haber alcanzado en este momento el valor máximo de los registros obligó a extender el tiempo de observación por lo que en este grupo se hicieron ensayos por dos días más. Durante el día 7 se observó una tendencia a la disminución en el incremento de peso, misma que persistió el día siguiente registrando 20.1 mg a las 22:00 horas del día 8. La magnitud máxima alcanzada fue superior en este grupo respecto a los dos grupos anteriores.

En estos resultados destacan dos características importantes. Por un lado, la magnitud de la respuesta fue diferente en cada grupo, siendo menor en el caso del estímulo mecánico, con un valor máximo de 160.9 mg. En el grupo del macho normal la respuesta máxima fue de 467.4 mg lo que representa 290 % en relación con el primer grupo. La respuesta máxima en el grupo con el macho vasectomizado fue de 550.8 mg lo que significa 342 % del valor máximo en el primer grupo y 117 % respecto al segundo grupo.

La otra característica dentro de la respuesta entre los tres grupos fue el tiempo en el que se obtuvo el incremento máximo de peso encontrando éste a las 14 horas del día 5 de pseudoembarazo en el grupo del estímulo mecánico, en tanto que en el grupo del macho normal, el incremento máximo se consiguió 18 horas después; es decir, a las 8 horas del día 6. Finalmente, en el grupo del macho vasectomizado, la respuesta máxima se alcanzó a las 22 horas del día 6, lo que significó 34 horas después del tiempo requerido para el primer grupo y 14 horas después del segundo grupo.

El análisis de varianza de una vía de las diferencias encontradas en el peso uterino en el grupo con estímulo mecánico probó que el valor máximo registrado en el pico de receptividad uterina (subgrupo 5, día 5 a las 14 horas) fue significativamente mayor ($p < 0.05$) que el registrado en otros días.

En el caso del grupo de animales que tuvo cópula con un macho normal, el análisis de varianza mostró que, exceptuando el registro del día 6 a las 14 horas, la diferencia del peso uterino en el día 6 a las 8 horas fue significativamente mayor al resto de los registros hechos en el mismo grupo.

En el caso de los animales que tuvieron cópula con un macho vasectomizado, el valor máximo del peso uterino se alcanzó el día 6 a las 22 horas. En este caso tampoco hubo diferencia significativa con los dos valores adyacentes (día 6 a las 14 horas y día 7 a las 8 horas). Estos dos valores fueron significativamente mayores que el resto pero no fueron diferentes entre ellos.

Como puede observarse en la gráfica 1, el cambio máximo de peso en el grupo en el que se utilizó un estímulo mecánico y en el que se utilizó un macho normal para provocar un pseudoembarazo fue de 160.9 ± 41.6 mg y 467.4 ± 87.1 mg respectivamente en tanto que en el grupo estimulado con un macho vasectomizado el peso máximo registrado fue de 550.8 ± 43.7 mg. Cuando se compararon estos valores se observó en el análisis de varianza que el incremento máximo de peso uterino alcanzado en el grupo con estímulo mecánico fue estadísticamente menor que en los otros dos grupos ($p < 0.05$), en tanto que la diferencia de peso en el punto máximo de los otros dos grupos no fue estadísticamente significativa ($p > 0.05$).

RESULTADOS DEL EXPERIMENTO II

En la tabla 6 se presentan los datos de la curva estándar utilizada para el análisis de prostaglandina E_2 en los tres grupos experimentales. En la columna 4 se indican la cuentas por minuto (CPM) y en la sexta columna el porcentaje de unión (B/Bo). Se utilizaron los tubos b - h, de manera que las concentraciones en la curva tipo fueron de 1 pg / 0.1 mL a 100 pg / 0.1 mL.

TUBO	CONCENTRACIÓN (pg / 0.1 mL)	log de la concentración	CPM	CPM - UNE (B)	% (B / Bo)
	CT		10440	10036	
	UNE		404	0	
a	UT		5938	(Bo)5534	100.00
b	100	2.00	1218	814	14.71
c	50	1.70	1669	1265	22.86
d	25	1.40	2444	2040	36.86
e	10	1.00	3539	3135	56.65
f	5	0.70	4225	3821	69.05
g	2.5	0.40	4818	4414	79.76
h	1	0.00	5530	5126	92.63

Tabla 6. Curva estándar de PGE₂. Los tubos b - h se utilizaron para la elaboración de la curva. CT es la cuenta total, UNE es la unión no específica o el "blanco", UT es unión total o el "0" estándar, Bo es la cuenta neta del "0" estándar, B es el valor que corresponde a la PGE₂ marcada unida.

