



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
PLANTEL IZTACALA**



**EFFECTO DE LA N-ETILMALEIMIDA (NEM) Y  
DEL ACIDO 5,5' (2-ditiobis nitrobenzoico)  
(DTNB) SOBRE LA IMPLANTACION  
DE LA RATA**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
B I O L O G O  
P R E S E N T A :  
ANGEL CAMBRON RUIZ

LOS REYES IZTACALA, MEXICO

1984



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

A MI INDIA

A LA GLRX

A ABRIL ISELA

ESTE TRABAJO SE DESARROLLO EN LA SECCION DE ENOCRINOLOGIA MOLECULAR, PERTENECIENTE A LA DIVISION DE BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION EN LA UNIDAD DE INVESTIGACION BIOMEDICA DEL CENTRO MEDICO NACIONAL (IMSS) BAJO LA DIRECCION DEL DOCTOR JUAN JOSE HICKS GOMEZ DESDE MAYO DE 1980 HASTA JUNIO DE 1981.

## I N D I C E

	PAG.
I.- INTRODUCCION.	1
II.- OBJETIVO E HIPOTESIS DE TRABAJO.	10
III.- MATERIAL Y METODO.	12
IV.- RESULTADOS.	17
V.- DISCUSION.	24
VI.- CONCLUSIONES.	33
VII.- BIBLIOGRAFIA.	34

## INTRODUCCION

GENERALIDADES SOBRE LA IMPLANTACION. Durante la preñez temprana en mamíferos se pueden reconocer dos etapas: La primera - de ellas es la de preimplantación, la cual abarca el tiempo la fecundación y el momento inmediato anterior a la implantación - (20). Esta etapa se caracteriza por cambios morfofuncionales del endometrio, los cuales están regulados por factores hormonales y locales (20). Estos cambios son necesarios para que se verifique que la implantación. La segunda etapa es la de implantación y - se puede definir como el proceso mediante el cual el blastocisto asume una posición fija en el útero y empieza a alternar fisiológicamente con él, induciendo la reacción decidual (31,32).

En los mamíferos Euterios se reconocen tres tipos de implantación:

1.- Central. El blastocisto aumenta de volumen antes de implantarse y, como consecuencia, se pone en contacto con un área mayor de la superficie endometrial. Este tipo de implantación la presentan la coneja y la perra.

2.- Excéntrica. El blastocisto no aumenta de tamaño antes de implantarse, se ubica en una cámara la cual se halla a un lado de la luz uterina en el momento de implantarse. Este tipo de implantación se encuentra en roedores como la rata y el hamster.

3.- Intersticial. Al igual que en la implantación excéntrica, el

blastocisto no aumenta de tamaño antes de implantarse. Se dife-  
rencia de esta última en que el blastocisto atraviesa el epite-  
lio y se implanta en el tejido conectivo subyacente (estroma).  
En los dos tipos anteriores de implantación, el embrión invade  
al estroma en una etapa más tardía del desarrollo. En la yegua,  
la mujer y el chimpancé se encuentra la implantación intersti-  
cial.

En la rata, el azul de tripan inyectado intravenosamente, per-  
mite diferenciar los sitios de implantación, pues es un colo-  
rante de alto peso molecular (980.2) que se adsorbe a albúmina  
sérica y se acumula en el sitio de implantación donde existe -  
un incremento en la permeabilidad vascular (53).

GENERALIDADES SOBRE LOS GRUPOS SH Y LA IMPLANTACION. Los  
grupos SH están muy distribuidas entre los seres vivos y reali-  
zan una gran variedad de funciones (68). Químicamente se divi-  
den en SH proteicos y en SH no proteicos. El segundo grupo lo  
encontramos fundamentalmente en aminoácidos tales como la Cis-  
teina, Homocisteina y en péptidos pequeños con el Glutatió  
n. Los SH proteicos entran como componentes del residuo de la Cis-  
teina de las cadenas polipeptídicas siendo importantes en mu-  
chas funciones proteicas como por ejemplo el establecimiento y  
mantenimiento de la estructura tridimensional de las proteínas,  
al oxidarse y formar puentes disulfuro (49). El grupo SH es po-  
lar, a pH 7 se encuentra poco ionizado (8.1%) siendo altamente

reactivo y muy oxidable. Reacciona fácilmente con los iones metales  $Ag^{++}$  y  $Hg^{++}$  y mercaptano (49).

En cuanto a las funciones que cumplen los grupos SH dentro de los seres vivos, se pueden dividir para fines prácticos en dos grupos:

A. Funciones biológicas en general.

B.- Funciones dentro de la Biología de la Reproducción en particular.

Dentro de las funciones del primer grupo se pueden anotar las siguientes:

1.- Mantenimiento de la estructura membranal. Participan activamente en interacciones hidrofóbicas manteniendo la interacción lípido-proteína membranal, lo cual al final de cuentas es importante para la integridad estructural de las membranas biológicas (11, 62, 63, 66).

2.- Transporte a través de membranas biológicas.

a) De carbohidratos y aminoácidos. Se ha demostrado que los grupos SH expuestos al exterior de la membrana del eritrocito son fundamentales para el transporte de Glucosa (7, 76). En procariotes se ha propuesto un modelo de transporte de azúcares y aminoácidos acoplado al transporte de electrones, en el cual uno de los transportadores se presenta en dos formas: una de disulfuro (oxidada) de alta afinidad al substrato y otra de



SH (reducida) de baja afinidad a éste. El bloqueo de los grupos SH inhiben el transporte en estos casos (63).

b) De cationes. El sistema de transporte activo  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATP asa (bomba de sodio-potasio) tiene grupos SH, esenciales para su funcionamiento. Si se bloquean estos SH con N-etilmaleimida la bomba no funciona (59,63,64,67,74).

3.- Reconocimiento Antigénico. Se ha demostrado que los grupos SH son indispensables en la estructura del antígeno Rh (36,63).

4.- Adhesividad Celular. Varios reactivos que bloquean específicamente los grupos SH de la superficie celular bloquean la adhesión celular en células embrionarias disgregadas y esta adhesividad es recuperada por reactivos que regeneran estos grupos SH (30,38).

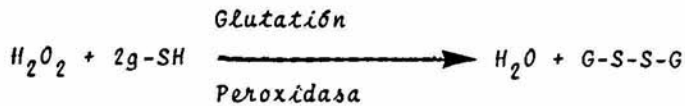
5.- Participación en la Actividad Enzimática. Muchas enzimas presentan grupos SH esenciales para el mantenimiento de su actividad, algunos en el sitio activo participando en el enlace enzima-substrato y otros en sitios de regulación alostérica. (49)

6.- Como agente reductor de diversos procesos celulares. En estos procesos actúa principalmente como constituyente del Glutatión (G-SH) el cual al oxidarse origina la forma oxidada G-S-S-G la cual puede ser reducida mediante la enzima Glutatión reductasa. Entre los procesos en que interviene se halla:

a) Preservación de grupos SH proteicos, Mediante la reacción de intercambio de disulfuro (27).



- b) Protege a eritrocitos y Hepatocitos del daño oxidativo por  $H_2O_2$  (27, 51)



- c) Síntesis de Prostaglandinas (49)  
d) Protege a los Lípidos de la Autooxidación. (51)  
e) Ruptura de puentes disulfuro en la Activación de hormonas proteicas como la Insulina y la Oxitocina. (27)

f) Posible significado regulatorio. El proceso oxidoreductor en que interviene el Glutatión con las proteínas varía de acuerdo con las variaciones del AMPc, siendo la relación proteina -S-S-G/GSH a altas concentraciones de AMPc y baja con niveles disminuidos (43).

7.- Formando parte activa de los receptores proteicos a diversas Hormonas. Se ha demostrado que los receptores citoplasmáticos a glucocorticoides tienen grupos SH indispensables para su función (35). También se ha encontrado que los receptores a hormonas esteroides pueden ser inactivadas con reactivos que bloquean los grupos SH (44, 46) ocurre algo parecido con los receptores a hormonas peptídicas (41, 57).

8.- Receptores a neurotransmisores. El receptor para la acetilco

lina tiene grupos SH que al ser bloqueados se reduce la afinidad acetil colina-receptor (45).

9.- Intervienen en la transmisión del impulso nervioso. Se ha demostrado que la acción inhibitoria de los compuestos que reaccionan con los grupos SH en el proceso de la conducción del estímulo nervioso es incremento por la estimulación eléctrica de la fibra nerviosa. Se han dado varias explicaciones para este "efecto estimulador" incluyendo: alteración de la permeabilidad de la membrana, desenmascaramiento de grupos SH membranales - ocultos y reducción electrolítica de S-S (4,56,61,79).

10.- Están relacionados con el Cáncer. Existen algunos inhibidores de grupos SH que son más tóxicos para las células cancerosas que para las normales y pueden inducir inmunidad contra el cáncer en los ratones. Asimismo, hay una relación entre el grado de radiosensibilidad y grupos SH no proteicos libres, los cuales son mas resistentes a la radiación (47,48,79).

En cuanto a sus funciones dentro de la Biología de la Reproducción se reconocen:

1.- Reconocimiento y enlace entre el espermatozoide y el óvulo durante la fecundación. El bloqueo de grupos SH con 4- (carboxi 3-hidroxi-fenil) maleimida (NCFM) en el espermatozoide evita la adhesión de éste a la zona pelúcida y membrana del óvulo inhibiendo así la fertilización (58,63).

2.- Participación en la maduración epididimaria del espermatozoide. La maduración epididimaria implica una disminución en la cantidad de grupos SH libres y un aumento en S-S en cabeza, núcleo y cola de espermatozoide aumentando su estabilidad, siendo por ésto más resistente a la ruptura con detergentes, a la acción de la Actinomicina D y menos reactivo a la tinción - Feulgen (17,18,63,64).

3.- Capacitación del espermatozoide. El bloqueo de grupos SH - de espermatozoides eyaculados con NCFM evita su capacitación - tanto *in vivo* como *in vitro* (63,64).

4.- Intervienen en la Morfogénesis. Se ha encontrado que si se agregan compuestos que reaccionan con los grupos SH al medio - en donde se desarrollan embriones de erizo de mar y anfibio se producen desarrollos abortivos o larvas anormales (2,6,12,13, 14,80).

Se ha propuesto que el ratón durante la implantación se forman enlaces covalentes entre la superficie de las células endometriales y la de las células del trofoblasto por oxidación de grupos SH de la superficie membranal (70). Hay un estudio *in vitro* sobre este aspecto. Se investigó el efecto que tienen varios agentes bloqueadores de grupos SH sobre la adhesión de los blastocistos a la pared de plástico a la caja de cultivo. A pesar de que los resultados fueron negativos no se pueden sacar conclusiones definitivas ya que la adhesión del blastocisto a-

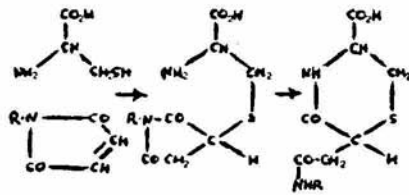
la caja de cultivo es inespecífica y debida probablemente a un aumento en la viscosidad del embrión (77). Además no es fácil extrapolar los resultados conseguidos in vitro al endometrio, debido a que en este último hay cambios en su superficie durante la preñez los cuales permiten la implantación (20,42).

