

63

2ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES IZTACALA

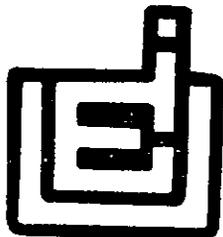
CARACTERIZACION DE UNA PROTEINA CON ACTIVIDAD AGLUTINANTE DE UTERO DE RATA

JUAN ANTONIO LOPEZ YAÑEZ

DIRECTOR DE TESIS: BIOL. ALBERTO MARTIN GUZMAN GRENFELL

DIVISION DE BIOQUIMICA DEL HOSPITAL DE ESPECIALIDADES

C. M. N. SIGLO XXI



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

1998 258945



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 está 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.

GRACIAS

A MIS ABUELAS

Luisa

Como un homenaje a su memoria.

Juana

Por sus consejos y cuidados.

A MIS TIOS

ANTONIO MILLAN, ONOFRE, YOLANDA, CRISTINA, ALFREDO, ANSELMO, PATRICIA, SERGIO, SILVIA, GUILLERMO, LETICIA, ROGELIO, ROSA, FRANCISCO, ROSALINDA, ALICIA, GREGORIO, ROSARIO, CARLOS, ELSA, DAVID y DOLORES.

Por sus enseñanzas.

A MIS HERMANAS

GABRIELA y VERONICA

Con quienes comparto este logro, gracias por su comprensión y ayuda.

A MIS PRIMOS

MARCOS ALEJANDRO, RICARDO, ELIZABETH, ÓSCAR, ADRIANA y ANA LUISA

Por su ayuda y compañía.

A MIS AMIGOS

PABLO CESAR, ÓSCAR, MARTÍN PALOMAR, MARGARITA, RAFAEL MEDINA ALFONSO VELAZQUEZ, CECILIA VILAR, Dr. LUIS ARTURO BAIZA GUTMAN, a la FAMILIA GARCÍA PAZ en especial a mis amigos ALFONSO, SERGIO, RAÚL y ERNESTO.

Por permitir compartir mi vida con ustedes.

Y A TODOS AQUELLOS QUE HICIERON POSIBLE ESTE TRABAJO

GRACIAS

DEDICO ESTE TRABAJO

A MIS PADRES

LEONARDO

Por educarme.

BERNARDA

Por su sacrificio y ejemplo que me alientan a superarme.

A MI ABUELA

JUANA

Por su paciencia y cuidados.

A MIS TIOS

DAVID y LOLA

Por alimentarme durante toda mi carrera.

A MI AMIGO

Dr. LUIS ARTURO BAIZA GUTMAN

Por dedicar una gran parte de su tiempo a dirigirme en el plano profesional y por su infinita paciencia en la realización de este trabajo.

A MI MUJER

ALICIA OCHOA SÁNCHEZ

Por estar siempre a mi lado sin condición alguna, por cuidarme y animarme siempre que lo necesité, por ser mi apoyo para seguir adelante y por que la amo.

ÍNDICE

ÍNDICE	i
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	ii
RESUMEN	iv
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	16
METODOLOGÍA	17
RESULTADOS	30
DISCUSIÓN	48
CONCLUSIONES	54
BIBLIOGRAFÍA	56

T A B L A S

TABLA I	Cambios que presenta el epitelio uterino previos a la implantación	8
TABLA II	Tipos de lectinas	12
TABLA III	Actividad hemaglutinante de extractos uterinos del epitelio y del estroma	37
TABLA IV	Localización subcelular de la actividad hemaglutinante	38
TABLA V	Actividad hemaglutinante de extractos citosólicos de células de epitelio uterino	39
TABLA VI	Valoración de la columna de cromatografía de afinidad (sefarosa asialo-fetuina)	40
TABLA VII	Elución del factor hemaglutinante por la columna de sefarosa asialo-fetuina (intersitio)	41
TABLA VIII	Elución del factor hemaglutinante por la columna de sefarosa asialo-fetuina (sitio)	42
TABLA IX	Valoración de la columna de cromatografía de afinidad (aminofenil-tiogalactopiranosido)	43
TABLA X	Elución del factor hemaglutinante por la columna de aminofenil-tiogalactopiranosido (intersitio)	44
TABLA XI	Elución del factor hemaglutinante por la columna de aminofenil-tiogalactopiranosido (sitio)	45
TABLA XII	Efecto de la temperatura en la actividad del factor hemaglutinante	46
TABLA XIII	Extracción lipídica en la fracción citosólica con actividad hemaglutinante	47
TABLA XIV	Efecto de la tripsina sobre la actividad del factor hemaglutinante	47

PAGINACION

DISCONTINUA

FIGURAS

FIGURA 1	El proceso de la implantación	2
FIGURA 2	Cambios en la adhesividad de la zona apical del epitelio uterino durante la implantación	5
FIGURA 3	Diagrama de flujo	17
FIGURA 4	Obtención de distintas fracciones celulares del epitelio y el estroma de útero de rata	21

RESUMEN

Las células de los organismos multicelulares requieren de diversos mecanismos de reconocimiento entre sí, a fin de funcionar de manera integral. Como es sabido, existe gran variedad de moléculas que participan en el reconocimiento y adhesión celulares dentro de las cuales encontramos a las lectinas, proteínas que tienen más de un sitio de reconocimiento a carbohidratos específicos y por ello pueden aglutinar células como eritrocitos, bacterias, espermatozoides, etc. que además participan en el reconocimiento del espermatozoide y óvulo. Es posible entonces que estas proteínas estén involucradas en el proceso de la implantación embrionaria como mediadoras del reconocimiento del blastocisto y el epitelio uterino. El presente trabajo tiene como objetivos determinar si existen proteínas con actividad aglutinante en las células epiteliales de útero de rata en el quinto día de preñez; precisar si la presencia de estas se restringe únicamente a la zona de implantación; así como determinar la especificidad de las proteínas con dicha actividad por algún carbohidrato. Se utilizaron ratas hembras de la cepa *Sprague Dawley*, se aparearon y al quinto día de preñez se sacrificaron por dislocación cervical, previa inyección de 1 ml de solución de azul tripan para visualizar los sitios de implantación se separó el epitelio del estroma uterino por medio del método de Fagg. Se obtuvieron extractos subcelulares de las células epiteliales mediante centrifugación diferencial, se comprobó la presencia de las proteínas con actividad aglutinante por medio de ensayos de hemaglutinación y se probó su especificidad por medio de ensayos de inhibición con la adición de carbohidratos. Se encontró actividad aglutinante en el útero tanto en el sitio donde ocurre la implantación como en las regiones en que no ocurre; la actividad fue inhibida por galactosa, lo que indica la presencia de una lectina específica para ese azúcar. Se probaron dos métodos de cromatografía de afinidad para purificar dicho factor, mediante dos columnas de sefarosa; una en la que se inmovilizó asialo-fetuina (fetuina a la que se eliminó el ácido siálico) y otra comercial ya preparada. Ambas columnas contenían en su polo terminal residuos de galactosa. En este caso muy particular no fue posible la purificación del factor hemaglutinante debido quizá a factores tales como requerimientos de algún ion u otro tipo de molécula para que pueda ligarse a la columna, o utilizar otro método de purificación. Es evidente que estas moléculas podrían tener una participación en la implantación aunque se necesitan estudios más a fondo para poder determinarlo.

INTRODUCCIÓN

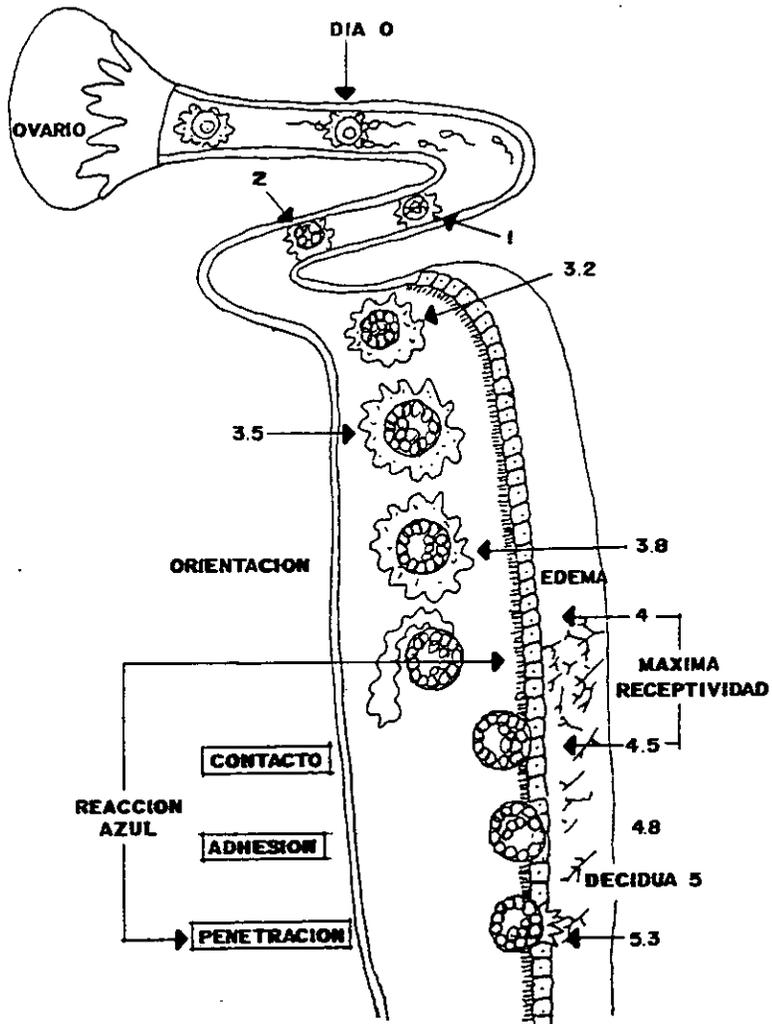
Una vez fecundado el óvulo de los mamíferos, el cigoto se desarrolla hasta alcanzar el estadio de mórula, evento que tarda por lo general de 3 a 4 días después de la fecundación y que ocurre durante su trayecto por el oviducto. Al entrar la mórula al útero, ésta se convierte en blastocisto por la formación de la cavidad del blastocele y la diferenciación de sus células en macizo celular interno y trofoblasto. Posteriormente los blastocistos se distribuyen a través de la luz uterina principalmente por los mecanismos de contracción muscular del útero, para después fijarse en el endometrio. Este proceso es conocido como implantación embrionaria, y se define como la adopción de una posición fija del blastocisto al endometrio (Enders, 1970). Durante la implantación podemos distinguir varias etapas (ver figura 1):

1.- **Orientación:** El blastocisto se sitúa próximo a la porción específica del endometrio en que la implantación toma lugar; así, en la rata, el polo abembrionario del blastocisto se dirige hacia el epitelio de la zona antimesometrial del endometrio (Enders, 1970). Durante este proceso ocurre la pérdida de la zona pelúcida.

2.- **Contacto o Aposición:** Se refiere a la simple yuxtaposición entre el trofoblasto y el epitelio luminal uterino y puede ocurrir por diversos mecanismos:

a) Por envolvimiento: Por hinchamiento, el endometrio uterino rodea al blastocisto (rata, ratón) estableciéndose el contacto del trofoblasto con las células del epitelio uterino (reacción de ataque epitelial) (Enders, 1970; Psychoyos, 1973).

Figura-1
EL PROCESO DE LA IMPLANTACIÓN



b) Por expansión: El blastocisto incrementa su volumen llenando la luz uterina (conejo, carnívoros, algunos monos) (Enders, 1970; Psychoyos, 1973).

c) Por acercamiento activo del blastocisto a la mucosa uterina (cuyo, chimpancé, hombre) (Enders, 1970; Psychoyos, 1973).