La cuenta total se obtuvo con la solución que contenía únicamente PGE₂ marcada haciendo directamente la lectura ya que no se adicionó anticuerpo y por lo tanto no se separó ningún precipitado. La unión no específica corresponde al "blanco" y representa el valor obtenido en la fracción precipitada de la mezcla del marcador y la solución amortiguadora. La unión total o el "cero" estándar es el valor máximo obtenido por precipitación del complejo antígeno-anticuerpo porque

en esta mezcla toda la PGE₂ está marcada. El valor de B₀ se obtiene restando la unión no específica del "0" estándar, por lo que representa el valor de la unión neta máxima.

La curva estándar se realizó con los valores del porcentaje de unión de PGE₂ [% (B/B₀)] y el logaritmo de la concentración de PGE₂. El procedimiento se realizó simultáneamente con las muestras de los grupos D, E y F, a los cuales se les indujo un pseudoembarazo con un estímulo mecánico, un macho normal y un macho vasectomizado respectivamente. Como los valores en los tres grupos se encontraron inicialmente fuera de los límites de la curva estándar, se probaron diferentes diluciones hasta que con una dilución 1:2.5 fue posible interpolar los valores en la curva. A cada valor se restó el correspondiente a la unión no específica y con este dato se calculó el porcentaje de unión [% (B/B₀)].

El valor promedio del porcentaje de unión de PGE₂ [% (B/B₀)] fue de 53.48, 52.46 y 40.54 para los grupos D, E y F respectivamente. Estos valores fueron interpolados en la curva construida con los datos de la Tabla 6, obteniendo el logaritmo de la concentración por interpolación en la curva. Los valores de la concentración de PGE₂ en las muestras analizadas se obtuvieron con los antilogaritmos correspondientes.

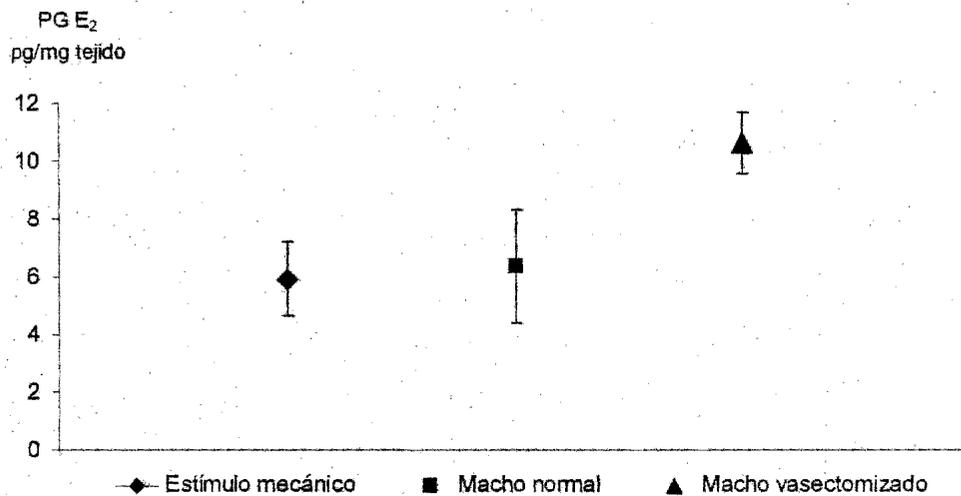
La concentración de PGE₂ en el tejido se calculó considerando que la concentración en la curva es en pg/0.1 mL, la dilución de la muestra (1:2.5) y la cantidad de líquido en que se colocó inicialmente el tejido. En la Tabla 7 se presentan estos datos.

Grupo	D Estímulo mecánico	E Macho normal	F Macho vasectomizado
Media \pm desviación estándar (pg / mg)	5.92 \pm 1.29	6.33 \pm 1.95	10.59 \pm 1.03 *

Tabla 7. Concentración uterina de prostaglandina E₂ en el quinto día de pseudoembarazo en los grupos D, E y F. Se presentan los datos en picogramos por cada miligramo de tejido. * p < 0.05
n = 10 en cada grupo.