Por otro lado se ha determinado recientemente la concentración de grupos SH en el útero de la rata durante el ciclo estral y en el día 5 de preñez (día en que se implanta el blastocisto) encontrándose que en el día 5 de preñez existe una mayor concentración aquí de grupos SH en los sitios de implante (SI) que en los intersitios de implante (ISI).

LOS REACTIVOS SH. Desde hace más de 50 años se empezó a reconocer la importancia biológica de los grupos SH y desde entonces se han estado diseñando métodos para estudiarlos (8). La N-etilmaleimida (NEM) es una de varias maleimidias N-substituidas, la cual reacciona fácilmente con los grupos SH a través de su enlace C=C. Tiene una reacción estequiométrica de 1:1 con los grupos SH (59), razón por la cual se le ha utilizado en la determinación espectrofotométrica de los mismos (1,8,15,19,21,22,25,28,37,39,50,65,71,72,79). En estado sólido es muy estable, en solución acuosa hay una suave hidrólisis a pH ácido y se incrementa linealmente con el pH en soluciones alcalinas. A pH 7 la NEM reacciona en menos de 2 minutos con los SH libres, pero no alcanza a los SH ocultos en las cadenas poli-

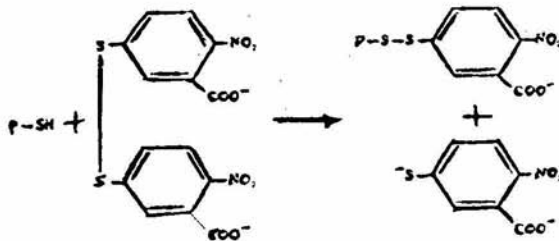
peptídicas, siendo necesario desnaturalizar estas proteínas.

Esquema de la reacción de la NEM con los grupos SH:



El ácido 5, 5' (2-ditiobis nitrobenzoico) ó DTNB reacciona estequiométricamente 1:1 con los grupos SH (40) y se usa para determinarlos espectrofotométricamente (3,26,40), también se le ha usado para bloquear los grupos SH de la superficie membranal (41) debido a que no penetra fácilmente las membranas celulares (29).

Esquema de la reacción del DTNB con los grupos SH:



O B J E T I V O S :

Observar el efecto que tiene sobre la implantación del -- blastocisto en la rata Long Evans dos reactivos que bloquean - los grupos SH (NEM y DTNB), cuando se administran en la luz - uterina durante la etapa de preimplantación. Además se plan- - tean los siguientes objetivos secundarios:

A).- Determinar si estos reactivos SH pueden inhibir la implan- tación sin afectar a la reacción azul. Se le llama reacción - azul a un proceso de aumento en la permeabilidad vascular de - los vasos sanguíneos del endometrio y el cual puede ser visua- lizado macroscópicamente al inyectar a la rata el azul de Tri- pan. La inyección del colorante se efectúa en la mañana del - día 5 de preñez antes de que el blastocisto se implante. El co- lorante se va a acumular en los sitios de implante (SI), en la región que queda entre los sitios de implante adyacentes no - hay acumulación del colorante. La imagen que se obtiene es una serie de bandas azules en los cuernos uterinos, correspondien- do cada banda a un sitio de implante (SI), el resto del útero son los intersitios de implante (ISI).

B).- Observar el efecto de la NEM y el DTNB sobre la morfolo- - gía celular (a microscopía de luz) de las células endometria- - les.

C).- Determinar el contenido de ADN, ARN, proteínas y % de hi- dratación del SI y del ISI, para observar el efecto que tienen

sobre estos parámetros la NEM y el DTNB.

HIPOTESIS DE TRABAJO. Para que el blastocisto pueda im-  
plantarse es necesario que la superficie celular del endome-  
trio se modifique para formar los sitios de implante (SI), en  
los cuales hay cambios en la polaridad de la superficie membra-  
nal (20) y en la población de carbohidratos (42). Los grupos -  
SH pueden oxidarse fácilmente para formar puentes disulfuro -  
(S-S). Se ha propuesto que, en el ratón, en el momento de im-  
plantarse el blastocisto, se forman puentes S-S entre la super-  
ficie del blastocisto y la del endometrio, siendo necesario es-  
tos puentes para la implantación (70). Asimismo, se ha encon-  
trado que la concentración de grupos SH es mayor en los sitios  
de implante (SI) que en los intersitios (ISI) (3). Entonces, si  
los SH de la superficie del blastocisto pueden oxidarse a S-S  
con los SH de la superficie endometrial, al bloquear estos úl-  
timos, va a ocurrir un bloqueo de la implantación.



M A T E R I A L Y M E T O D O S .

Se trabajo durante la fase de preimplantación (del día 1 al 4 de preñez) (20) con ratas preñadas de la cepa Long Evans, con un peso de  $174.7 \pm 26$  g mantenidas en un bioterio con luz y temperatura constante, con un periodo de luz de 14 horas (7 AM 9 PM), alimentadas con Purina Rat Chow y agua ad libitum. Las ratas fueron apareadas durante la tarde (4PM) por el sistema de trio (2 hembras vírgenes y 1 macho) (9) muestras de moco vaginal fueron tomados a las 8AM del día siguiente, considerándose como día cero de preñez al día en que se hallaron espermatozoides en el lavado.

El reactivo SH (NEM ó DTNB, Sigma Co) se administró una sola vez en los días 1, 2, 3, ó 4 de preñez, teniendo un grupo de aproximadamente 10 ratas para cada día de aplicación del reactivo (en total 8 grupos).

Se preparó una solución 0.001 M de NEM en un Tampón de fosfatos de Na, pH 6 (34) lo que da una concentración de 250 milimolas en 50  $\mu$ l. Se preparó una solución 0.0001 M de DTNB en solución salina NaCl 0.9% lo que da una concentración de 50 milimolas en 50  $\mu$ l. La diferencia en las concentraciones usadas de los reactivos se debe a que la NEM penetra fácilmente a las células y el DTNB no lo hace (29,58).

La concentración promedio de grupos SH por cuerno uterino es -

de 250 milimolas y la concentración en el epitelio endometrial es ligeramente inferior a 50 milimolas (Baiza L A, comunicación personal). Entonces, se puede suponer que estas concentraciones bastan para saturar a todos los SH presentes en la luz uterina y en todo el cuerpo.

Para administrar el reactivo SH se procedió de la siguiente manera: Para anestésiar al animal se le inyectó un relajante muscular (dehidrobenezoperidol 0.76 ml/100 g) y 20 minutos después el anestésico (Clorhidrato de Ketamina 0.1 ml/100 g). Se hizo la paratomía, localizando el cuello del útero, se colocó una pinza hemostática en la base de cada cuerno, cerca del cuello del útero. En el cuerno experimental se inyectó un volumen de 50 ul del reactivo SH (ENM ó DTNB) y en el cuerno control se inyectó un volumen igual del vehículo. Se dejaron 10 minutos antes de proceder al cierre de la insición. El animal fue regresado al bioterio y no se tocó sino hasta el momento de ser sacrificado.

Recientemente se ha demostrado que, en algunos grupos de mamíferos que poseen útero bicorneo (lagomorfos, quirópteros) (78, 82) se implantan más embriones en un cuerno que en el otro. Se ha demostrado que ocurre el mismo fenómeno en las ratas de la cepa Sprage-Dawley (5,16). Aunque esto no se ha demostrado para las ratas de la cepa Long Evans, para evitar interpretaciones erróneas de los resultados se aplicó el reactivo SH en el-

cuerno derecho de la mitad de las ratas de cada grupo y en el cuerno izquierdo a la otra mitad.

De cada grupo de ratas, se tomó la mitad para inyectarles 1 ml de azul de tripan al 5% en la vena de la cola en la mañana del día 5 de preñez entre las 7 y las 9 AM (el blastocisto se implanta en la tarde de este día), 30 minutos más tarde fueron sacrificadas por dislocación cervical.

El útero fue disecado colocándose sobre una caja de petri instalada sobre hielo donde fue limpiado del exceso de grasa y de tejido conectivo.

Se contaron las bandas azules (indicadoras de los sitios de implante) de cada cuerno, Se separaron los sitios de implante (SI) de los intersitios (ISI) tanto del cuerno control como del experimental manejándose como muestras separadas (un total de 4 muestras por útero), se pesaron hasta el miligramo en una balanza analítica, se homogeneizaron con solución salina (NaCl 0.9%) 1:20 P/V en un homogeneizador Pyrex vidrio-vidrio mantenido en un baño de hielo (cuando hubo poco tejido se juntó el material de dos ratas para obtener un volumen mínimo de trabajo). Se determinó el peso seco (10) (cuadro 1) tomándose una alicuota directamente del homogeneizado. Otra alicuota del mismo homogeneizado se procesó de acuerdo a la técnica de Schneider (60) para obtener una serie de extractos en los cuales se determinaron los siguientes parámetros bioquímicos, los cuales fueron reportados con respecto al peso seco.

- A).- Proteínas (54), cuadro 2
- B).- Acido ribonucleico (52), cuadro 3
- c).- Acido desoxiribonucleico (33), cuadro 4

En todas las determinaciones se hizo una curva patrón por triplicado, los tubos problema se hicieron por triplicado siempre que hubo un volúmen suficiente. Las lecturas se hicieron en un espectrofotómetro Pye Unicam SPG-500

La otra mitad de cada grupo de ratas fué sacrificada en la mañana del día 8 de preñez, se disecaron los úteros y se colocaron en una caja de petri dispuesta sobre hielo, se limpiaron del exceso de grasa y se contaron los implantes y las reabsorciones. Algunos de los úteros se fijaron en formól salino (90 ml. de solución salina NaCl 0.9% más 10 ml. de formaldehído al 40-43%), se procesaron de acuerdo a la técnica histológica con inclusión en parafina, se hicieron cortes histológicos (del SI y del ISI tanto del cuerno control como del experimental) de 7  $\mu$ M de espesor y se tiñeron con Hematoxilina-Eosina (55). Para el estudio de los cortes histológicos se usó el trabajo de Vincent de Feo (23).

EVALUACION ESTADISTICA.- Para analizar el recuento de bandas azúles y de embriones implantados se usó la prueba de  $\chi^2$  - aplicando la siguiente fórmula (24);

$$\chi^2 = \frac{(\text{observados} - \text{esperados} - .5)^2}{\text{esperados}}$$

Donde:

Observados = # de bandas azúles o de embriones implantados en cuerno experimental ó en el cuerno control.

Esperados = # total de bandas azúles o de embriones implantados multiplicados por .5

.5 = al factor de corrección de Yates para la prueba de  $\chi^2$  cuando se usan muestras pequeñas.

$\Sigma$  = a la sumatoria de todos los valores.

