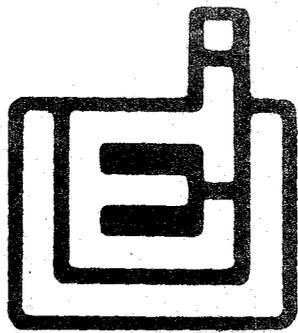


720547

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
IZTACALA**



**CONCENTRACION DE GRUPOS SH EN UTERO
DE RATA DURANTE EL CICLO ESTRAL.**

*BO 64/80 Ep. 2
Biología*

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**

LUIS ARTURO BAIZA GUTMAN

San Juan Iztacala, México

1980



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ESTE TRABAJO FUE DESARROLLADO EN
LA SECCION DE ENDOCRINOLOGIA MO-
LECULAR DE LA DIVISION DE BIOLO-
GIA DE LA REPRODUCCION, UNIDAD
DE INVESTIGACION BIOMEDICA, CEN-
TRO MEDICO NACIONAL, BAJO LA DI-
RECCION DEL DR. JUAN JOSE HICKS.

A mi Madre.

A mi Padre.

A mi tío Abraham.

A mi tía Esther.

A Mamá Mili.

A mis hermanos.

I N D I C E

	PAG.
I. INTRODUCCION	1
II. OBJETIVO	16
III. MATERIAL Y METODOS	17
IV. RESULTADOS	22
V. DISCUSION	25
VI. CONCLUSION	32
VII. RESUMEN	34
VIII. BIBLIOGRAFIA	36

I. INTRODUCCION.

En los organismos vivíparos el hecho central del establecimiento de una conexión materno-embrionaria implica una serie de adaptaciones en los mecanismos reproductivos, unas tendientes a asegurar la fecundación, otras para el mantenimiento del desarrollo embrionario. Incluyendo los cambios uterinos e implantación, proceso biológico íntimamente relacionado con las características de los ciclos sexuales en las distintas especies de mamíferos.

Ciclos sexuales y Ciclo estral.

Durante los ciclos sexuales ocurren variaciones periódicas: ováricas, uterinas, vaginales y conductuales, integradas por cambios hormonales que aseguran así las condiciones óptimas para la fertilización, implantación y desarrollo (1).

Estos cambios implican varias etapas (1,2,3):

- a) Una de preparación activa, en que ocurre la maduración folicular y ovular, así como la proliferación del endometrio.

- b) Un período de máxima efectividad reproductiva -

acompañado de la ovulación y conducta de apareo

- c) Un período de preparación uterina para la recepción del embrión.
- d) Otro de regresión de las estructuras diferenciadas cuando la preñez no ocurre (regresión del cuerpo lúteo y resorción o desprendimiento endometrial).

Los ciclos sexuales se pueden dividir en estrales y menstruales, caracterizándose el primero por un período corto de calor o conducta sexual intensa, el segundo, por la formación de arterias espirales en la capa funcional del endometrio y desprendimiento endometrial acompañado de sangrado. La rata presenta un ciclo estral, el cual consta de 4 fases: proestro, estro, metaestro y diestro.

En la figura 1 correlacionamos los distintos cambios que ocurren durante el ciclo estral en rata, puede notarse que existe una coordinación entre los distintos eventos la cual es debida a un intrincado control hormonal en que intervienen:

- a) El hipotálamo: Coordinando la reproducción con los factores ambientales a través de las hormonas hipotalámicas que regulan la actividad hipofisiaria (1,2,3).

- b) El lóbulo anterior de la hipófisis: A través de las hormonas gonadotróficas, actúa sobre el ovario estimulando mediante la hormona foliculo estimulante (HFE) al desarrollo folicular y producción de estrógenos; a través de la hormona luteinizante (HL) la ovulación y desarrollo del cuerpo lúteo y por medio de la prolactina (HLT) el mantenimiento del cuerpo lúteo y producción de progesterona (1,2,3,4).
- c) El ovario: Mediante la producción de estrógenos y progesterona actúa sobre útero y vagina, induciendo los estrógenos (17β estradiol, estrona, etc), la proliferación del endometrio y cornificación vaginal y la progesterona actuando en el mantenimiento del endometrio secretor y cambios preparativos para la gestación (aumento del suplemento sanguíneo endometrial, etc) actúan ambas por otro lado a nivel de hipotálamo-hipófisis en un mecanismo de retroalimentación; la progesterona inhibiendo la producción de HL, los estrógenos estimulando la producción de HL y a alta concentración inhibiendo la producción de HFE (1,2,3,4).

Las concentraciones hormonales durante el ciclo estral en la rata las podemos apreciar en la Figura 2 (4).

Es de notar que en el ciclo estral el tiempo de la ovulación está sincronizado al estro (estado de acep

Figura 1.-El ciclo estral y su regulación.

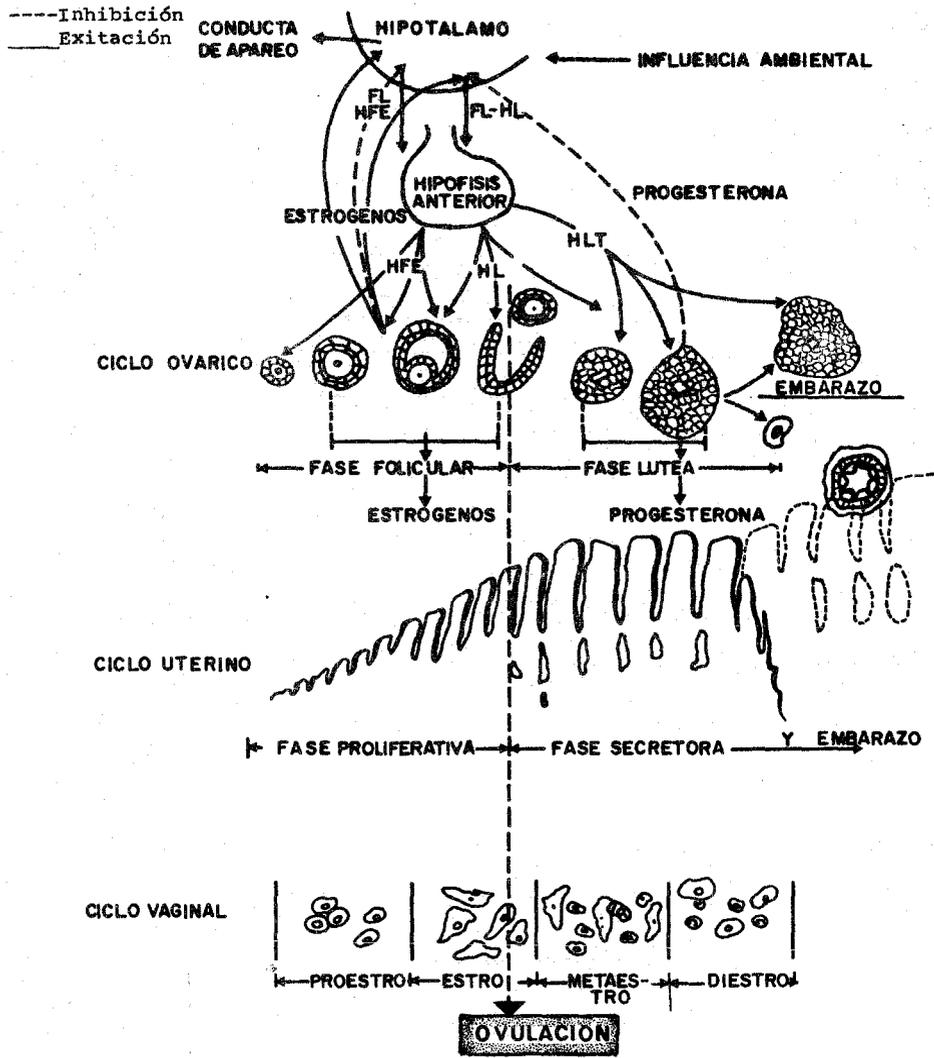
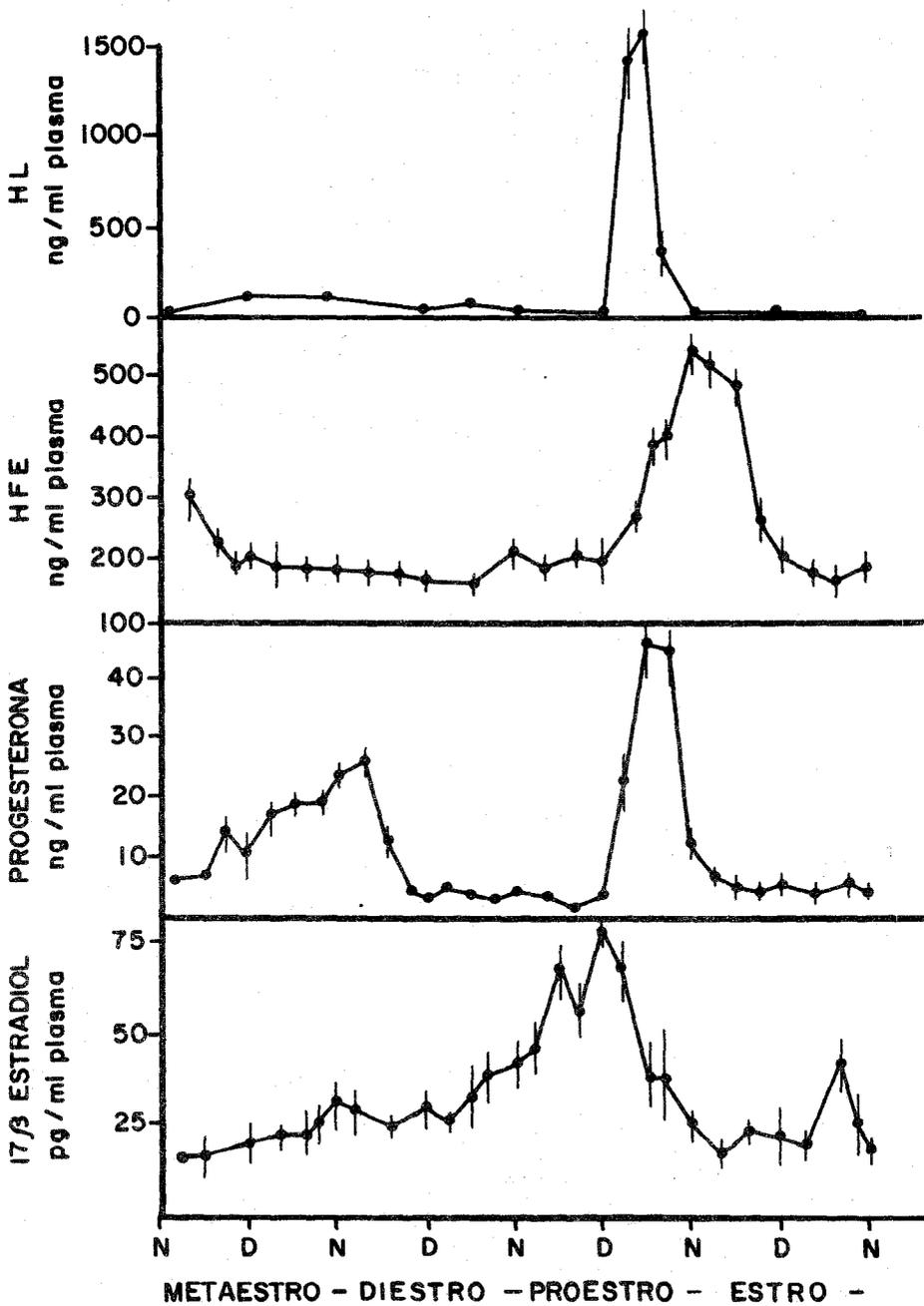


Figura 2.- Concentraciones hormonales durante el ciclo estrol de la rata (4).



N - Media noche
D - Medio día

tación al macho) para asegurar que el espermatozoide y el óvulo tengan más probabilidad de encuentro y se asegure mayor eficacia reproductiva (1) y que el endometrio uterino sea reparado durante el proestro y el estro bajo la influencia estrogénica, experimentando proliferación celular activa y crecimiento de glándulas uterinas. Durante el metaestro bajo la acción de la progesterona - principalmente, aumenta su irrigación y es preparado para responder a los estímulos conducentes a la implantación, asimismo, para nutrir al embrión (1,2). Si no ocurre embarazo el endometrio experimenta resorción y se inicia un nuevo ciclo.

Ovulación, fertilización e implantación.

La descarga del óvulo del folículo de Graff es conocida como ovulación (1,2) cuando esto ocurre el resto del folículo origina al cuerpo lúteo, el cual produce progesterona y estrógenos (1,2,3).

El óvulo expulsado va acompañado de células foliculares que lo rodean (corona radiada), es entonces transportado a través del oviducto donde ocurre la fertilización, el huevo fertilizado sigue su viaje a través del oviducto experimentando segmentación, hasta el estado de mórula, este transcurso tarda por lo general de 3 a 4 días post-fertilización, al entrar la mórula al útero, se convierte en blastocisto por la formación de la cavidad del blastocele y diferenciación de su masa celular en macizo celular internoyotrofoblasto (2,5). Poste -

riormente los blastocistos se distribuyen a través de la luz uterina principalmente por mecanismos de contracción muscular uterina (6), iniciándose una serie de interacciones blastocisto-útero que concluyen con la implantación - (5,6).

Se define la implantación como la adopción de una posición fija del blastocisto al endometrio debida a su mutua interacción (6,8), durante este proceso podemos distinguir varias etapas (Figura 3) (6,11):

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 embrionario del blastocisto se dirige hacia la superficie antimesometrial del endometrio (5,6).

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, puede ocurrir por diversos mecanismos a saber:

- a) Por envolvimiento: Por hinchamiento el endometrio uterino rodea al blastocisto (rata, ratón) estableciéndose el contacto del trofoblasto con células del epitelio uterino (reacción de ataque epitelial) (5,6)

- b) Por expansión: El blastocisto incrementa - en volumen llenando la luz uterina (conejo, carnívoros, algunos monos) (5,11).
- c) Por acercamiento activo: Del blastocisto a la mucosa uterina (cuyo, chimpancé, hombre) (5).

Durante este proceso ocurre la interdigitación de las microvellosidades del trofoblasto y epitelio luminal (5,11). En el endometrio aumenta la permeabilidad sanguínea 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) (12,13) éstos se extravasan también permitiendo diferenciar las zonas de implantación del resto del útero (Reacción Azul (11,12,13)). Se inicia con esto la reacción decidual.

3. Adhesión: Se establece una unión trofoblasto-epitelio endometrial resistente a la ruptura física (6) con el establecimiento de desmosomas, e interacción estrecha entre las superficies membranales, son importantes en este proceso: los cambios de carga en la membrana, así como grupos activos (SH, COOH, NH₂, etc) y compuestos (ácidos siálicos, etc) de superficie (9,11,15,16).

4. Penetración: El blastocisto penetra a través del epitelio uterino por diversos mecanismos :

fagocitosis, desplazamiento mecánico o actividad enzimática (9,11,18), en el conejo ocurre fusión de las membranas del trofoblasto y células epiteliales (11); el grado de penetración del endometrio varía según el tipo de implantación (15,18).

La implantación implica una serie de fenómenos los cuales requieren una estricta sincronía entre los eventos embrionarios y uterinos (5), 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 rata y ratón se requieren estrógenos para el inicio de la ovoimplantación (5,19), ocurriendo una elevación de los niveles estrogénicos en la tarde del día 3 de preñez (19,20) (Fig. 4).

Reacción decidual.

El blastocisto inicia la serie de interacciones con el endometrio al lanzar el estímulo decidualizante; ya sea por la secreción de sustancias inductoras, estrógenos, CO_2 producto de la respiración o estimulación mecánica del endometrio durante los ciclos sucesivos de expansión-contracción que experimente durante el 4° día de preñez (5,14), la reacción decidual comprende la diferenciación de las células del estroma endometrial en una masa de células cuboidales que participan en la nutrición embrionaria y protección del útero a la invasión

del blastocisto (6,14). Intervienen en modo importante: la acción de la progesterona que desvía el efecto mitogénico de los estrógenos de las células epiteliales a las células estromales (5,14), el epitelio luminal como intermediario indispensable entre el blastocisto y las células estromales, la respuesta en permeabilidad vascular endometrial pues si es bloqueada no hay reacción decidual, algunas sustancias como la histamina y AMPc, etc (5,14,20) - (Fig. 5).

Cambios en las zonas de implantación.

Los cambios uterinos experimentados durante la implantación son más marcados en las zonas diferenciadas para ello (determinada previamente en la rata, como se manifiesta en la respuesta en permeabilidad ya mencionada) que en el resto del útero (5,8,11,20), estos cambios están relacionados ya sea con la respuesta decidual experimentados por las células del estroma (5,8,14,20) o con cambios que permiten el contacto y adhesión blastocisto-epitelio luminal sufridos por el epitelio uterino (8,15). En los cuadros I y II, se comparan algunos cambios bioquímicos entre el sitio de implantación y el resto del útero relacionados principalmente con la reacción decidual.

Para la interacción blastocisto-epitelio endometrial son importantes: cambios en polaridad y carga membranaral (16,17), flujo iónico (17), contenido de ácido siálico (21,22), actividad de neuraminidasa (21) y glicoproteínas de superficie (11,36). Ya sea porque participen en

Figura 3.- El proceso de la implantación.