Como se observa en la Tabla 7, la concentración de PGE₂ fue de 5.92 \pm 1.29 picogramos por miligramo de tejido uterino cuando el pseudoembarazo se obtuvo con un estímulo mecánico (grupo D). En el grupo E, que recibió el estímulo fue con un macho normal, la concentración de PGE₂ resultó de 6.33 \pm 1.95 pg/mg. En el caso del grupo de pseudoembarazo con macho vasectomizado (grupo F) la concentración fue de 10.59 \pm 1.03 pg/mg. Esto significa que en el grupo del macho vasectomizado la concentración de PGE₂ es 178 % mayor que en el grupo D y 167 % mayor que en el grupo E. Estos resultados se presentan en la gráfica 2.

Se aplicó un análisis de varianza con estos valores y no se encontró diferencia estadística entre los grupos D y E (p>0.05), en tanto que sí hubo diferencia entre los grupos D y F (p<0.05) así como entre los grupos E y F (p<0.05).



Gráfica 2. Concentración de Prostaglandina E2 en el quinto día de pseudoembarazo obtenido con estímulos diferentes. Se representa el valor de la media \pm la desviación estándar de 10 determinaciones

DISCUSIÓN

La dificultad para investigar el fenómeno de la implantación en el humano ha llevado a la búsqueda de diferentes modelos animales para estudiar la función endometrial desde el punto de vista celular, bioquímico y molecular para tratar de dilucidar los mecanismos que ocurren en esta etapa. Aunque existen diferencias entre especies en el proceso reproductivo, algunos de los modelos que se han empleado para estudiar la implantación han servido de base para extrapolar estos hallazgos a otras especies. En este estudio se utilizó un modelo que se basa en la aplicación de un estímulo en el cérvix uterino de la rata para producir un estado de pseudoembarazo y posteriormente un estímulo decidualogénico para inducir un

incremento de peso del útero, respuesta que ha sido considerada marcador de la receptividad endometrial. Este modelo ha sido empleado durante muchos años para estudiar, entre otros aspectos, a la implantación^{36,37,42,43,44}. Además de su reproducibilidad, la elección de este modelo se apoya en la disponibilidad y la accesibilidad.

Otros marcadores que han sido utilizados para estudiar la receptividad uterina incluyen la aparición de pinópodos, la concentración de citocinas, de factores de crecimiento, de moléculas de adhesión celular y la expresión de algunos genes en la etapa de implantación, sin embargo, se desconoce hasta el momento la acción específica de estas moléculas sobre la receptividad endometrial y por ende su papel en este fenómeno⁴⁵.

Los estudios en los que se ha investigado la implantación se han concentrado al período en que interactúan el embrión y el endometrio tratando de identificar alguna (s) sustancia (s) relacionadas directamente con este proceso. Se sabe actualmente que este fenómeno es resultado de una serie de eventos que parecen ocurrir de manera secuencial y que aparentemente están interrelacionados, de forma tal que los eventos precedentes crean las condiciones necesarias para que se presenten los siguientes. De acuerdo con esto, uno de los fenómenos que podría iniciar la serie de cambios que culminan en la implantación es la deposición del semen en el tracto reproductivo femenino y el posterior transporte de espermatozoides a lo largo del tracto genital. De aquí la idea de que uno o varios de los constituyentes seminales pudieran ser los responsables del inicio de los cambios endometriales que conducen a la implantación. Por esta razón, el objetivo de este estudio fue investigar si las condiciones en la etapa

inicial del proceso reproductivo, como es la presencia o ausencia de los componentes seminales en el momento de la cópula, impactan en la receptividad endometrial durante el período de implantación. Por el momento no hay alguna evidencia de que esto ocurra debido a que no existe información relacionada con los efectos a largo plazo sobre la receptividad uterina (en este caso 9 días) después de la aplicación de los diferentes estímulos que producen pseudoembarazo. De acuerdo con la revisión de la literatura, esta es la primera vez que se aborda este fenómeno con esta perspectiva, tratando de ligar dos fenómenos que temporalmente parecerían ser muy distantes.