Para el análisis de los parámetros bioquímicos se usó la prueba de T combinada aplicando la siguiente fórmula (24):

$$T = \frac{X_1 - X_2}{Sp \sqrt{\frac{1}{N_1} + \frac{1}{N_2}}}$$

Donde:

T = a la prueba estadística de T

$X_1, X_2$  = # de casos para las muestras 1 y 2

$Sp$  = desviación estándar = 
$$\frac{(N_1 - 1)^2 S_1 + (N_2 - 1)^2 S_2}{N_1 + N_2 - 2}$$

$N_1 = N_2 - 2$  = a los grados de libertad.

**Fig. 1 ESQUEMA METODOLOGICO**

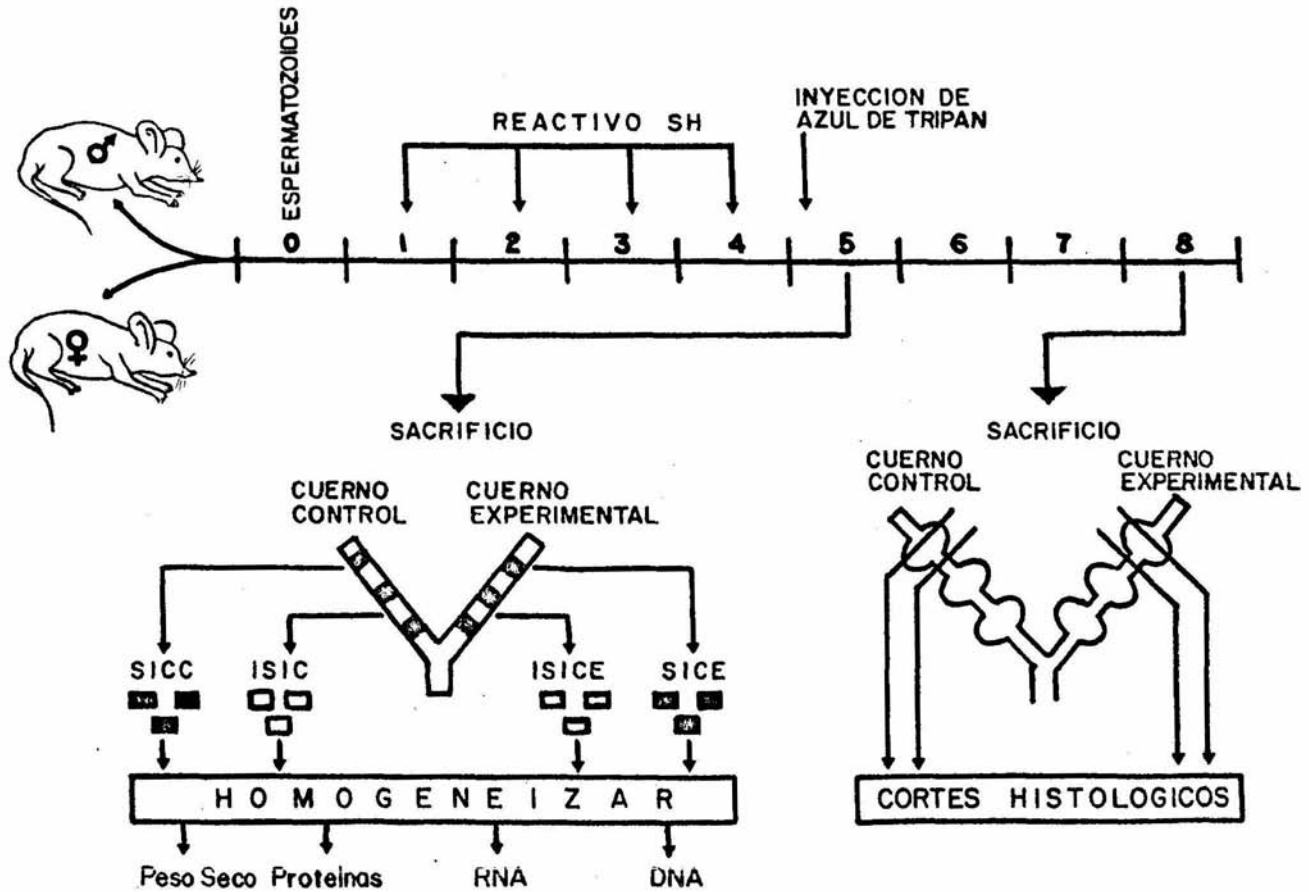


FIGURA 2. ESQUEMA METODOLOGICO (60)

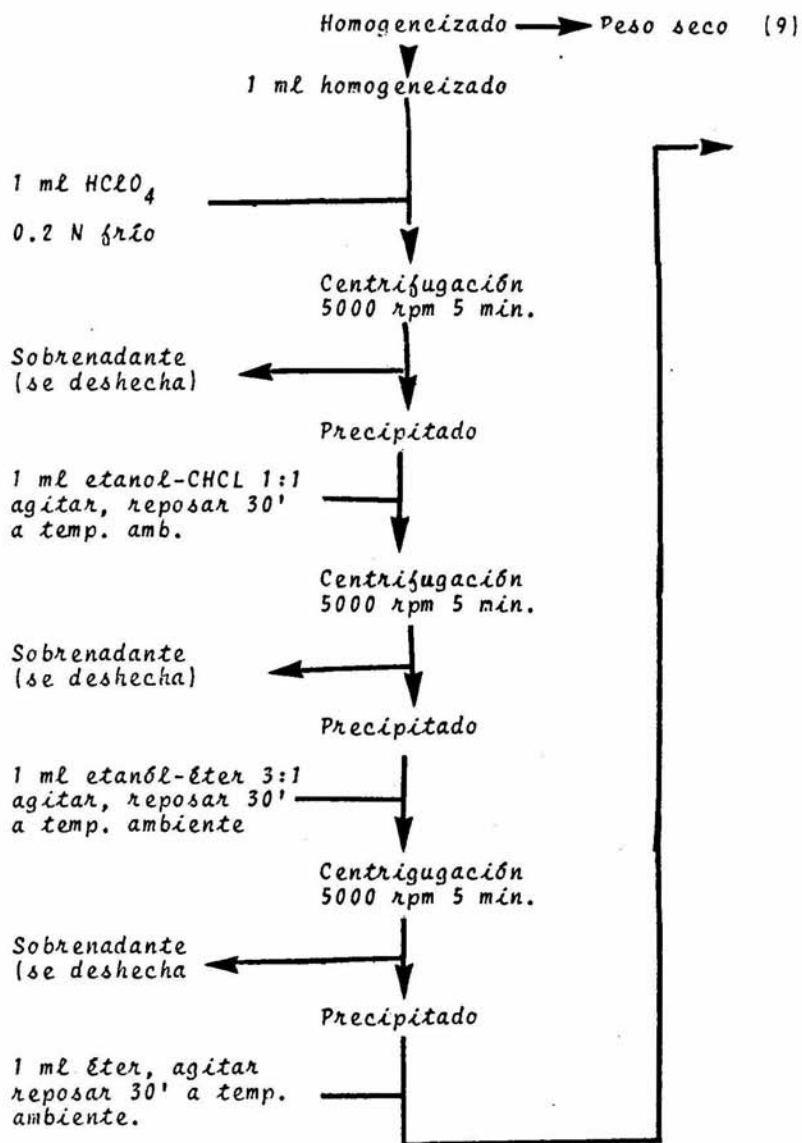
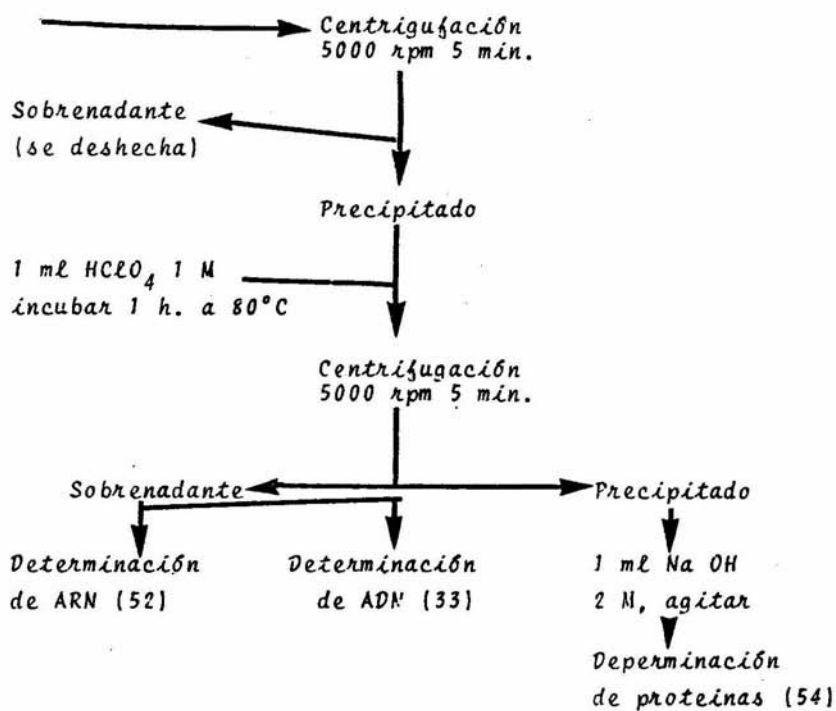


FIGURA 2 (continuación)





C U A D R O 1

DETERMINACION DE PESO SECO (9)

1. Soln. A lg de dicromato de potasio en 50ml de  $H_2SO_4$  - (Merck c Baker) calentar a  $70-80^\circ C$  hasta que se disuelva, agitar con una varilla de vidrio si es necesario.

2. Soln. B, se disuelven 20mg de manosa o manitol con 10-ml de agua destilada en un matraz aforado.

CURVA PATRON

Tubo	Soln. B.	Agua dest.	Sol. A	Probl.
B	0.0 ml	1.0 ml	2.0 ml.	0.2 ml.
1	0.2 "	0.8 "	" "	" "
2	0.4 "	0.6 "	" "	" "
3	0.6 "	0.4 "	" "	" "
4	0.8 "	0.2 "	" "	" "
5	1.0 "	0.0 "	" "	" "

3. Agitar perfectamente en un vortex y poner los tubos en agua hirviendo durante 20 minutos.

4. Enfriar los tubos y leer en 660 nm.

O B S E R V A C I O N E S

A) Hay que manejar con mucho cuidado la solución A, es muy corrosiva.

B) Se colocan los tubos en hielo antes de agregar la solución - A, procurando que la solución resbale por las paredes del tubo.

C) Se puede eliminar la incubación en agua hirviendo agitando los tubos durante 1 minuto en el vortex, poniendo este último a su máxima potencia. Los tubos se leen enseguida en el espectrofotómetro. No deben de ser enfriados los tubos después de agitarlos. Este método es más rápido que el anterior aunque la curva que se obtiene no es tan lineal en todos los puntos como en el primer caso. Además, las densidades ópticas son ligeramente más altas.

## C U A D R O 2

### DETERMINACION DE PROTEINAS (54)

1. Soln. A solución alcalina (4g de NaOH, 20g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, - 0.2g de tartrato de sodio, aforar a 1 litro).
2. Soln. B, solución acuosa de CuSO<sub>4</sub> al 0.5%
3. Soln. C, solución cuproalcalina formada al mezclar 50 ml de la solución A con 1ml de la solución B.
4. Reactivo de Folin-Cecalteau (Merck) 1:3 con agua destilada.
5. Soln. E, solución acuosa patrón de albúmina bovina (Sigma) Co 0.3 mg/ml.