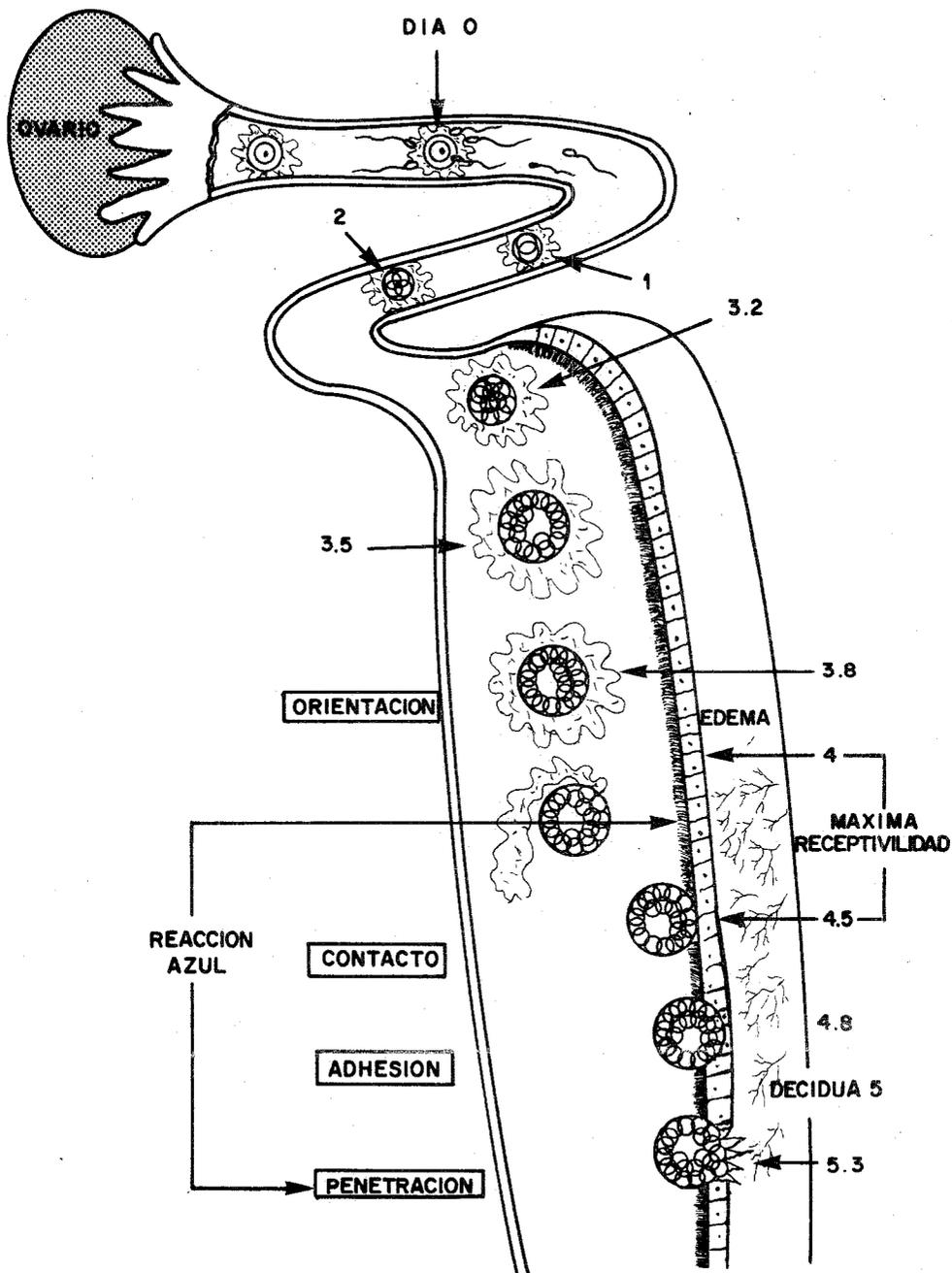
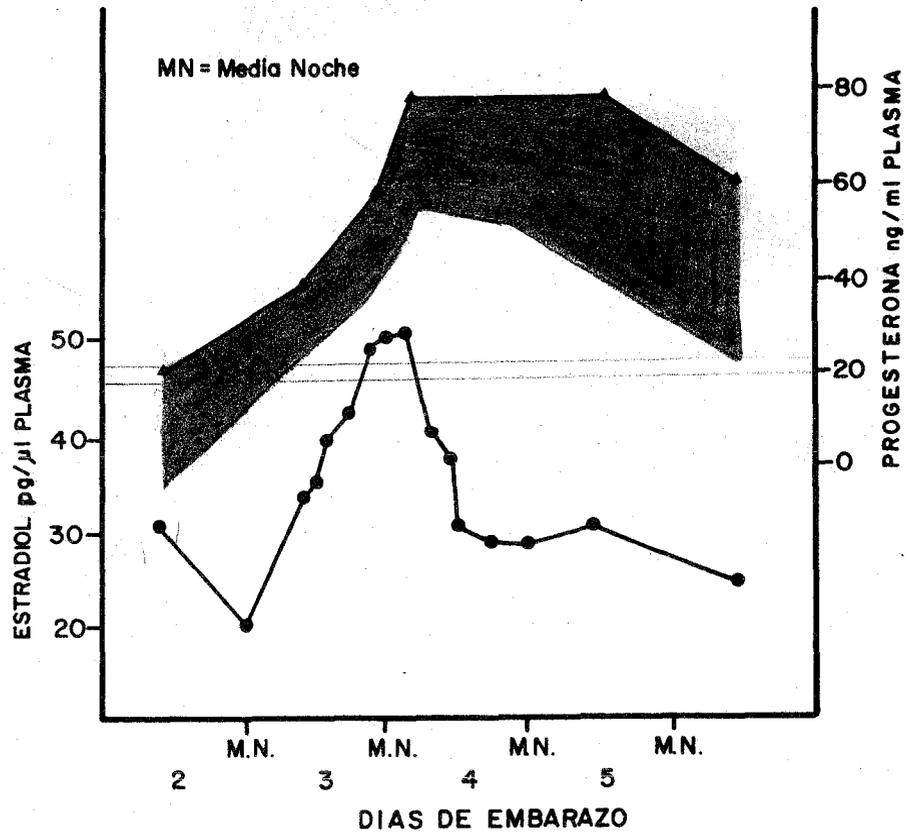


Figura 4.- Niveles plasmáticos de 17 estradiol (●) y progesterona (▲) durante los primeros días de embarazo en la rata (20).



CUADRO I

METABOLITOS Y MACROMOLECULAS QUE SE INCREMENTAN EN
EL SITIO DE IMPLANTACION (11,47)

	ESPECIE	CAUSA PROBABLE
I. MACROMOLECULAS		
DNA (20)	Rata	Aumento en el ritmo mitotico
RNA (20)	Rata	Aumento en la síntesis proteica
PROTEINAS (blastocina) (46)	Rata	Inducción de síntesis proteica por hormonas
II METABOLITOS		
Acido láctico (20)	Rata-ratón	Aumento en la glucólisis
Triacilgliceroles(47)	Ratón	Aumento en la síntesis de triacil gliceroles
AMPc (20)	Rata	Como mediador hormonal
ATP (20)	Rata	Aumento en la demanda energética.

CUADRO II

CARACTERISTICAS DEL SITIO DE IMPLANTACION
ACTIVIDADES ENZIMATICAS (11)

ENZIMAS ESTUDIADAS	SITIO DE IMPLANTACION	RESTO DEL ENDOMETRIO	ESPECIE	REFERENCIA
I. Glicólisis				
Fosfofructocinasa	↑	↓ día 6	Rata	20
Piruvato cinasa	↑	↓ día 6	Rata	20
Deshidrogenasa láctica total	↑		Rata	49
Deshidrogenasa láctica H ₄ y H ₅	↑		Rata	49
II. Ciclo del Krebs				
Isocítrico deshidrogenasa	↓	↑ no cambia d.7-9	Rata	49,51
Deshidrogenasa málica	Variable	Variable	Rata	48
Deshidrogenasa succínica	↑		Ratón	49
III. Ciclo de las pentosas				
G-Fosfogluconato deshidrogenasa	↑	no cambia d.7-9	Rata	20,51
IV. Enzimas proteolíticas				
Catepsina D	↓	(50%)	Rata	51
Catepsina ácida	↓	no cambia d.6-7	Rata	51
V. Diversos				
β-glucoronidasa	No cambia	no cambia	Rata	51
Fosfatasa ácida	↑	↑ día 7	Rata	51
Fosfatasa alcalina	↑	no cambia d. 7	Rata	51
Glicerofosfato deshidrogenasa.	↑	↑	Rata-ratón	49
Ornitina descarboxilasa	↑	día 6 ↓	Rata-ratón	51
Lípasa-esterasa	↑		Rata-ratón	47

el reconocimiento o enlace blastocisto-endometrio, en los mecanismos de adhesión celular o en los cambios de polaridad y carga membranal que permiten el acercamiento del blastocisto.

Los grupos SH podrían jugar un papel importante en los mecanismos de reconocimiento y adhesión celular como ha sido previamente demostrado para diversos procesos biológicos (23,24,27,33). A continuación analizaremos algunas características de los grupos SH así como algunos procesos biológicos en los que la participación de los grupos SH ha sido considerada como fundamental.

Los grupos SH y su participación fisiológica.

Los grupos SH se encuentran asociados a proteínas o no (Cuadro III). En forma no proteica los encontramos principalmente en la cisteína, glutatión (γ -glutamil cisteinilglicina) y homocisteína, y en forma proteica entra como componente de la cisteína siendo importante en el establecimiento y mantenimiento de la conformación de las proteínas (33) en las cuales es importante su propiedad de oxidarse y formar puentes disulfuro.

El grupo SH es polar, no cargado, ligeramente ácido y a pH 7 se encuentra poco ionizado (8%) siendo altamente reactivo y fácilmente oxidable, reacciona fácilmente con iones metálicos Ag^{++} Hg^{++} (33). Participa de modo importante en diversos procesos biológicos, con el fin de hacer más explícita esta participación dividiré las funciones en 2 grupos, siendo el primero de ellos en

el que se les ha relacionado con procesos afines a la biología de la reproducción (Cuadro IV) y el segundo con procesos biológicos en general (Cuadro V).

En cuanto al primer grupo podemos mencionar los siguientes:

1. Reconocimiento y enlace entre el espermatozoide y el óvulo durante la fecundación: El bloqueo de grupos SH con 4-(4-carboxi 3-hidroxi-fenil) maleimida (NCFM) en el espermatozoide evita el enlace de éste a la zona pelúcida y membrana del óvulo y con esto la fertilización (23,24).
2. Participación en la maduración epididimaria del espermatozoide (24,29,30,31). La maduración epididimaria implica un decremento en la cantidad de grupos SH libres y un aumento en S - S en cabeza, núcleo y cola del espermatozoide aumentando su estabilidad (24,29,30), siendo por esto más resistentes a la ruptura con detergentes, a la acción de actinomicina D y menos reactivo a la tinsión. feulgen (30).
3. Capacitación del espermatozoide: El bloqueo de grupos SH con NCFM de espermatozoides eyaculados evita su capacitación tanto in vivo como in vitro

(24,29).

En cuanto al segundo grupo podemos mencionar:

1. Mantenimiento de la estructura membranal: A través de su participación en interacciones hidrofóbicas manteniendo la interacción lípido-proteína membranal (24,28).
2. Transporte a través de la membrana:
 - a) Carbohidratos y aminoácidos: Vanstevenick et al (26) demuestran que grupos SH expuestos al exterior de la membrana del eritrocito son esenciales para el transporte de glucosa (24,26), en cuanto a células procariontes, Kabeck (33) propone un modelo de transporte de azúcares (lactosa, glucosa, galactosa, etc) y aminoácidos acoplado al transporte de electrones, en él, uno de los acarreadores ocurre en 2 formas, una de disulfuro (oxidada) de alta afinidad al sustrato y otra de disulfidrilo (reducida) de baja afinidad a este (Fig.6), el bloqueo de grupos SH inhibe el transporte en estos casos.
 - b) De Cationes: El sistema de transporte activo $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{ATP}_{\text{asa}}$ (bomba de sodio-potasio) puede inhibirse por bloqueo de grupos SH con etilmaleimida, pues la ATP_{asa} membranal contiene grupos SH en su centro de enlace a

EL ESTIMULO DECIDUAL

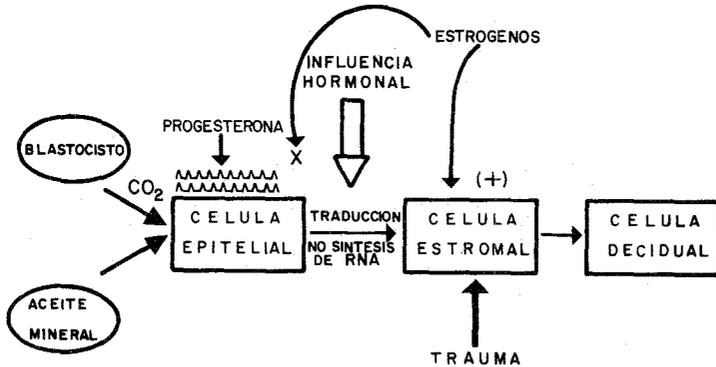
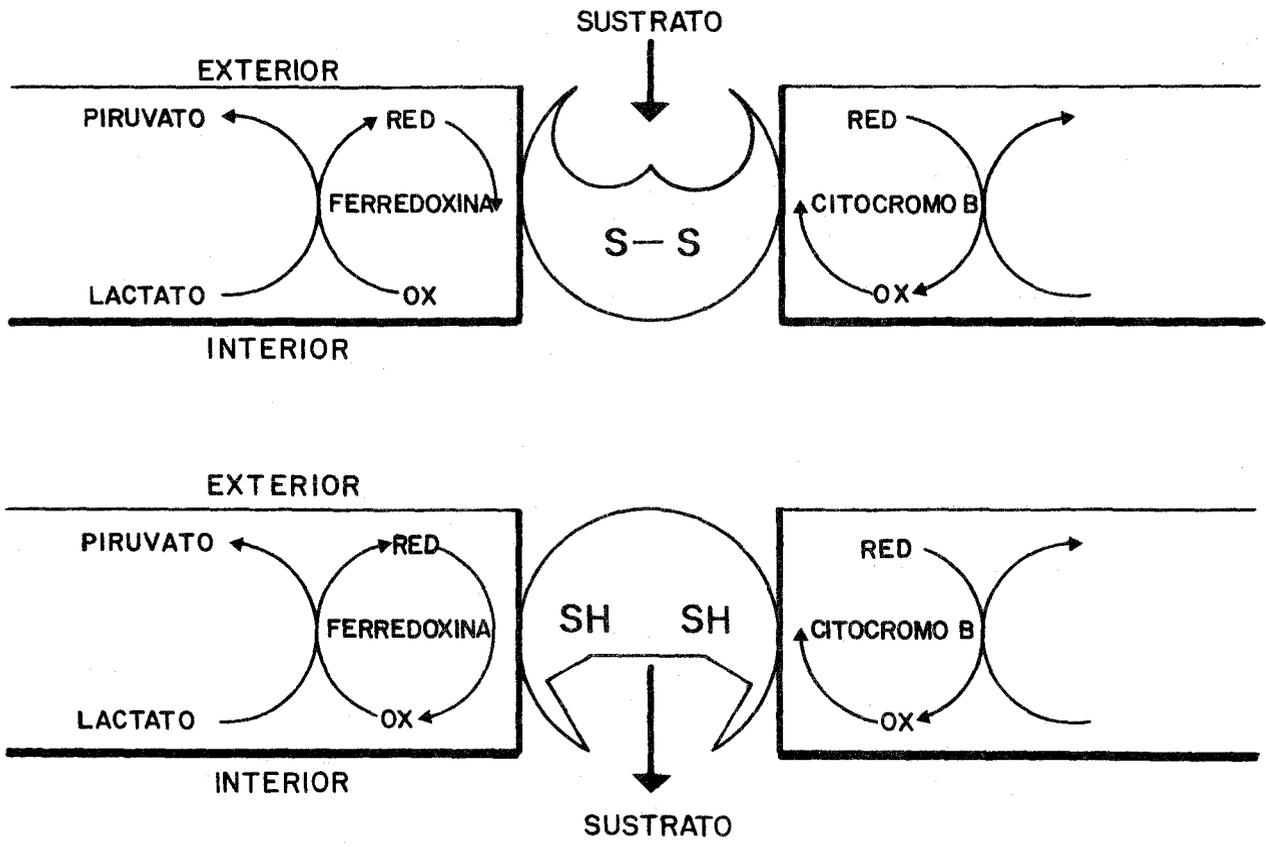


Figura 5.- La reacción decidual: (14):

Las células estromales responden al estímulo decidualizante (mandado por el -blastocisto y mediado por el epitelio -luminal) aumentando su ritmo mitótico y diferenciándose en células deciduales.- La progesterona sencibiliza al endome--trio uterino desviando el efecto mito--génico de los estrogénos de las células epiteliales a las células estromales(5, 6, 14).

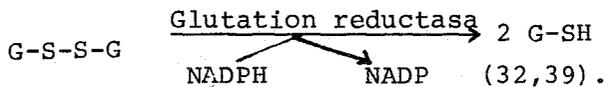
Figura 6. - Modelo de Kabeck para el transporte de azúcares y aminoácidos en bacterias (33).



ATP y otros fuera de él necesarios para su actividad (24,25,29,34).

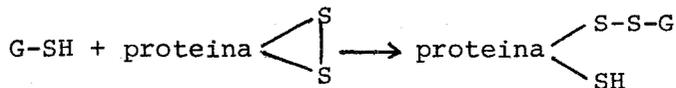
3. Reconocimiento antigénico: Green (27) demostró que los grupos SH son indispensables para la actividad del antígeno Rh (24,27).
4. Adhesividad celular: Una de las teorías para explicar la adhesividad celular propone que los grupos SH juegan un papel definitivo dentro de las características de superficie celular (35), esta teoría se basa en el hecho de que diversos reactivos bloqueantes a SH (disulfuro carboxipiridina, disulfuro de nitropiridina, etc) bloquean la adhesión celular en células embrionarias disgregadas y la adhesividad es recuperada por reactivos que regeneran estos grupos (cisteína, glutatión, etc).
5. Participación en la actividad enzimática: Muchas enzimas presentan grupos SH esenciales para el mantenimiento de su actividad catalítica. unos en el sitio activo participando en el enlace covalente enzima-sustrato (papaina, gliceraldehído 3-P deshidrogenasa, etc), otros en sitios de regulación alostérica (33).
6. Participa en el enlace de glucocorticoides por receptores citoplasmicos (38).