Actualmente están siendo aclarados los mecanismos que dirigen eventos que hasta hace poco tiempo se consideraban bien definidos. Un ejemplo de ellos es la respuesta inflamatoria endometrial observada después de la cópula cuya causa ha sido atribuida a componentes del plasma seminal, en especial a constituyentes derivados de las vesículas seminales⁴⁶. Sin embargo es probable que las células espermáticas sean parte esencial de este fenómeno porque los espermatozoides son capaces de activar el complemento y éste es abundante en la secreción uterina, por lo que la interacción entre el espermatozoide y la secreción uterina podría producir quimiotaxis y la consecuente migración de polimorfonucleares al lumen uterino⁴⁷. Además, durante el desplazamiento de las células espermáticas a través del útero, hay contacto entre éstas y el epitelio endometrial² y al parecer es el mismo espermatozoide el que a través de la modificación de las moléculas de superficie de las células epiteliales permitiría una interacción célula-célula entre el espermatozoide y el endometrio⁴⁸. Esto abre la posibilidad de que la atracción de leucocitos por el espermatozoide al endometrio

podiera tener algún efecto diferente al de la fagocitosis como se ha argumentado previamente. La interacción del espermatozoide con las células endometriales o con las secreciones uterinas que se adhieren a su membrana plasmática⁴⁹ pueden formar parte de los eventos que inducen la capacitación espermática, pero se desconoce si alguna interacción de este tipo tiene efectos en eventos reproductivos posteriores.

Como ya fue comentado anteriormente, una característica que identifica la receptividad del endometrio de la rata pseudoembarazada es la capacidad de que sus células endometriales se transformen en células deciduales después de recibir un estímulo decidualogénico. La manifestación más evidente de este proceso es el incremento de peso, resultado del desarrollo masivo de células deciduales en el estroma del útero. En este modelo, la aplicación de uno de los estímulos experimentales (estímulo mecánico, cópula) genera un estado de pseudoembarazo y la aplicación de aceite de sésamo es un estímulo decidualogénico. El incremento de peso uterino después de la aplicación del estímulo decidualogénico se tomó en estos experimentos como prueba de receptividad del endometrio ya que se carece de un marcador específico.

En el caso del grupo en el que el pseudoembarazo fue obtenido por estimulación mecánica del cérvix el cambio en el peso del útero fue menor comparado con los grupos en los que el pseudoembarazo se indujo con un macho normal o con un macho vasectomizado. Esto sugiere que los efectos inmediatos post-cópula inducidos por el semen, presente en el grupo del macho normal, pudieran repercutir en el período de la implantación, presentando una respuesta de mayor magnitud respecto al grupo del estímulo mecánico, lo que sugiere que

algún componente del líquido seminal o de los espermatozoides estaría involucrado en el origen de esa respuesta. En el tercer grupo de animales en los que el pseudoembarazo se acompañó de la presencia de líquido seminal pero no de espermatozoides, también fue evidente una mayor receptividad uterina, dado que el incremento de peso fue mayor que en el primer grupo. El hecho de que no se encontrara diferencia estadística en la magnitud del peso máximo entre el grupo del macho normal y el grupo del macho vasectomizado puede interpretarse como una similitud en la respuesta inducida tanto por el semen completo como por el líquido seminal. Esto parecería indicar que existe algún tipo de interacción entre uno o varios de los componentes seminales con las células endometriales lo cual podría crear una respuesta cuya manifestación final es el incremento de peso uterino. Esto último podría atribuirse a una mayor capacidad de transformación del tejido endometrial en tejido decidual y en consecuencia, probablemente una mayor receptividad del endometrio. De acuerdo con esto, la presencia de los componentes seminales durante la cópula pudiera traducirse en una mayor probabilidad de implantación.

Durante el embarazo normal de la rata el blastocisto se encuentra libre en el útero alrededor de las 12 horas del día 5 con el polo embrionario dirigido hacia la superficie antimesometrial del lumen uterino. Entre el mediodía y las 16 horas desaparece la zona pelúcida y en la tarde del día 5 el blastocisto y las células epiteliales llegan a tener un contacto estrecho¹⁰. En el caso del presente estudio se observó un incremento de peso uterino muy parecido en los tres grupos cuando se aplicó el estímulo deciduogénico a las 14 horas del quinto día, lo que significa que la capacidad receptiva valorada en términos del incremento de peso es

prácticamente la misma en este momento. El contacto entre el blastocisto y el endometrio en el embarazo normal ocurre en un tiempo posterior a aquel en que se alcanza la máxima receptividad cuando el pseudoembarazo es inducido con un estímulo mecánico, lo que significa que la preparación de las células endometriales para interactuar con el blastocisto pudiera darse incluso durante este período. La capacidad receptiva de las células debe ampliarse a momentos posteriores, cuando se presenta el contacto entre el blastocisto y el endometrio.