### C U R V A P A T R O N

Tubo	Soln. E	H <sub>2</sub> O dest.	Soln. C	Soln. D	Probl.
B	0.0 ml	0.5 ml	2 ml	0.2 ml	0.1 ml
1	0.1 "	0.4 "	" "	" "	" "
2	0.2 "	0.3 "	" "	" "	" "
3	0.3 "	0.2 "	" "	" "	" "
4	0.4 "	0.1 "	" "	" "	" "
5	0.5 "	0.0 "	" "	" "	" "

6. Después de agregar la soln. C agitar y reposar por 10 - min.

7.- Después de agregar la solución D, agitar los tubos y reposar 20 minutos.

8. Leer a 550 nm.

N O T A : Hay que preparar las soluciones en el momento de usarlas y deshechar el sobrante.

C U A D R O 3

DETERMINACIÓN DE ACIDO RIBONUCLEICO (52)

1. Soln. A, se hidroliza 1mg de ARN (Sigma Co.) en un matraz aforado con 10 ml de la solución B.
2. Soln. B,  $\text{HClO}_4$  0.5 N.
3. Soln. C, 0.05 g de acetato cáprico (Baker) disuelto en 10 ml de ácido acético glacial (Merck), prepararla en el momento de usarse.
4. Soln. D, 0.1g de Orcinol por cada 10ml de HCl concentrado (Merck) preparar en el momento de usarla.

C U R V A P A T R O N

Tubo	Soln. A	Soln. B	Soln. C	Soln. D	Probl.
B	0.0 ml	1.0 ml	0.2 ml	1.5 ml	0.4 ml
1	0.2 "	0.8 "	" "	" "	" "
2	0.4 "	0.6 "	" "	" "	" "
3	0.6 "	0.4 "	" "	" "	" "
4	0.8 "	0.2 "	" "	" "	" "
5	1.0 "	0.0 "	" "	" "	" "

5. Agitar los tubos e incubarlos en agua hirviendo durante 20 minutos.
6. Enfriar los tubos y leerlos a 660 nm.

## C U A D R O 4

### DETERMINACION DE ACIDO DESOXIRIBONUCLEICO (33).

#### Preparación de la solución de ADN

A) Solución concentrada. Se pasan 10mg de ADN de timo de ternera (Sigma Co) y se disuelven en un matraz aforado de 10 ml con 8ml de NaOH 5m, se agita durante 30 minutos y después se afora a 10ml con la misma solución (concentración final 1mg/ml). Guardada en el congelador esta solución se conserva por varios meses.

B) Solución de trabajo. En un matraz aforado de 10ml se pone 1ml de la solución concentrada, se agrega 4ml de NaOH 5m más 4 ml de  $HClO_4$  2 M. Se calienta durante 4 minutos a  $70^\circ C$ , se enfría y se afora a 10ml con  $HClO_4$  2M (concentración final  $100\mu m/ml$ ). Guardada en el congelador, esta solución se mantiene por una semana, después suben las lecturas de la densidad óptica.

#### Preparación de la solución de Acetaldehído

Hay que usar material enfriado a  $4^\circ C$  debido a que el acetaldehído es volátil y explosivo.

A) Solución concentrada. En un tubo mantenido en hielo se diluyen 0.2ml de Acetaldehído (Merck) con 9.8ml de agua destilada. Se prepara cada semana y se guarda en el congelador.

B) Solución de trabajo. Diluir 0.5ml de la solución A con 9.5ml

de agua destilada prepararla poco antes de usarse y deshechar el sobrante (hay que mantener en hielo esta solución mientras se usa).

#### Preparación de la solución de Difenilamina

Se disuelven 0.4g de difenilamina (Merck) en el momento de usar y deshechar la sobrante.

#### CURVA PATRON

Tubo	Soln. ADN	HClO <sub>4</sub> 2 M	Acetal.	Difenil.	Probl.
B	0.0 ml	0.5 ml	0.05 ml	0.5 ml	0.1 ml
1	0.1 "	0.4 "	" "	" "	" "
2	0.2 "	0.3 "	" "	" "	" "
3	0.3 "	0.2 "	" "	" "	" "
4	0.4 "	0.1 "	" "	" "	" "
5	0.5 "	0.0 "	" "	" "	" "

1.- Incubar en agua a 30°C durante 17-24 horas

2. Leer a 600 nm.

## RESULTADOS.

*N-Etilmaleimida (NEM)*. Inhibió la reacción azul ( $p < .025$ ) en todos los días en que se aplicó (tabla 1). La inhibición fue máxima (100%) en los días 2 y 3 de preñez y más baja en el día 4 (77.41%).

La implantación fue inhibida en todos los días en que se aplicó la NEM (tabla 2), siendo más alta en el día 2 de preñez (93.33%) y más baja en el día 4 (65.21%).

*ACIDO 5,5' (2DITIOBIS NITROBENZOICO) (DTNB)*. No inhibió significativamente la reacción azul (tabla 3), su efecto fue nulo en los días 2 y 3 de preñez.

La implantación no fue inhibida significativamente en ninguno de los días (tabla 4), presentándose en el día 3 una inhibición que es alta aunque no llega a una significación estadística.

**PARAMETROS BIOQUIMICOS.** Antes de hacer una descripción más detallada de *c/u* de los parámetros bioquímicos estudiados hay que hacer notar que, con excepción del ARN, ya han sido estudiados previamente (tabla 13) (3,83). Los resultados indican que:

a).- El SI está más hidratado que el ISI.



- b).- El cociente prot/peso seco es más alto en SI que en ISI.
- c).- El cociente peso seco/peso húmedo es más alto en el ISI que en el SI.
- d).- El cociente AON/peso seco es más alto para el ISI que para el SI.

Se encontró que, en general, en el caso de la NEM, estos parámetros siguen esta conducta. En cambio, en el caso del DTNB, se observó que los parámetros a y c se invierten de una manera consistente. Apparently, para los parámetros a y c los resultados se deben a un error en el trabajo experimental

NEM. En todos los días (tablas 5-8), el SICC está más hidratado que el ISICC habiendo diferencias significativas ( $p < .05$ ) en el día 2 y en el 4 (tablas 6 y 8). Ocurre entre el SICE y el ISICE en el día 1 de preñez (tabla 5) aunque la diferencia no es significativa. En el día 4 de preñez el SICE está menos hidratado que el ISICE (tabla 8,  $p < .05$ ). La hidratación del SICE no es significativamente distinta de la del SICC y la del ISICC, quedando situada dentro del rango de ambas. (tabla 5 y 8). El % de hidratación del ISICE se parece más a la del SICC que a la del ISICC, siendo diferente a la de ésta última en el día 2 (tabla 6  $p < .05$ ).

El cociente PS/PH fue más alto para el ISICC que para el SICC en todos los días (tablas 5-8) habiendo diferencias significativas en el día 2 (tabla 6,  $p < .05$ ). En el día 1 el cociente

PS/PH es más alto para el ISICE que para el SICE (tabla 5) aunque la diferencia no es significativa. En el día 4, el cociente PS/PH es más alto para el SICE que para el ISICE (tabla 8,  $p < .05$ ). El cociente PS/PH del SICE (tablas 5 y 8) queda intermedio entre el del SICC y el del ISICC. El mismo cociente del ISICE se parece más al del SICC que al del ISICC, teniendo significancia este parecido en el día 2 (tabla 6,  $p < .05$ ).

En el día 1 hay más proteínas en el SICC que en el ISICC (tabla 5,  $p < .05$ ), en el día 2 la concentración es igual en ambas regiones (tabla 6), en el día 3 hay más proteínas en el ISICC (tabla 7,  $p < .05$ ) y en el día 4 no hay diferencia entre ambas regiones. En el día 1 hay más proteínas en el ISICE que en el SICE (tabla 5) aunque la diferencia no es significativa, en el día 4 hay más proteínas en el SICE que en el ISICE (tabla 8;  $p < .05$ ). En el día 1, el nivel de proteínas del SICE es intermedio y diferentes al del SICC y al del ISICC (tabla 5,  $p < .05$ ) y en el día 4 es más alto (tabla 8,  $p < .05$ ). En el día 1, el nivel de proteínas del ISICE es intermedio entre el del SICC y el del ISICC, pero no diferente (tabla 5), en el día 2 es más bajo (tabla 6), en el día 3 es intermedio pero no diferente (tabla 7). En el día 4 el contenido de proteínas es semejante entre las 3 regiones (tabla 8).

El SICC tiene más ARN que el ISICC en el día 1 (tabla 5) aunque la diferencia no es significativa, en el día 2 tiene me

nos ARN que el ISICC (tabla 6), la diferencia no es significativa, en el día 3 es semejante al nivel de ARN entre ambas (tabla 7) y en el día 4 tiene menos ARN (tabla 8,  $p < .05$ ). El SICE y el ISICE tienen una cantidad parecida de ARN en el día 1 y la cual es más alta que la del SICC y el ISICC (tabla 5), aunque la diferencia no es significativa. En el día 4 el SICE tiene más ARN que las demás regiones (tabla 8,  $p < .05$ ). en los días 2, 3, y 4 el ISICE tiene un contenido de ARN semejante a la del SICC y a la del ISICC (tablas 6-8).

El nivel de ADN es semejante entre el SICC y el ISICC en el día 1 (tabla 5), en el día 2 hay más ADN en el ISICC (tabla 6), la diferencia no es significativa, en los días 3 y 4 es semejante el nivel de ADN entre las dos regiones (tablas 7 y 8). En el día 1 es semejante el contenido de ADN entre el SICE y el ISICE (tabla 5), la diferencia no es significativa. En el día 4 es semejante el nivel de ADN entre las 4 regiones (tabla 8). En los días 1, 2 y 3 hay más ADN en el ISICE que en el SICE, aunque la diferencia no es significativa (tablas 5-7).

DTNB. En todos los días el SICC estuvo más hidratado que el SICE (tablas 9-12,  $p < .05$ ). El ISICE estuvo más hidratado que el SICE en todos los días, habiendo diferencias significativas en los días 1, 3 y 4 (tablas 9, 11 y 12,  $p < .05$ ). No hay resultados consistentes al comparar el SICE o el ISICE con el SICC y el ISICC debido a que en algunos días el % de hidrata-

ción del SICE se parece al del SICC y en otros días al del - - ISICC, ocurriendo lo mismo con el ISICE.

El cociente PS/PH fué más alto para el SICC que para el - ISICC en todos los días (tablas 9-12) aunque sólo hubo diferen - cias significativas en el día 3 (tabla 11,  $p < .05$ ). Este co - ciente fué más alto para el SICE que para el ISICE en todos - los días (tablas 9-12), habiendo diferencias significativas en los días 3 y 4 (tablas 11 y 12,  $p < .05$ ). En todos los días el cociente PS/PH fué más alto para el SICE que para el ISICE en todos los días (tablas 9-12), habiendo diferencias significati - vas en los días 3 y 4 (tablas 11 y 12,  $p < .05$ ). En todos los días el cociente PS/PH fué más alto para el SICE que para los otros (tablas 9-12,  $p < .05$ ).