7. Como agente reductor en diversos procesos celulares: En estos procesos actúa principalmente como constituyente del glutatión (G-SH) el cual puede donar hidrogeniones y originar la forma de glutatión oxidado G-S-S-G la cual puede ser reducida mediante la enzima glutatión reductasa

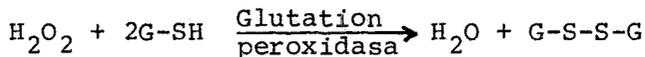


Interviene en:

- a) Preservación de grupos SH proteicos: Mediante la reacción de intercambio de disulfuro (39).



- b) Protege a eritrocitos y hepatocitos del daño oxidativo por H₂O₂ (32,39).



- c) Síntesis de prostaglandinas (33).
- d) Protege a los lípidos de autooxidación (32)
- e) Ruptura de puentes disulfuro en la degradación proteica (insulina, oxitocina) (39)

- f) Posible significado regulatorio: Pues el proceso oxidoreductor en que interviene el glutatión con las proteínas varía acorde a las variaciones del AMPc, siendo alta la relación proteína-S-S-G/GSH a alto nivel de AMPc y baja a bajos niveles de AMPc en el hígado (40), así mismo la actividad de algunas enzimas del metabolismo de carbohidratos (fructosa-1, 6-bifosfatasa, fosfofructocinasa, glucógeno sintetasa, etc) varían por este proceso.

Los grupos SH pueden enlazar iones metálicos principalmente Zn^{++} formando complejos SH- Zn^{++} los cuales participan en la estabilización de estructuras eventualmente a la formación de puentes bisulfuros, interviniendo también en regulación enzimática (23,24,30,31); el Zn^{++} disminuye la reactividad de los grupos SH, protegiéndolos además de la oxidación.

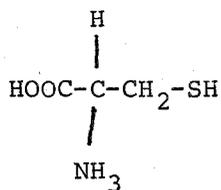
El estudio de los grupos SH en el ciclo sexual e implantación ha sido muy limitado, se han cuantificado en moco cervical humano bajo la acción de dispositivo intrauterino de cobre (41) y en el cérvix uterino humano. Sherman (37) los trató de asociar a la implantación en ratón, bloqueando grupos SH en trofoblasto con disulfuro de carboxipiridina produciendo tan solo un ligero retardo en la adhesión del blastocisto a superficies de plástico (37). Este estudio sin embargo, no es conclusivo, ya que el enlace del blastocisto es no específico y quizá debido a un aumento en viscosidad del embrión (52) , además no se considera el papel del epitelio uterino, ni

sus características de superficie implicadas en la implan
tación.

CUADRO III

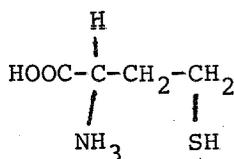
COMPUESTOS QUE CONTIENEN GRUPOS SH

$\frac{\text{SH}}{\text{NO}} \text{ PROTEICOS}$	PROTEICOS
---	-----------

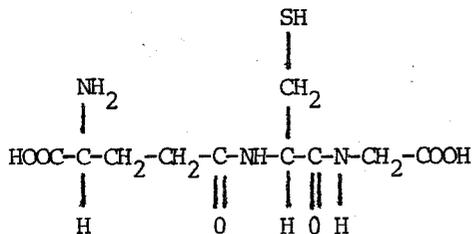


PROTEINAS - SH

CISTEINA



HOMOCISTEINA



GLUTATION (γ GLUTAMIL-CISTEINIL-GLICINA)

CUADRO IV

PAPEL FISIOLÓGICO DE LOS GRUPOS SH EN LOS
PROCESOS REPRODUCTIVOS

PROCESO	REFERENCIA
Reconocimiento y enlace entre células durante - la fecundación	23,24
Maduración epidididi- maria	24,29 30,31
Capacitación del esper- matozoide	24

CUADRO V

PAPEL FISIOLÓGICO DE LOS GRUPOS SH EN PROCESOS BIOLÓGICOS EN GENERAL.

PROCESO	REFERENCIAS
MANTENIMIENTO DE LA ESTRUCTURA MEMBRANAL	24, 28
TRANSPORTE A TRAVÉS DE LA MEMBRANA	
a) GLUCOSA EN EUKARIOTES	26
b) CARBOHIDRATOS Y AMINOÁCIDOS EN PROCARIONES	33
c) CATIONES	24, 29, 34
RECONOCIMIENTO ANTIGÉNICO	27
ADHESIVIDAD CELULAR	35
ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	33
ENLACE DE GLUCOCORTICOIDES POR RECEPTORES CITOPLÁSMICOS	38
AGENTE REDUCTOR EN DIVERSOS PROCESOS CELULARES:	
a) REGENERACIÓN DE GRUPOS SH	32, 34
b) PROTECCIÓN CONTRA DAÑO OXIDATIVO CON H ₂ O ₂	32, 39
c) SÍNTESIS DE PROSTAGLANDINAS	33
d) PROTEGE A LÍPIDOS DE AUTOOXIDACIÓN	32
e) RUPTURA DE PUENTES DISULFURO EN DEGRADACIÓN PROTEICA	39
f) POSIBLE SIGNIFICADO REGULATORIO	40

II. OBJETIVO.

El objetivo del presente trabajo es estudiar las variaciones de grupos SH en el útero de la rata a través del ciclo estral y al quinto día de preñez, relacionándolo con la preparación y receptividad uterina a la implantación, así como con los distintos niveles hormonales reportados por la literatura (4,20), para discutir la posible importancia de estos grupos en el proceso de implantación.

III. MATERIAL Y METODOS

Ratas Long-Evans adultas vírgenes de 2 a 3 meses de edad, con un peso de 200 ± 30 g y un ciclo estral de 5 días, fueron mantenidas en un cuarto con temperatura y luz controlados, con un período de luz de 14 h (7-21 h) alimentadas con purina rat chow y agua ad libitum.

Se efectuaron frotis vaginales diariamente antes de las 10 A.M. al menos por 5 días para asegurar la ciclicidad, las etapas del ciclo fueron identificadas conforme a la figura 7 (1,42).

Para las determinaciones de grupos SH durante el ciclo estral, grupos de 10 ratas para cada etapa fueron sacrificados por dislocación cervical; el útero fue disecado, limpiado de grasa y tejido conectivo sobre una caja de petri con hielo, los cuernos uterinos fueron pesados, cortados en pequeños fragmentos y posteriormente homogeneizados en EDTA 0.02 M pH 4.7 empleando 1.5 ml/100 mg de tejido en un homogenizador Potter-Elvehjem - teflón-vidrio manteniéndolo en un baño de hielo. Se tiene un homogenado final al 6.25% p/v con 62.5 mg de peso húmedo por ml de homogeneizado, de este se tomaron alícuotas para la determinación de: SH totales, SH no - proteicos y proteínas.

Para las determinaciones al 5° día de embarazo se emplearon 16 ratas las cuales fueron apareadas mediante

Figura 7.- Características vaginales y conductuales durante el ciclo estral de la rata (1).

CARACTERÍSTICAS CITOLÓGICAS Y CONDUCTUALES DURANTE EL CICLO—ESTRAL DE LA RATA.

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

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

el sistema de Trio (2 hembras y 1 macho) (57), considerándose como día cero de preñez el día en que se encontraron espermatozoides en el frotis vaginal. El día 5 de preñez entre 8:00 a 9:00 A.M., se les aplicó una inyección intravenosa de 1 ml de azul tripan al 1.5 % en solución salina fisiológica (NaCl 0.9 %), después de 30 minutos fueron sacrificadas por dislocación cervical, se disecó el útero y se procedió a separar los sitios de implantación (31) del resto del útero (RU) manejándose como dos muestras separadas, las que se someten al mismo tratamiento que los úteros de las ratas no preñadas. (Fig. 8, 9).

La inyección de azul tripan nos permite diferenciar los sitios de implantación, pues es un colorante de alto peso molecular (960,000) que se une a la albúmina sérica y se acumula en la zona de implantación de permeabilidad aumentada (Fig. 10) (43).

Determinación de grupos SH:

Los grupos SH totales, proteicos y no proteicos fueron determinados mediante el reactivo de Ellman (DTNB; 5',5'Ditio-Bis (2-Nitro-ácido benzoico) (Sigma Chemical Co.)) de acuerdo con el procedimiento de Sedlack y Lindsay (44) conforme a los Cuadros VI y VII. Las lecturas de absorbancia fueron hechas en un espectrofotómetro Pye-Unicam SPG-500 a 412 nm .

Las curvas de recuperación con cisteína (Fig.11) nos sirven de referencia para los valores del problema los cuales se efectuaron por triplicado y con su blanco correspondiente.

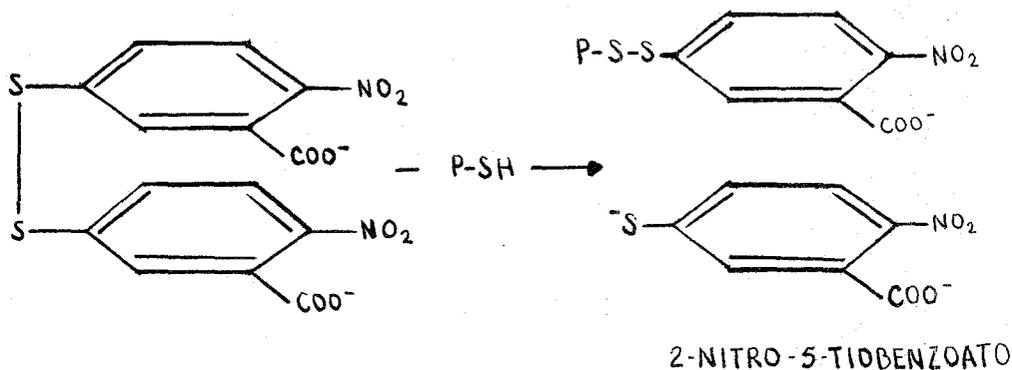
Para la determinación de los grupos SH no proteicos, las proteínas son precipitadas con ácido tricloroacético (TCA) al 50% (Cuadro VII).

Los grupos SH proteicos se obtienen de la diferencia entre los grupos SH totales y SH no proteicos.

$$\text{SH proteicos} = \text{SH totales} - \text{SH no proteicos.}$$

Se realizó una curva patrón con cisteína empleando ésta en lugar de homogeneizado, al comparar con las curvas de recuperación se encontró 100% de recuperabilidad y otra con azul tripan 1 mg/ml en EDTA pH 4.7 encontrando que en estas condiciones el colorante no interfiere en la determinación de grupos SH.

Este método se basa en la reacción estequiométrica entre el DTNB y tioles alifáticos de acuerdo a la siguiente reacción:



El nitromercapto benzoato formado presenta máxima actividad óptica a 412 nm con una absorptividad molar de $13\ 600\ M^{-1}\ cm^{-1}$ (44) (Fig. 11).

Todos los valores obtenidos de grupos SH son referidos con propósitos comparativos a mg de peso húmedo y a mg de proteínas.

Determinación de proteínas:

Se midieron como parámetro de referencia empleando el método de Microbiuret (Cuadro VIII). Se utilizaron 50 ul del homogeneizado, se probó la linealidad y paso por el origen de las gráficas de absorbancia vs. concentración de proteínas en el rango de trabajo (Fig. 12) Este método se basa en el complejo colorido entre el ion Cu^{++} y C = O y N-H del enlace peptídico que absorbe a 310 nm (58).

Evaluación Estadística:

Fue aplicada la prueba t de student para evaluar diferencias significativas en un ensayo de 2 colas para $P < 0.05$ y $P < 0.01$ para evaluar diferencias significativas entre las distintas etapas y el 5° día de preñez aplicando la fórmula (45):

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sigma \sqrt{\frac{1}{N_1} + \frac{1}{N_2}}} \quad \text{DONDE} \quad \sigma = \sqrt{\frac{N_1 S_1^2 + N_2 S_2^2}{N_1 + N_2 - 2}}$$

$$\text{CON } V = N_1 + N_2 - 2$$

t = estadístico t

σ = desviación estandar poblacional

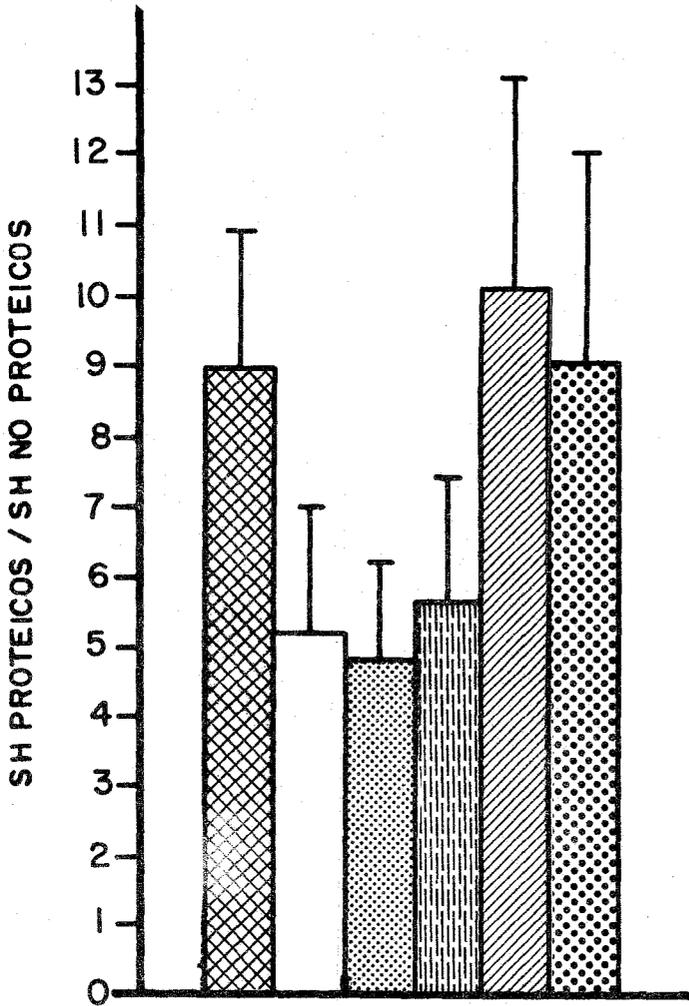
N_1, N_2 = número de casos para las muestras 1 y 2

\bar{X}_1, \bar{X}_2 = medias muestrales

S_1, S_2 = desviación standard para las muestras 1 y 2

V = Grados de libertad.

Gráfica 8.- SH PROTEICOS / SH NO PROTEICOS.*

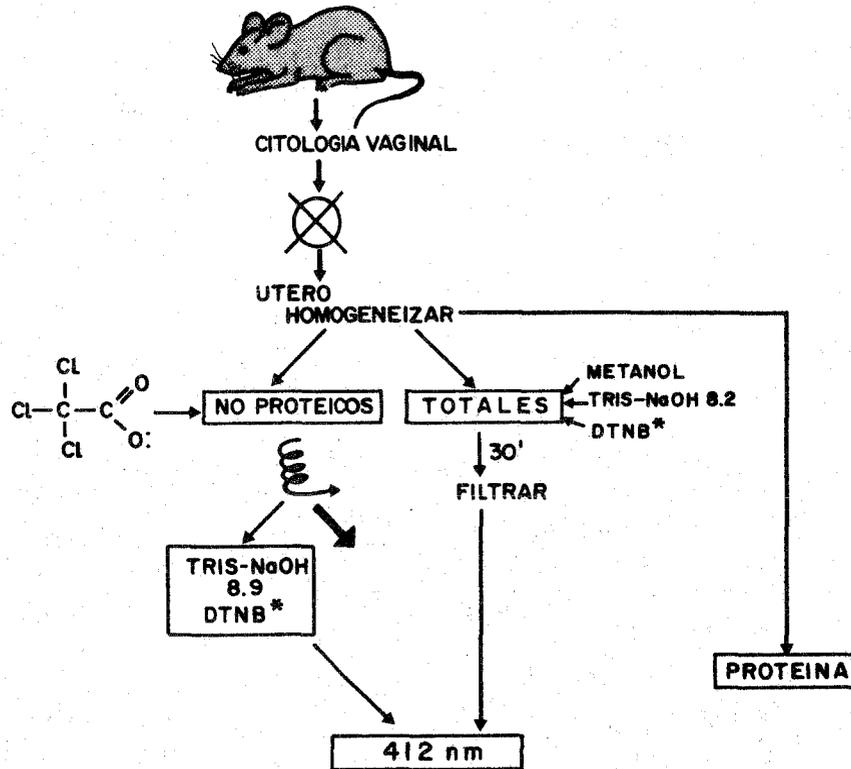


* COCIENTE OBTENIDO DE LOS DATOS
mg DE PROTEINA.