Otro aspecto a destacar en estos experimentos es que en los tres grupos hubo un desfase en el tiempo en el que se observó la respuesta máxima. En el grupo en el que se indujo el pseudoembarazo con un estímulo mecánico el incremento máximo de peso se observó en el quinto día a las 14 horas, aunque en los otros dos grupos el incremento de peso fue muy parecido en ese momento. No obstante, los registros que se hicieron posteriormente fueron cada vez menores en el primer grupo, mientras que en los otros dos el peso fue en incremento hasta alcanzar un máximo 18 horas después en el grupo del macho normal y 32 horas después en el grupo del macho vasectomizado, lo que significa que entre estos dos hubo una diferencia de 14 horas. Esto indica que hasta el momento en que se obtuvo la respuesta máxima en el grupo del estímulo mecánico las condiciones del útero son similares y a partir de ahí la presencia de semen o de líquido seminal imprime un cambio en la duración y ubicación de la máxima receptividad uterina. El hecho de que en el grupo con el macho normal el incremento máximo de peso se alcanzara antes que en el grupo del macho vasectomizado sugiere que los espermatozoides son los responsables de este cambio. En consecuencia, muy

probablemente las células espermáticas aceleran la respuesta que produce el líquido seminal solo.

Como el período en el que se indujo el incremento de peso uterino fue más prolongado tanto en el grupo del macho normal como en el del macho vasectomizado, puede atribuirse a los estímulos que estos grupos representan, que son el semen y el líquido seminal, la causa de este cambio. Dado que el incremento de peso uterino se asocia a su capacidad receptiva, el hecho de haber mantenido alto el peso uterino por un mayor tiempo probablemente pudiera estar en relación a una ampliación en el período receptivo y por lo tanto de la ventana de implantación.

Aunque las diferencias observadas en el incremento de peso uterino en los tres grupos mencionados son inducidas por los componentes seminales, no debe perderse de vista que el fenómeno estudiado fue en un estado de pseudoembarazo y, como ha sido reportado en diferentes estudios^{50,51,52}, el blastocisto secreta algunas sustancias que pudieran ser parte de un diálogo necesario entre las células para que se lleve a cabo la implantación, situación que no se presentó en este estudio y por lo tanto no existió una interacción entre el blastocisto y el endometrio. Lógicamente, la ausencia de un blastocisto no permite observar la influencia de éste sobre los cambios endometriales que potencialmente pueden ser muy importantes dentro del fenómeno reproductivo. Por esta razón, si bien es cierto que el líquido seminal y los espermatozoides inducen cambios en el período e intensidad de receptividad uterina, en realidad no es posible saber qué tanto pudieran modificarse estos cambios si el blastocisto estuviera presente.

En conclusión, la presencia de los componentes seminales parecen inducir un fenómeno de receptividad endometrial diferenciada en la que aparentemente el líquido seminal favorece una mayor receptividad uterina y la mantiene por un tiempo mayor, en tanto que los espermatozoides tienen un efecto sobre la temporalidad, acelerando la respuesta.

En relación con la prostaglandina E₂, se sabe que ésta es producto de la transformación local del ácido araquidónico a través de la vía de la ciclo-oxigenasa y se encuentra en concentración elevada en los sitios de implantación embrionaria. Esta sustancia induce decidualización en el endometrio de la rata incrementando la permeabilidad vascular y contribuyendo a generar edema del estroma, lo que proporciona un intersticio laxo para la invasión del trofoblasto y permite la expansión de volumen de las células deciduales^{53,54}. La principal fuente parece ser el epitelio uterino¹¹ y se ha observado un nivel máximo el quinto día de pseudoembarazo en la rata⁵⁵ así como un incremento en la cantidad de receptores¹⁸ y de prostaglandín sintetasa el mismo día²⁴.

Por esto se decidió en este estudio determinar la concentración de PGE₂ en el quinto día de pseudoembarazo en las tres condiciones ya mencionadas. En el grupo que inició el pseudoembarazo con un estímulo mecánico la concentración de prostaglandina E₂ (5.29 pg/mg de tejido) fue similar a la del grupo cuyo pseudoembarazo se obtuvo con un macho normal (6.33 pg/mg tejido). Sin embargo, la concentración de esta sustancia en el grupo con un macho vasectomizado fue francamente más alta (10.59 pg/mg tejido) que en los otros dos.