El ISICC tiene más proteínas que el SICC en los días 1 y 4 (tablas 9 y 12) en los días 2 y 3 tiene menos proteína que - el SICC (tablas 10 y 11) aunque en ningún caso las diferencias son significativas. Excepto en el día 1 (tabla 9) el ISICE más proteínas que el SICE (tablas 10, 11 y 12) aunque la diferen - cia es significativa en el día 4 (tabla 12,  $p < .05$ ). En los - - días 1, 2, y 3 el SICE tiene menos proteínas que el SICC y el - ISICC, en el día 4, el nivel es semejante (tablas 9-12). No hay diferencias significativas en ningún caso. En el día 1, el - - ISICE tiene menos proteínas que el SICC y el ISICC (tabla 9), - siendo significativa la diferencia ( $p < .05$ ). En el día 2 que -

da intermedio pero no diferente (tabla 10), en el día 3 es más bajo (tabla 11), aunque no hay diferencia significativa y en el día 4 es más alto aunque sólo es diferente del OICC (tabla-12,  $p < .05$ ).

El SICC tiene más ARN que el ISICC en los días 1 y 3 (tablas 10 y 12), tiene menos ARN, en ningún caso hay diferencias significativas. En todos los días el ISICE tiene más ARN que el SICE pero no hay diferencias significativas (tablas 9-12). En el día 1 el SICE tiene menos ARN que el SICC y el ISICC (tabla 9), en el día 2 el contenido es intermedio (tabla 10), en el día 3 es intermedio, siendo diferente y menor que el ISICC (tabla 11,  $p < .05$ ), y en el día 4 es semejante a ambos (tabla 12). El ISICE tiene un nivel de ARN que es intermedio entre los del SICC y el ISICC en los días 1-3 (tablas 9-11), en el día 4 es igual al del ISICC y mayor que el SICC. No hay diferencias significativas en ninguno de los días.

En los días 1, 3 y 4 el ISICC tiene menos ADN que el SICC (tablas 9, 11 y 12), pero no hay diferencias significativas. En el día 2 el contenido es semejante (tabla 10). En los días 1 y 2 hay un nivel semejante de ADN entre el SICE y el ISICE (tablas 9 y 10), en el día 3 hay más ADN en el ISICE (tabla 11) aunque la diferencia no es significativa y en el día 4 (tabla-12,  $p < .05$ ), hay más ADN en el ISICE. En los días 1, 2 y 3 el SICE tiene menos ADN que el SICC y el ISICC (tablas 9-11), y

en el día 4 es semejante al del SICC pero más bajo que el ISICC (tabla 12), no hay diferencias significativas. En los días 1, 2 y 3 el ISICE tiene menos ADN que el SICC y el ISICC (tablas 9- y 10), no hay diferencias significativas, en el día 3 es intermedio pero no diferente (tabla 11), y en el día 4 es más alto aunque sólo hay diferencias significativas con el SICC (tabla 12,  $p < .05$ ).

CORTES HISTOLOGICOS. El estudio con microscopía de luz no revela cambios morfológicos apreciables entre el SICC (foto # 1) y el SICE (foto # 2), lo mismo ocurre entre el ISICC (foto # 3) y el ISICE (foto # 4). La foto # 5 es un acercamiento de un ISICE de una rata tratada con NEM, se puede apreciar que el epitelio se mantiene intacto. Estos resultados fueron semejantes tanto en las ratas tratadas con NEM como en las que recibieron DTNB.

Además se observó que los cuernos uterinos tratados con NEM eran más delgados y pálidos que los cuernos contralaterales. Esto no fue observado en los cuernos tratados con DTNB.

T A B L A 1

NUMERO DE SITIOS DE IMPLANTE (BANDAS AZULES) EN RATAS CON ADMINISTRACION INTRALUMINAL DE 250 mM DE N-ETILMALEIMIDA Y SACRIFICADAS EN EL DIA 5 DE PRENEZ.

DIA DE PRENEZ.	CUERNO CONTROL	CUERNO EXPER.	Nº DE CASOS.	* % DE INHIBICION	x <sup>2</sup>
1	25	2	6	92.80	.001
2	15	0	6	100 %	.001
3	3	0	2	100 %	.001
4	31	7	7	77.41 %	.025
TOTAL	74	9	21	87.83 %	.025

T A B L A 2

NUMERO DE EMBRIONES IMPLANTADOS EN RATAS CON ADMINISTRACION INTRALUMINAL DE 250 mM DE N-ETILMALEIMIDA Y SACRIFICADAS EN EL DIA 8 DE PRENEZ

DIA DE PRENEZ.	CUERNO CONTROL	CUERNO EXPER.	Nº. DE CASOS.	% DE INHIBICION	x <sup>2</sup>
1	17	2	5	88.23%	.001
2	15	1	5	93.33%	.001
3	12	4	4	68.66%	.025
4	23	8	6	65.21%	.025
TOTAL	67	15	20	77.61%	.025

\*% INN. =  $C. CONT. - C EXP = X$ ,  $\frac{X}{C CONT} \times 100 = \% INHIBICION.$

T A B L A 3

NUMERO DE SITIOS DE IMPLANTE (BANDAS AZULES) EN RATAS CON ADMINISTRACION INTRALUMINAL DE 50 mM DE DTNB SACRIFICADAS EN - EL DIA 5 DE PRENEZ.

DIA DE PRENEZ.	CUERNO CONTROL.	CUERNO EXPER.	Nº. DE CASOS.	% DE INHIBICION*	$\chi^2$
1	26	14	5	46.15 %	N.S.
2	25	28	5	0.00 %	N.S.
3	16	16	5	0.00 %	N.S.
4	23	13	7	43.47 %	N.S.
TOTAL.	90	71	22	21.11 %	N.S.

T A B L A 4

DIA DE PRENEZ.	CUERNO CONTROL.	CUERNO EXPER.	Nº. DE CASOS.	% DE INHIBICION*	$\chi^2$
1	20	15	5	25.00 %	N. S.
2	24	15	5	37.50 %	N. S.
3	32	18	6	43.75 %	N. S.
4	37	30	7	18.91 %	N. S.
TOTAL.	118	78	23	30.97 %	N. S.

\* % INH =  $C \text{ CONT.} - C \text{ EXP.} = X \cdot \frac{X}{C \text{ CONT.}} \times 100 = \% \text{ INHIBICION}$



TABLA 5  
N E M DIA 1

	% Hidratación	mg PS/mg PI	mg Prot/mg PS	ug RNA/mg PS	ug DNA/mg PS
S I C C	88.79 ± 5.29 (4)	.1120 ± .052(4)	.1480 ± .4 (4)	1.810 ± .4 (4)	1.402 ± .5 (4)
I S I C C	76.87 ± 12.39 (2)	.2312 ± .123(2)	.0263 ± .002 (2)	1.386 ± .03 (2)	1.487 ± .1 (2)
S I C E	89.36 (1)	.1063 (1)	.0469 (1)	2.240 (1)	2.295 (1)
I S I C E	86.33 ± .068 (2)	.1365 ± .068 (2)	.0720 ± .052 (2)	3.385 ± 2.6 (2)	2.530 ± 1.4 (2)

TABLA 6  
N E M DIA 2

	% Hidratación	mg PS/mg PI	mg Prot/mg PS	ug RNA/mg PS	ug DNA/mg PS
S I C C	91.55 ± 3.40 (2)	.0844 ± .034 (2)	.0550 ± .28 (2)	1.533 ± .20 (2)	1.497 ± .04 (2)
I S I C C	84.00 ± 0.72 (2)	.1599 ± .007 (2)	.0547 ± .014 (2)	1.892 ± .30 (2)	1.894 ± .24 (2)
S I C E	_____	_____	_____	_____	_____
I S I C E	91.08 ± .141 (2)	.0891 ± .001 (2)	.0455 ± .008 (2)	1.559 ± .42 (2)	2.799 ± 1.4 (2)

( ) .- Número de determinaciones hechas.

TABLA 7  
N E M DIA 3

	% Hidratación	mg PS/mg PH	mg Prot/mg PS	ug RNA/mg PS	ug DNA/mg PS
S I C C	87.25 ± 3.15 (3)	.1274 ± .031 (3)	.0849 ± .048 (3)	3.704 ± 2.10 (3)	2.487 ± 1.10 (3)
I S I C C	83.33 ± 12.33 (3)	.1512 ± .122 (3)	.1316 ± .073 (3)	3.555 ± .30 (3)	3.148 ± 1.29 (3)
S I C E	_____	_____	_____	_____	_____
I S I C E	88.09 ± 8.32 (3)	.1799 ± .140 (3)	.1328 ± .093 (3)	3.970 ± 1.00 (3)	4.012 ± 1.70 (3)

TABLA 8  
N E M DIA 4

	% Hidratación	mg PS/mg PH	mg Prot/mg PS	ug RNA/mg PS	ug DNA/mg PS
S I C C	84.83 ± .00 (3)	.1516 ± .000 (3)	.0337 ± .007 (3)	.887 ± .33 (3)	2.664 ± 2.59 (3)
I S I C C	68.52 ± 6.90 (3)	.3148 ± .069 (3)	.0380 ± .005 (3)	1.648 ± .23 (3)	1.895 ± 1.11 (3)
S I C E	75.36 (1)	.2463 (1)	.3444 (1)	9.400 (1)	1.135 (1)
I S I C E	77.60 ± 1.62 (3)	.2235 ± .016 (3)	.0325 ± .005 (3)	.757 ± .47 (3)	1.399 ± .30 (3)

(1).- Número de determinaciones hechas.

TABLA 9  
D T N E DIA 1

	% Hidratación	mg PS/mg PH	mg Prot/mg PS	ug RNA/mg PS	ug DNA/mg PS
S I C C	92.64 ± 0.79 (4)	.0735 ± .007 (4)	.2127 ± .094 (4)	5.867 ± 1.34 (4)	3.532 ± .07 (4)
I S I C C	94.31 ± 1.53 (4)	.0567 ± .015 (4)	.3259 ± .280 (4)	4.382 ± 1.01 (4)	4.216 ± 1.01
S I C E	84.40 ± 6.05 (3)	.1558 ± .074 (3)	.1524 ± .086 (3)	3.780 ± .60 (3)	2.230 ± .43 (3)
I S I C E	91.97 ± 0.87 (3)	.0801 ± .008 (3)	.0790 ± .016 (3)	4.546 ± 1.55 (3)	2.122 ± .48

TABLA 10  
D T N B DIA 2

	% Hidratación	mg PS/mg PH	mg Prot/mg PS	ug RNA/mg PS	ug DNA/mg PS
S I C C	72.08 ± 12.34 (4)	.2798 ± .123 (4)	.6315 ± .691 (4)	1.855 ± .691 (3)	2.939 ± 1.93 (4)
I S I C C	84.11 ± 5.81 (4)	.1587 ± .058 (4)	.3386 ± .158 (4)	3.204 ± 1.51 (4)	2.475 ± 1.05 (4)
S I C E	68.84 ± 12.78 (2)	.3484 ± .155 (2)	.2637 ± .258 (2)	2.154 ± 3.64 (2)	1.081 ± .02 (2)
I S I C E	78.20 ± 2.65 (4)	.2178 ± .026 (4)	.4550 ± .225 (4)	2.780 ± .10 (4)	1.886 ± .84 (4)

( ).- Número de determinaciones hechas.