P - PROESTRO
E - ESTRO
M - METAESTRO
D - DIESTRO

S - SITIOS DE IMPLANTACION
NS - RESTO DEL UTERO

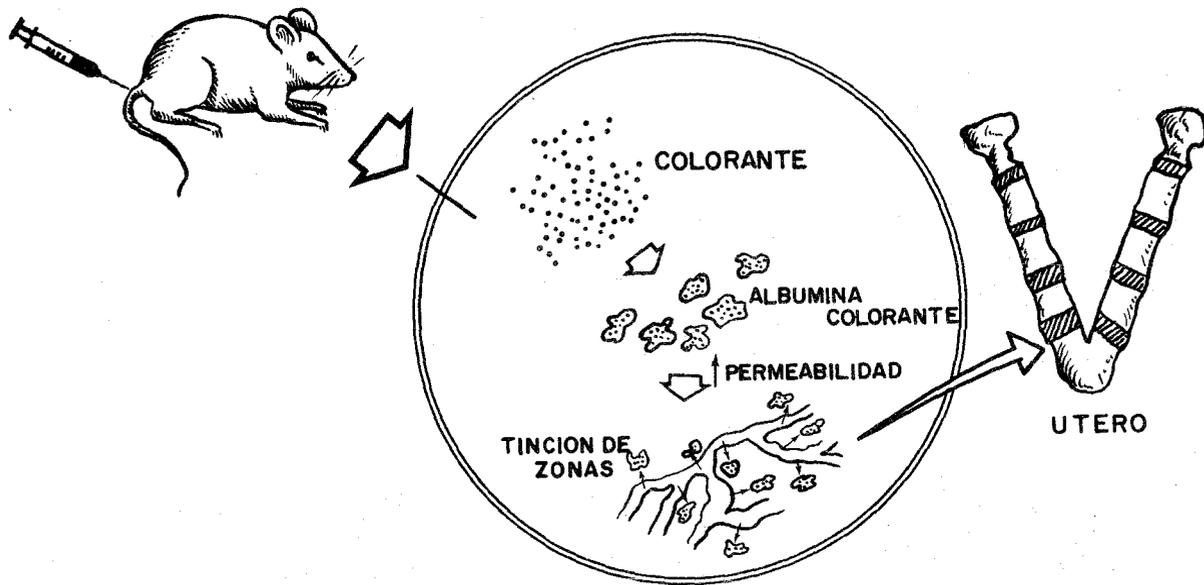
Figura 9.- Esquema metodológico.



* - ACIDO 5,5'-DITIOBIS-2-NITROBENZOICO

Figura 10.- Método para determinar zonas de implantación:

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



CUADRO VI

DETERMINACION SH TOTALES

TUBO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
HOMOGENADO	0	50 ul	50 ul	50 ul	50 ul	50 ul	50 ul	50 ul	250 ul	
EDTA 0.02M pH 4.7	50 ul	0	0	0	0	0	0	250 ul	0	
Cis 0.37 mg/ml *	0	0	30 ul	60 ul	90 ul	120 ul	150 ul	0	0	
Tris 0.2M pH 8.2	2500 ul	2500 ul	2470 ul	2440 ul	2410 ul	2380 ul	2350 ul	2300 ul	2300 ul	
DTNB 0.3 mM ⁺	50 ul	50 ul	50 ul	50 ul	50 ul	50 ul	50 ul	50 ul	50 ul	
METANOL	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	
	BLANCO DE REACTIVO	CURVA DE RECUPERACION						BLANCO	PROBLE- MA.	

REPOSAR 30 minutos - filtrar y leer a 412 nm.

* Cis = Cisteina, preparada en buffer Tris 0.2M pH 8.2

+ El DTNB se prepara en Metanol

● El pH es ajustado con HCl diluido.

CUADRO VII
DETERMINACION SH NO PROTEICOS

T U B O	1	2	3	4	5	6	7	8	9
HOMOGENADO	0	500 ul	0	700 ul					
EDTA 0.02M pH 4.7	500 ul	0	0	0	0	0	0	700 ul	0
Cis 0.37 mg/ml *	0	0	30 ul	60 ul	90 ul	120 ul	150 ul	0	0
Tris 0.2M pH 8.2	500 ul	500 ul	470 ul	440 ul	410 ul	380 ul	350 ul	300 ul	300 ul
AGUA	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml
TCA 50 %	500 ul	500 ul	500 ul	500 ul	500 ul	500 ul	500 ul	500 ul	500 ul
AGITAR 30 MINUTOS									
CENTRIFUGAR A 5000 rpm 10 MINUTOS Y SEPARAR SOBRENADANTE									
SOBRENADANTE	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
Tris 0.4M pH 8.9	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml
DTNB 0.3 mM ⁺	50 ul	50 ul	50 ul	50 ul	50 ul	50 ul	50 ul	50 ul	50 ul
BLANCO DE REACTIVO	CURVA DE RECUPERACION							BLANCO PRO- BLEMA	PRO- BLEMAS

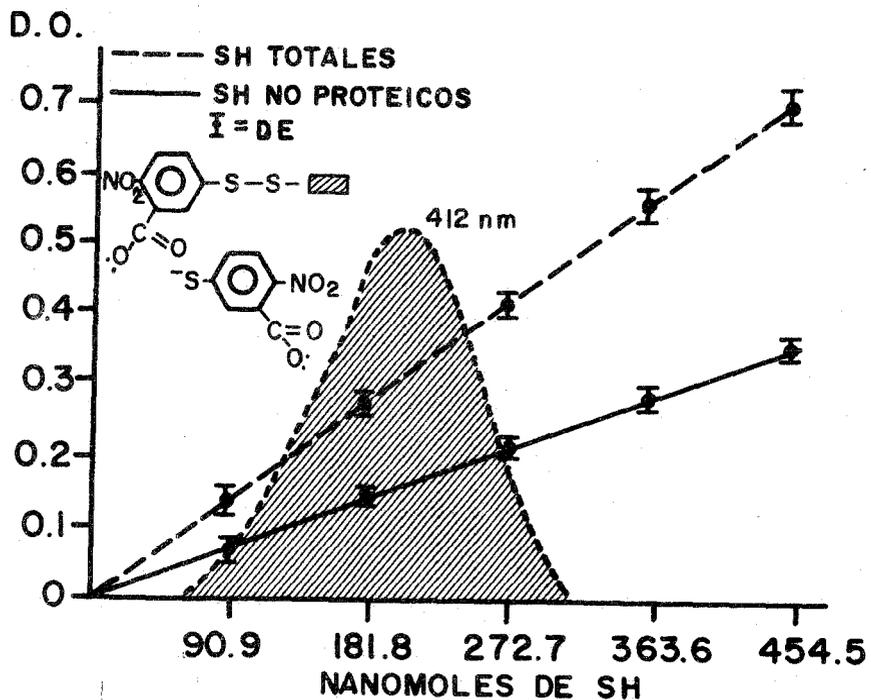
Leer a 412 nm

* Cis = Cisteina, preparada en buffer Tris 0.2M pH 8.2

+ El DTNB se prepara en Metanol

● El pH es ajustado con HCl diluido.

Figura 11.- Curvas de recuperación promedio para grupos SH totales y no proteicos y espectro de absorción del nitromercaptobenzoato formado de la reacción del DTNB y compuestos con grupos SH.



CUADRO VIII

DETERMINACION DE PROTEINAS POR EL METODO MICROBIURET (58)

T U B O	Estandar de albúmina (1 mg/ml)ul*	ug proteina	H ₂ O ml	NaOH 30% ml	Reactivo de Biuret ml **	Homogeneizado
BLANCO	0	0	2.0	1	0	--
1	200	200	1.8	1	0	--
2	400	400	1.6	1	0	--
3	600	600	1.4	1	0	--
4	800	800	1.2	1	0	--
5	1000	1000	1.0	1	0	--
BLANCO	0	0	2.0	0	1	--
1	200	200	1.8	0	1	--
2	400	400	1.6	0	1	--
3	600	600	1.4	0	1	--
4	800	800	1.2	0	1	--
5	1000	1000	1.0	0	1	--
PROBLEMA	0.0	?	1.95	1	0	50 ul
	0.0	?	1.95	0	1	50 ul

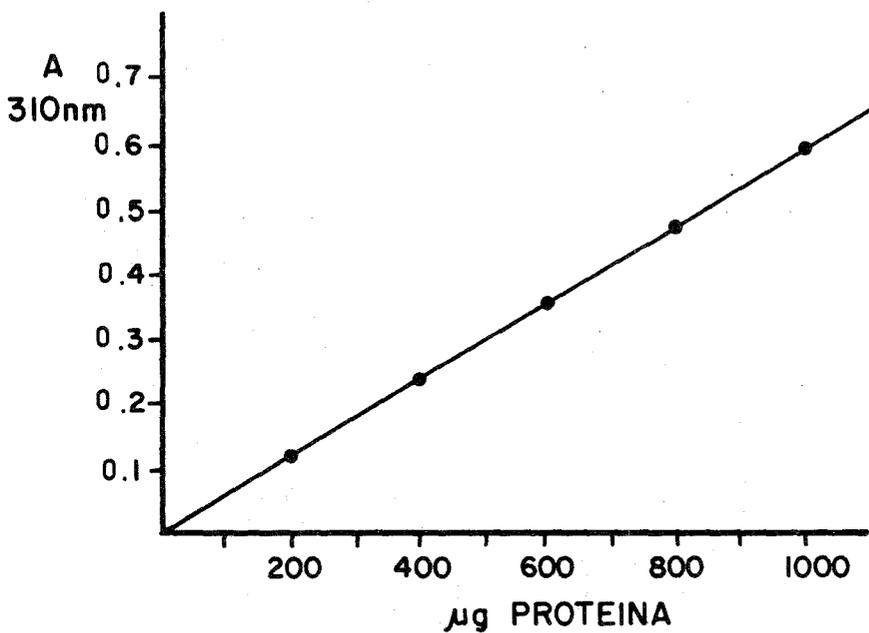
LEER A 310 nm.

* Preparada en agua.

* Reactivo Biuret: a 79 ml NaOH 38% se le agrega lentamente 21 ml de CuSO₄ 1 % (dando una concentración final de NaOH al 30%).

+ A las lecturas con el reactivo de Biuret se le restan las lecturas obtenidas con sosa al 30 % que le sirven de blanco.

Figura 12.- Curva patrón de absorvancia vs. concentración de proteínas. (Método de microburet (58)).



IV RESULTADOS.

Las variaciones de grupos SH totales y proteicos durante el ciclo estral siguen un patrón similar presentando una concentración en un 15 a 30% más alta durante proestro y estro con respecto al metaestro y diestro - tanto si la comparación es con referencia a peso húmedo como a proteínas (Cuadro IX y X, Gráficas 1,2,4,5).

Los grupos SH no proteicos presentan por su parte una concentración mínima durante el proestro (0.98 ± 0.03 nmolas/mg de peso húmedo ó $7.2 \pm .8$ nmolas/mg de proteina elevándose en un 40 a 46% durante estro y metaestro cayendo ligeramente en el diestro (Cuadros IX y X, Gráficas 3,6).

La relación SH proteicos/SH no proteicos es máxima en proestro (8.9 ± 1.9) y mínima durante el metaestro (3.5 ± 1.3 en los datos de peso húmedo y 4.5 ± 1.4 refiriendo a proteínas) (Cuadros IX y X. Gráficas 7 y 8).

El comportamiento de los grupos SH no proteicos - tiende a ser inverso al comportamiento de los grupos SH proteicos (Gráfica 1,2,3,10,11) siendo más marcado - con referencia a peso húmedo con un índice de correlación $r = 0.77$ (Gráfica 12) no encontrando correlación lineal con respecto a proteínas.

Si nos referimos a las determinaciones efectuadas al 5º día de embarazo notamos un aumento considerable de grupos SH totales y proteicos con respecto a sus concentraciones durante el ciclo estral. Siendo significativamente diferentes a una $P < 0.01$ con pocas excepciones (Cuadro IX y X, Gráficas 1,2,4,5). Al comparar los sitios de implantación con el resto del útero, cuando nos referimos a peso húmedo es más alta la concentración de SH proteicos y totales en el resto del útero sin ser significativas, esto se invierte cuando referimos a proteínas siendo entonces más alto en un 24% en el sitio de implantación en ambos casos (Cuadros IX y X. Gráficas 1,2,4,5). Esta inversión la explicamos en base a una mayor hidratación en permeabilidad en esta zona, esto es, patente en los Cuadros XI y XII. En base a esta hidratación consideramos más válidas las comparaciones en base a los valores referidos a proteínas.

Por su parte la concentración de grupos SH no proteicos en el 5º día de preñez presentan similitud a los valores encontrados en estro y diestro, siendo significativamente más altos $P < 0.01$ al proestro (Cuadro IX y X - Gráficas 3 y 4). Es mayor en el resto del útero si nos referimos a peso húmedo, invirtiéndose si nos referimos a proteínas.

Cuando comparamos con los distintos niveles hormonales reportados en la literatura (Gráfica 10 y 11) es notoria la correspondencia entre el comportamiento de la relación SH proteicos/SH no proteicos, con los niveles medios para cada fase de 17 β estradiol presentando una

proporcionalidad directa con un alto índice de correlación ($r = 0.979$ y $r = 0.985$) (Gráficas 13 y 14). Los grupos SH totales y proteicos presentan sus picos máximos correspondiendo con los picos máximos de 17β estradiol aunque presentan una correlación más baja ($r = 0.77$ y $r = 0.89$ respectivamente cuando referimos a peso húmedo y $r = 0.59$ y $r = 0.7$ cuando referimos a proteínas) (Gráfica 15, 16). Los grupos SH no proteicos presentan una proporcionalidad inversa a los niveles de 17β estradiol con una correlación más baja. (Gráfica 15,16).

Los niveles de SH totales, proteicos y la relación SH proteicos/SH no proteicos son siempre más altos tanto en sitios como en no sitios que los valores esperados de la correlación con 17β estradiol (Cuadro VIII, Gráficas 12-16) encontrándose los valores de SH no proteicos, cercanos a los valores predichos por la curva de regresión. Así, cuando referimos a peso húmedo la correspondencia es con el resto del útero presentando un valor más bajo el sitio de implantación y lo inverso cuando referimos a proteínas (Cuadro XIII).

CUADRO IX

CUANTIFICACION DE GRUPOS SH EN EL UTERO DE RATA

		No. de Experimento**	nmoles SH mg peso húmedo ⁻¹ *			SH PROTEICOS	17 β Estradiol pg/ml plasma PROMEDIO ‡
			TOTALES	PROTEICOS	NO PROTEICOS	SH NO PROTEICOS	
CICLO ESTRAL	PROESTRO (P)	5	9.8 \pm 2	8.8 \pm 2	0.98 \pm .03	8.4 \pm 1.4	61
	ESTRO (E)	5	9.2 \pm 1	7.62 \pm 1.1	1.61 \pm .44	5.2 \pm 1.8	28
	METAESTRO (M)	5	8.0 \pm 1.9	6.19 \pm 2	1.81 \pm .15	3.5 \pm 1.3	22
	DIESTRO (D)	5	7.9 \pm .89	6.7 \pm 1.1	1.28 \pm .3	5.6 \pm 1.8	31
5°DIA DE PREÑEZ	SITIO (S)	5	11.9 \pm 1.5	10.5 \pm 1.6	1.4 \pm .19	7.78 \pm 2	29
	NO SITIO (NS)	5	13.9 \pm 2	12.4 \pm 2	1.57 \pm .28	8.08 \pm 2	
PRUEBA DE		P < .05	NS - P S - E	S - E.M. NS - P	P - E M - D	P - E M - S	
t +		P < .01	NS - E.M.D. S - M.D.	S - D NS - E.M.D.	P - M.S, NS M - P.S.	P - M M - NS	

* $\bar{X} \pm$ D.E.

+ A - B.C.

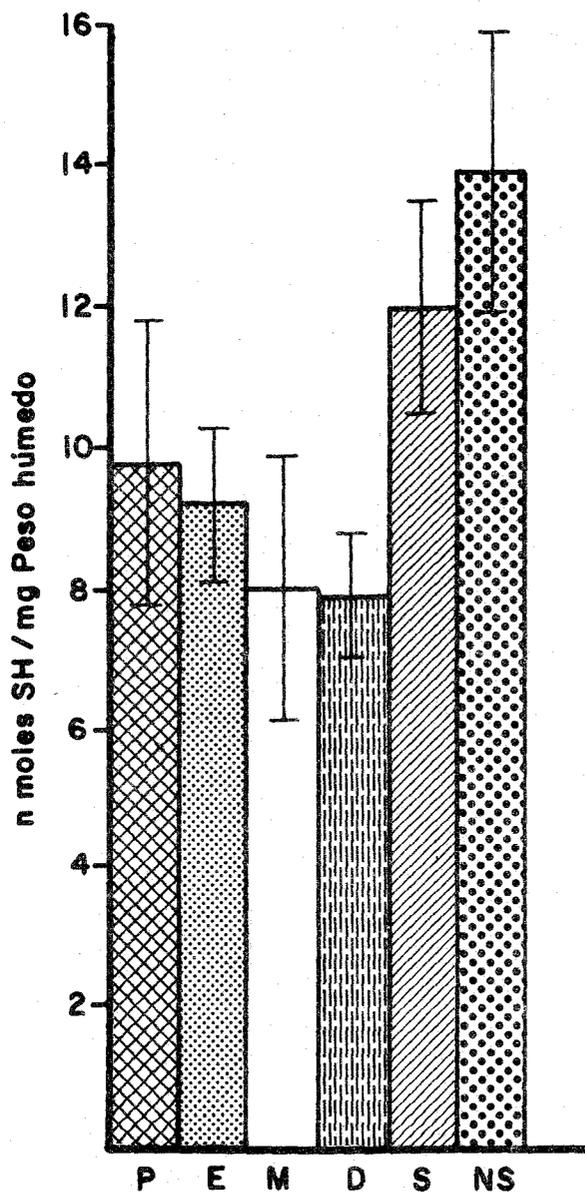
A = Fase que se compara, significativamente diferente a las fases B y C.