La explicación de este fenómeno es por el momento especulativa. La concentración de PGE_2 en el grupo del estímulo mecánico es consecuencia de la síntesis uterina en un estado de pseudoembarazo inducido aún en ausencia de los componentes seminales. Sin embargo, en el grupo con el macho vasectomizado su concentración se incrementa en forma importante al parecer como consecuencia de la presencia de líquido seminal. Pero la concentración de PGE_2 es similar entre el grupo del macho normal y el del estímulo mecánico lo que en apariencia es paradójico si se espera una modificación en la producción de prostaglandina por la presencia de algún componente seminal. Es probable que la presencia de células espermáticas pudiera tener un efecto modulador de este fenómeno modificando la síntesis de prostaglandina, dado que en el grupo del macho normal están presentes tanto líquido seminal como espermatozoides.

Además, debe destacarse que el análisis de esta sustancia se realizó en un momento en que se esperaba una alta concentración de ella, pero se ignora si su cambio en el tiempo es diferente en cada uno de los grupos porque las condiciones en que se indujo el pseudoembarazo fueron diferentes en cada caso. Es decir, no se puede descartar la posibilidad de que haya una cinética de producción de prostaglandina distinta en cada grupo y en consecuencia su concentración fuera distinta en otros momentos. No es posible la comparación con resultados de otros trabajos porque hasta el momento no hay estudios similares.

En resumen, es evidente de los resultados obtenidos en este estudio que los componentes seminales presentes en el tracto reproductivo femenino de la rata en el momento de la cópula tienen un efecto modulador tanto en la respuesta al estímulo decidual como en la producción de prostaglandina E_2 , ambos

fenómenos presentes al tiempo en que ocurre la implantación. Los componentes del líquido seminal inducen un incremento de la respuesta endometrial a la deciduización, pero la fracción celular representada por los espermatozoides aceleran esta respuesta. En relación con la PGE₂ también parece haber un efecto inductor del líquido seminal en el quinto día de pseudoembarazo y una aparente falta de respuesta si están presentes los espermatozoides, pero debe considerarse la posibilidad de que la concentración de PGE₂ fuera diferente en otros momentos. Si esto es cierto, el período de receptividad endometrial, la llamada ventana de implantación, pudiera cambiar si los estímulos a los que está expuesto el aparato genital femenino al tiempo de la cópula modifican los eventos posteriores.

CONCLUSIONES

La presencia de los componentes seminales en el momento de la cópula modifica la respuesta endometrial a un estímulo decíduogénico en el útero de la rata en estado de pseudoembarazo.

Tanto el líquido seminal como los espermatozoides inducen una mayor receptividad endometrial que la inducida sólo por el estímulo mecánico, medida ésta por el incremento de peso uterino posterior a la aplicación de un estímulo decíduogénico.

Los espermatozoides modulan el período de máxima receptividad porque ésta se presenta antes cuando se compara con la respuesta que produce el líquido seminal.

No hay diferencia en la intensidad de la respuesta endometrial al estímulo deciduogénico cuando el útero se expone al líquido seminal o al semen completo.

La concentración de prostaglandina E₂ en el útero de la rata en el quinto día de pseudoembarazo es mayor si éste se induce en presencia de líquido seminal que si se induce mecánicamente o con semen.

La presencia de semen en el momento de la cópula de la rata no modifica la concentración uterina de prostaglandina E₂ en el quinto día de pseudoembarazo en relación con la que se observa cuando éste se induce mecánicamente.

La presencia de espermatozoides o de líquido seminal durante la cópula incrementó la receptividad uterina y prolongó su duración, en tanto que el líquido seminal indujo un incremento de la concentración de prostaglandina E₂ en el quinto día de pseudoembarazo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Yanagimachi R. Mammalian fertilization. En Knobil E, Neill J (eds). The Physiology of Reproduction. New York: Raven Press, 1994:189.
2. Lobel B, Levy J, Shelesnyak M. Studies on the mechanism of nidation. Acta Endocrinologica 1967(Suppl 123):1-45.
3. Finn C. Implantation, menstruation and inflammation. Biol Rev 1986;61:313-328.
4. De M, Choudhuri R, Wood G. Determination of the number and distribution of macrophages, lymphocytes and granulocytes in the mouse uterus from mating through implantation. J Leuk Biol 1991;50:252-262.