TABLA 11  
DTNB DIA 3

	% Hidratación	mg PS/mg PH	mg Prot/mg PS	ug RNA/mg PS	ug DNA/mg PS
S I C C	89.39 ± 1.17 (3)	.1059 ± .011 (3)	.1501 ± .091 (3)	5.413 ± 2.40 (3)	2.938 ± .47 (3)
I S I C C	92.92 ± 1.14 (4)	.0707 ± .011 (4)	.1011 ± .038 (3)	4.323 ± 1.76 (4)	4.152 ± 2.63 (4)
S I C E	27.71 ± 9.79 (3)	.9693 ± .350 (3)	.0891 ± .059 (3)	2.272 ± .81 (3)	1.589 ± 1.14 (3)
I S I C E	94.18 ± 2.28 (3)	.0580 ± .022 (3)	.0935 ± .081 (3)	4.326 ± 1.24 (3)	3.355 ± 1.13 (3)

TABLA 12  
DTNB DIA 4

	% Hidratación	mg PS/mg PH	mg Prot/mg PS	ug RNA/mg PS	ug DNA/mg PS
S I C C	82.03 ± 3.52 (3)	.1795 ± .035 (3)	.1039 ± .040 (3)	2.870 ± 3.16 (3)	1.838 ± .82 (3)
I S I C C	89.12 ± 4.15 (4)	.1087 ± .041 (4)	.1762 ± .101 (3)	3.621 ± 1.56 (4)	3.730 ± 1.95 (4)
S I C E	69.75 ± 6.89 (2)	.3023 ± .068 (2)	.1395 ± .014 (2)	3.196 ± 1.17 (2)	1.815 ± 1.06 (2)
I S I C E	94.18 ± 2.28 (3)	.0580 ± .022 (3)	.3366 ± .082 (3)	4.688 ± .80 (3)	5.104 ± 1.67 (3)

( ).- Número de determinaciones hechas.

T A B L A 13

VALORES PROMEDIO DE LOS PARAMETROS. DETERMINADOS (83).

<u>PARAMETROS DETERMINADOS.</u>	<u>SITIO DE IMPLANTE.</u>	<u>INTERSITIO DE IMPLANTE.</u>
mg prot/mg de peso seco.	0.38 ± 0.16 (11)	0.39 ± 0.07 (14)
mg ADN/mg de peso seco.	0.023 ± 0.005 (12)	0.028 ± 0.007 (17)
mg prot/mg ADN.	12.04 ± 6.79 (20)	10.63 ± 6.62 (27)
ug ADH/mg de peso húmedo.	15 ± 9 (24)	21 ± 12 (29)
ug prot/mg de peso húmedo.	144 ± 60 (20)	189 ± 168 (27)
mg p. húmedo/mg p. seco.	7.35 ± 0.71 (11)	6.11 ± 0.86 (15)

( ) = número de experimentos.



FOTO N° 1 (10X).

RATA TRATADA CON NEM.

SITIO DE IMPLANTE.

CUERNO CONTROL (SICC).

- a) *Decidua basalis.*
- b) *Decidua capsularis.*
- c) *Embrión.*



RATA TRATADA CON NEM.

SITIO DE IMPLANTE.

CUERNO EXPERIMENTAL.

- a) *Decidua basalis.*
- b) *Decidua capsularis.*
- c) *Trofoblastos.*



FOTO N<sup>o</sup>. 3 (10X).

INTERSITIO DE IMPLANTE.

CUERNO CONTROL.

RATA TRATADA CON NEM.

- a) Lado antimesometrial,
- b) Mioterio.
- c) Estroma endometrial.
- d) Epitelio endometrial.
- e) Lado mesometrial.
- f) Luz uterina.



FOTO N<sup>o</sup>. 4 (10).

INTERSITIO DE IMPLANTE.

CUERNO EXPERIMENTAL (ISICE).

RATA TRATADA CON NEM.

- a) Lado antimesometrial.
- b) Mioterio.
- c) Estroma endometrial.
- d) Epitelio endometrial.
- e) Lado mesometrial.
- f) Luz uterina.

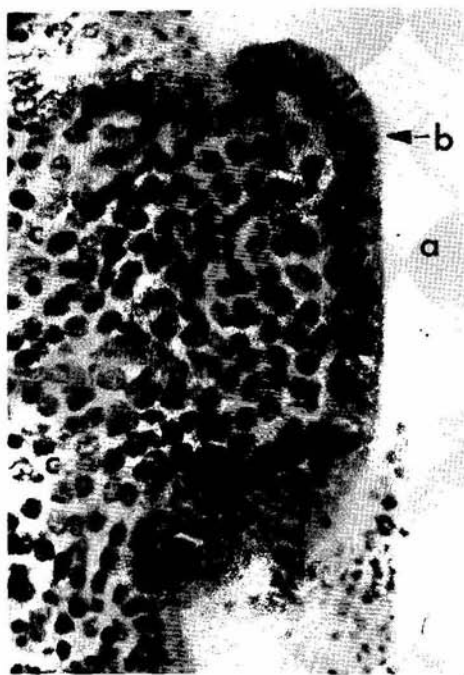


FOTO N<sup>o</sup>. 5 (100X) Intersitio de Implante, Cuerno Experimental (ISICE), Rata tratada con NEM, a) Luz uterina, b) Epitelio en dometrial, c) Estroma endometrial.



## D I S C U S I O N .

El estudio del proceso de la implantación embrionaria es importante no sólo por su interés intrínseco dentro de la Biología de la Reproducción, sino que además en las condiciones actuales de explosión demográfica, plantea una ruta alterna - en la búsqueda de métodos anticonceptivos seguros del control de la natalidad, además de los ya existentes. El mecanismo finamente balanceado que controla la implantación vuelve esta - etapa del desarrollo sumamente atractiva para el ataque anticeptivo

En la unidad de Investigación Biomédica del Centro Nacional -- (IMSS), se estudian varios aspectos de la Biología de la Re--producción, entre ellos está la implantación embrionaria, formando parte de un programa más amplio que tiene por objetivo el desarrollo de nuevos métodos del control de la natalidad. Este trabajo es una continuación de reportes anteriores (3,42) y se deseaba encontrar otro radical o residuo de los grupos - SH de una molécula de la superficie del epitelio endometrial, el cual al ser bloqueado afecta a todo el proceso de la im--plantación.

Hay evidencias muy firmes de que el útero sufre una diferen--ciación progestacional previa a la implantación y la cual es indispensables para que el embrión se implante en sitios espe

eficos del útero (SI). En cualquier otro tiempo que no sea justo en el momento de la implantación, el útero no es un lugar adecuado para el desarrollo embrionario (81). Una de las características de los sitios de implante (SI) son los cambios de polaridad y de composición molecular de la superficie membranal externa de las células del epitelio endometrial (20,42) Un reflejo de la diferenciación progestacional son los cambios en la población de residuos de ácido sídlico y de carbohidratos como el manopiranosil y el glucopiranosil (42).

Si se elimina enzimáticamente el ácido sídlico ó se bloquean los residuos de carbohidratos usando Concanavalina A, la implantación es bloqueada (42).

La observación de las tablas de resultados, y en especial las 4 primeras muestran que los resultados entre NEM y DTNB son generalmente opuestos, ya que la NEM inhibe la implantación en todos los días en que fue aplicada mientras que, en cambio, el DTNB no tuvo un efecto inhibitor, estadísticamente significativo sobre la implantación en cualquiera de los días en que fue aplicado. Esto puede ser explicado tomando en cuenta la facilidad con que ambos reactivos atraviesan la membrana celular y a las condiciones de reacción entre estos últimos y los grupos SH.

Aparentemente la NEM comercial es lo suficientemente pura para muchos propósitos y los contaminantes que pueda tener no reaccionan con los grupos SH. La NEM en estado sólido es muy-

estable, pero en solución acuosa el anillo se hidroliza formando ácido N-etilmaleámico. Esta reacción ocurre a una tasa negligible a pH ácido, pero en solución alcalina hay un incremento de primer orden en la hidrólisis, la cual se incrementa al elevarse el pH de la solución. El % de hidrólisis en 6 horas es aproximadamente como sigue: pH 7-10%, pH 8-60%, pH 9-90%. Las soluciones alcalinas de NEM son lo suficientemente estables para hacer experimentos de corta duración. A pH 7 la tasa de reacción de la NEM con los grupos SH es muy rápida requiriendo un promedio de 2 minutos para llevarse a cabo. La tasa de reacción descende con el pH (1,39,65,79). Se ha demostrado que bajo ciertas condiciones extremas como son el exceso de reactivos y un pH alcalino la NEM reacciona con otros radicales que no son los grupos SH (15,50,71,72,73,79). El imidazol y algunos aminoácidos son N-acilados por la NEM, ésta reacciona con los grupos alfa-amino de los péptidos glicil-alanina (pH 7.7, -25°C 3.2 h.), Val-Leu-Ser-Pro-Ala-Asp-Lis (pH 7.4, 25°C, 3.2h.) del grupo imidazol de la Histidina y de los aminoácidos Leucina y Cisteína (71,72,73). No se sabe si tales acilaciones son de importancia en la reacción de la NEM con proteínas y enzimas, pero es siempre posible que algunos residuos amino o de Histidina pueden hallarse en un estado particularmente reactivo (79).

Para favorecer la especificidad de la NEM hacia los grupos SH la mezcla de reacción debe mantenerse a pH ácido y evitar el -

exceso de reactivos. Bajo estas condiciones la NEM muestra un alto grado de especificidad hacia los grupos SH (72,79).

Los estudios de titulación de enzimas que tienen grupos SH con NEM, han demostrado que esta última sólo se combina con los SH expuestos y no reacciona con los que se hallan sepultados en la cadena peptídica. A veces, este bloqueo de los grupos SH externos no basta para inactivar total o parcialmente a la enzima (1,79).

Sólo hay información superficial acerca de la mayoría de las rutas metabólicas que pueden ser atacadas por la NEM y en ningún caso se han localizado sitios específicos de acción o una enzima en particular. Sobre este hecho se puede mencionar que, en estudios hechos con el Dispositivo Intrauterino liberador de Cobre, indican que, el Cu interfiere con la utilización normal de la glucosa, especialmente a través de la vía de Embden-Meyerhoff.