Durante este proceso ocurre la interdigitación de las microvellosidades del trofoblasto y el epitelio luminal (Enders, 1970). En el endometrio aumenta la permeabilidad vascular con la producción de edema y extravasación de proteínas séricas. Cuando se inyectan colorantes de alto peso molecular (azul tripan, azul de pontamina, azul Geigy, etc.) (Ljungkuist y Nilsson, 1974; Ward y Donovan, 1971) éstos, enlazados con la albúmina, se extravasan también permitiendo diferenciar las zonas de implantación del resto del útero, lo que se conoce como reacción azul (Ljungkuist, 1974; Ward, 1971).

3.- **Adhesión:** Se establece una unión trofoblasto-epitelio endometrial resistente a la ruptura física (Enders, 1970) con el establecimiento de desmosomas, e interacción estrecha entre las superficies membranales. Son importantes en este proceso: los cambios de carga en la membrana, moléculas de adhesión celular, así como grupos activos (SH, COOH, NH₂, etc.) y compuestos de superficie entre los que se encuentran los ácidos siálicos. (Enders, 1976).

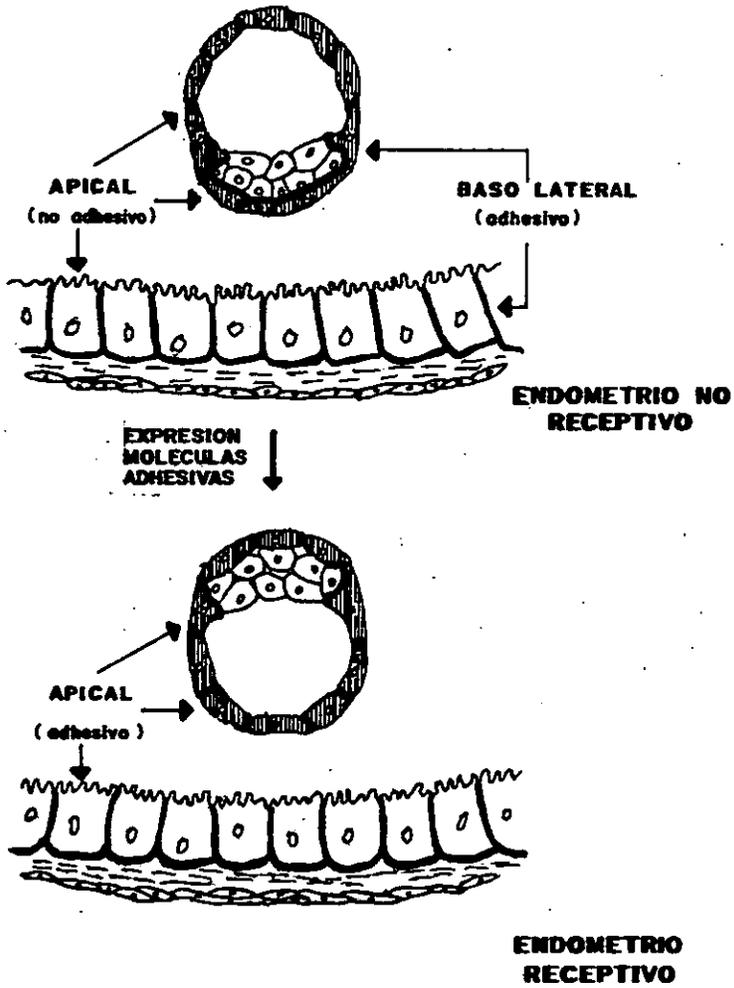
4.- **Penetración:** El blastocisto penetra a través del epitelio uterino por diversos mecanismos: fagocitosis, desplazamiento mecánico o actividad enzimática (Enders, 1976). El grado de penetración varía según el tipo de implantación (Boving, y Larson. 1973).

La implantación del embrión de mamífero es un proceso complejo que implica una serie de fenómenos que requieren una estricta sincronía entre los eventos embrionarios y

uterinos (Psychoyos, 1973), además de presentarse una interacción de dos epitelios distintos: el epitelio luminal uterino y las células del trofoblasto del embrión. En este proceso se presentan dos hechos muy interesantes e importantes desde el punto de vista biológico. Por un lado, células antigénicamente distintas (trofoblasto y endometrio) se toleran inmunológicamente. Por otra parte, es bien conocida la regionalización membranal en los epitelios; es decir, estos tejidos poseen varias zonas en su membrana plasmática con características adhesivas diferentes. Las regiones lateral y basal son adhesivas hacia células adyacentes y/o componentes de la matriz extracelular; en contraste, la región apical (orientada hacia la luz del útero para el caso del epitelio de este órgano) no es adhesiva, lo que previene la oclusión (obliteración) de las cavidades corporales. Sin embargo, en las primeras etapas de la implantación, se presenta la aposición del trofoblasto al epitelio luminal, para posteriormente adherirse a éste. Este fenómeno es favorecido por el hecho de que las paredes del lumen uterino se vuelven adherentes entre sí, provocando la oclusión de la luz uterina (Chávez y Shriver, 1987).

La condición fisiológica del útero para permitir la implantación, se conoce como receptividad uterina (Enders, 1970) y tiene un periodo de duración breve. La adquisición de esta propiedad es dependiente de hormonas esteroides (Hodgen y Itskovits, 1988) e involucra que la región apical del epitelio luminal pase de un estado no adhesivo a uno adhesivo (ver figura 2). La membrana apical del trofoblasto del embrión también adquiere características adhesivas que deben de coincidir con el periodo de receptividad del útero; es decir, ambos procesos deben ser sincrónicos y complementarios para que la implantación

Figura-2
CAMBIOS EN ADHESIVIDAD DE LA ZONA APICAL DEL EPITELIO
UTERINO DURANTE LA IMPLANTACIÓN



se realice. Cuando ocurre la fecundación el ciclo sexual se interrumpe, existiendo un predominio de la acción de la progesterona, la cual prepara al útero para la reacción decidual, en la rata y el ratón, además se requieren estrógenos para el inicio de la ovoimplantación (Psychoyos, 1973), produciéndose una elevación de la concentración de estrógenos en la tarde del día 3 de la preñez (Heald, 1976).

Una de las teorías tendientes a explicar la receptividad del endometrio por el blastocisto, es la relación con el grosor y cargas de la capa de glicocáliz. En este sentido se ha postulado desde hace tiempo (Clemetson y col, 1972), que una disminución en las cargas superficiales esta relacionada con la adhesión del blastocisto al endometrio. Esta teoría ha sido cuestionada fuertemente (Levin, 1973; Jenkinson y Wilson, 1973); sin embargo, son varios los trabajos que han mostrado una disminución de las cargas negativas y el grosor del glicocáliz del epitelio endometrial relacionada con la implantación en varias especies (Anderson y Hoffman, 1984; Lampelo, y col. 1985). No obstante, es evidente que estas dos estirpes celulares en cuestión (trofoblastos y epitelio uterino) aún conservan su negatividad superficial, lo que hace suponer que la adhesión del blastocisto al endometrio está dada por mecanismos más complejos que una simple disminución de cargas (Jenkinson y Searle, 1977), aunque esto puede contribuir al acercamiento entre ambos tejidos.

Es interesante el hecho de que el blastocisto puede desarrollar sus propiedades adhesivas *IN VITRO* (Farach, y col. 1987) e implantarse *IN SITU*, independientemente de las condiciones hormonales cuando el epitelio uterino es eliminado (Cowell, 1969). Por

otro lado, cuando se transfiere a regiones diferentes del útero (ectópicas), el blastocisto se comporta adhesivo e invasivo (Porter, 1967; Samuel y Perry, 1972); sin embargo, este comportamiento no se presenta cuando se transfiere a un útero no receptivo. Esto sugiere que el epitelio del útero (o sus secreciones) desempeñan un papel central en la receptividad o la no-receptividad, controlando la manifestación de las propiedades adhesivas desarrolladas por el blastocisto. La adquisición de la receptividad del endometrio y la adhesividad del trofoblasto deben de estar dadas por la expresión de moléculas de adhesión (o por la supresión de moléculas que la impidan), en las superficies apicales correspondientes (Denker, 1990).

Los cambios uterinos experimentados durante la implantación son más marcados en las zonas diferenciadas para ello (Sitios de implantación) que en el resto del útero. Estos cambios están relacionados ya sea con la respuesta decidual, experimentada por las células del estroma (Psychoyos, 1973; Heald, 1976), o con cambios del epitelio uterino que permiten el contacto y la adhesión blastocisto-epitelio luminal presentados por el epitelio uterino (ver tabla I).

TABLA I
CAMBIOS QUE PRESENTA EL EPITELIO UTERINO PREVIOS A
LA IMPLANTACION

Pérdida de enzimas marcadoras en la membrana plasmática.	Classen-Linke, y col. 1987
Cambios en propiedades de unión a lectinas de la superficie celular.	Chávez y Anderson, 1985; Anderson y col, 1986
Reducción del espesor del glicocáliz y de la carga de la superficie celular.	Enders y Schlafke, 1978; Anderson y col, 1986; Morris y Potter, 1984, 1990.
Incremento de partículas proteicas intramembranales en la membrana vasolateral.	Murphy y Roger, 1981; Winterhager y kuhnel, 1985; Winterhager y Mendoza, 1987.
Adquisición de nuevas proteínas y/o glicoproteínas.	Lampello y col, 1985; Hoffman y col, 1990.
Adquisición de receptores para moléculas de matriz extracelular (e.g. HSPG*).	Carson y col, 1990.
Adquisición de habilidad para formar uniones tipo hemidesmosomas.	Denker, 1990.
Adquisición de habilidad para formar uniones comunicantes intercelulares (Gap Junctions).	Murphy y Roger, 1981.

*HSPG: ProteoGlicanos de Heparan Sulfato

Para la interacción blastocisto-epitelio luminal son importantes los cambios en el glicocálix de la superficie celular; los componentes de la superficie son un monitor de posición única en el ambiente extracelular, traduciendo información externa de una forma tal que pueda ser interpretada por la maquinaria interna de la célula. La superficie celular se constituye de componentes integrales de membrana, proteínas extrínsecas e intrínsecas, glicoproteínas, lípidos y glicolípidos. (Geiger y col. 1983; y Agutter y Suckling, 1984). Todas estas moléculas son esenciales para el monitoreo y la respuesta a eventos que ocurren en la superficie celular externa (Jacobson, 1983).

Los glicoconjugados tienen un papel importante en este respecto. Se pueden encontrar en la naturaleza una gran variedad de estructuras de oligosacáridos creadas a partir de diferentes combinaciones de monosacáridos. Los glicoconjugados son candidatos ideales para acarrear la información de la superficie celular (Stoddar y col, 1985; Kennedy, 1983). Los glicolípidos y las glicoproteínas actúan como receptores de moléculas en el ambiente externo de la célula participando en procesos de reconocimiento y adhesión entre célula-substrato (Aplin y Hughes, 1982; Damsky y col, 1983) o célula-célula (Hausman y Moscona, 1979; Barondes, 1981).

Como ya se mencionó, las glicoproteínas de la membrana plasmática han sido involucradas como mediadoras en los fenómenos de reconocimiento, adhesión y fusión celulares (Murphy y Roger, 1981; Nicolson, 1982). En relación a estos procesos, se han realizado varios estudios que han descrito los cambios en la glicoproteínas superficiales en embriones preimplantados, incluyendo la evaluación de su afinidad por varias lectinas, que

son proteínas de origen no inmunológico con capacidad de aglutinar células y/o glicoconjugados en virtud de que unen moléculas de carbohidrato (Golstein, y col. 1980). Cuando las lectinas, que tienen múltiples sitios de combinación, se unen a estos sacáridos, pueden llegar a interconectar gran número de células causando con esto la aglutinación (Sharon, 1977).