‡ Valores obtenidos de la figura 2 y 4 (4,20)

**Para cada experimento durante el ciclo estral fueron empleadas 2 ratas y 4 ratas para los mismos al 5° día de preñez.

GRAFICA 1

SH TOTALES



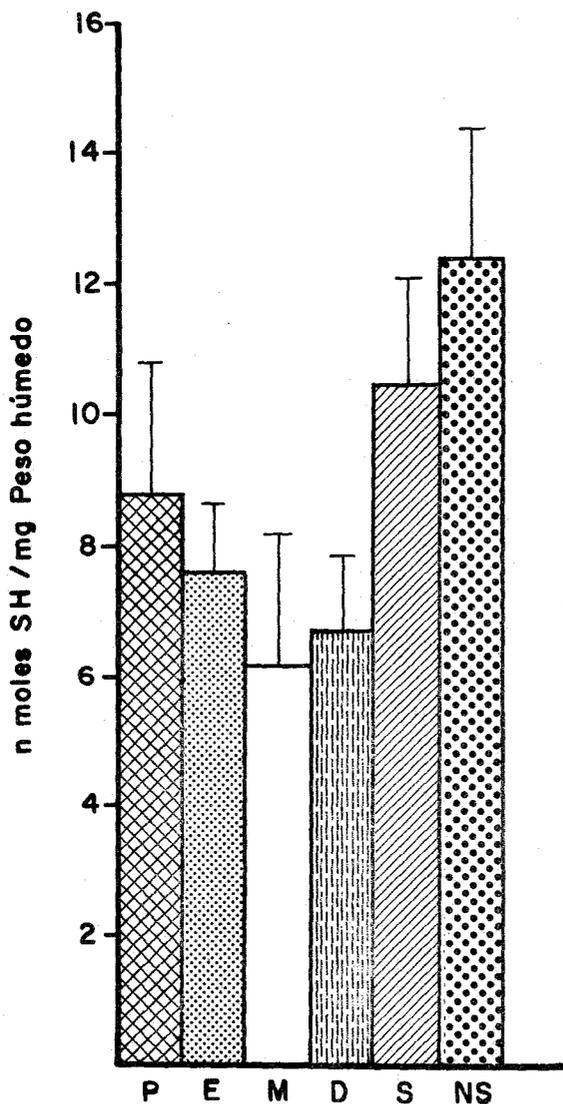
P - PROESTRO
 E - ESTRO
 M - METAESTRO

S - SITIOS DE IMPLANTACION
 NS - RESTO DEL UTERO

I - DE.

D - DIESTRO

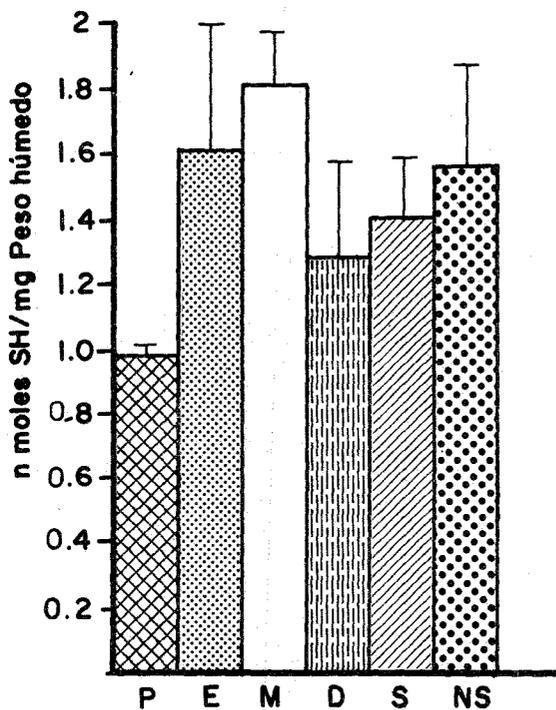
GRAFICA 2
SH PROTEICOS



P - PROESTRO
E - ESTRO
M - METAESTRO
D - DIESTRO

S - SITIOS DE IMPLANTACION
NS - RESTO DEL UTERO
I - D.E.

GRAFICA 3
SH NO PROTEICOS



P - PROESTRO
E - ESTRO
M - METAESTRO
D - DIESTRO

S - SITIOS DE IMPLANTACION
NS - RESTO DEL UTERO

CUADRO X

CUANTIFICACION DE GRUPOS SH EN UTERO DE RATA

	No. de Experimento**	nmoles SH mg Proteína ⁻¹ *			SH PROTEICOS	17 estradiol pg/ml plasma PROMEDIO ‡	
		TOTALES	PROTEICOS	NO PROTEICOS	SH NO PROTEICOS		
CICLO ESTRAL	PROESTRO (P)	5	72.4 ± 17	65 ± 17	7.2 ± 0.8	8.95 ± 1.9	61
	ESTRO (E)	5	75.5 ± 18	63 ± 18	12.8 ± 2.9	5.16 ± 1.9	28
	METAESTRO (M)	5	59 ± 11	48 ± 11.8	11.4 ± 2.7	4.48 ± 1.4	22
	DIESTRO (D)	5	62 ± 12	52 ± 11.28	10 ± 3	5.66 ± 1.8	31
5 ° DIA DE PREÑEZ	SITIO (S)	5	124 ± 15	111 ± 15	12 ± 1.5	10.09 ± 3.4	29
	NO SITIO (NS)	5	94 ± 17	84.3 ± 18	9.7 ± 1.5	9.04 ± 3	
PRUEBA DE	P < .05	S - NS NS - D.E.	NS - D	P.M. - NS	D - E		
t +	P < .01	S - P.E.M.D. NS - M	S- P.E.M.D. NS - M	P - E.S.	P - M M - S. NS		

* \bar{X} ± D.E.

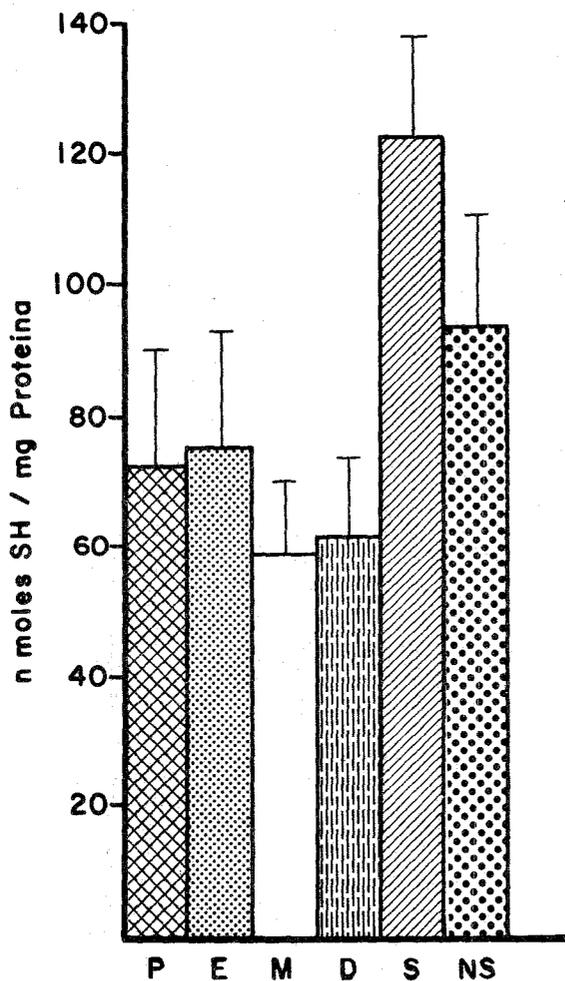
+ A - B, C

A = fase que se compara, significativamente diferente a las fases B y C.

‡ Valores obtenidos de los grupos 2 y 4 (4, 20)

** Para cada experimento durante el ciclo estral fueron empleadas 2 ratas y 4 ratas para los mismos al 5 ° día de preñez.

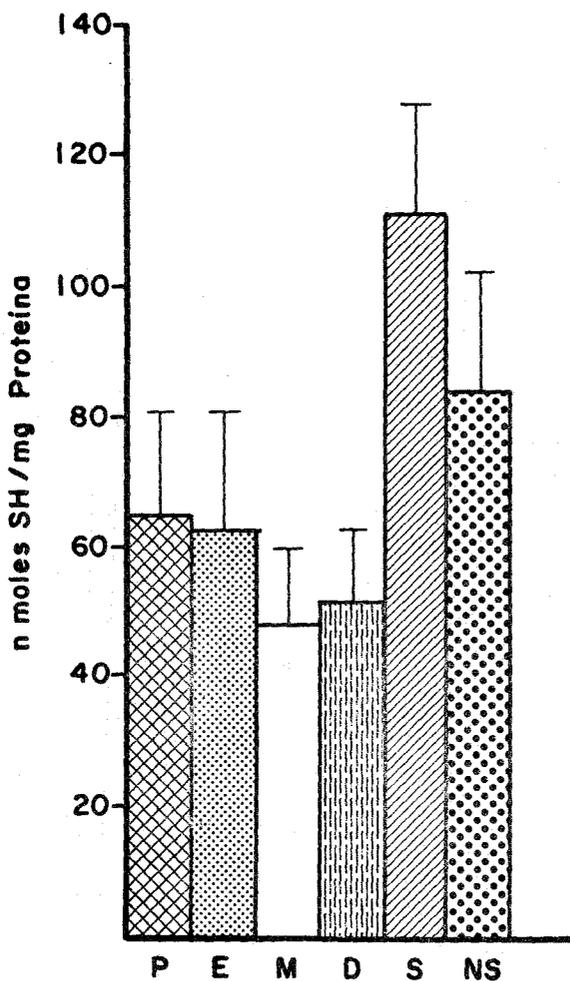
GRAFICA 4
SH TOTALES



P - PROESTRO
E - ESTRO
M - METAESTRO
D - DIESTRO

S - SITIOS DE IMPLANTACION
NS - RESTO DEL UTERO

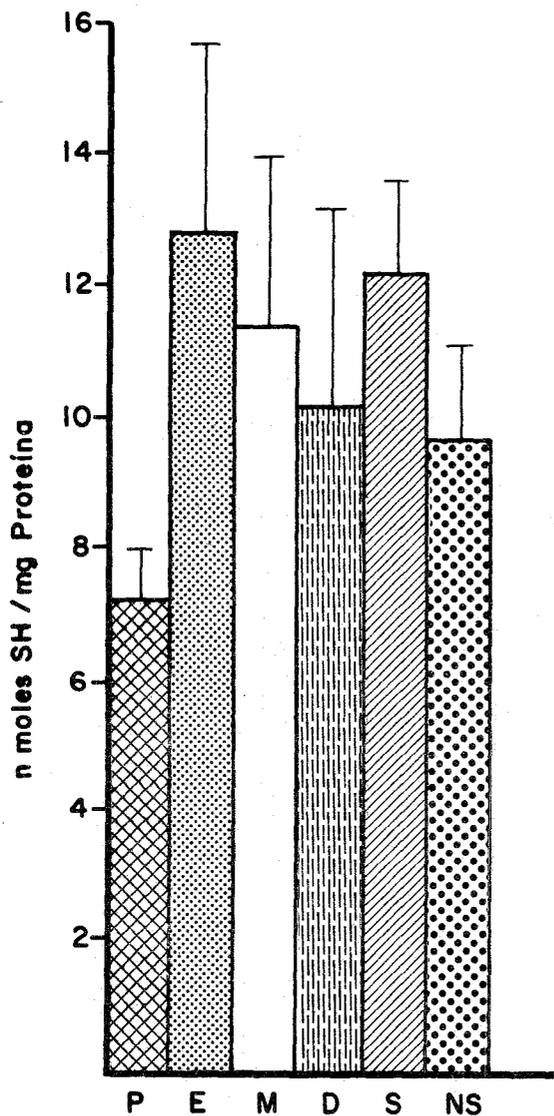
GRAFICA 5
SH PROTEICOS



P - PROESTRO
E - ESTRO
M - METABSTRO
D - DIESTRO

S - SITIOS DE IMPLANTACION
NS - RESTO DE UTERO

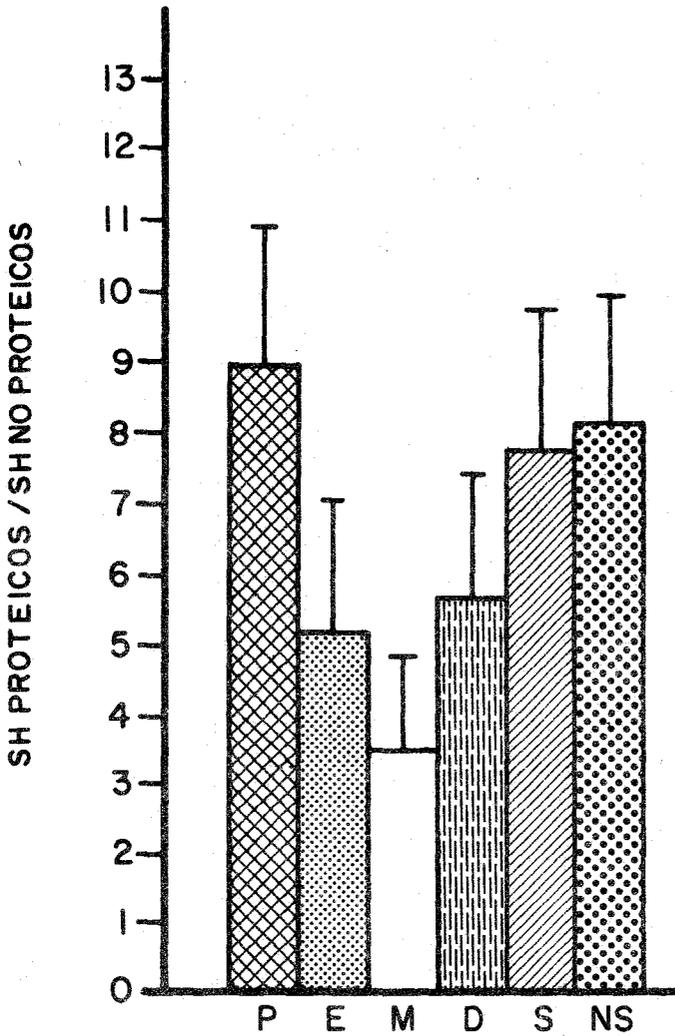
GRAFICA 6
SH NO PROTEICOS



P - PROESTRO
E - ESTRO
M - ME (ABSTRO)
D - DIESTRO

S - SITIOS DE IMPLANTACION
NS - RESPO DEL UTERO

Gráfica 7.- SH PROTEICOS / SH NO PROTEICOS.*



* COCIENTE OBTENIDO DE LOS DATOS
mg PESO HUMEDO.

P - PROESTRO
E - ESTRO
M - METAESTRO
D - DIESTRO

S - SITIOS DE IMPLANTACION
NS - RESTO DEL UTERO

MATERIAL Y METODOS

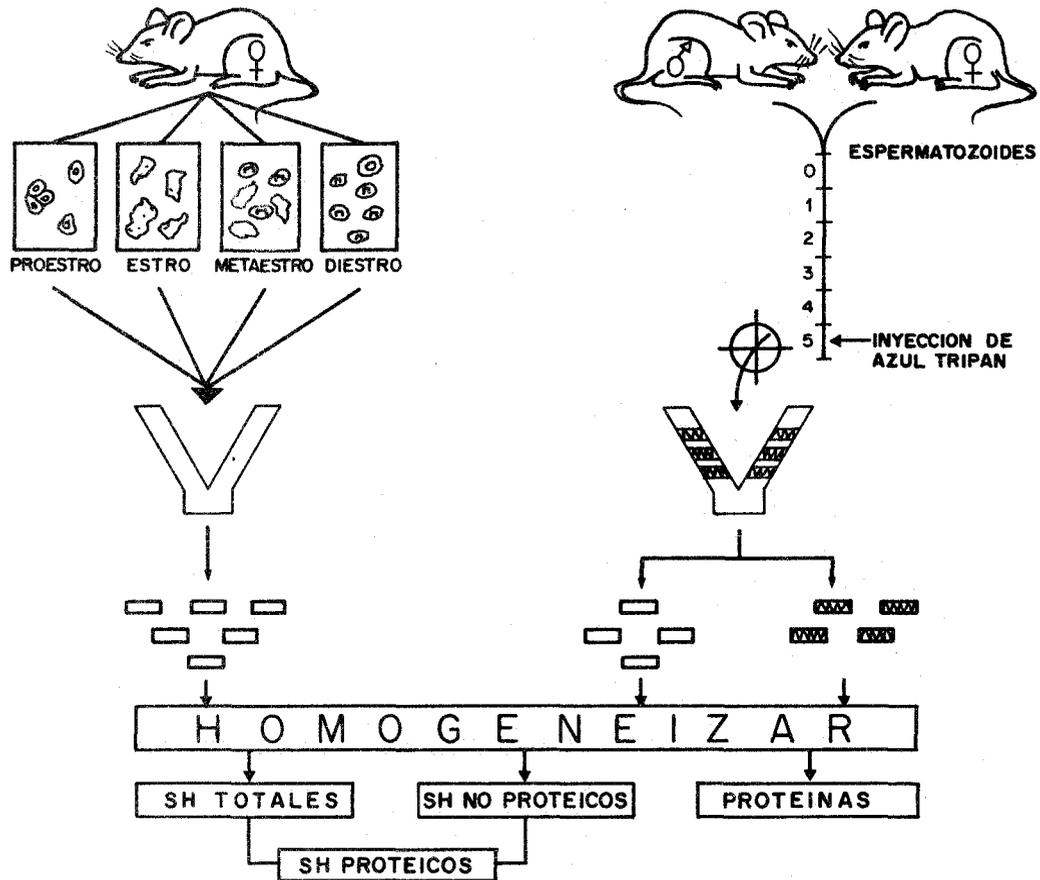


Figura 8.-Esquema metodológico

CUADRO XI

CUANTIFICACION DE PROTEINAS EN UTERO DE RATA

	mg Prot/ ml Homog	mg Prot/ mg P.Hum
PROESTRO	9.18 _± .9	0.136 _± .013
ESTRO	8.59 _± 2	0.129 _± .03
METAESTRO	8.98 _± 1.5	0.136 _± .02
DIESTRO	8.78 _± 1.6	0.130 _± .027
SITIO	6.47 _± .45	0.096 _± .008
NO SITIO	9.9 _± .8	0.149 _± .012

* Se utilizó un homogenado al 6.25% en EDTA 0.02M
PH 4.7

\bar{X} _± D.E.