Debido a que el Cu reacciona con los grupos SH libres, esto sugiere que actúa sobre enzimas dependientes de grupos SH como son la gliceraldehído-3 fosfato deshidrogenasa, la deshidrogenasa láctica y la piruvica (84). Esta información sugiere que estas enzimas también son blanco de la acción de la NEM. Además de la glucólisis, otros sitios posibles de acción de la NEM son la biosíntesis de lípidos y de nucleosidos (79). Se ha de--

mostrado que la melemida, la cual carece del radical etilo -CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub> pero conserva el doble reactivo C=C, es un inhibidor, *in vitro*, de las enzimas del metabolismo de la L-asparagina - (21). También es una fuerte citotoxina *in vitro* para las células L1210, produciendo un alto parcial en la fase G<sub>2</sub> del ciclo celular, reduciendo también la velocidad de progresión a través de las fases del ciclo celular (21).

La NEM a una concentración de 0.0004 mM reduce en un 18% las mitosis en cultivo de fibroblastos de pollo y el efecto se incrementa cuando la concentración se va elevando hasta un máximo de 0.002 mM cuando el efecto se estabiliza aunque suba la concentración de NEM. No se observan anormalidades citológicas apreciables. Cuando se permite que la NEM reaccione con un exceso de glutatión, se pierde la mayor parte de la actividad antimitotica persistiendo algo de actividad residual (79).

Tomando como base lo anterior se puede asumir que la NEM reaccionó básicamente con los grupos SH uterinos debido a que el pH de la luz es ácido, aproximadamente de 6.5 (medido con papel indicador) y no hubo exceso de reactivos (la concentración de la NEM fue casi la misma que la concentración de grupos SH)

También se puede suponer que reaccionó con grupos SH de otras regiones del cuerpo además del útero debido a que su permeabilidad le permitiría alcanzar el torrente circulatorio. Esto po

dría explicar el hecho de que a las ratas tratadas con NEM se les desprendía la piel de la cola con mucha facilidad en el momento de ser desnucadas (la colágena es abundante en grupos SH)

Considerando la actividad antimitótica de la NEM se puede explicar el porque obtuvo un máximo de inhibición en los días 2 y 3 (tabla 1) sobre la aparición de los sitios de implante. En el día 3 hay un pico estrogénico que sensibiliza al útero dominado por la progesterona de manera que este pueda responder más tarde al estímulo deciduizante. La reacción deciduizante comprende la proliferación y diferenciación de las células del estroma endometrial en una masa de células cuboidales que participan en la nutrición embrionaria y dan protección al útero contra la invasión del blastocisto. Es indispensable esta elevación de los niveles de estrógenos en la sangre para que las células estromales alcancen una tasa máxima de divisiones celulares en las 24 horas que siguen al pico estrogénico. Aparentemente estas mitosis son indispensables para que ocurra la reacción deciduizante (81). La progesterona induce la diferenciación de las células estromales del endometrio de una manera asincrónica hasta un estado en el cual son sensibles al estímulo deciduizante. Los estrógenos aumentan la tasa a la que ocurre la diferenciación estromal incrementando el número de células por unidad de área del endometrio que son capaces de responder al estímulo deciduizante del blastocisto, aumentando por lo tanto, la probabilidad de una implantación. En la ausencia de es-

trogenos no hay implantación debido a una falta de densidad - relativa en la población de células sensibles (81). Por un lado la NEM bloquea a los receptores citoplasmáticos a esteroides (44,46) y por otro detiene a las células que han entrado en mi tosis (79). El hecho de que haya habido implantes exitosos (ta bla 2) sugiere que este bloqueo fue temporal, presentandose un retardo en la implantación.

La misma actividad antimitótica de la NEM al detener el progre so de la mitosis sin destruir a las células sugiere que tuvo - un efecto citostático sobre las células endometriales, expli-- cando la ausencia de citólisis.

El hecho de que la NEM pueda atacar los grupos SH citoplásmi-- cos, alterando posiblemente varias rutas metabólicas explica - la aparente incoherencia observada entre las determinaciones - hechas (tabla 5-8) y los resultados previos (3,83).

De todo lo ya expuesto se puede concluir que los resultados ob tenidos con la NEM no son relevantes para el objetivo de este trabajo, fundamentalmente porque sólo interesan los grupos SH de la superficie endometrial y no los de todo el útero y otras regiones del organismo. Los resultados obtenidos con el DTNB - son más definitivos.

El DTNB es un disulfuro aromático y tiene por lo tanto un po--

tencial promedio de oxido-reduccion más alto que sus análogos alifáticos, reacciona con los grupos SH por una reacción de intercambio para formar un disulfuro mixto con la proteína y un molde 2 nitro-5-tiobenzoato por mol de grupo SH proteico. Este anión de nitromercaptobenzoato tiene un intenso color amarillo con un máximo de absorción a 412 nm. La reacción debe llevarse a cabo en un medio alcalino para desarrollar un máximo de color (pH 8) (26,40).

Sin embargo, no es indispensable que el medio sea alcalino para que se lleve a cabo la reacción, el desarrollo de color es importante unicamente cuando se hacen determinaciones espectrofotométricas. Hay evidencias experimentales muy firmes de que el DTNB no atraviesa fácilmente la membrana plasmática de las células beta del páncreas ni la membrana mitocondrial del hígado de rata (9,42). Es importante hacer notar que el DTNB sólo ataca a los grupos SH que se hallan en la periferia de las moléculas y que no afecta a los que se hallan ocultos (40).

Se puede asumir que es muy alta la probabilidad de que el DTNB reaccione con los grupos SH de la superficie del epitelio endometrial. Sin embargo, esto no tuvo efecto sobre la aparición de las bandas azules ni sobre la implantación (tablas 3 y 4). Esto permite suponer que los SH que en el sitio de implante no son indispensables en el proceso de adhesión del blastocisto.



El resultado de que el SICC este menos hidratado que el ISICC en todos los días (tablas 9-12), lo cual esta en contradicción con los resultados previos (3,83), lo cual hace suponer que hubo un error experimental que se repitió constantemente. Si esta inversión en el % de humedad fuera un efecto del DTNB la implantación hubiera sido afectada sensiblemente, lo cual no ocurrió. En el día 5, el sitio de implante se vuelve más turgente que el resto del útero debido a que se presenta un aumento en la permeabilidad de los vasos sanguíneos del estroma endome---trial (53). Con los datos existentes hasta la fecha no es posible suponer que se pueda cambiar el fenómeno de hiperpermeabilidad vascular al ISICC y que de todas maneras el embrión se -implante.

Sin embargo, el hecho de que los restantes parámetros bioquímicos no tengan punto de comparación entre los diferentes días y con la formación preexistente (3,83), hace suponer que el DTNB si llegó a penetrar a las células endometriales y que produjo algunos desajustes, los cuales pudieron ser corregidos por el organismo (tablas 9-12).

Es evidente de la observación de los cortes histológicos, que - el DTNB no fué citolítico para las células endometriales, debido probablemente a su escasa permeabilidad.

C O N C L U S I O N E S .

A).- El bloqueo de los grupos SH de la superficie membranál ute  
rrina no tiene efecto sobre la implantación del blastocisto, sien  
do esto una evidencia de que no tienen una participación muy ac  
tiva en la implantación del embrión.

B).- Hay una relación directa entre la reacción azul y la im -  
plantación, al desaparecer la reacción azul no hay implantación

C).- La NEM y el DTNB afectan el metabolismo de las células ute  
rinas, reflejándose este hecho en la ausencia de un esquema - -  
constante de los 4 parámetros bioquímicos estudiados, al compa-  
rarlos entre sí mismos como con la información previa.

D).- A las concentraciones usadas la NEM y el DTNB no son lo su  
ficientemente tóxicos para lisar a las células endometriales.

B I B L I O G R A F I A.

- 1.- Alexander N H (1958). Spectrophotometric assay for sulfhydryl groups using N-ethylmaleimide. Anal Chem 30: 1292-1293
- 2.- Backstrom S. (1959). Studies on sulfhydryl containing substances in sea urchin embryos of various developmental trends. Exp Cell Res 16: 165-173
- 3.- Baiza L A (1980). Concentración de grupos SH en el útero de rata durante el ciclo estral. Tesis profesional ENEP Iztacala.
- 4.- Baker PF, Conelly CH (1966). Some properties of the external activation site of the Na<sup>+</sup> pump in crab nerve. J Physiol 185: 270-294
- 5.- Barr M. Jensch R P. Brent R L (1970). Prenatal growth in the albino rat: effect of number intrauterine position and resorptions. Amer Anat 128: 413-428
- 6.- Barth L J (1956). Selective inhibition of cleavage in different regions of the frog eye by sulfhydryl inhibitors. J Embryol Exper Morph 4: 73-92

- 7.- Batt R L Abbot R E Schachter D (1976). Impermeant maleimide II. Identification of a hexofacial component of the human erythrocyte hexose transport mechanism. *J Biol Chem* - 251: 7184-7190
- 8.- Benesch R Benesch R E (1962). Determination of SH groups in proteins. *Meth Biochem Anal* 10: 43-70
- 9.- Bennet J P Vickery B H (1970). Rats and mice. En reproduction and Breeding Techniques for Laboratory Animals p.199-315. Editado por E S E Hafes.
- 10.- Bernal A Mendez J D Rosado A (1981). Determinación rápida del peso seco por colorimetría. *Arch Invest Med* 12: 83-88
- 11.- Bide R W Myers D K (1967). Effect of thiol masking agents on the stromata of rat erythrocytes. *Can J Biochem* - - - 45: 19-29
- 12.- Brachet J (1958). Thiol groups in morphogenesis. *Nature* - 181: 1736-1737
- 13.- Brachet J Delange-Cornil M (1959). Recherches sur le rôle des groupes sulfhydryles dans la morphogenese. *Develop Biol* 1: 79-100

- 14.- Brachet J (1959). The role of sulphhydryl groups in morphogenesis. *J Exper Zool* 142: 115-139
- 15.- Brewer CF Rhien J P (1967). Evidence for possible nonspecific reactions between N-ethylmaleimide and proteins. - *Anal Biochem* 18: 248-255
- 16.- Buchanan D (1974). Asymmetrical distribution of implantation sites in the rat uterus. *Biol Reprod* 11: 611-618
- 17.- Calvin H, Yu C C, Bedford J M (1973). Effect of epididymal maturation Zinc (II) and Copper (II) on the reactive sulphhydryl content of structural elements in rat spermatozoa. *Esper Cell Res* 81: 333-341
- 18.- Calvin H, Bleau G (1974). Zinc-thiol complexes in keratin like structures in rat spermatozoa. *Esper Cell Res* - - - 86: 280-284
- 19.- Cole D R, Stein W H, Moore S (1958). . On the cysteine content of human haemoglobin. *J Biol Chem* 233: 1359-1363.
- 20.- Collado M L, Gil Recasens M E, Castro Osuna G (1978). Nuevos conceptos relacionados con la implantación I. Periodo de preimplantación. *Ginec Obstet (Mex)* 44: 211-221