Por su selectividad en cuanto a los carbohidratos que reconocen, las lectinas han sido utilizadas para identificar y mapear los carbohidratos de la superficie celular. En un principio se pensaba que las lectinas sólo aglutinaban células sanguíneas, sin embargo, se sabe actualmente que también aglutinan fibroblastos, espermatozoides, bacterias y hongos. La aglutinación por lectinas puede ser inhibida por la adición de carbohidratos simples, lo que se debe a que éstos, ocupan los sitios de combinación que las unidades de carbohidratos presentes en la superficie de las células ocuparían. La inhibición por un carbohidrato determinado y no por otros nos muestra la especificidad de una lectina.

Las lectinas originalmente fueron descritas en plantas y llamadas fitohemaglutininas. La primera descripción de que se tiene noticia fue reportada en 1888 por Stillmark en la universidad de Dorpat en Estonia, quien en extractos de *Ricinus communis* observó que las moléculas responsables de la aglutinación de las células rojas eran proteínas a las cuales llamó ricinas. Otra planta en la cual se descubrieron este tipo de proteínas fue *Abrus precatorius* que también causaban aglutinación de células rojas. Estas fitohemaglutininas fueron llamadas abrinas. Además de estar presentes en plantas, se les puede encontrar desde las bacterias hasta los mamíferos (Sharon, 1977).

Algunas de las lectinas aisladas de tejidos de vertebrados se agrupan en dos distintas clases estructurales (Poirer, y col. 1992; Drickamer, 1988). La primera comprende una gran familia de proteínas integrales de membrana que requieren calcio para unir carbohidratos y son conocidos como tipo C, estas pueden reconocer fundamentalmente manosa aunque también glucosa, N-acetilglucosamina y L-fucosa pero no galactosa. La segunda clase consiste de pequeñas lectinas independientes de calcio, caracterizadas por dos propiedades importantes: son solubles y unen perfectamente estructuras conteniendo lactosamina (Gal β -(1,4) N-acetil-glucosamina). A esta última clase se les ha llamado de diferentes maneras: lectinas solubles en soluciones amortiguadoras en ausencia de detergentes, lectinas Tipo-S y lectinas S-Lac. El peso molecular de esta clase no se ha establecido, pero las de rata varían de 14 a 29 kDa (Leffler y Barondes, 1986., Drickamer, 1988.y Sharon, 1993), ver tabla-II.

TABLA II
TIPOS DE LECTINAS

Lectina	Especificidad	P. M. kDa	Sitios de Unión	Enlace S-S	Cation Requerido	Localización
Vegetal						
Leguminosa	Diversa	25-30	1	--	Ca ²⁺ , Mn ²⁺	
Cereal	GlcNAc, NeuAc	18	2	+	--	
Animal						
Tipo-C	Diversa	15 ó más	1-8	+	Ca	Extracelular
Tipo-S	Gal	14-35	2	--	--	Intracelular

P.M.: peso molecular
S-S: enlace disulfuro
NeuAc: ácido neuramínico

kDa.: kilodaltones
GlcNAc: N acetil glucosamina
Gal: galactosa

Los patrones de expresión de proteínas que unen carbohidratos son de particular interés en el contexto de la diferenciación celular; adicionalmente, sus moléculas ligando (glicoproteínas y glicolípidos) se han relacionado con la regulación del desarrollo embrionario (Fenderson, 1981). Desde 1973, se han encontrado cambios cualitativos y cuantitativos en las glicoproteínas superficiales de embriones de rata pre-implantados en relación a su desarrollo y su adhesividad (Chávez y Enders, 1981; 1982). Estos cambios rápidos y complejos en los carbohidratos sugieren que estos juegan un papel importante durante la embriogénesis (Fenderson, 1981).

En el ratón se ha descrito que durante la fecundación, la unión del espermatozoide al óvulo depende de un oligosacárido de la glicoproteína ZP-3 de la zona pelúcida (Wassarman, 1987). Por otro lado ciertos glicoconjugados participan en el proceso de

compactación embrionaria en el que la adhesión entre los blastómeros individuales se incrementen en gran medida en el estadio de mórula (Surani, 1979).

Las glicoproteínas, glicolípidos y proteoglicanos comprenden un gran número de conformaciones estructurales que podrían estar directamente relacionados con ciertas funciones de la superficie celular, como la adhesión y migración celulares, y adicionalmente, podrían proveer señales necesarias para la morfogénesis. Dichos procesos dependen de carbohidratos y pueden estar mediados por proteínas que los unen como las lectinas (Poirer, y col. 1992).

Una de las funciones principales de este tipo de proteínas que reconocen carbohidratos es el de participar en las interacciones célula-célula y célula-substrato (Hart y col. 1988). Las lectinas se han encontrado en diversos compartimientos celulares: núcleo (algunas de estas formando parte de ribonucleoproteínas (Wang y Olaing, 1992)), citoplasma, en la superficie celular y extracelularmente. Las propiedades de unión a carbohidratos podrían representar tan sólo una parte de la capacidad funcional de las lectinas, ya que se ha observado que algunas presentan además un sitio de reconocimiento para otra proteína, como es el caso de la lectina discoidina I, aislada del hongo primitivo *Dictyostelium discoideum*, la cual presenta un sitio de unión a proteína que reconoce un triptéido de Arg-Gly-Asp (secuencia RDG) (Barondes, 1988).

Dentro de toda esta gama de lectinas, en especial las lectinas animales, la mejor caracterizada en mamíferos es la llamada lectina-14 (L-14) la cual no se fosforila o

glicosila y parece ser un dímero *in vivo*. Se ha demostrado recientemente *in vitro* que la L-14 puede regular la unión del mioblasto a la laminina promoviendo así la formación de miofibrillas. De estos datos surge la posibilidad de que una de las funciones *in vivo* de esta lectina es la de participar en las interacciones de las células con la matriz extracelular. La transcripción de la lectina L-14, en las células del pre-embrión, no se detecta durante los primeros cuatro días de gestación; el gene se activa hasta el día cuatro y medio. Dicho gene fue aislado en virtud de que su correspondiente RNAm se expresa en niveles altos en las células del trofotodermo. El uso de anticuerpos contra L-14, muestra que la proteína se localiza en dichas células (Poirer y col., 1992).

En el proceso de implantación se presentan cambios en la superficie celular y en particular en la composición de glicoconjugados, tanto en el blastocisto como en el epitelio uterino (Kimber, 1990), por ello se ha propuesto que los componentes de la matriz extracelular participan en este proceso. Sin embargo, es más probable que esta especie de interacciones se presenten en etapas secundarias de la implantación como la invasión del útero por las células del trofoblasto, mientras que en las etapas primarias como, el anclaje del embrión, esté mediado por interacciones receptor-ligando más específicas. Lindenberg y col. (1988) proponen que un posible ligando es la lacto-N-fucopentosa (LNF-1). La adición exógena de este glicoconjugado inhibe el anclaje del blastocisto a células uterinas endometriales *in vitro*. Dicho ligando fue descubierto en el epitelio uterino restringido a las zonas específicas donde ocurrirá la implantación (Kimber, y col. 1988), adicionalmente,

no se presenta en estadios tempranos antes de la implantación, sólo en el día cuatro y medio inmediatamente antes del anclaje. Este ligando y un receptor específico podrían participar en el proceso de la implantación, y se ha observado que la L-14 aparece paralelamente con el receptor LNF-1 (Poirer, y col. 1992).

Es de suponer que lectinas como la L-14, que se encuentra en el epitelio de las células del embrión, podrían encontrarse también en las células del epitelio uterino y participar en el proceso de adhesión entre el epitelio uterino y el trofotodermo durante la implantación embrionaria.

OBJETIVOS

- **Objetivo general:**

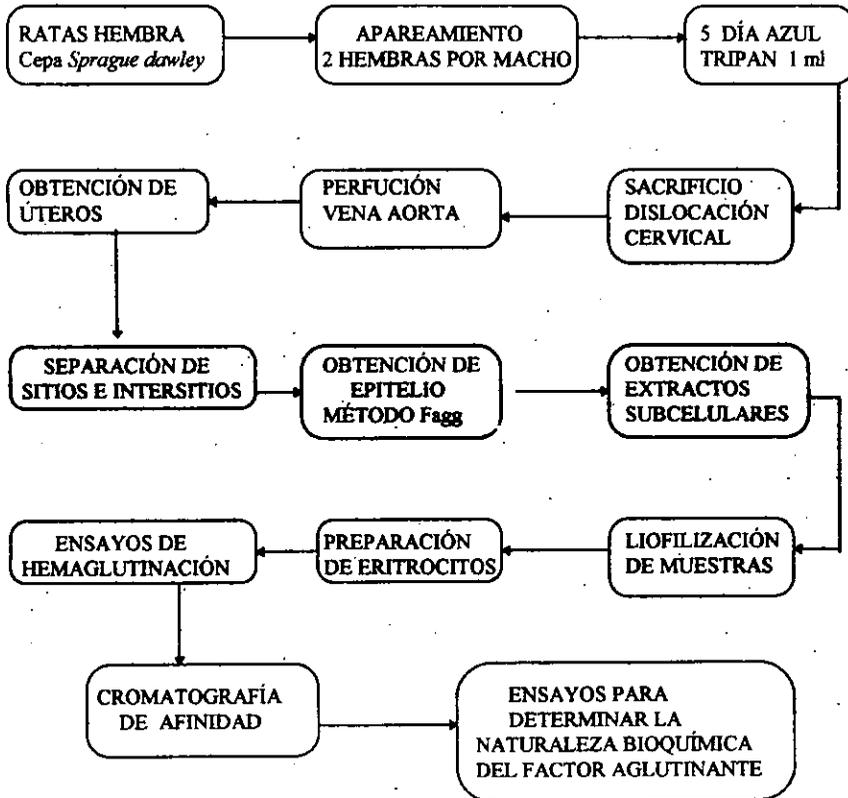
1. Determinar la presencia y afinidad de proteínas con actividad aglutinante, en el epitelio uterino en el periodo de implantación embrionaria.

- **Objetivos particulares:**

2. Determinar la existencia de proteínas con actividad aglutinante en el epitelio endometrial de rata en el quinto día de preñez (cuando ocurre la implantación).
3. Localizar la actividad hemaglutinante en diferentes fracciones subcelulares del epitelio.
4. Estudiar la especificidad de tales proteínas, por algún carbohidrato.
5. Purificar las proteínas con capacidad de reconocer y unir residuos de galactosa.

METODOLOGÍA

figura-3
DIAGRAMA DE FLUJO



Se utilizaron ratas hembras de la cepa *Sprague Dawley* sexualmente maduras, de 250 a 300 gramos de peso, mantenidas en condiciones controladas de luz-obscuridad (ciclos 12:12), con agua y alimento *ad libitum*. El apareamiento fue a razón de dos hembras por macho. Se tomaron muestras de frotis vaginal y se observaron al microscopio óptico para determinar la presencia de espermatozoides, lo que indicó el día cero de preñez. Las ratas fueron sacrificadas por dislocación cervical al día cinco de preñez, previa inyección de 1 ml de solución de azul de tripano (1%) en solución salina fisiológica para visualizar los sitios de implantación (Ljungkuist y Nilsson, 1974; Pshychoyos, 1976). Se perfundieron con cloruro de sodio al 0.9% por canulación en la arteria aorta descendente para eliminar la sangre del útero. Se obtuvieron los úteros, y fueron cortados longitudinalmente, separados en regiones azules (sitio de implantación) y regiones sin colorante (intersitio), inmediatamente fueron tratados con el método de Fagg y col. (1979) para obtener la fracción epitelial, el cual consistió en colocar el tejido uterino en un tubo cónico de centrífuga, el que contenía 4 perlas de vidrio, y someter a agitación por dos minutos en un vortex a máxima velocidad para desprender células de epitelio rotas, en una solución amortiguadora de fosfatos 0.075M, conteniendo ditioneitol 5mM y lactosa 0.3M a pH 7.2 a 4°C (PBS-DIT-LAC). El siguiente paso fue el de obtener el estroma, tomando el útero y colocándolo en un homogenizador de vidrio-vidrio con la solución amortiguadora antes mencionada para desprender el estroma del tejido muscular.