\bar{X} promedio de 5 determinaciones.

CUADRO XII

COMPARACION DEL CONTENIDO DE HUMEDAD ENTRE LOS
SITIOS DE IMPLANTACION Y EL RESTO DEL
UTERO.

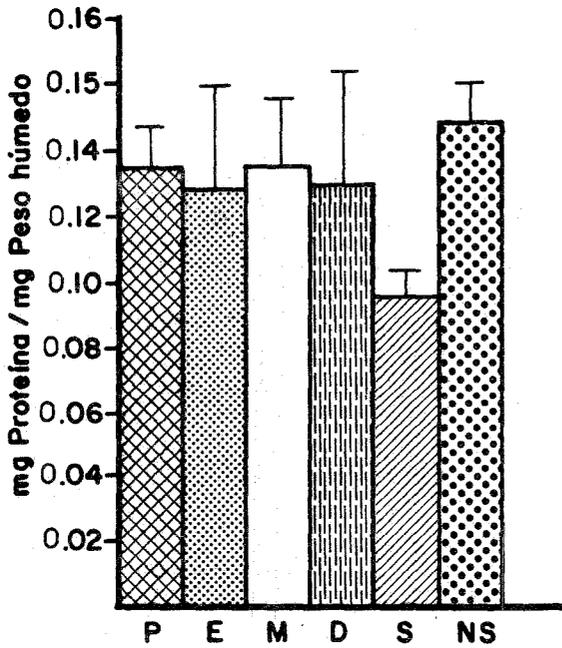
Parámetro determinado	Sitio	Resto del útero
mg peso húmedo/mg peso seco	7.35 \pm 0.71** (11)	6.11 \pm 0.86 (15)
% humedad	86.4 %	83.6 %

** $P < 0.05$

() número de experimentos.

GRAFICA 9

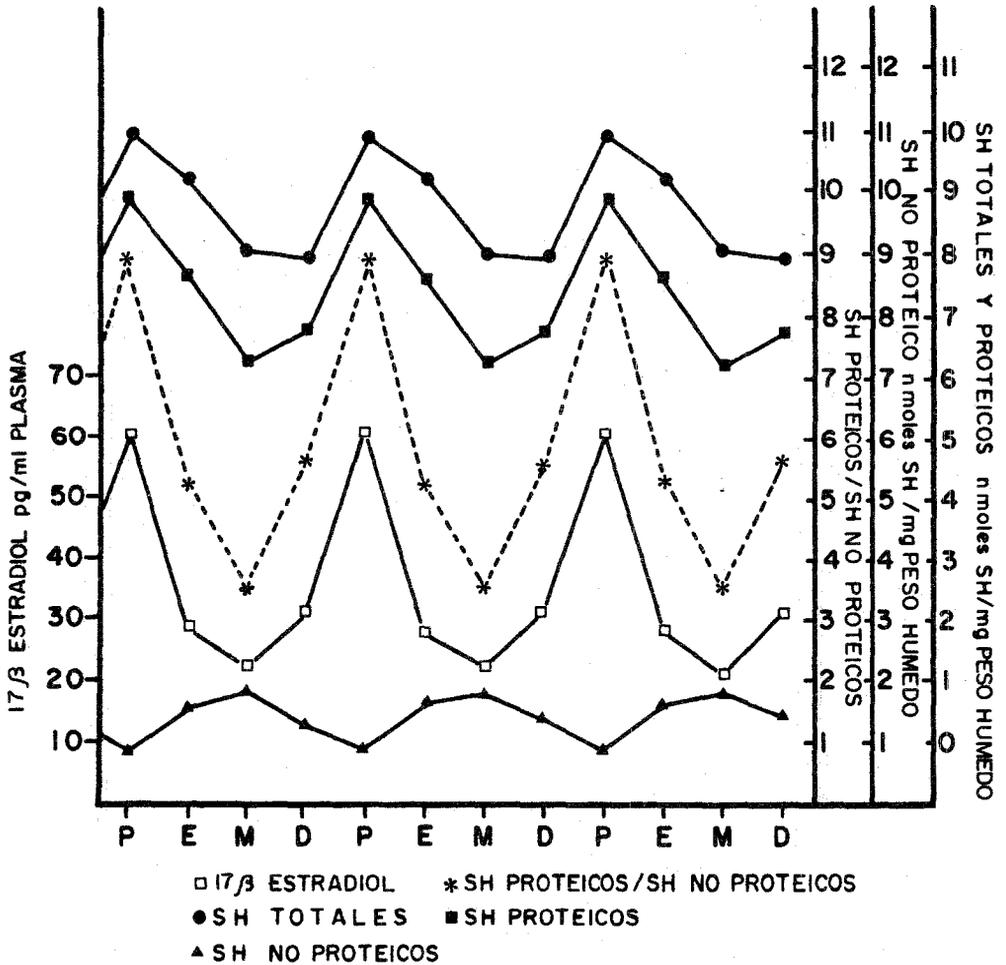
PROTEINAS



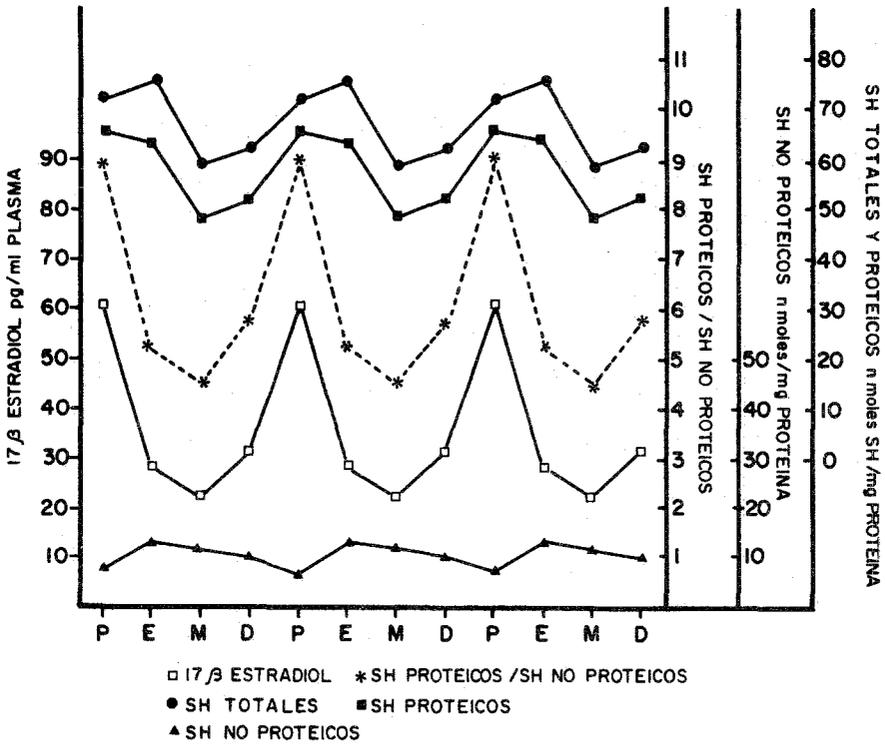
P - PROESTRO
E - ESTRO
M - METAESTRO
D - DIAESTRO

S - SITIOS DE IMPLANTACION
NS - RESTO DEL UTERO

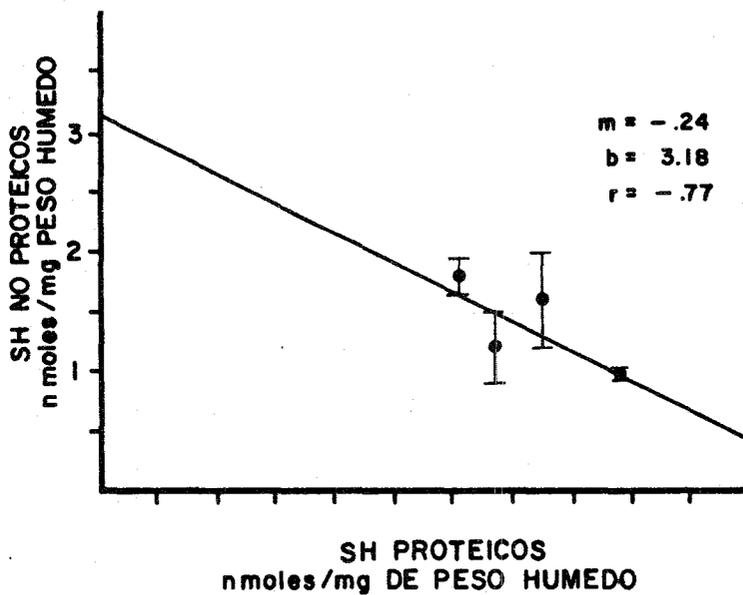
Gráfica 10.- Comparación entre los niveles plasmáticos de 17β estradiol (4) y las distintas concentraciones de grupos SH uterinos durante el ciclo estral de la rata.



Gráfica 11.- Comparación entre los niveles plasmáticos medios para cada fase de 17β estradiol (4) y las distintas concentraciones de grupos SH uterinos durante el ciclo estral de la rata.

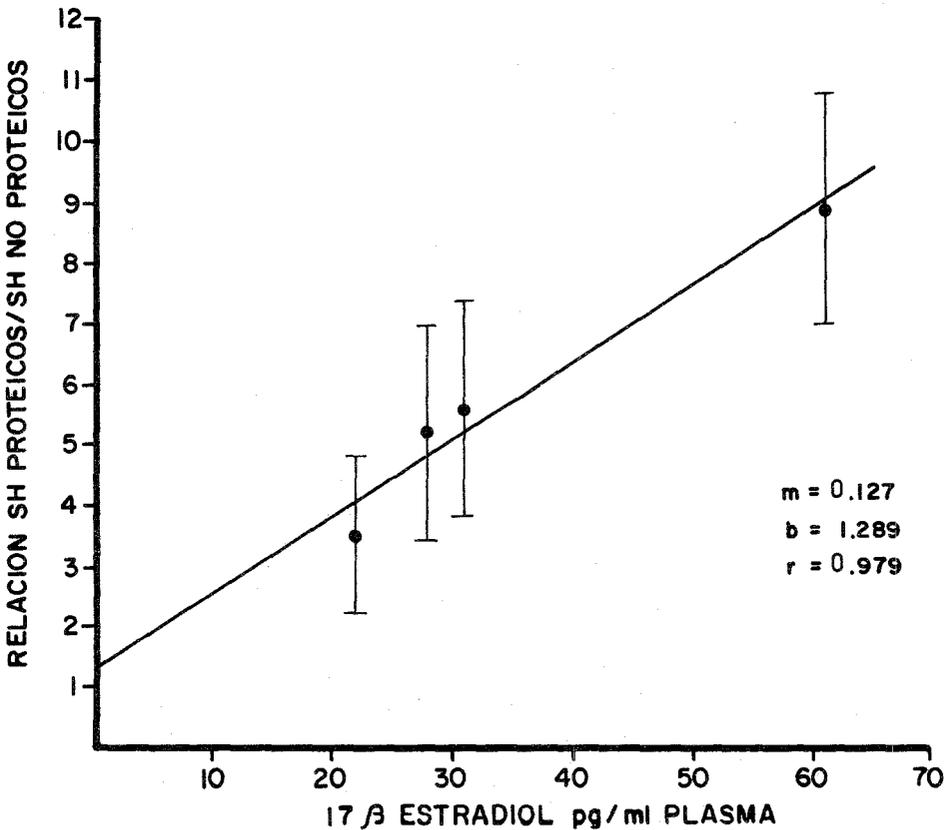


Grafica 12.- Correlación entre las concentraciones de grupos SH proteicos y no proteicos.



GRAFICA 13

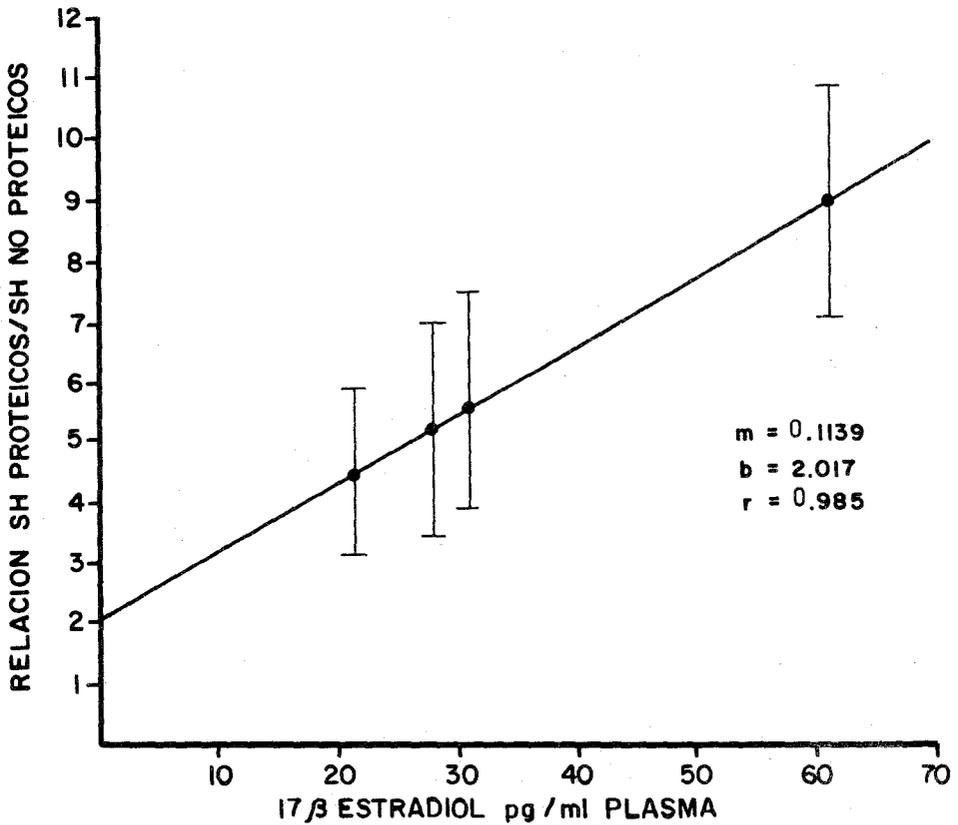
CORRELACION ENTRE LOS NIVELES DE
17 β ESTRADIOL Y LA RELACION
SH PROTEICOS / SH NO PROTEICOS *



* VALORES REFERIDOS A PESO HUMEDO

GRAFICA 14

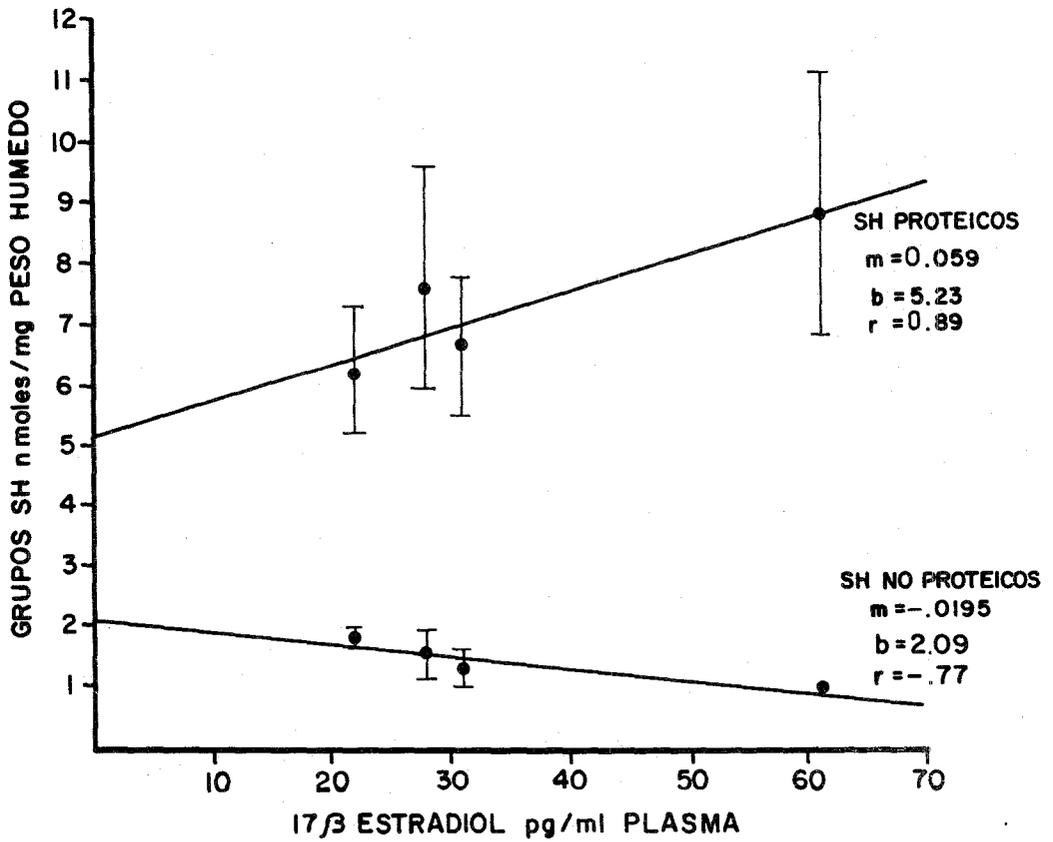
CORRELACION ENTRE LOS NIVELES DE
17 β ESTRADIOL Y LA RELACION
SH PROTEICOS / SH NO PROTEICOS *