5. Rozeboom K, Troedsson M, Crabo B. Characterization of uterine leukocyte infiltration in gilts after artificial insemination. *J Reprod Fertil* 1998;114:195-199.
6. Rosado A, Hicks J, Reyes A, Blanco I. Capacitation in vitro of rabbit spermatozoa with cyclic adenosine monophosphate and human follicular fluid. *Fertil Steril* 1974;25(9):821-824.
7. Soupart P. Leukocytes and sperm capacitation in the rabbit uterus. *Fertil Steril* 1970;21(10):724-754.
8. Howe R. Leukocyte response to spermatozoa in ligated segments of the rabbit vagina, uterus and oviduct. *J Reprod Fertil* 1967;13:563.
9. Loke Y, King A, Burrows T. Decidua in human implantation. *Hum Reprod* 1995;10(Suppl 2):14-20.
10. Psychoyos A. Hormonal control of ovoimplantation. *Vitamines and hormones*. 1973;31:201-256.
11. Psychoyos A, Nikas G, Gravanis A. The role of prostaglandins in blastocyst implantation. *Hum Reprod* 1995;10 (Suppl) 2:30-42.
12. Lejeune B, Van Hock J, Leroy F. Transmitter role of the luminal uterine epithelium in the induction of decidualization in rats. *J Reprod Fertil* 1981;61:235-240.
13. Kennedy T. Evidence for a role for prostaglandins in the initiation of blastocyst implantation in the rat. *Biol Reprod* 1977;16:289-291.
14. Pakrasi P. Prostaglandins and ovum implantation in mice. *J Exp Zool* 1997;278:53-57.

15. Parr M, Parr E, Munaretto K, Clark M, Dey S. Immunohistochemical localization of prostaglandin synthase in the rat uterus and embryo during the perimplantation period. *Biol Reprod* 1988;38:333-343.
16. Smith S, Kelly R. The release of PGF_{2a} and PGE₂ from separated cells of human endometrium and deciduas. *Prostaglandins, leukotrienes, essential fatty acids* 1988;33:91-96.
17. Kennedy T, Martel D, Psychoyos A. Endometrial prostaglandin E₂ binding during the estrus cycle and its hormonal control in ovariectomized rats. *Biol Reprod* 1983;29:565-571.
18. Martel D, Monier M, Roche D, Psychoyos A. Effect of mifepristone (RU486) on concentrations of prostaglandin E-2 binding sites in the rat endometrium. *J Reprod Fertil* 1989;85:527-532.
19. Lim H, Dey K. Prostaglandin E₂ receptor subtype EP₂ gene expression in the mouse uterus coincides with differentiation of the luminal epithelium for implantation. *Endocrinology* 1997;138:4599-4606.
20. Chegini N, Rao C, Wakim N, Sanfilippo J. Prostaglandin-binding to different cell types of human uterus: quantitative light microscope autoradiographic study. *Prostaglandins Leukotrienes Med* 1986;22:129-138.
21. Keys J, Kennedy T. Effect of indomethacin and prostaglandin E₂ on structural differentiation of rat endometrium during artificially induced decidualization. *Am J Anat* 1990;188(2):148-162.
22. Poyser N. A comparison of the effects of indomethacin and NS-398 (a selective prostaglandin H synthase-2 inhibitor) on implantation in the rat. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1999;61(5):297-301.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

23. Kudolo G, Kasamo M, Harper M. Autoradiographic localization of platelet-activating factor (PAF) binding sites in the rabbit endometrium during the peri-implantation period. *Cell Tissue Res* 1991;265:231-241.
24. O'Neill C, Pike J, Porter R, Gidley-Baird A, Sinosich M, Saunders D. Maternal recognition of pregnancy prior to implantation: methods for monitoring embryonic viability in vitro and in vivo. *Ann N Y Acad Sci* 1985;442:429-439.
25. Van der Weiden R, Helmerhorst F, Keirse M. Influence of prostaglandins and platelet activating factor on implantation. *Hum Reprod* 1991;6(3):436-442.
26. Nakatsuka M, Yoshida N, Kudo T. Platelet activating factor in culture media as an indicator of human embryonic development after in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1992;7:1435-1439.
27. Shepard T, Fantel A. Embryonic and early fetal loss. *Clinics in Perinatology*. 1979;6(2):219-243.
28. Lindley M. Life and death before birth. Editorial. *Nature* 1979;280:635-637.
29. Roberts C, Lowe C. Where have all the conceptus gone?. *Lancet*;1975;i:4989-499.
30. Miller J, Williamson E, Glue J, Gordon Y, Grudzinskas J, Sykes A. Fetal loss after implantation. A prospective study. *The Lancet* 1980;2(8194):554-556.
31. Edmonds K, Lindsay K, Miller J, Williamson E, Wood P. Early embryonic mortality in women. *Fertil Steril* 1982;38(4):447-453.