Con el propósito de localizar la actividad hemaglutinante en diferentes fracciones subcelulares del epitelio y del estroma, se realizó una centrifugación diferencial a 4°C. Las muestras se centrifugaron a 800g durante 10 minutos en una centrifuga Bekman modelo J2-HS con un rotor modelo JA-18.1, se tomó sólo el sobrenadante al que se le llamó extracto crudo, se tomó una alícuota y se guardó a -70°C, la muestra restante se centrifugó a 13,000g durante 20 minutos en la misma centrifuga y con el mismo rotor, se tomó el precipitado al que llamamos extracto lisosomal-mitocondrial que fue guardado a -70°C, el sobrenadante fue centrifugado nuevamente a 80,000g durante 90 minutos en una ultracentrifuga Bekman modelo L8-80 con un rotor modelo 65, se recuperó el precipitado al que llamamos extracto microsomal y el sobrenadante o extracto citosólico, ambas muestras fueron guardadas a -70°C (ver figura 3). Dichas fracciones se dializaron para eliminar la lactosa contra una solución de PBS 0.075M-DTT 5mM durante 24 horas. Una vez realizado esto, los extractos fueron liofilizados con el objeto de concentrar la muestra y después resuspendidos en un volumen de 2 ml de PBS 0.075M-DTT 5mM.

ENSAYOS DE HEMAGLUTINACIÓN

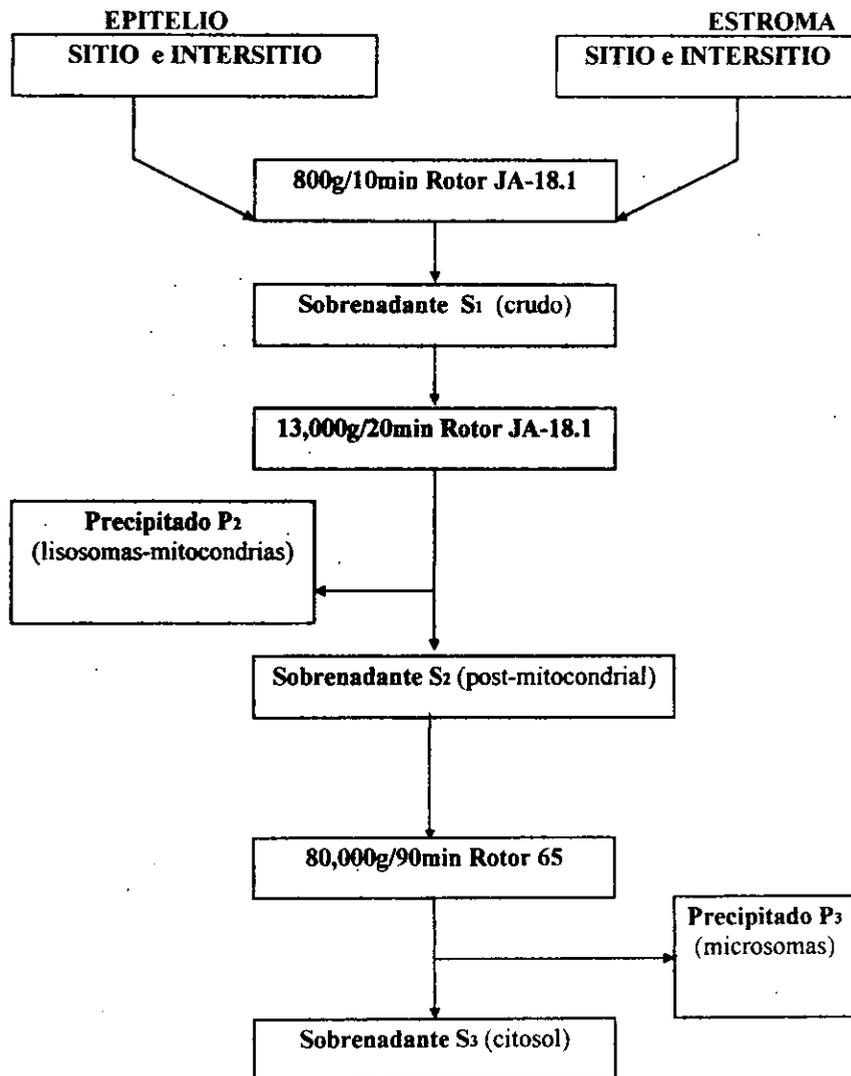
Los ensayos de hemaglutinación se realizaron en placas de microtitulación, que constan de 12 columnas de pozos numerados de izquierda a derecha y 8 líneas de pozos con letras de la A hasta la letra H. Las diluciones de cada muestra fueron colocadas en una línea de la placa colocando al final de la misma su respectivo control, se agregó en cada pozo una solución de albúmina sérica de bovino (BSA) para evitar la hemaglutinación

inespecífica y se utilizó una solución de eritrocitos de conejo tripsinizados y fijados con gluteraldehído, cada prueba se describe más adelante.

PREPARACIÓN DE ERITROCITOS TRIPSINIZADOS Y FIJADOS

Se utilizó el método de Simpson y col. (1977), se obtuvieron 5 ml de sangre de conejo, por la vena de la oreja que fue colocada en un tubo con versenato de sodio al 10%, se lavó 4 veces por centrifugación a 2000g. con 5 volúmenes de solución salina al 0.85% los eritrocitos se resuspendieron al 4% (v/v) con una solución de PBS 0.1 M con un pH 7.2 que contenía 0.1 mg de Tripsina (Sigma tipo III) y se mantuvieron en incubación con agitación suave a 37°C durante 60 min. una vez transcurrido ese tiempo fueron lavados 5 veces por centrifugación a 2000g. con 10 volúmenes de solución salina al 0.85%, después se resuspendieron en 5 volúmenes de PBS 0.075 M con un pH 7.2 con gluteraldehído al 1% y se incubaron con agitación suave a temperatura ambiente durante 60 min., se agregaron 5 volúmenes de solución de PBS 0.1 M con glicina a 4°C y se lavaron 3 veces por centrifugación con 5 volúmenes de PBS 0.1 M con un pH 7.4. Se revisaron al microscopio para comprobar que no existió crenación de los eritrocitos.

FIGURA 3
PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE DISTINTAS FRACCIONES
CELULARES



EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE EN DIFERENTES FRACCIONES CELULARES DEL EPITELIO UTERINO

Los ensayos de hemaglutinación se realizaron en las diferentes fracciones celulares de epitelio uterino que, en éste caso, llamamos *fracción cruda*, *fracción lisosomal-mitocondrial*, *fracción microsomal* y *fracción citosólica*, divididos en dos lotes, sitios de implantación e intersitios. Se probaron una serie de diluciones, que fueron de 1:2 hasta 1:1024.

En cada uno de los pozos de la placa de microtitulación se colocó la dilución determinada de la muestra, siempre partiendo de izquierda a derecha y cada pozo contenía:

- 25 µl de PBS 0.075 M pH 7.2, DTT 5mM
- 25 µl de albúmina sérica de bovino al 0.5%
- 25 µl de suspensión de eritrocitos al 2.5% v/v
- 25 µl de la dilución de la fracción a ensayar.

Para cada una de las series de diluciones se utilizó un ensayo control que contenía:

- 50 µl de PBS 0.075 M pH 7.2, DTT 5mM
- 25 µl de BSA al 0.5%
- 25 µl de suspensión de eritrocitos al 2.5% v/v.

El punto final de aglutinación se tomó como la última dilución del extracto en la que los eritrocitos sedimentan en un punto claramente circunscrito en el fondo del pozo, que además se distingue del control; la actividad aglutinante se expresó como el recíproco del punto final de la dilución (Butler, 1963).

DETERMINACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD DE LA HEMAGLUTINACIÓN

La especificidad de la hemaglutinación se determinó mediante pruebas de inhibición de ésta, utilizando los siguientes glucósidos en solución para tener una concentración final de 0.125 M:

- Metil- α -D glucósido
- Metil- β -D glucósido
- Metil- α -D manósido
- β -lactosa
- L-fucosa

Para cada una de las diluciones los ensayos se realizaron de la siguiente manera:

- 25 μ l de PBS 0.075 M pH 7.2 DTT 5mM glucósido
- 25 μ l de BSA al 0.5%

- 25 μ l de suspensión de eritrocitos al 2.5% v/v
- 25 μ l de la dilución de la fracción a ensayar.

El control de éstos ensayos se realizó de la siguiente manera:

- 50 μ l de PBS 0.075 M pH 7.2, DTT 5mM glucósido
- 25 μ l de BSA al 0.5%
- 25 μ l de suspensión de eritrocitos al 2.5% v/v.

Una vez que se conoció la localización de la actividad hemaglutinante y se determinó la especificidad, se decidió realizar otros ensayos únicamente en la muestra denominada *fracción citosólica* en la que se utilizaron tres lotes de 10 a 12 ratas cada uno.

Conociendo la especificidad del factor hemaglutinante se realizó el montaje de una columna de cromatografía de afinidad por el método de Cuatrecasas (1970) para intentar purificar dicho factor.

COMPORTAMIENTO DEL FACTOR AGLUTINANTE EN UNA COLUMNA DE CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD

• MONTAJE DE LA COLUMNA DE CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD

Se utilizaron dos tipos de columnas, ambas con la misma capacidad de aislar lectinas que reconocen galactosa, la primera fue una columna de sefarosa 4-B en la que se acopló fetuina a la que se le eliminó el ácido siálico (asialofetuina), para exponer los

residuos de galactosa. La otra columna utilizada fue una columna comercial de sigma Chemical Co. p-Aminofenil β -D-Tiogalactopiranosido.

A) Sefarosa 4-B acoplada con asialofetúina.

Que consiste de sefarosa 4-B (Sigma) activada con bromuro de cianógeno en la que se inmovilizó asialo-fetúina. Se hidrataron 0.6 g de la Sepharosa 4-B con 10 ml de HCl 1mM en agitación constante durante 15 min. a temperatura ambiente después se colocó en un embudo Buchner y se lavó con 100 ml de HCl, se realizó otro lavado con 5 ml de amortiguador de bicarbonato 0.1M a pH 8.6 y rápidamente se transfirió a un matraz Erlenmeyer de 25 ml y se adicionó 2.5 ml de la solución de asialo-fetúina (50mg) en bicarbonato 0.1 M pH 8.6 una vez realizado esto se ajustó a un volumen de 9 ml con el mismo amortiguador y se mantuvo en agitación toda la noche en el cuarto frío a 4°C. Se adicionó 150 μ l de etanolamina y se continuó agitando durante dos horas más para después lavarse 3 veces con glicina 0.05 M, NaCl 0.5 M a pH 3.0 se lavó 4 veces más con PBS. Se cuantificaron las proteínas por el método de Bradford (1976) en el lavado hecho con glicina (25 ml) para determinar que cantidad de la proteína se unió a la sefarosa, además se hizo reaccionar a la sefarosa con el reactivo de Bradford como una prueba indirecta para determinar la unión de la proteína a la sefarosa.