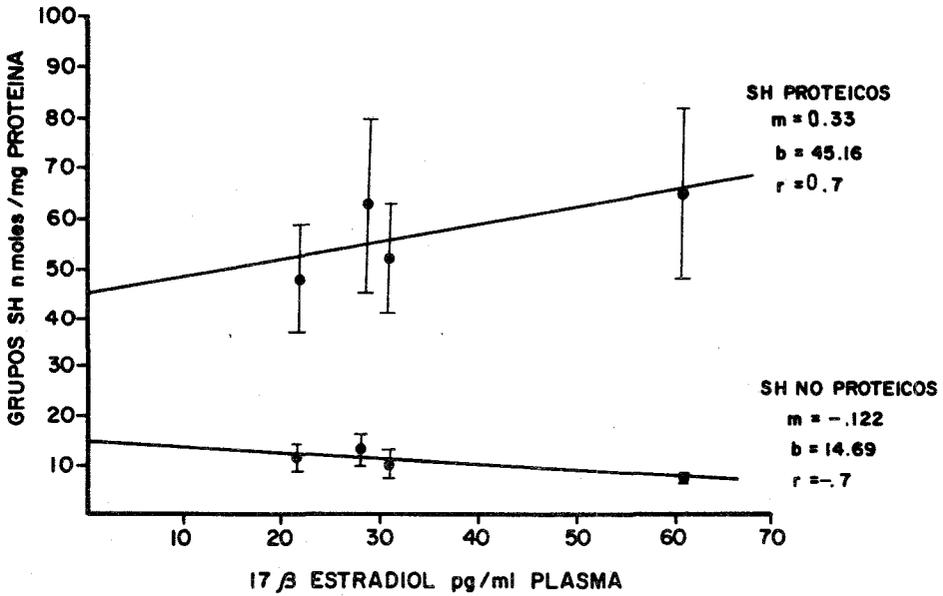
* VALORES REFERIDOS A PROTEINAS

GRAFICA 15

CORRELACION ENTRE LOS NIVELES DE 17 β ESTRADIOL CON SH PROTEICOS Y SH NO PROTEICOS



CORRELACION ENTRE LOS NIVELES DE
17 β ESTRADIOL CON SH PROTEICOS
Y SH NO PROTEICOS



CUADRO XIII

VALORES DE GRUPOS SH AL 5°DIA DE PREÑEZ Y SU COMPARACION CON LOS VALORES PREDICHOS CONFORME AL ANALISIS DE REGRESION PARA LOS NIVELES MEDIOS DE 17β ESTRADIOL REPORTADOS PARA ESTE DIA (29pg/ml PLASMA) (20)

GRUPOS SH	SH nmoles/mg peso húmedo		SH nmoles/mg proteína		
	SITIO DE IMPLANTACION	RESTO DEL UTERO	SITIO DE IMPLANTACION	RESTO DEL UTERO	
PRO-TEI-COS	E*	6.9	6.9	54.8	54.8
	O	10 + 1.6	12.4+ 2	111.4+ 17	84 + 18
NO PRO-TEI-COS	E	1.54	1.54	11.4	11.4
	O	1.4+ .19	1.57+.28	12 + 1.5	9.7+ 1.5
TO-TA-LES	E	8.45	8.45	65.7	65.7
		11.9+1.5	13.9+ 2	124+ 15	94 + 17
PROTEI-COS	E	4.97	4.97	5.32	5.32
	O	7.78+ 2	8.08+ 2	10.09+ 3	9.04+ 3

* E = Esperado

O = Observado

IV DISCUSION

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 presentan 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 (5,14).

En el presente trabajo estudiamos los cambios en contenido de grupos SH durante el ciclo estral e implantación. Como podemos notar, durante el ciclo estral estos experimentan fluctuaciones cíclicas equiparables - con las variaciones de 17β estradiol durante el ciclo (gráfica 10,11), presentando además en la mayoría de los casos una alta correlación con las concentraciones plasmáticas reportadas para esta hormona (Gráficas 13, 14,15,16)

Por tanto, creemos que sea el 17β estradiol u -

otros estrógenos los responsables de estas variaciones al menos durante el ciclo estrol, el aumento observado de grupos SH proteicos y totales concomitante al aumento de 17β estradiol podría relacionarse ya sea con el aumento de proteínas conteniendo grupos SH o con la ruptura de puentes disulfuro en las proteínas ya existentes y formación de nuevos grupos SH libres a costa de los grupos SH no proteicos (principalmente glutathion) que como puede notarse disminuyen y tienden a un comportamiento inverso tanto a 17β estradiol como a SH proteicos (Gráficas 10,11,12,15,16).

Consideramos que ocurren ambos procesos el 1° - apoyado en el aumento en grupos SH totales durante el proestro y estro (Cuadros IX, X, Gráficas 1,4,10,11), y el segundo en la relación inversa de los grupos SH no proteicos con respecto a los SH proteicos (Gráficas 10,11,12). Además la relación SH proteicos/SH no proteicos presenta mayor coeficiente de correlación con las variaciones de 17β estradiol que los grupos SH totales proteicos y no proteicos. En la Figura 13 esquematizamos nuestra hipótesis de cómo ocurren los cambios durante el ciclo estrol de los grupos SH, considerando que son regulados por el 17β estradiol, ya sea directa o indirectamente, posiblemente la forma oxidada y reducida del glutathion intervenga en este proceso (9).

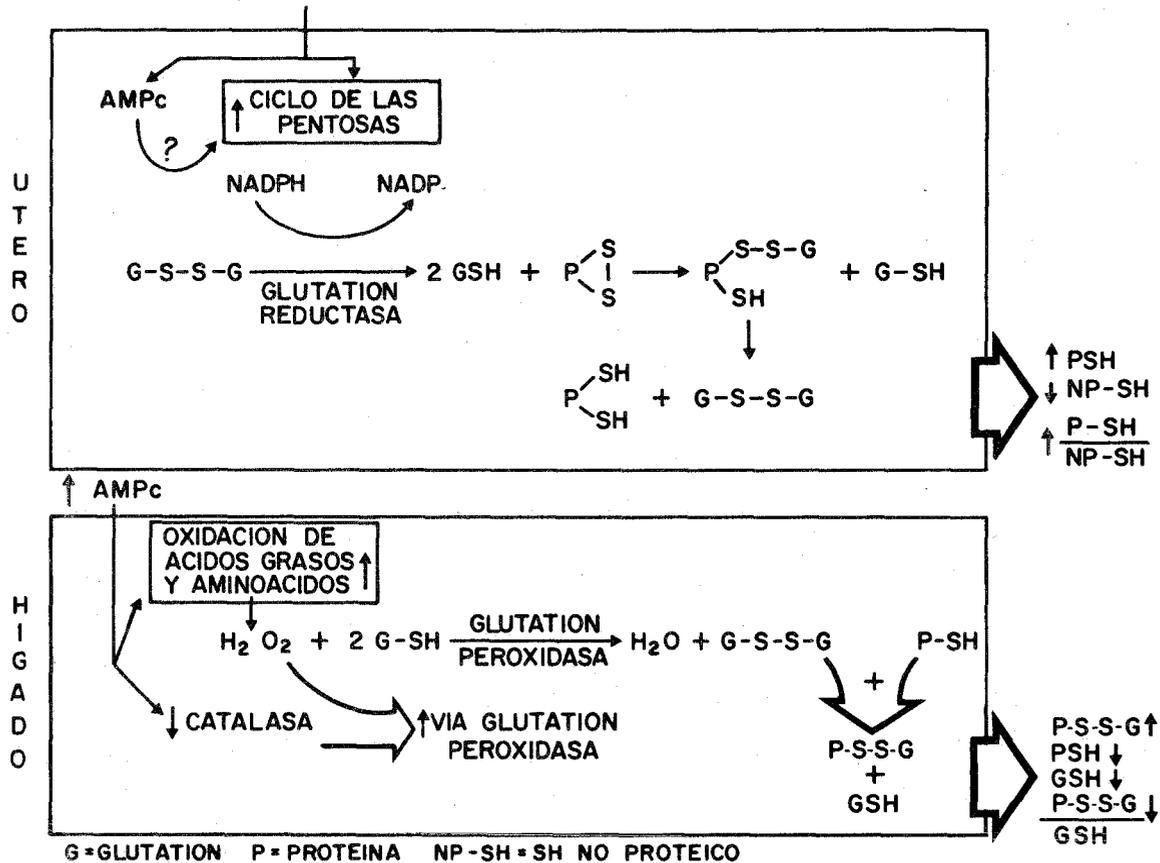
Como mencionamos anteriormente, se ha relacionado en el hígado el aumento de AMPc con aumento de proteínas S-S Glutathion y disminución de Glutathion-SH (G-SH) y proteínas-SH (39,40), en vista de que el 17β estradiol

produce aumento de AMPc (11,20,53). Esto no concuerda del todo con nuestros hallazgos, sin embargo, puede deberse a diferencias intrínsecas a ambos órganos, considérese además que en el hígado el efecto del AMPc no es directo sino que opera a través del aumento de agua oxigenada y disminución de la actividad de catalasa, como es esquematizamos en la figura 14, y que ésto puede variar según el tipo de catabolismo del útero. Nosotros consideramos que el ciclo de las pentosas (oxidativo directo) al ser incrementado por el 17β estradiol (49), proporciona cantidades suficientes de NADPH + H coenzima indispensable para la reducción de glutathion por la enzima glutathion reductasa (39), y al interaccionar el glutathion reducido con puentes disulfuro proteicos los rompe formando grupos SH proteicos libres, debiéndose demostrar la participación del AMPc en la regulación del ciclo de las pentosas endometriales.

En la Figura 14 comparamos las fluctuaciones en grupos SH que ocurren en el hígado por el aumento del AMPc (40) y en útero por el aumento de 17β estradiol según nuestro modelo.

Otro factor que podría intervenir en las fluctuaciones de SH no proteicos y proteicos durante el ciclo estrol es la acumulación de cisteina y su incorporación a proteínas, incorporación que correspondería con aumentos en SH proteicos y disminución de SH no proteicos. Se menciona sin embargo, para el hígado que el mayor componente en grupos SH no proteicos es el glutathion, por lo

Figura 11.- Comparación de el efecto del AMPc en el hígado sobre grupos SH (40) y - nuestro modelo de variación de estos grupos en útero



que le dimos mayor peso a la hipótesis planteada de interconversión de grupos SH proteicos y grupos SH no proteicos. Sin embargo, es necesario una discriminación del papel de ambos elementos (cisteína, glutatión) para poder establecer conclusiones más precisas.

El intenso aumento de grupos SH totales y proteicos al 5 ° día de preñez, no correspondientes con los niveles de 17β estradiol (Cuadro XIII) nos hace pensar en la participación de un juego hormonal más complicado propio de la preñez (secuencia, progesterona-estradiol) y a respuestas uterinas propias de esta etapa (Síntesis de nuevas proteínas características de esta etapa, aumento en la permeabilidad y extravasación de albúmina sérica (proteína con alto contenido de SH)).

Los niveles de SH no proteicos permanecen dentro del nivel de lo predicho por las curvas de regresión - (Cuadro XIII) lo que apoya esta idea, pues el aumento de SH proteicos está poco relacionado con el mecanismo propuesto en la Figura 13.

La elevación de las concentraciones de SH proteicos libres al 5° día de preñez más marcada refiriendo a proteínas en el sitio de implantación (24% más que en el resto del útero) (Cuadro 10, Gráfica 5) nos hace pensar que están relacionados con cambios propios del útero durante la implantación y que pueden tener una participación importante durante este proceso. Discutiremos ahora el papel que estos grupos podrían desempeñar.

1. Pueden participar en los mecanismos de enlace y adhesión celular trofoblasto-epitelio endometrial en base a lo fundamentado durante la introducción, pudiendo participar en sitios de reconocimiento entre las células o en la adhesión celular, por otra parte, se ha encontrado un mayor contenido de Zn^{++} en el sitio de implantación (54), este ión forma complejos con los grupos SH (30,31) y se ha postulado también que estos complejos pueden participar en la estabilización de estructuras previa a la formación de puentes disulfuro (31), se sugiere aquí que grupos SH expuestos en la superficie del epitelio endometrial forman complejos $Ti\text{ol}-Zn^{++}$ los cuales facilitan el acercamiento trofoblasto-útero por proporcionar grupos cargados positivamente a la membrana, estableciéndose complejos $Zn^{++}-ti\text{ol}$ entre el trofoblasto y epitelio endometrial con posterior formación de puentes disulfuro entre ambas estructuras (Fig. 15, 16), lo cual está sujeto a posterior comprobación experimental.
2. El aumento de grupos SH puede ser un reflejo de disminución en la estabilidad de las estructuras del endometrio, así como una unión más laxa de las células deciduales entre sí o con las fibras de tejido conectivo, lo cual facilitaría la posterior invasión del blastocisto al endometrio que ocurre en la tarde del 5° día de

preñez (5). Nos apoyamos en el hecho de que en el espermatozoide la estabilidad y resistencia a diversos agentes (detergentes, actinomicina D, etc) ha sido relacionado con la disminución de grupos SH libres y aumento de puentes disulfuro (30,31) y por otro lado, las explicaciones referentes a la invasión del endometrio - por el blastocisto postulan desplazamiento mecánico y cambios citolíticos y degradativos en el endometrio (9,11,18,52). La ruptura de puentes bisulfuro y aumento de grupos SH libres podría por tanto facilitar este proceso.

3. Por último, consideramos que los grupos SH pueden guardar una estrecha relación con el metabolismo de glucosa y su regulación durante la implantación, pues se conoce que la actividad de fosfofructocinasa (39,40) y piruvato cinasa - (40,55) es mayor cuando estas enzimas presentan sus grupos SH en la forma reducida. Como vemos en la Tabla II, la actividad de estas enzimas se encuentra aumentada en el sitio de implantación (11,20,56), estas enzimas se encuentran relacionadas con la glucólisis la cual se encuentra aumentada en ellos (57).

Como podemos notar, la participación funcional de los grupos SH en diversos procesos biológicos es múltiple y su estudio no ha sido en ningún modo agotado. Durante la implantación presenta diversas posibilidades de acción prácticamente no estudiadas, cuyo entendimiento

aumentaría la comprensión de este proceso, abriendo la -
posibilidad de nuevos métodos anticonceptivos, así como
una mayor comprensión de posibles causas de infertilidad
etc.