32. Wilcox A, Weinberg C, O'Connor J, Baird D, Schlatterer J, Canfield R, Armstrong E, Nisula B. Incidence of early loss of pregnancy. *New Engl J Med* 1988;319(4):189-194.
33. Flamigni C, Bulletti C, Polli V, Ciotti P, Prefetto R, Galassi A, Di Cosmo E. Factors regulating interaction between trophoblast and human endometrium. *Ann N Y Acad Sci* 1991;622:176-189.
34. Landeras J, Zuzuarregui J, Simón C. Pérdida gestacional precoz. En: Pellicer A, Simón C. (eds). *Implantación embrionaria. Aspectos básicos y aplicaciones clínicas*. Editorial Médica Panamericana. 1997:91-102.
35. Simón C, Landeras J, Zuzuarregui J, Martín J, Remohí J, Pellicer A. Early pregnancy losses in in vitro fertilization and oocyte donation. *Fertil Steril* 1999;72(6):1061-1065.
36. De Feo V. Determination of the sensitive period for the induction of decidualization in the rat by different inducing procedures. *Endocrinology* 1963;73:488-497.
37. Finn C, Keen P. The induction of decidualization in the rat. *J Embriol Exp Morph* 1963;11(4):673-682.
38. Freeman M. The ovarian cycle of the rat. En En Knobil E, Neill J (eds). *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press, 1988:1893.
39. Abrahamsohn P, Zorn T. Implantation and decidualization in rodents. *J Exp Zoo* 1993;266:603-628.
40. Beck F, Tucci J, Senior P. Expression of parathyroid hormone-related protein mRNA by uterine tissues and extraembryonic membranes during gestation in rats. *J Reprod Fertil* 1993;99(2):343-352.

41. Ohta Y. Age-related decline in decidualogenic ability of the rat uterus. *Biol Reprod* 1987;37(4):779-785.
42. Kennedy T, Ross H. Temporal- and hormone-dependent changes in uterine sensitization for the decidual cell reaction and decidualization *in vitro* of rat endometrial stromal cells. *J Reprod Fertil* 1997;109:129-136.
43. Hamilton G, Kennedy T. Uterine extracellular fluid volume and blood flow after artificial uterine stimulation to rats differentially sensitized for the decidual cell reaction. *Biol Reprod* 1993;48(4):910-915.
44. Farheen S, Srivastava V, Mehrotra P. Expresión of adenosine deaminase and 5'-nucleotidase in artificially induced deciduoma in rat and hamster. *Indian J Exp Biol* 2002;40(8):889-893.
45. Cavagna M, Mantese J. Biomarkers of endometrial receptivity. *Placenta* 2003;24:S39-S47.
46. Johansson M, Bromfield J, Jasper M, Robertson S. Semen activates the female immune response during early pregnancy in mice. *Immunology* 2004;112(2):290-300.
47. Troedsson M, Loset K, Alghamdi A, Dahms B, Crabo B. Interaction between equine semen and the endometrium: the inflammatory response to semen. *Anim Reprod Sci* 2001;68(3-4):273-8.
48. Gonzalez-Angulo A, Collado L, Hicks J. Ultrastructural changes in the endometrium of rabbit induced by spermatozoa. *Arch Androl* 1984;12 Suppl:1-8.

49. Banerjee M, Chowdhury M, Purification and characterization of a sperm-binding glycoprotein from human endometrium. Hum Reprod 1994;9(8):1497-504.
50. Takacs P, Kauma S. The expression of interleukin-1 alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-1 receptor type 1 mRNA during preimplantation mouse development. J Reprod Immunol 1996;32(1):27-35.
51. Basak S, Dubanchet S, Zourbas S, Chaouat G, Das Ch. Expression of pro-inflammatory cytokines in mouse blastocysts during implantation: modulation by steroid hormones. Am J Reprod Immunol 2002;47:2-11.
52. De M, Stanford T, Wood G. Expression of IL-1, IL-6 and TNF- α in mouse uterus during the peri-implantation of pregnancy. J Reprod Fertil 1993;97:83-89.
53. Yee G, Kennedy T. Role of adenosine 3',5'-monophosphate in mediating the effect of prostaglandin E₂ on decidualization *in vitro*. Biol Reprod 1991;45:436-442.
54. Sananes N, Baulieu E, Le Goascogne C. Prostaglandin(s) as inductive factor of decidualization in the rat uterus. Mol Cell Endocrinol 1976;6:153-158.
55. Moulton B. Epithelial cell function during blastocyst implantation. J Biosci 1984;6(Suppl 2):11-21.