B) p-Aminofenil β -D-Thiogalactopiranosido (Sigma).

Se tomó 1 ml del gel para columna de cromatografía de afinidad comercial activada con bromuro de cianógeno. Se realizaron lavados con 50 ml de amortiguador de fosfatos 0.075M a pH 7.2.

EVALUACIÓN DE LA COLUMNA DE CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD

Tanto la columna de cromatografía de afinidad preparada como la comercial se evaluaron utilizando una lectina comercial de *Arachis hypogaea* de Sigma que es específica para D-galactosa.

La evaluación consistió en hacer pasar la solución de lectina 1 mg/ml a través de la columna colectándose cinco fracciones de 1 ml por eluido obteniendo un primer eluido, en el que se cuantificaron proteínas por el método de Bradford y se realizó el ensayo de hemaglutinación. El segundo eluido se hizo con una solución de amortiguador de fosfatos 0.075M a pH 7.2 con lactosa 0.3M (PBS-LAC) para recuperar la lectina ligada, éste segundo eluido se dializó en una solución de PBS.

Se realizaron los ensayos de hemaglutinación, como se describió anteriormente, en el primer y segundo eluidos.

REGENERACIÓN DE LA COLUMNA DE CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD

Después de la evaluación de las columnas, éstas se regeneraron con soluciones de amortiguador de tris/HCL al 0.1M y amortiguador de acetato de sodio al 0.1%.

CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD DEL FACTOR HEMAGLUTINANTE DE LOS EXTRACTOS CITOSÓLICOS

Los extractos fueron pasados a través de la columna de cromatografía de afinidad colocada en un colector de fracciones, y se colectaron 8 fracciones de 1 ml para el primer eluido y 8 fracciones para el segundo; este último realizado con PBS-DDT-LAC. Una vez que se colectaron las fracciones del segundo eluido se colocaron en membranas para diálisis Spectra/por con una exclusión de 6,000-8,000 y se mantuvieron así durante 24 hrs., con 5 cambios de PBS-DDT, para después concentrar la muestra por medio de liofilización.

Las muestras fueron recuperadas y resuspendidas en un volumen mínimo de 50 μ l con las que se realizaron los ensayos de hemaglutinación como se describió anteriormente.

Se cuantificaron proteínas por el método de Bradford para cada una de las fracciones.

La elución de los extractos fue similar en ambas columnas.

ENSAYOS PARA DETERMINAR LA NATURALEZA DEL FACTOR HEMAGLUTINANTE

Para evaluar la naturaleza química del factor hemaglutinante, se realizaron los siguientes experimentos:

- Efecto de la temperatura en la actividad hemaglutinante.

Se incubaron alícuotas de 60 μ l de la fracción citosólica del sitio y del intersitio a temperaturas de 56°C durante 15 min. y 86°C durante 20 min. en tubos Eppendorf, se esperó a que regresaran a temperatura ambiente para después realizar los ensayos de hemaglutinación de la manera anteriormente descrita.

- Separación del extracto en tres fases, *acuosa*, *lipídica* y *proteica*

En otra muestra de la fracción citosólica se llevó a cabo la extracción de lípidos que se realizó con cloroformo metanol 2:1 de la siguiente manera:

Se mezcló la solución de cloroformo metanol 2:1 con la fracción citosólica del epitelio del sitio y del intersitio respectivamente y se centrifugó a 3500 r.p.m. durante 15 min., después con una pipeta Pasteur se separó cada una de las tres fases. El exceso de cloroformo remanente en las fases fue eliminado con nitrógeno gaseoso; la fase *lipídica* y la *proteica* fueron resuspendidas con la solución amortiguadora de fosfatos PBS-DTT y se

centrifugaron a 10,000 r.p.m. durante 10 min. y con el sobrenadante se realizaron los ensayos de hemaglutinación.

- Efecto de enzimas proteolíticas (tripsina) en la actividad hemaglutinante.

Se tomó una alícuota de 100 μ l de los extractos de citosol del epitelio uterino del sitio y del intersitio respectivamente y se incubaron con 10 μ l de una solución de tripsina (tipo III de Sigma Chemical Co.) (1 mg/ml), durante 30 min. a 25°C, y al final se agregaron 10 μ l de una solución de inhibidor de tripsina tipo (II-I de Sigma Chemical Co.) (0.25 mg/ml) incubándose durante 5 min. más a 25°C.

En otro de los ensayos se tomó una alícuota de 100 μ l de los extractos cada uno por separado y se incubaron con 10 μ l de una solución de tripsina y en esta ocasión se adicionaron 10 μ l de una solución de inhibidor de tripsina desde el inicio, durante 35 min a 25°C para después realizar los ensayos de hemaglutinación como se describieron anteriormente.

RESULTADOS

ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE DE EXTRACTOS UTERINOS DE EPITELIO Y DE ESTROMA AL QUINTO DÍA DE PREÑEZ.

A continuación se presentan los resultados de los primeros ensayos de hemaglutinación de extractos obtenidos del epitelio y del estroma de útero de rata al quinto día de preñez, mismos que eran precipitados en acetona para concentrarlos y resuspendidos en diferentes soluciones para comprobar su actividad.

En los extractos crudos del epitelio del sitio y del intersitio (tabla III) se encontró que provocaban la aglutinación franca de eritrocitos con un punto final de 4. En todos, la β -lactosa inhibió completamente la hemaglutinación para todas las diluciones, incluyendo los extractos sin diluir, mientras que metil- α -D-glucósido y L-fucosa, sólo inhibieron en la dilución 1:4, no se apreciaron diferencias entre el sitio y el intersitio.

Los extractos de estroma mostraron una actividad hemaglutinante mayor, con un punto final de aglutinación de 8, la cual fue inhibida por β -lactosa.

Los extractos acetónicos solubles en PBS-DTT presentaron un mínimo de hemaglutinación en el epitelio y el estroma, la que fue inhibida por β -lactosa. No existieron diferencias entre el sitio y el intersitio.

En los extractos acetónicos solubles en Triton X-100 al 0.1% en el epitelio del sitio de implantación e intersitio, presentaron ligera hemaglutinación, que fue inhibida parcialmente por β -lactosa. El estroma del sitio presentó un punto final de hemaglutinación de 2, que además no pudo ser inhibido por algún glucósido de los que se utilizaron en el experimento.

El comportamiento del estroma del intersitio fue similar pero con una actividad hemaglutinante menor.

Los extractos acetónicos solubles en desoxicolato al 0.1% no presentaron actividad hemaglutinante (tabla III).

LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LA ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE

En el epitelio uterino, la actividad hemaglutinante se encontró exclusivamente en la fracción citosólica, siendo mayor en los sitios de implantación ver tabla IV.

En contraste, el tejido estromal mostró actividad hemaglutinante en todas las fracciones estudiadas. A diferencia del tejido epitelial, el citosol del estroma de los intersitios fue mas activo que el del estroma de los sitios de implantación .

Adicionalmente, la fracción lisosomal-mitocondrial del tejido estromal presentó una alta actividad hemaglutinante específica, siendo mas alta para las regiones de implantación, sin embargo esta actividad no fue inhibida por los glicósidos utilizados ver tabla IV.

ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE DE EXTRACTOS CITOSÓLICOS DE CÉLULAS EPITELIALES DE ÚTERO DE RATA

La actividad hemaglutinante que se presenta en los dos casos es muy similar salvo por el primer ensayo, sin embargo, la actividad específica es mayor en el epitelio del sitio de implantación, ya que la concentración de proteínas es menor en este extracto que en el extracto del intersitio (ver tabla V).

VALORACIÓN DE LA COLUMNA DE CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD (Sefarosa-Aziolo-fetúna)

Como se aprecia en la tabla VI, un 79.05% de la lectina comercial de *Arachis hypogaea* fue retenida por la columna de cromatografía de afinidad. Sólo el 11.34% no pudo ser retenido por ella, recuperándose así el 90.39% de la proteína utilizada, mientras que un 9.61% se perdió en el manejo de la solución.

Esta lectina conserva su actividad después de eluirse de la columna.

ELUCIÓN DEL FACTOR HEMAGLUTINANTE MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD (Sefarosa-Asialo-fetuina)

EPITELIO INTERSITIO.

La tabla VII muestra que de la proteína adicionada (7.73 mg), el 80.6% no fue retenida por la columna, sin embargo, esta siguió presentando actividad hemaglutinante y más aún, pudo ser inhibida por β -lactosa.

El 0.3 % de la proteína que aparentemente se recuperó en el segundo eluido (detectada solo por la cuantificación de proteínas) no causó hemaglutinación por lo que no podemos afirmar que ésta se haya unido a la columna, aunque pudo ser que la técnica utilizada no detectó la actividad aglutinante. La proteína total recuperada fue de 80.9% perdiéndose en el manejo un total de 19.1%

EPITELIO SITIO.

La tabla VIII muestra que la proteína de epitelio del sitio no pudo ser retenida por la columna ya que, del total de proteína utilizada (4.44 mg) el 92.7% se recuperó en el primer eluido, en el segundo eluido se muestra en cero la cuantificación de proteínas, así como la actividad hemaglutinante, mientras que, el 7.3% se perdió en el manejo de la muestra.

La proteína recuperada en el primer eluido conservó su actividad hemaglutinante y también fue inhibida por β -lactosa. En ambos casos se muestra una de cuatro repeticiones.

VALORACIÓN DE LA COLUMNA DE CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD

(Aminofenil-Tiogalactopiranosido)

La tabla IX muestra los resultados de la valoración de la columna, en la que se aprecia que un 76.5% de la lectina comercial de *Arachis hypogaea* fue retenida, mientras que el 10.8% no lo fue, lo que nos indica que la columna de cromatografía de afinidad estaba lista para ser utilizada.

ELUCIÓN DEL FACTOR HEMAGLUTINANTE MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD (Aminofenil-Tiogalactopiranosido)

EPITELIO INTERSITIO.

La tabla X muestra que del 100% de proteína adicionada el 85.2% no pudo ser retenida por la columna de cromatografía de afinidad pero siguió causando hemaglutinación.

El 0.6% aparentemente fue retenido por la columna pero no causó hemaglutinación.

EPITELIO SITIO.

La tabla XI nos muestra que del 100% de proteína adicionada el 98.3 no pudo ser retenida por la columna de cromatografía de afinidad pero esta siguió causando

hemaglutinación y en el segundo eluido no se recupero proteína alguna. En ambos casos se muestra una de cuatro repeticiones.

EFFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE DEL EXTRACTO CITOSÓLICO

Los experimentos realizados para estudiar la naturaleza química del factor que provoca la hemaglutinación demostraron que éste era termoestable a 56°C pero no a 86°C esta estabilidad se perdió, lo cual se reflejó en la actividad aglutinante ya que observamos que la actividad específica decreció de 8.88 a 0, para el epitelio del sitio de implantación, mientras que en el epitelio del intersitio la actividad específica nuevamente decayó de 1.7 a 0 con lo que se aprecia que en ambos casos la actividad se vio interferida por la temperatura ver tabla XII. Se muestra el promedio de tres repeticiones.

EXTRACCIÓN LIPÍDICA DEL EXTRACTO CITOSÓLICO

El interés de realizar este análisis fue el de descartar la posibilidad de que el factor que provocaba la hemaglutinación fuese de naturaleza lipídica. En la tabla XIII se observa que dicho factor se encontró en la interface (proteica) en mayor proporción y en la fase acuosa en menor proporción, pero no así en la fase orgánica (lipídica) con lo que queda descartado que el factor tenga una naturaleza lipídica. Se muestra el promedio de tres repeticiones.