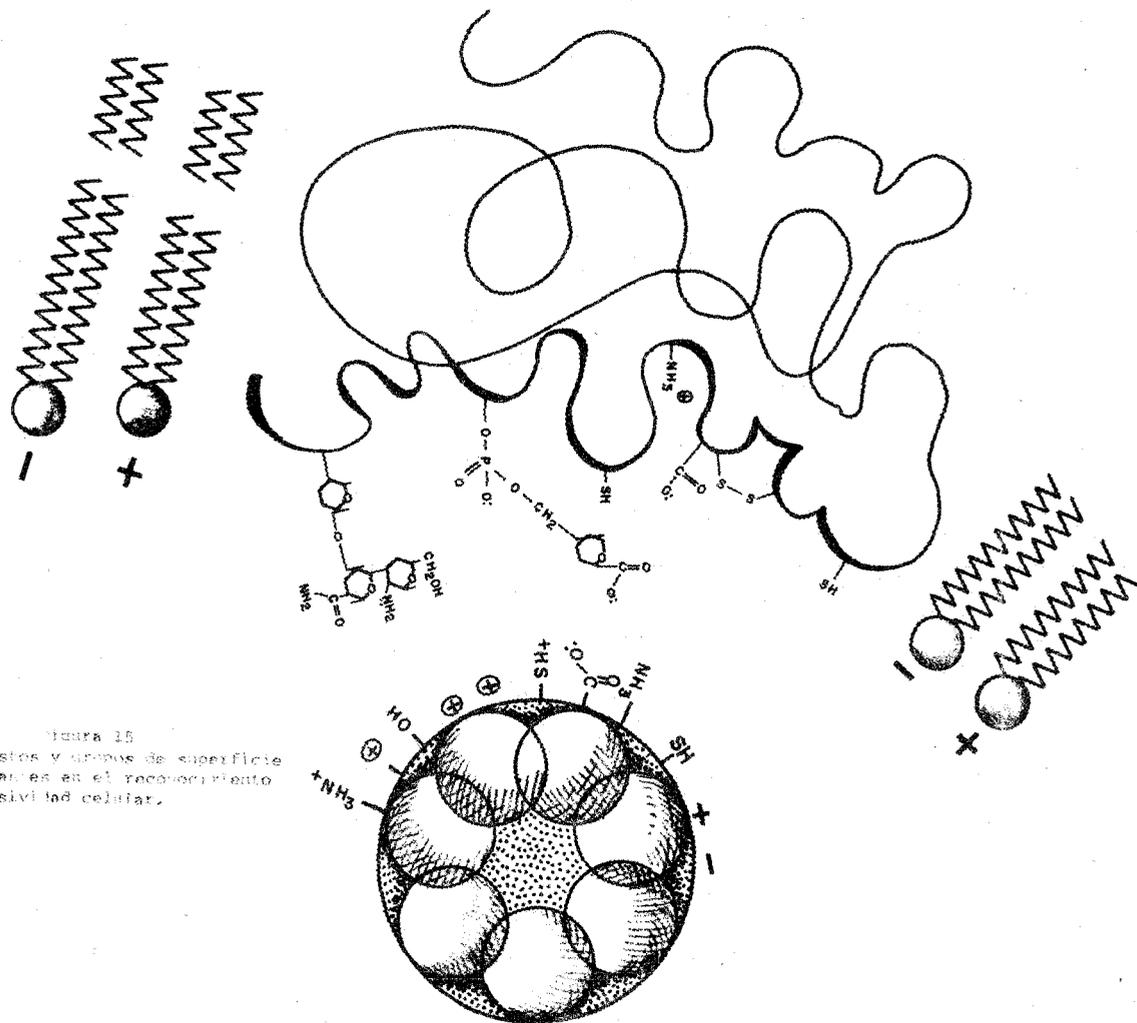
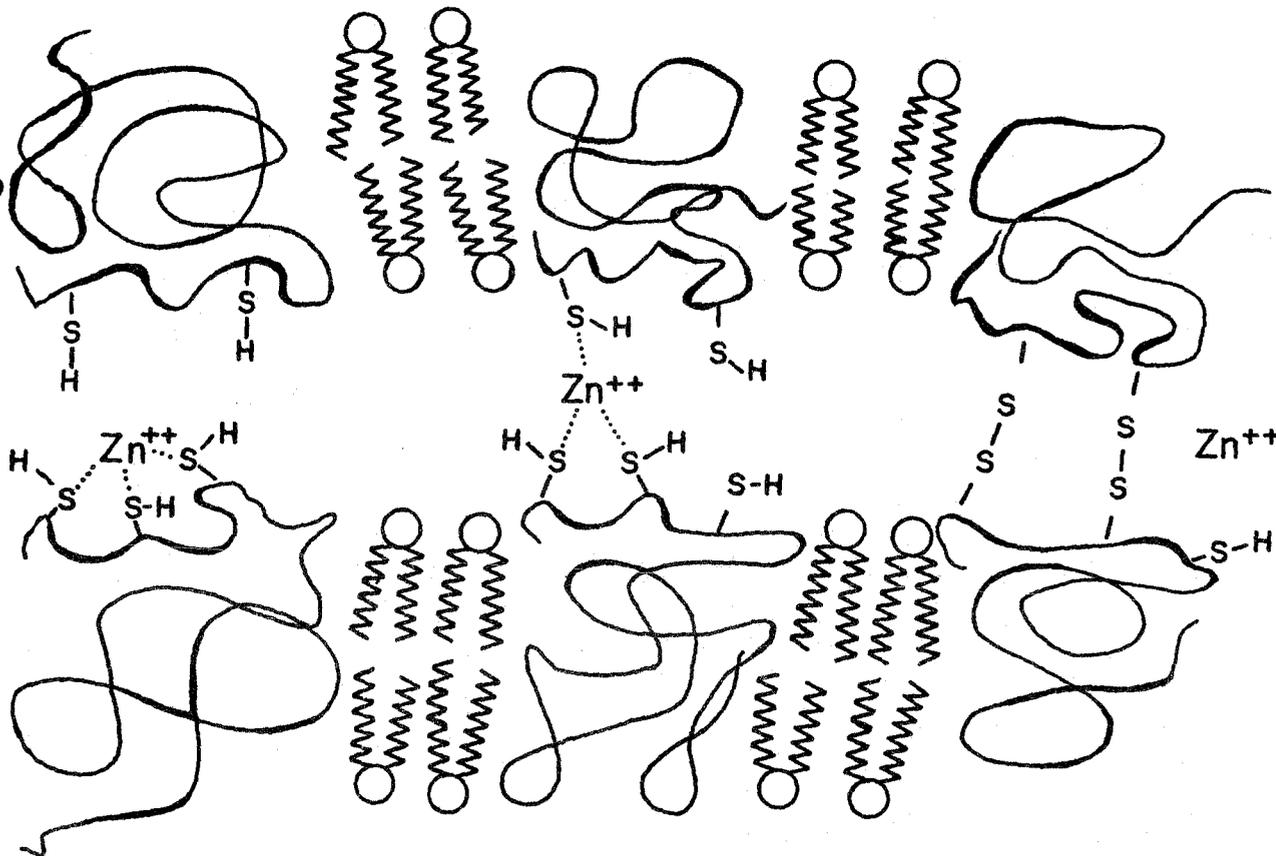


Figura 15
 Compuestos y grupos de superficie
 importantes en el reconocimiento
 y adhesividad celular.

MEMBRANA
DEL
TROFOBLASTO



MEMBRANA
DEL
EPITELIO
UTERINO

Figura 16. Hipótesis acerca de la participación de complejos Zn^{++} -tiol en el proceso de adhesión durante la implantación.

V CONCLUSIONES

Los grupos SH presentan un patrón de variación cíclica durante el ciclo estral, caracterizado en caso de grupos SH proteicos y totales por una máxima concentración durante el proestro y un mínimo en el metaestro, tendiendo a ocurrir lo inverso en grupos SH no proteicos.

Todas estas variaciones están correlacionadas con los niveles de 17β estradiol en el plasma, hormona que posiblemente los regule.

Suponemos que la variación de los grupos SH puede ocurrir conforme a lo propuesto en la Figura 13, ocurriendo una mutua interconversión SH proteicos, SH no proteicos durante el ciclo estral.

Durante el quinto día de embarazo existe un notable aumento en los grupos SH proteicos y totales con respecto al ciclo estral, siendo más pronunciado en el sitio cuando referimos a proteínas. Esto se considera característico del embarazo y posiblemente relacionado con la secuencia progesterona-estrógenos requerida para la ovulación o con respuestas características de este proceso.

Este aumento podría estar relacionado con la importancia funcional de los grupos SH durante la implantación postulándose su posible intervención en los mecanismos de contacto y adhesión trofoblasto-epitelio uterino, disminución de la estabilidad del enlace entre las células deciduales para facilitar la penetración del blastocisto al endometrio y su participación en el metabolismo de glucosa.

VI RESUMEN

Las variaciones de grupos SH totales, proteicos y no proteicos durante el ciclo estral fueron determinadas en ratas Long Evans vírgenes de dos a tres meses de edad, así como la concentración de estos grupos al quinto día de embarazo en sitios de implantación, y en el resto del útero, las determinaciones de grupos SH fueron determinadas acorde al método de Sedlack y Lindsay (44), determinándose proteínas por el método de microbiuret como parámetro de referencia.

Se encontraron variaciones cíclicas de los grupos SH durante el ciclo estral, los grupos SH totales, proteicos y la relación grupos SH proteicos/grupos SH no proteicos presentan un máximo en proestro y un mínimo en metaestro, tendiendo los grupos SH no proteicos a lo inverso. Se encontró buena correlación de las variaciones mencionadas y los niveles de 17β estradiol, proponiéndose un modelo del efecto del 17β estradiol sobre las variaciones en grupos SH (Fig. 13).

Durante el quinto día de preñez se encontró elevación de grupos SH proteicos y totales de un 20 a 40 % más que la concentración más alta durante el ciclo estral, por lo que relacionó con cambios propios de la preñez. Se discuten como posibles funciones de los grupos SH durante la implantación: el contacto y adhesión trofo

blasto-epitelio uterino, facilitación de la penetración del blastocisto al endometrio y su posible participación - ción en el aumento de la glucolisis.

VIII BIBLIOGRAFIA

1. Fox, R., Lair, C (1970): Sexual cycles , en: Hafez, E. (Edit.) Reproduction and breeding techniques for laboratory animals. Lea & Febiger, Philadelphia, E.U.A pp. 107-122.
2. Patten, B. (1964): Foundations of embriology, Mc Graw-Hill, Tokio Japón, pp. 68-79.
3. Ganong, W. (1976): Manual de fisiología médica. Editorial El Manual Moderno, México. pp. 379-389.
4. Kalra, P. Kalra, S. (1977): Temporal changes in the hypothalamic and serum luteinizing hormones-releasing hormone (LH-RH) levels and the circulating ovarian steroids during the rat oestrous cycle. Acta Endocrinológica. 85: 449-455.
5. Pshychoyos, A. (1973): Hormonal control of ovoimplantation. Vitamins and hormons. 31, 201-256.
6. Enders, A. (1970): Fertilization, cleavage and implantation, en: Hafez, E. (Edit.) Reproduction and breeding techniques for laboratory animals, Lea & Febiger. Philadelphia, EUA. pp. 137-156.
7. Wimsatt, W.A. (1975): Some comparative aspects of implantation. Biol. Reprod. 12: 1-7.
8. Collado, M. Gil, M. Castro, G. Hicks, J. (1978): Nuevos conceptos relacionados con la implantación. Ginec. Obstet. Mex. (44): 261: 63-84.

9. Enders, A. (1976): Anatomical aspects of implantation
J. Reprod. Fertil. Suppl. 25: 1-15.
10. Finn, C., Porter, O. (1975); Implantation of ova. En
The uterus. Eleck Science London, pp. 18-56.
11. Gil, M. Collado, M., Hicks, J. (1978): Nuevos concep-
tos relacionados con la implantacion. III. Caracterís-
ticas bioquímicas. Ginec. Obstet. Mex. 44: 491-505.
12. Ljunokuist, I. Nilsson, O. (1974): Blastocyst-endome-
trial contact and pontamine blue reaction during -
normal implantation in the rat. J. Endocr. 60: 149-151
13. Ward, O., Donovan, B. (1971): Implantation and induced
decidualization of the uterus in the guinea pig as
indicated by pontamine blue. Biol. Reprod. 5: 220-273
14. Gil, M., Collado, M., Hicks, J. (1978): Nuevos con-
ceptos relacionados con la implantación. II. Reacción
decidual. Ginec. Obstet. Mex. 47: 212-224.
15. Schlafke, S., Enders, A. (1975): Celular basis of inter-
action between trofoblast and uterus at implantation.
Biol. Reprod. 12: 41-65.
16. Nilsson, O., Lindavist, J., Ronquist, G. (1975): Blas-
tocyst surface charge and implantation in the mouse.
Contraception 11: 441-450.
17. Levin, A. (1973): A critique on the relevance of mem-
bral potentials to the mechanism of nidation. J. End.
54: 141-142.
18. Boving, B., Larson, J. (1973): Implantation, en. Hafez
E. Human Reproduction conception and contraception,
Hafer & Evans, London, Inglaterra, pp. 133-156.

19. Pshychoyos, A. (1976): Hormonal control of uterine - receptivity for nidation. J. Reprod. Fert. Suppl. 25: 17-28.
20. Healf, P (1976): Biochemical aspects of implantation. J. Reprod. Fert. Suppl. 25: 24-52.
21. Ganguly, L. et al (1974): Sialic acid and sialidase activity in human endometrial tissue, uterine fluid and plasm under different condition of uterine disfunc tion. J. Reprod. Fert. 46: 383-394.
22. Rajalaksumi, E. et al (1971): Changes in uterine sialic acid and glycogen during early pregnancy in the rat. J. Reprod. Fertil. 50: 40-55.
23. Mercado, E., Carvajal, G., Reyes, A. (1976); Sulphydril groups on the spermatozoa membrane, a study with a new fluorescent probe for SH groups. Biol. of Reprod. 14: 632-640.
24. Reyes, A., Mercado, E., Rosado, A. (1974): Participación de grupos SH en la estructura y fisiología del - espermatozoide humano. En: Mora, J. Estrada-O, S. Martuscelli, J. (Eds). Los perfiles de la bioquímica en México. UNAM. México. pp. 263-279.
25. Sutherland, R., Rothstein, A.; Weed, R. (1967): Erythrocyte membrane sulphydryl groups and cation permeability. J. Cel. Physiol. 69: 185-198.
26. Vanstevenick, J. Weed, R., Rothstein, A. (1965): Localization of erythrocyte membrane sulphydryl group essential for glucose transport. J. Gen. Physiol. 48: 617-632.
27. Green, F.C. (1967) Erythrocyte membrane sulfhudryl - groups and Rh antigenic activity. Immunochem. 4: 247 257.

28. Rosado, A., Velázquez, A., Lara-Ricalde, R. (1973): Cell polarography II. Effects of neuraminidase and fluid follicular upon the surface characteristics of human spermatozoa. *Fert. & Steril.* 24: 349-354.
29. Reyes, A., Mercado, E., Goicoechea, B., Rosado, A. (1976) Participation of membrane sulfhydryl groups in the epididymal maturation of human and rabbit spermatozoa. *Fert. & Steril.* 27: 1452-1458.
30. Calvin, H., Yui C. Bedford, J. (1973): Effects of epididymal maturation, Zinc (11) and copper (11) on the reactive sulfhydryl content of structural element in rat spermatozoa. *Exp. Cell Res.* 81: 333-341.
31. Calvin, H., Bleau, G. (1974): Zinc-Thiol complexes in keratin-like structures of rat spermatozoa. *Exp. Cell Res.* 86: 280-284.
32. Li, T-K (1975) The glutathione and thiol content of mammalian spermatozoa and seminal plasma. *Biol. of Reprod.* 12: 641-646.
33. Lehninger, A. (1977) *Biochemistry.* Worth Publishers New York, E.U.A.
34. Schoot, B., Bepont, J., Bunting, S. (1978) Studies on $(\text{Na}^+ - \text{K}^+)$ - activated ATPase. XLII evidence for two classes of essential sulfhydryl groups. *Biochim. Biophys. Acta.* 522: 602-613.
35. George, J., Rao, V. (1975) The role of sulfhydryl groups in cellular adhesiveness. *J. Cell Physiol.* 85: 457-555.
36. Hicks, J.J., Guzmán, A.M. (1979): Inhibition of implantation by intraluminal administration of concanavalina A. in mice. *Contraception* 20: 129-136.

37. Sherman, M., Atienza-Samuels, S. (1978): In vitro studies on the surface. Adhesiveness of mouse - blastocyst, En: Ludwig, H., Tauber, P., Human Fertilization, Georg Thiems Publishers, Stuttgart, Alemania. pp. 179-183.
38. Gramberg, J., Ballard, P. (1937): The role of - sulfhydryl groups in the binding of glucocorticoids by cytoplasmic receptors of lung an other mammalian tissues. Endocrinology 100: 1160-1168.
39. Freedman, R. (1979): How many enzymes are responsi**u**bles for the several celullar processes involving thiol, protein-disulphide interchang**s** ?. Febs Letters, 97: 201-210.
40. Issacs, J., Binkley, F, (1977): Cyclic ami-depend**e**nt control of the rat hepatic glutathione disulfide-sulfhydryc ratio. Biochim. Biophys, Acta.498 29-38.
41. Daunterr, B. (1977): Trace metals (Cu,Mc, Zn,Fe) sulfhydrill and disulphide of cervical mucus. - Contraception 15: 543-552.
42. Billet, F. (1975): Practical studies of animal - development, Chapman and Hall. London, Inglaterra, pp. 185-193.
43. Ljunkuist, S., Nilsson, O (1974): Blastocyst endometrial contact and pontamine blue reaction - during normal implantation in the rat. Endocrinology 60: 142-154.
44. Habeeb, F. (1966): Reaction of protein sulfhydryl group with Ellman's reagent, en: Collowick, S. - Kaplan, N.: Methods in enzymology, Academic Press New York, E.U.A. pp. 457-464.

45. Spiegel, M. (1970): Estadística. Mc Graw-Hill, - México, pp. 188-191.
46. Surani, M. (1976): Uterine luminal proteins of - the time of implantation in rats. J. of Reprod. - and Fertil. 48: 141-145.
47. Boshier, D. (1976): Effects of the rat blastocyst on neutral lipids and non specific sterases in the uterine luminal epithelium at the implantation area J. of Reprod. and Fertil. 46: 245-247.
48. Teran, J. (1978): Actividad de tirosina aminotransferasa y triptofano dioxigenasa en el útero de la rata. Tesis Profesional, Universidad Iberoamericana. México.
49. Surani, M., Heald, P (1971): Changes in enzymes - of carbohydrate metabolism in rat uterus during - early pregnancy. Acta Endocrinológica 68: 805-816.
50. Hall, K (1973): Lactic dehidrogenase and other - enzymes in the mouse uterus during the perimplantation period of pregnancy. J. of Reprod. and Fert. 34: 79-91.
51. Moulton, B. (1974): Ovum implantation and uterine lysosomal enzyme activity. Biol. of Reprod. Co, 543-548.
52. Venkinson, E. (1977): The in vitro blastocyst - outgrowth system as a model for the analysis of peri-implantation development. En: Johnson, M. -)Edit.) Development in mammals Vol. 2 North Huzcand, New York, E.U.A. pp. 151-172.
53. Flandroy, L., Galand, P. (1978): Changes in cGMP

- y cAMP. Content in the estrogen-stimulated rat uterus: temporal relationship with other parameters of hormonal stimulation with other parameters of hormonal stimulation. Journal of Cyclic Nucleotide Research. 9: 145-158.
54. Hernández, L. (1980): Concentración de algunos cationes en el sitio de implantación de la rata. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias, U.N.A.M.
55. Rosado, A., Hernández, O., Aznar, R., Hicks, J. (1976): Comparative glycolitic metabolism in the normal and in copper treated human endometrium. Contraception 13: 17-29.
56. Surani, M., Heald, P. (1971): The metabolism of glucose by rat uterus tissue in early pregnancy. Acta Endocrinológica 66: 16-24.
57. Bennet, J., Vickery, B., (1970). Rats and mice. En Hafez, E. (Editor). Reproduction and Breeding - techniques for laboratory animals. Lea & Feabiger. Philadelphia. E.U.A. pp. 299-315.
58. Itzhaki, R., Gill, D., (1964): A method microbiuret for estimating proteins. Analitical biochemistry 9: 401-410.