- 21.- Cooney D A, M Lman H A, Cable R G, Dion R L, Bono B H - - (1978). Maleimide biochemical pharmacological and toxicological studies. Interaction with L-asparagin metabolism. *Biochem Pharmacol* 27: 151-166
- 22.- De Marco C, Graziani M T, Mosti R (1966). Spectrophotometric determination of thiols and disulfides with N-ethylmaleimide. *Anal Biochem* 15: 40-44
- 23.- De Feo V (1967). Decidualization. En *Cellular Biology of the Uterus* p. 191-284 Editado por R M Wynn. Meredith Pub Co.
- 24.- Dunean R C, Knapp R, Miller C (1978). *Bioestadística*. Ed. Interamericana. Primera edición, 165 páginas.
- 25.- Ellis R J (1968). The use of N-ethylmaleimide in stabilizing and measuring inorganic sulphur compounds. *Biochem J*, 110-43 p.
- 26.- Ellman G L (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys*, 82: 70-77
- 27.- Freedman R (1977). How many enzymes are responsables for several cellular processes involving thiol protein-disulfides interchanges. *FEBS Letters*, 97: 201-210

- 28.- Frese R, Groschel-Stewart U (1972). On the stability of *n*-ethylmaleimide alkylated sulfhydryl groups. *Experientia*, 28: 1013-1015
- 29.- Gaudemer Y, Latruffe N (1975). Evidence for penetrant and non penetrant thiol reagents and their use in the location of rat liver mitochondrial D(-)-B-hydroxybutirate de hydrogenase. *FEBS letters*, 54: 30-34
- 30.- George J, Rao V (1975). The role of sulfhydryl groups in cellular adhesiveness. *J Cell Physiol*, 85: 457-555
- 31.- Gil M E, Collado M L, Hicks J J (1978). Nuevos conceptos relacionados con la implantación II. Reacción decidual. *Ginec Obstet (Méx)*, 44: 211-221
- 32.- Gil M E, Collado M L, Hicks J J (1978). Nuevos conceptos relacionados con la implantación III. Características bioquímicas. *Ginec Obstet (Méx)* 44: 491-506
- 33.- Giles K W, Myers H (1966). An improved diphenylamine method for the estimation of deoxiribonucleic acid. *Nature*, 206: 93
- 34.- Gomori G (1955). Preparation of buffers for use in enzyme studies. En *methods in Enzimology*, 1: 140. Editado por Colowick C P y Kaplan N O. Academic Press.

- 35.- Granberg J, Ballard P (1973). The role of sulfhydryl groups in the binding of glucocorticoids by cytoplasmic receptors on lung and other mammalian tissues. *Endocrinology*, 100: 1160-1168
- 36.- Green F C (1967). Erythrocyte membrane sulfhydryl groups and Rh antigenic activity. *Immunochem*, 4: 247-257
- 37.- Gregory J D (1955). The stability of N-ethylmaleimide and its reaction with sulfhydryl groups. *J Amer Chem Soc*, 77: 3922-3923
- 38.- Grinell F (1971). Inhibition of cellular adhesiveness by sulfhydryl blocking agents. *J Cell Physiol*, 78: 153-158
- 39.- Gori G, Martic P A, Doughty G (1966). Kinetics of the reaction of N-ethylmaleimide with cysteine and some congeners. *Arch Biochem*, 115: 593-597
- 40.- Habeeb A F S A (1966). Reaction of protein sulfhydryl groups with Ellman's reagent. *En Methods in Enzymology*, 25: 457-464. Editado por Colowick C Py Kaplan N O. Academic Press.
- 41.- Hellman B, Idal L A, Lernmark A, Sehlin J, Talhedal I B (1973). Role of thiol groups in insulin release: Studies with poorly penetrating disulfides. *Mol Pharmacol*, 9: 792-801



- 42.- Hicks J J, Guzman-Gonzalez A M (1979). Inhibition of implantation by intraluminal administration of Concanavalin A in mice. *Contraception*, 20: 129-136
- 43.- Issacs J, Binkley F (1977). Cyclic-AMP dependent control of the rat hepatic glutathion disulfide sulfhydryl ratio. *Biochem Biophys Acta*, 498: 29-38
- 44.- Jensen E V (1967). Sulfhydryl groups and estradiol receptors interactions. *Science*, 158: 385-387
- 45.- Karlin A (1973). Molecular interactions of the acetylcholine receptor. *Fed Proc*, 32: 1847-1853
- 46.- Kather H (1976). Membrane SH groups related to drenaline action in rat adipocytes: A comparative study using sulfhydryl reagents of different molecular size. *Naunin Schmiedbergers Arch Pharmacol*, 292: 177-182
- 47.- Klinek M (1970). Is radiosensitivation of tumour cells by N-ethylmaleimide caused by its ability to bind non-protein SH groups in the cells. *Neoplasm*, 17: 209-212
- 48.- Knock F (1979). Selected sulfhydryl inhibithors capable of inducing immunity against cancer in mice. *Oncology*, 36: 197-201

- 49.- Lehniger A L (1975). *Biochemistry*, e ed. Worth Pub Co.
- 50.- Leslie J, Williams D L, Gorin G (1962). *DEtermination of mercapto groups in proteins with N-ethylmaleimide.* - *Anal Biochem*, 3: 257-263
- 51.- Li T K (1975). *The glutathion and thiol content of mammalian spermatozoa and seminal plasma.* *Biol Reprod.* - - 12: 641-646
- 52.- Lin R J S, Sohjeide A (1969). *Micro estimation of RNA by the cupric ion catalized orcinol reaction.* *Anal Biochem*, 27: 473-483
- 53.- Ljungkvisst S, Nilsson O (1974). *Blastocyst endometrial contact and pontamine blue reaction during normal im- - plantation in the rat.* *Endocrinology*, 60: 142-154
- 54.- Lwry O H, Rosebrough N J, Farr L A, Randall R J (1951). *Protein measurement with the folin phenol reagent.* *J Biol Chem.* 193: 265-275
- 55.- *Manual of Histological Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology.* Editado por Luna L G. - 1968, Mc Grow Hill.

- 56.- Marquis J K, Mautner H G (1974). The binding of thiol reagents to axonal membranes: Effect of electrical stimulation. *Biochem Biophys Res Comm*, 57: 154-161
- 57.- Martin P J, Schild H O (1965). The antagonism of disulphide polipeptides by thiols. *British J Pharmacol*, - - 25: 418-431
- 58.- Mercado E, Carvajal G, Reyes A, Rosado A (1976). Sulphydril groups in the spermatozoa membrane: A study with a new fluorescent probe for SH groups. *Biol Reprod*, - - - 14: 632-640
- 59.- Motais R, Sold F (1973). Characteristics of a sulphydril group essential for sodium exchange diffusion in beef erythrocytes. *J Physiol*, 233: 423-438
- 60.- Munro H N (1966). The determination of nucleic acids. *Methods Biochem Anal*, 15: 113-176
- 61.- Neering J P, Glover W E (1979). The role of sulphydril groups in contraction of vascular smooth muscle. *J Pharmacol Exper Ther*. 208: 335-340
- 62.- Ohmiya J, Naki K (1977). Relationships between inhibitors of membrane SH groups and haemolysis induced by SH inhibitors *Jpn J Pharmacol*, 27: 595-599

- 63.- Reyes A. Mercado E. Rosado A (1974). Participación de grupos SH en la estructura y fisiología del espermatozoide humano. En *Perfiles de la Bioquímica en México* Pags. 263-279. Editado por Mora J. Estrada S. Martuschelli J. U N A M .
- 64.- Reyes A. Mercado E. Goicohea B. Rosado A (1976). Participation of membrane sulphydril groups in the epididymal maturation of human and rabbit spermatozoa. *Fert Steril.* 27: 1452-1458
- 65.- Roberts R. Rouser G (1958). Spectrophotometric assay for reaction of N<sub>2</sub> ethylmaleimide with sulphydril groups. *Anal Chem.* 30: 1291-1292
- 66.- Rosado A, Velazquez A. Lara-Ricalde R (1973). Cell polarography II. Effect of neuraminidase and fluid follicular upon the surface characteristics of human spermatozoa. *Fert Steril.* 88: 349-354
- 67.- Schoot B (1978). Studies on (Na-K)-activated ATPase - - XLII. Evidence for two classes of essential sulphydril groups. *Biochem Biophys acta.* 522: 602-613
- 68.- Simón B. Kather H (1975). PCMB-Dextran T-10. A useful tool in evaluating the functional importance of superficial SH groups in rat adipocytes. *Agents Actions,* 5: 125-127

- 69.- Sippel T O (1969). New colored maleimides for the demonstration of bound sulfhydryles. *J Histochem Cytochem*, 17: 428-430
- 70.- Sherman M. Atienza-Samols S (1978). In vitro studies on the surface adhesiveness of mouse blastocyst. En *Human Fertilization*. Editado por Ludwig H. Tauber P. George - Thiems Pub.
- 71.- Smith D G. Nagamatsu A. Fruton J S (1960). Some reactions of N-ethylmaleimide, *J Amer Chem Soc.* 82: 4600-4604
- 72.- Smyth D G. Blumenfeld O O. Konigsberg W (1964). Reactions of N-ethylmaleimide with peptids and aminoacids. *Biochem J.* 91: 589-595
- 73.- Smyth D G. Tupy H (1968). Acylation reactions with cyclic amides. *Biochem Biophys Acta.* 168: 173-180
- 74.- Sutherland R M. Rothstein A. Weed R I (1967). Erythrocyte membrane sulfhydryl groups and cation permeability. *J Cell Physiol*, 69: 185-198
- 75.- Twarog M (1977). Serotonin and dopamin as neurotransmitters in Mytilus: Block of serotonin receptors by an organic mercurial. *J Pharmacol Exper Ther.* 201: 530-536

- 76.- Vanstevenick J, Weed R J, Rothstein A (1965). Localization of erythrocyte membrane sulfhydryl essential group for glucose transport. *J Gen Physiol.* 48: 617-632
- 77.- Venkinson E (1977). The *in vitro* blastocyst outgrowth - as a model for the analysis of periimplantation development. *En Development in Mammals*, p. 151-172. Ed por - - Jhonson M. North Huzcand Pub.
- 78.- Wimsatt W A (1979). Reproductive asymmetry and unilateral pregnancy in Chiroptera. *J Reprod Fert.* 56: 345-357
- 79.- Webb J L (1966). Enzyme and metabolic inhibitors. Vol 3 p. 337-365
- 80.- Wolfson N (1966). Determination of sulfhydryl groups on the surface of living embryos of the sea urchin Paracentrotus lividus. *C R Soc Biol (Paris)*. 160: 196-199
- 81.- Yochim J M (1975). Development of the profestational uterus: Metabolic aspects. *Biol Reprod.* 12: 106-133
- 82.- Young-lai E V, Pan CC, Bharami BR. (1981). Asymmetric distribution of male and female fetuses in the pregnant rabbit uterus *Experientia*, 37: 690-691

- 83.- Vilar-Rojas C. Castro-Osuna G. Hicks JJ. (1982). Cyclic AMP and cyclic GMP in the implantation site of the rat. *Int er J Fert.* 27: 56-59
- 84.- Hicks J J. Hernández-Pérez O, Aznar R, Méndez J D, Rosado A (1975). Effect of intrauterine copper on the nucleic acids, polysome pattern and glycoprotein composition of the human endometrium . *Amer J Obstet Gynecol*, 121: 981-986