EFFECTO DE LA TRIPSINA EN LA ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE DE LOS EXTRACTOS CITOSÓLICOS

Los extractos fueron tripsinizados como una prueba mas de que el factor que causó la hemaglutinación era de naturaleza proteica ver tabla XIV, en la que se muestra que la tripsina nulifica la actividad hemaglutinante del factor, al agregar el inhibidor de tripsina desde el principio del ensayo, la actividad hemaglutinante no se ve afectada comportándose igual que el control. Se muestra el promedio de tres repeticiones.

TABLA III

**ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE DE EXTRACTOS UTERINOS DEL
EPITELIO Y DEL ESTROMA AL DIA 5 DE PREÑEZ**

EXTRACTO	*ACTIVIDAD AGLUTINANTE	INHIBIDOR
A-Crudos		
-Ep/si	4	β -lactosar
-Ep/Nsi	4	metil- α -glucósido P β -lactosa T, L-fucosa P
-Es/si	8	β -lactosa T
Es/Nsi	8	β -lactosa T
B-Precipitados con acetona solubles en PBS		
-Ep/si	1	β -lactosa T
-Ep/Nsi	1	β -lactosa T
-Es/si	1	β -lactosa T
-Es/Nsi	1	β -lactosa T
C-Precipitados con acetona solubles en Triton X-100		
-Ep/si	1	β -lactosa P
-Ep/Nsi	1	β -lactosa P
-Es/si	2	Nulo
-Es/Nsi	1	Nulo
D-Precipitados con acetona solubles con desoxicolato		
-Ep/si	Nulo	Nulo
-Ep/Nsi	Nulo	Nulo
-Es/si	Nulo	Nulo
-Es/Nsi	Nulo	Nulo

* inverso del punto final de aglutinación

Ep/si.- epitelio sitio

Ep/Nsi.- epitelio intersitio

P inhibición parcial = 50%

T inhibición total=100%

TABLA IV

LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LA ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE

EXTRACTO	ACTIVIDAD AGLUTINANTE *	ACTIVIDAD ESPECÍFICA **	INHIBIDOR
A-Citosol			
Ep/si	16	67.37	β -lactosa T L-fucosa P
Ep/Nsi	4	35.03	β -lactosa T L-fucosa P
Es/si	4	44.40	β -lactosa T α -glucosa P β -glucosa P α -manosa P L-fucosa P
Es/Nsi	16	131.50	β -lactosa T
B-Microsomas			
Ep/si	0	0	
Ep/Nsi	0	0	
Es/si	4	62.50	β -lactosa P
Es/Nsi	1	26.67	β -lactosa P
C-Lisomas-Mitocondrias			
Ep/si	0	0	
Ep/Nsi	0	0	
Es/si	32	603.77	Nula
Es/Nsi	8	384.61	Nula
D-crudo			
Ep/si	2	19.51	β -lac T
Ep/Nsi	2	12.70	β -lac T, α -glu P L-fuc P
Es/si	8	28.32	β -lac T
Es/Nsi	4	27.74	β -lac T

* inverso del punto final de aglutinación

** actividad aglutinante/mg de proteína

Ep/si.- epitelio sitio

Ep/Nsi.- epitelio intersticio

P inhibición parcial = 50%

T inhibición total

TABLA V
ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE DE EXTRACTOS CITOSÓLICOS DE
CELULAS EPITELIALES DE UTERO DE RATA

EXTRACTO	CONCENTRACIÓN				*ACTIVIDAD				**ACTIVIDAD			
	DE PROTEÍNAS mg/ml				AGLUTINANTE				ESPECÍFICA			
Epitelio sitio	1	2	3	X	1	2	3	X	1	2	3	X
	4.44	1.8	0.72	2.64	16	16	16	16	3.6	8.8	22.2	11.5
Epitelio intersitio	1	2	3	X	1	2	3	X	1	2	3	X
	4.7	7.73	2.35	4.92	8	16	16	13.3	1.7	2.1	6.8	3.5

NOTA: Tdos los extractos fueron inhibidos con lactosa

* recíproco del punto final de aglutinación

** actividad aglutinante/mg proteína

• se realizaron 3 experimentos (1,2,3) empleando los úteros de 11 ratas para cada uno

TABLA VI
VALORACIÓN DE LA COLUMNA DE CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD
SEFAROSA-ASIALO-FETUÍNA

PROTEÍNA	*ACTIVIDAD AGLUTINANTE	CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS mg/ml
A.hypogaea	64	7.540
ELUIDO-1 (PBS-DTT)		
No. fracción		
1	nula	nula
2	nula	nula
3	nula	0.643
4	nula	0.156
5	nula	0.056
Proteína no retenida		Σ 0.855
ELUIDO-2(PBS-DTT-LAC)		
No. fracción		
1	nula	0.350
2	8	3.640
3	2	0.740
4	2	0.780
5	nula	0.450
Proteína retenida		Σ 5.960
Proteína total recuperada		6.815

- * inverso del punto final de aglutinación
- se presenta un experimento representativo de cinco

TABLA VII

**ELUCIÓN DEL FACTOR HEMAGLUTINANTE DE CITOSOL DE CÉLULAS
EPITELIALES DE ÚTERO AL QUINTO DÍA DE PREÑEZ
(COLUMNA SEFAROSA-ASIALO-FETUÍNA)**

FRACCIÓN CITOSÓLICA	*ACTIVIDAD AGLUTINANTE	CUANTIFICACIÓN DEPROTEÍNAS mg/ml
Epitelio intersitio	16	7.73
ELUIDO-1 (PBS-DTT)		
No fracción		
1	nula	nula
2	nula	0.127
3	4	2.100
4	4	2.910
5	1	1.020
6	nula	0.070
7	nula	nula
8	nula	nula

Proteína no retenida Σ 6.227

ELUIDO-2 (PBS-DTT-LAC)		
No. fracción		
1	nula	0.015
2	nula	0.008
3	nula	0.002
4	nula	0.0005
5	nula	nula
6	nula	nula
7	nula	nula
8	nula	nula

Proteína retenida Σ 0.02354
Proteína total recuperada 6.25054

- * inverso del punto final de aglutinación
- se presenta un experimento representativo de cuatro

TABLA VIII

**ELUCIÓN DEL FACTOR HEMAGLUTINANTE DE CITOSOL DE CÉLULAS
EPITELIALES DE ÚTERO AL QUINTO DÍA DE PREÑEZ
(COLUMNA SEFAROSA-ASIALO-FETUÍNA)**

FRACCIÓN CITOSÓLICA	*ACTIVIDAD AGLUTINANTE	CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS mg/ml
Epitelio Sitio	16	4.44
Eluido-1 (PBS-DTT)		
No. fracción		
1	2	1.08
2	4	1.13
3	2	1.02
4	nula	0.74
5	nula	0.14
6	nula	nula
7	nula	0.0064
8	nula	0.0015
proteína que no fue retenida		Σ 4.1179
Eluido-2(PBS-DTT-LAC)		
No. fracción		
1	nula	nula
2	nula	nula
3	nula	nula
4	nula	nula
5	nula	nula
7	nula	nula
8	nula	nula
Proteína retenida		0.0000
Proteína total recuperada		4.1179

* inverso del punto final de aglutinación

• se presenta un experimento representativo de cuatro

TABLA IX
VALORACIÓN DE LA COLUMNA DE CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD
AMINOFENIL-TIOGALACTOPIRANOSIDO

PROTEÍNA	*ACTIVIDAD AGLUTINANTE	CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS mg/ml
A. hypogaea	64	8.023
ELUIDO-1 (PBS-DTT)		
No. fracción		
1	nula	nula
2	nula	nula
3	nula	nula
4	nula	0.52
5	nula	0.35

Proteína no retenida Σ 0.87

ELUIDO-2(PBS-DTT-LAC)		
No. fracción		
1	nula	0.402
2	8	4.100
3	2	0.807
4	2	0.705
5	nula	0.125

Proteína retenida Σ 6.139

Proteína total recuperada 7.009

- * inverso del punto final de aglutinación
- se presenta un experimento representativo de cinco

TABLA X

**ELUCIÓN DEL FACTOR HEMAGLUTINANTE DE CITOSOL DE CÉLULAS
EPITELIALES DE ÚTERO AL QUINTO DÍA DE PREÑEZ
(COLUMNA AMINOFENIL-TIOGALACTOPIRANOSIDO)**

FRACCIÓN CITOSÓLICA	*ACTIVIDAD AGLUTINANTE	CUANTIFICACIÓN DEPROTEÍNAS mg/ml
Epitelio intersitio	8	5.88
ELUIDO-1 (PBS-DTT)		
No fracción		
1	nula	0.84
2	2	1.43
3	4	1.45
4	2	0.97
5	nula	0.25
6	nula	0.03
7	nula	0.02
8	nula	0.02

Proteína no retenida

Σ 5.01

ELUIDO-2 (PBS-DTT-LAC)		
No. fracción		
1	nula	0.0130
2	nula	0.0107
3	nula	0.0042
4	nula	0.0030
5	nula	0.00085
6	nula	0.00035
7	nula	nula
8	nula	nula

Proteína retenida

Σ 0.0321

Proteína total recuperada

5.0421

* inverso del punto final de aglutinación

• se presenta un experimento representativo de cuatro

TABLA XI

ELUCIÓN DEL FACTOR HEMAGLUTINANTE DE CITOSOL DE CÉLULAS
 EPITELIALES DE ÚTERO AL QUINTO DÍA DE PREÑEZ
 (COLUMNA AMINOFENIL-TIOGALACTOPIRANOSIDO)

FRACCIÓN CITOSÓLICA	*ACTIVIDAD AGLUTINANTE	CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS mg/ml
Epitelio Sitio	16	4.13
Eluido-1 (PBS-DTT)		
No. fracción		
1	2	1.030
2	4	1.250
3	2	1.020
4	nula	0.750
5	nula	0.006
6	nula	0.003
7	nula	nula
8	nula	nula

proteína que no fue retenida Σ 4.059

Eluido-2(PBS-DTT-LAC)		
No. fracción		
1	nula	nula
2	nula	nula
3	nula	nula
4	nula	nula
5	nula	nula
7	nula	nula
8	nula	nula

Proteína retenida 0.0000

Proteína total recuperada 4.059

- * inverso del punto final de aglutinación
- se presenta un experimento representativo de cuatro

TABLA XII
EFEECTO DE LA TEMPERATURA EN LA ACTIVIDAD DEL FACTOR
HEMAGLUTINANTE

	*Actividad Aglutinante	**Actividad Especifica
Epitelio sitio		
56 °C	16	8.88
86°C	0	2.22
25°C	16	8.88
Epitelio intersitio		
56°C	8	1.70
86°	0	0.20
25°C	8	1.70

- * inverso del punto final de aglutinación
- ** actividad aglutinante/mg de proteína
- se muestra el promedio de tres repeticiones

TABLA XIII

**EXTRACCIÓN LIPÍDICA EN LA FRACCIÓN CITOSÓLICA CON
ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE DE CÉLULAS EPITELIALES DE ÚTERO
DE RATA AL QUINTO DÍA DE PREÑEZ**

*ACTIVIDAD AGLUTINANTE		
Fases	SITIO	INTERSITIO
Acuosa	4	2
Proteica	16	8
Lipídica	Nula	Nula
Control	16	8

- * inverso del punto final de aglutinación
- se muestra el promedio de tres repeticiones

TABLA XIV

**EFFECTO DE LA TRIPSINA SOBRE EL FACTOR HEMAGLUTINANTE DE
LAS FRACCIONES CITOSÓLICAS**

EXTRACTO	TRIPSINA	TRIPSINA MÁS INHIBIDOR DE TRIPSINA	CONTROL
Epitelio sitio	Nula	16	16
Epitelio intersitio	Nula	16	16

- * inverso del punto final de aglutinación
 - ** actividad aglutinante/mg de proteína
 - se muestra el promedio de tres repeticiones
- r inhibición total

DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

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

El estudio de la bioquímica del endometrio presenta gran interés por su función especial dentro de la reproducción, estando sujeto a variaciones cíclicas dependientes de la acción de hormonas ováricas. Así mismo, sus cambios tienen una estrecha dependencia con el embarazo e implantación, el análisis de estos cambios no siempre son fáciles por los múltiples factores implicados, por otro lado, también el tipo de respuesta a hormonas puede variar acorde a un estado fisiológico uterino específico, tenemos por ejemplo que durante el embarazo temprano, son las células del estroma las que se dividen por la acción de los estrógenos y no las células epiteliales y glandulares como ocurre durante la fase proliferativa del endometrio (Psychoyos, 1973).

Son dos los componentes básicos requeridos para que se lleve a cabo la implantación: un blastocisto maduro, libre de la zona pelúcida y un útero acondicionado debidamente.

El presente trabajo se orientó básicamente al estudio de proteínas citosólicas que causan aglutinación de eritrocitos como lo hacen las lectinas solubles, éstas fueron

obtenidas de células epiteliales del útero de la rata al quinto día de gestación. Algunos estudios presentan evidencias de que las lectinas solubles juegan un papel importante en el desarrollo embrionario, así como en la implantación del blastocisto. La importancia de las lectinas solubles durante el desarrollo embrionario se ha observado en especies como *Xenopus laevis* (Barondes y Roberson, 1983) y embriones de cerdo, donde han encontrado que dos lectinas que unen lactosa están presentes en las células que migran durante la gastrulación (Levi y Teichber, 1989). Estos autores también sugieren que interacciones entre lectinas y glicoconjugados podrían jugar un papel importante en los cambios dinámicos del ambiente extracelular durante la embriogénesis de esas especies.

En el trabajo desarrollado por Poirer y col. (1992), demuestran la presencia de una lectina (Lect-14), en las células del trofotodermo al cuarto día y medio de gestación. Es importante señalar la presencia de otras moléculas como el receptor de LNF-1 que participan en el anclaje del blastocisto y que al igual que Lect-14 aparece al cuarto día y medio de gestación. Linderberg y col. (1990); menciona además que los eventos clave que controlan la implantación podrían ser interacciones entre glicoconjugados acarreadores de LNF-1 en el epitelio uterino y su receptor en la superficie expandida del blastocisto.

Por otro lado en un trabajo reciente realizado por Brooke y col (1996). demuestra la presencia de dos galectinas (lectinas que reconocen lactosa), identificadas como galectin-1 (14 kDa) y galectin-3 (30 kDa) localizadas en el complejo útero-placentario del ratón.

En sus resultados determinan la localización y el papel que podrían desempeñar estas proteínas en el complejo útero-placentario. Determinan la localización de galectin-1 en todos los tejidos del complejo útero-placentario y además en úteros de hembras no preñadas, por lo que se piensa que su función es de mantenimiento primordialmente, mientras que galectin-3 solo se presenta en hembras preñadas y específicamente localizada en aquellos tejidos que forman en la interface feto-maternal.

Los resultados en el presente trabajo muestran la presencia de un factor en el citosol de células epiteliales de útero de rata al quinto día de preñez, en la tabla III se muestran los ensayos preliminares para determinar la presencia de actividad aglutinante en el epitelio y el estroma del sitio de implantación y del intersitio en esta se observa una actividad ligera en ambos tejidos, como se puede apreciar se utilizaron dos diferentes detergentes para desprender las proteínas de la membrana celular; la actividad solo se mantiene con Triton-X-100 y en presencia de Desoxicolato no se detecta actividad aglutinante. En la tabla IV se muestran los resultados de los ensayos encaminados a estudiar la distribución subcelular de la actividad aglutinante encontrándose dicha actividad en el citosol de células epiteliales y no así en las demás fracciones; aunque la actividad fue constante en todas las fracciones de las células del estroma uterino no eran nuestro objeto de estudio, en la tabla V se muestra una serie de tres experimentos, realizados en el citosol de las células del epitelio uterino dividido en sitio de implantación e intersitio, con el objeto de comprobar la repetitividad de la actividad, los datos nos muestran que la actividad aglutinante es similar en los dos

extractos; pero la actividad específica muestra diferencias muy marcadas, se puede apreciar un incremento en el citosol de las células del epitelio del sitio de implantación con respecto de la actividad específica del citosol de las células del intersitio. Este factor muestra las mismas características que las lectinas del tipo soluble como son la capacidad de aglutinar células, en este caso los eritrocitos de conejo fijados, la especificidad para reconocer lactosa, determinado por la inhibición de la hemaglutinación con dicho carbohidrato y la solubilidad en solución amortiguadora. En vista de que todo parecía indicar que este factor se trataba de una galectina se intentó purificar con cromatografía de afinidad para este tipo de lectinas, utilizando 2 tipos de columnas que contienen residuos de galactosa. Los resultados que se muestran en las tablas VI y IX nos indican un comportamiento constante en ambas columnas con respecto a su valoración. La columna de sefarosa asialofetuina retuvo el 79.05% de la lectina de *Arachis hypogaea* y la columna de aminofenil tiogalactopiranosido retuvo el 76.5% de la misma proteína, lo que nos indica que la columna funcionó adecuadamente; una vez que las columnas fueron valoradas realizamos la elución de nuestro factor; en las tablas VII (intersitio) y VIII (sitio) se muestra la elución del factor a través de la columna de asialo-fetuina y como se puede apreciar el factor no fue retenido por la columna; en las tablas X (intersitio) y XI (sitio) se muestra la elución del factor a través de la columna de aminofenil tiogalactopiranosido presentando el mismo comportamiento de la otra columna; esto podía deberse a que el factor se haya desnaturalizado y perdido su actividad, sin embargo después de pasar por la columna y

no ser retenido, este seguía conservando la actividad hemaglutinante, la cual seguía siendo inhibida por β -lactosa. En las tablas XII y XIII se muestran los resultados de los ensayos para determinar la naturaleza del factor estos resultados nos dicen que el factor presentaba cierta inestabilidad a la temperatura ya que a 86°C la actividad aglutinante se perdió por completo; no así a 25°C y 56°C . En la extracción lipídica efectuada al extracto se encontró actividad en las fases proteica con mayor intensidad y en la acuosa con menor intensidad no así en la fase lipídica en donde no se encontró actividad aglutinante con lo que podemos descartar que el factor fuera de naturaleza lipídica. En la tabla XIV se muestran los resultados del efecto de la tripsina en la actividad aglutinante del factor y en este caso podemos ver que el factor era sensible a ésta ya que se perdió toda la actividad en presencia de la tripsina, no así cuando el inhibidor de tripsina era agregado desde el inicio del ensayo en donde se mantuvo la actividad de manera similar que en el control; estos ensayos arrojaron evidencias de que el factor era de naturaleza proteica.

Todo lo anterior nos puede indicar que se trata de otro tipo de lectina con baja afinidad a lactosa o que requiere de algún compuesto que aumente su afinidad a ella, el cual se perdería durante el paso por la columna de afinidad.

Se requieren más estudios para conocer más este factor y diseñar una estrategia metodológica para purificar y caracterizarlo, como el uso de estromas de eritrocitos fijados con glutaraldehído y usando como soporte el sefadex G-50 o G-25.

Dicho factor Potencialmente podría desempeñar una función importante durante la implantación embrionaria ya que podría participar en regular el reconocimiento célula-célula o célula-sustrato puesto que tiene sitios de unión a galactosa.

El factor se localizó en todo el epitelio uterino y no estaba restringido a el sitio de implantación lo que confirma que existen por lo menos dos tipos de lectinas afines a galactosa y que participan en diferentes eventos durante el proceso del embarazo como lo mencionan Brooke y col (1996).

CONCLUSIONES.

- El epitelio y el estroma de útero de rata gestante en el periodo de preimplantación poseen actividad hemaglutinante con especificidad a β -lactosa.
- Por su sensibilidad al tratamiento térmico y a tripsina así como su solubilidad, podemos concluir que el factor que causa la actividad hemaglutinante es de naturaleza proteica. Conjuntamente con el hecho de que la actividad hemaglutinante fue inhibida por β -lactosa y no por otros glucósidos estudiados, los resultados obtenidos sugieren fuertemente la existencia de por los menos una lectina capaz de reconocer residuos de β -lactosa en el epitelio y estroma uterinos.
- El estudio realizado con el propósito de estudiar la distribución subcelular de la actividad hemaglutinante en las dos estirpes celulares mostró que en el epitelio, la actividad está confinada en el citosol; en contraste, el tejido estromal mostró mayor heterogeneidad, ya que se encontró actividad hemaglutinante en todas las fracciones subcelulares estudiadas. Sin embargo, la actividad hemaglutinante específica para β -lactosa también mostró estar confinada en el citosol de estas células.
- En relación a la distribución entre sitios de implantación y el tejido adyacente (intersitios), la actividad hemaglutinante citosólica y capaz de ser inhibida por β -lactosa se comportó de manera diferente en el epitelio y en el estroma: en el epitelio fue mayor en los sitios de implantación, mientras que en el estroma fue mayor en los intersitios.

- El factor con actividad hemaglutinante del extracto citosólico del tejido epitelial no fue retenido por cromatografía de afinidad empleando como ligando a la galactosa; sin embargo, la valoración de la columna con la lectina de *Arachis hypogaea*, una lectina que reconoce y une β -lactosa mostró su funcionalidad.
- En base a esto, podemos concluir que la actividad hemaglutinante del citosol de células epiteliales de útero de rata, está dada por un factor con ciertos requerimientos extracelulares de unión que no pueden ser satisfechos por nuestro ligando utilizado (asialofetaina o tiogalactopiranosido).
- Sería interesante el uso de otros ligandos para este propósito como: fenil-glicósidos, glicopéptidos de asialofetaina o el empleo de otras condiciones físico-químicas en la columna que estabilicen la unión del factor hemaglutinante con la galactosa.

REFERENCIAS

- Agutter, P.S., y Suckling, K.E.: Models of the interactions between membranes and intercellular protein structures. *Biochem. Soc. Trans.* 12: 4. 713-718. 1984.
- Anderson, T.L. y Hoffman, L.H.: Alterations in epithelial glycocalix of rabbit uteri during early pseudopregnancy and pregnancy, and following ovariectomy. *Am. J. Anat.* 171: 321, 1984.
- Anderson, T.L., Olson, G.E., Hoffman, L.H.: Stage-specific alteration in the apical membrane glycoproteins of endometrial epithelial cells related to implantation in rabbits. *Biol. Reprod.* 34:4. 701-720. 1986.
- Aplin, J.D., Hughes, R.C.: Complex carbohydrates of the extracellular matrix structures, interactions and biological roles. *Biochem. Biophys. Acta.* 694: 4. 375-418. 1982.
- Barondes, S.H., y Roberson, M.N.: *Xenopus laevis* lectin is localized at several sites in *Xenopus* oocytes, eggs and embryos. *J. Cell. Biol.* 97: 6. 1875-1881. 1983.
- Barondes, S.H.: Biofunctional properties of lectins: lectins redefined. *Tins.* 13, Dec. 1988.
- Barondes, S.H.: Lectins: their multiple endogenous cellular functions. *Annu. Rev. Biochem.* 50: 107-231. 1981.
- Boving, B., Larson, J.: Implantation. En Hafez, Ed. *Edit Human Reproduction conception and contraception*, Hafez & Evans, London, Inglaterra, pp. 133-156. 1973.

- Bradford, M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248. 1976.
- Brooke, P., Keith, K., Kayla, D.W., Janelle, D., Vaughan, L. y Harry, W.: Differential expression of two β -galactoside-binding lectins in the reproductive tracts of pregnant mice. *Biol. Reprod.* 55: 548-558. 1996.
- Butler, W. T.: Hemagglutination studies with formalinized erythrocytes. *J. Immuno.* 90: 663-671. 1963.
- Carson, D.D., Wilson, O., Jacobs, A.J., Stewart, S.: Expression of externally-disposed Heparin/Heparan Sulfate binding sites by uterine epithelial cells. *J. Cell. Phys.* 143: 60. 60-67. 1990.
- Chávez, D. J., Anderson, T.L.: The glycocalyx of the mouse uterine luminal epithelium during estrus, early pregnancy, the peri-implantation period, and delayed implantation. I. acquisition of *Ricinus communis* I binding sites during pregnancy. *Biol. Reprod.* 32:5. 1135-1142. 1985.
- Chávez, D.J. y Enders, A. C.: Lectin binding of mouse blastocyst: Apparence of *Dolichos biflorus* binding sites on the trophoblast during delayed implantation and their subsequent disappearance during implantation. *Biol. Repro.* 26: 545. 1982.
- Chávez, D.J. y Enders, A. C.: Temporal changes in lectin binding of periimplantation mouse blastocyst. *Dev. Biol.* 87: 267. 1981.

- Chávez, D.J., Shriver, E.M.: Modification of mouse uterine luminal epithelium during apposition and adhesion of early implantation. *Anat.Rec.* 22-23A. 1987.
- Classen- Linke, I., Denker, H.W., Winterhager, E.: Apical plasma membrane-bound enzymes of rabbit uterine epithelium. *Histochemistry.* 87-6: 517-529. 1987.
- Clemetson, C.A., Kim, J.K., Mallikar Juneswara, y Wilds, J.H.: The sodium and potassium concentrations in the uterus fluids of the rat the time of implantation. *J. Endocr.* 54: 417, 1972.
- Cowell, T.P.: Implantation and development of mouse eggs transferred to the uteri of non progestational mice. *J. Reprod Fertil.* 19: 239-245, 1969.
- Cuatrecasas, P.: Protein purification by affinity chromatography. *J. Biol. Chem.* 245: 3059-3065. 1970.
- Damsky, C.H., Richa, J., Solter, D., Knudsen, K., y Buck, C.A.: Identification and purification of a cell surface glycoprotein mediating intercellular adhesion in embryonic and adult tissue. *Cel.* 34: 2. 455-466. 1983.
- Denker, H.W.: Trophoblasts-endometrial interactions at embryo implantation: A cell biological paradox. En: *Trophoblast Research*, vol. 4. Trophoblast invasion and Endometrial Receptivity. Denker, H.W. and Aplin, J.D. (Ed.), Plenum Press. 3-29. 1990.
- Drickamer, K.: Two distinct classes of carbohydrate recognition domains in animal lectins. *J. Biol. Chem.* 263: 9557-9560. 1988.
- Enders, A.: Anatomical aspects of implantation. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 25: 1-25. 1976.

- Enders, A.: Fertilización, Cleavage and implantation. En Hafez, E. (Edit) *Reproduction and breeding techniques for laboratory animals*, Lea & Febiger. Philadelphia, EUA. pp 137-156. 1970.
- Enders, A.C., Given, R.L., Schlafke, S.: Differentiation and migration of endoderm in the rat and mouse at implantation. *Anat. Rec.* 190:1. 65-77. 1978.
- Fagg, B., Martin, L., Clark, B. y Quarmby, V.: A simple method for removing the luminal epithelium of mouse uterus for biochemical studies. *J. Reprod. Fert.* 57: 335. 1979.
- Farach, M.C., Tang, J.P., Decker, G.L. y Carson, D.D.: Heparin/Heparan Sulfate is involved in attachment and spreading of mouse embryos in vitro. *Dev. Biol.* 123: 401-410, 1987.
- Fenderson, B.A., Eddy, E.M. y Hamori, S.I.: Glycoconjugate expression during embryogenesis and its biocyst. *Dev. Biol.* 87: 267. 1981.
- Ganguly, L.: Sialic acid and sialidase activity in human endometrial tissue, uterine fluid and plasm under deferent condition of uterine disfunction. *J. Reprod. Fertil.* 46: 383-394. 1974.
- Geiger, B., Segel, L.A., y Volk, T.: On spatial periodicity in the formation of cell adhesions to a sustrate. *Cell. Biophys.* 5: 2. 95-104. 1983.
- Golstein, I., Hughes, C., Monsigny, M., Osawa, T. y Sharon, N.: What should be called a lectin. *Nature.* 285: 66, 1980.

- Hart, G.W., Holt, G.D. y Haltiwanger, R.S.: Nuclear and Citoplasmic glycosylation: novel saccharide linkages in unexpected places. *Trends Biochem.* 13: 380-384. 1988.
- Hausman, R.E., Moscona, A.A.: Immunologic detection of retina cognin on the surface of embryonic cell. *Exp. Cell. Res.* 119: 2. 191-204. 1979
- Heald, P.: Biochemical aspects of implantation. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 25: 24-52. 1976.
- Hodgen G.D. y Itskovits, J.: Recognition and maintenance of pregnancy. En *The physiology of reproduction*. Knobbil, E. y Neil J. (Edit) Raven Press, Ltd, NY., pp 1995-2021. 1988.
- Hoffman, L.H., Winfrey, V.P., Hoos, P.C.: Sites of endometrial vascular leakage during implantation in the rabbit. *Anat. Rec.* 227:1. 47-61. 1990.
- Jacobson, K.: Lateral diffusion in membranes. *Cell. Motil.* 3: 5-6. 531-543. 1983.
- Jenkinson, E.J. y Searle, F.: Cell surface Changes of de mouse blastocyst at implantation. *Exp. Cell. Res.* 106: 386, 1977.
- Jenkinson, E.J., y Wilson, I.B.: In vitro studies on the control of trophoblast outgrowth in the mouse. *J. Embryo. Exp. Morphol.* 30: 21, 1973.
- Kennedy, T.G.: Embryonic signals and the initiation of blastocyst implantation. *Aust. J. Biol. Sci.* 36:5-6. 531-543. 1983.
- Kimber, S.J.: Glicoconjugates and cell surface interactions in pre and peri-implantation mammalian embryonic development. *Int. Rev. Cytol.* 120: 53-167. 1990.

- Kimber, S.J., Linbenberg, S. y Lundblans, A.: Distribution of some gal B1-3(4) Glc Nac related carbohydrate antigens on the mouse uterine epithelium in relation to the peri-implantational period. *J. Reprod. Immunol.* 12: 297-313, 1988.
- Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. *Nature.* 227: 685. 1970.
- Lampelo, S.A., Ricketts, A.P. y Bullock, D.W.: Purification of rabbit endometrial plasma membranes from receptive and non-receptive uteri. *J. Reprod. Fert.* 75: 475, 1985.
- Leffler, H. y Barondes, S.H.: Specificity of binding of three soluble rat lung lectins to substituted and unsubstituted mamalian β -galactosides. *J. Biol. Chem.* 261: 10119-10126. 1986.
- Levi, G., Teichberg, V.I.: Patterns of expression of a 15K β -D-galactoside-specific lectin during early development of the avian embryo. *Develop.* 107: 909-921. 1989.
- Levin, R.J.: The critique on the relevance of membrane potentials to the mechanism of nidation. *J. Endocr.* 58: 141-142. 1973.
- Lindenberg, S., Sundeberg, K., Kimber, S.J. y Lundbland, A.: The milk oligosaccharide, Lacto-N-fucopentosa I, inhibits attachment of mouse blastocysts on endometrial monolayers. *J. Reprod. Fert.* 83: 149-158. 1988.
- Ljungkvist, I. Nilsson, O. : Blastocyst-endometrial contac and pontamine blue reaction during normal implantation in the rat. *J. Endocr.* 60: 149-151. 1974.

- Morris, J.E., y Potter, S.W.: An in vitro model for studying interactions between mouse trophoblast and uterine epithelial cells. *Cell*. 32:4. 275-280. 1990.
- Morris, J.E., y Potter, S.W.: Development of mouse embryos in hanging drop culture. *Anat. Rec.* 211:1 48-56. 1985.
- Murphy, C.R. and Roger, A.W.: Effects of ovarian hormones on cell membranes in the rat uterus. III. the surface carbohydrates at the apex for the luminal epithelium. *Cell. Biophys.* 3: 305. 1981.
- Nicolson, G.L.: Cancer metastasis. Organ Colonization and the cell-surface properties of malignant cells. *Biochem. Biophys. Acta.* 695: 113. 1982.
- Poirer, F., Timmons, M.P., Chan, C.T.J., Guenet, J.L. y Rigby, W.P.: Expression of the L-14 lectin during mouse embryogenesis suggests multiple roles during pre- and post-implantation development. *Develop.* 115: 143-155. 1992.
- Porter, D.G.: Observations on the development of the mouse blastocysts transferred to the uterus and kidney. *Amer. J. Anat.* 121: 73-81. 1967.
- Psychoyos, A.: Hormonal control of ovidimplantation. *Vitamins and Hormons.* 31: 201-256. 1973.
- Psychoyos, A.: Hormonal control of uterine receptivity for nidation. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 25: 17, 1976.
- Rajalaksumi, E.: Changes in uterine sialic acid and glycogen during early pregnancy in the rat. *J. Reprod. Fertil.* 50: 40-55. 1971.

- Samuel, C.A., Perry, J.S.: The ultrastructure of the pig trophoblast transferred to an ectopic site in the uterine wall. *J. Anat. (London)* 113: 139-149. 1972.
- Sharon, N.: Lectin-carbohydrate complexes of plants and animals an atomic view. *TIBS*. 2: 221-226. 1993.
- Sharon, N.: Lectins. *Sci. Amer.* 236: 6. 1977.
- Simpson, P., Thorne, D. y Loh, H.: Developmentally regulated lectin in neonatal rat brain. *Nature*. 266: 367. 1977.
- Stoddart, R.W., Benbow, E.M., Delamore, I.W., y Red, H.: Disseminated zygomycosis associated with erythroleukaemia: confirmation by lectins stains. *J. Clin. Pathol.* 38: 9. 1039-1044. 1985.
- Surani, M.A.H.: Glycoprotein synthesis and inhibition of glycosylation by tunicamycin in preimplantation mouse embryos: Compaction and Trophoblast adhesion. *Cell*. 18: 217-227. 1979.
- Wang, J.L., Olaing, G.J.: Nuclear and cytoplasmic localization of a lectin-ribonucleoprotein complex. *Biochemical Society Transaction*. 20: 2. 1992.
- Ward, O. Donovan, B. : Implantation and induced decidualization of the uterus in the guinea pig as indicated by pontamine blue. *Biol. Reprod.* 5: 270-273. 1971.
- Wassarman, P.M.: Early events in mammalian fertilization. *Ann. Rev. Cell Biol.* 3: 109-142. 1987.
- Winterhager, E., Kuhnel, W.: Diffusion barriers in the vaginal epithelium during the estrous cycle in guinea pigs. *Cell. Tiss. Res.* 241: 2. 325-331. 1985.

- Winterhager, E., Mendoza, A.S.: Structure of quick-frozen tight junctions in uterine epithelium of pseudopregnant rabbits. *Z. Mikrosk. Anat. Forsch.* 101:1. 178-185. 1987.