

Trabajos Originales

EXPRESIÓN DE AZÚCARES ENDOMETRIALES Y DEL OVIDUCTO DURANTE EL CICLO REPRODUCTIVO DE LA CONEJA

Jairo García G.¹, Ximena Arcila L.¹, John Fidel Cano F.¹, Verónica Isaza A.¹, Ana Cristina Tovar A.¹, Aristides Valencia R.¹, Fernando Moreno M.¹

¹Instituto de Ciencias de la Salud (CES). Medellín, Colombia.

RESUMEN

Antecedentes: Numerosos factores han sido implicados en el proceso de implantación, entre ellos se destaca la presencia de glicoproteínas de superficie. Se ha demostrado en ratones, entre otros, que los tipos y cantidades de azúcares de superficie varían según el período del ciclo reproductivo en el que se encuentran, lo que podría sugerir un importante papel de estas variaciones en la mayor receptividad del útero al blastocisto. *Objetivos:* Describimos los carbohidratos de superficie del aparato reproductor de la coneja, correlacionándolos con los cambios en sus genitales externos, y con los distintos períodos de su ciclo reproductivo. *Métodos:* Se usaron 15 conejas, ovuladoras coitales, en las que se identifica el período del ciclo según cambios en sus genitales externos; 5 tenían vulva blanca (poca receptividad al macho y bajo índice de embarazos), 5 tenían vulva rosa, y 5 roja (máxima receptividad al macho y alto índice de embarazos). Se estudiaron variaciones en los azúcares de superficie en el oviducto, útero distal, útero medio y cuello uterino, representados por el grado de tinción de 5 lectinas: eritrina cristagalli (ECL), dolichos biforus agglutinin (DBA), ulex europaeus agglutinin-1 (UEA-1), pisum sativum agglutinin (PSA) y artocarpus integrifolia (Jacalin). *Resultados:* Hubo predominio del disacárido N-acetilgalactosamina α 1-3N-acetilgalactosamina (DBA) en todos los períodos y lugares del aparato reproductor, exceptuando el período de vulva roja en útero medio, donde prevalece la beta galactosa (Jacalina). Los residuos de manosa/ α glucosa (PSA), presentan alta reacción en los períodos de vulva rosa y roja en el oviducto y útero distal. La galactosa β 1-4 N-acetil glucosamina (ECL) y la L-fucosa (UEA-1) tienen bajo nivel de expresión en todos los sitios y períodos. *Conclusión:* La ausencia del disacárido N-acetilgalactosamina α 1-3N-acetilgalactosamina en el período de vulva roja y en el útero medio y la prevalencia de la beta galactosa en el mismo período y lugar es consistente con los datos encontrados por otros autores, lo cual ayuda a confirmar la importancia de estos residuos para regular el proceso de implantación.

PALABRAS CLAVES: *Implantación, lectinas, glicoproteínas endometriales, glicoproteínas del oviducto*

SUMMARY

Background: Several factors have been implied in the process of implantation, among them the presence of glycoproteins of the surface is the most outstanding. It has been showed in mice; among others; that the kind and quantity of sugars of surface varies according to the cycling reproductive period in which they are found, which it may suggest an important role of these variations in a major receptivity of the uterus to the blastocyst. *Objectives:* It describes the surface carbohydrates of the female rabbit reproductive system

making an analogy with the changes in the outer genitals, and with the different cycles of the reproductive period. *Method:* In this study 15 the female rabbits were used which ovulated during coitus, and in which it could identify the cycling period found according the changes of the outer genitals, five had white vulva (low male receptivity and low index of pregnancy), five had them pink, and the other five had them red (high male receptivity and high index of pregnancy), it was studied variations of surface sugars in the oviduct, distal uterus, middle uterus and cervix of the rabbits represented by the degree of tincion of 5 different lectinas: eritrina cristagalli (ECL), dolichos biforus agglutinin (DBA), ulex europaeus agglutinin (UEA-1), pisum sativum agglutinin (PSA), and artocarpus intergifolia (Jacalin). *Results:* It was found superiority of disaccharide N-acetylgalactosamine α 1-3 N-acetylgalactosamine (DBA) in all periods and places of the reproductive system with the exception of the red vulva period in the middle uterus, where the β -galactose prevails (Jacalin). The residues of manose/ α glucose (PSA), present in high reaction in the pink and red vulva periods the oviduct and distal uterus. The galactose β 1-4 N-acetyl glucosamine (ECL) and the L-Fucose (UEA-1) have a low level of expression in all places and periods. *Conclusion:* The absence of disaccharide N-acetylgalactosamine α 1-3 N-acetylgalactosamine in the red vulva and the middle uterus period and the prevailing of the β -galactose in the same period and place it is consistent with the information found by other authors, this may help to confirm the importance of these residues to regulate the process of implantation.

KEY WORDS: *Implantation, lectins, endometrial glycoproteins, oviduct glycoproteins*

INTRODUCCIÓN

Para una adecuada implantación es necesario que haya receptividad del útero al blastocisto, y que el trofoblasto se interrelacione con el endometrio. Esta parte del proceso es crítica para que el embarazo pueda llevarse a término y es considerada como una secuencia de interacciones físicas y bioquímicas entre el útero y el embrión. Esta correspondencia entre trofoblasto y endometrio es iniciada gracias a la interdigitación de microvilli y a la aposición de membranas celulares entre el trofocotodermo del blastocisto y el epitelio uterino (1).

Se han postulado numerosas hipótesis acerca de los diversos factores que pueden servir como señales que inician o perpetúan el contacto e incorporación del embrión al útero, el cual debe poseer a su vez un ambiente apropiado para la supervivencia de este individuo. Estas señales consisten en el aumento de los niveles de estrógenos, los cuales influyen en la modulación de agentes pro-inflamatorios en el endometrio adyacente, tales como el aumento del factor del complemento C3 en la fase proliferativa (2); también, en la regulación positiva de las moléculas de adhesión celular (CAM) en el epitelio glandular por parte de la progesterona y en el epitelio luminal por parte de los estrógenos (3,4). Así mismo, se ha encontrado que la progesterona está implicada en la modulación directa de glicoproteínas, como la mucina Muc1, distribuida en las células epiteliales (5). Además de los estrógenos y la progesterona también se han implicado como factores modu-

ladores las prostaglandinas (1), el factor temprano del embarazo (6), algunas integrinas (1,7), y carbohidratos de superficie como parte del glicocalix, específicamente glicoproteínas de superficie celular implicadas en reconocimiento, adhesión, fusión y diferenciación celular (8).

Las manifestaciones físicas del ciclo en la coneja son discretas y variables, excepto en la coloración de la vulva (de rojo a blanco con rosa intermedio), que define el comportamiento ante el macho con cierta precisión. Si está roja, la receptividad para el macho se acerca al 100% (período de celo), mientras que cuando es blanca sólo alcanza un 20,6% (9). Si la hembra acepta el macho, se asume que está en fase estral (período de celo), momento apto para la gestación. Así mismo, se ha demostrado que las conejas que se aparean cuando la vulva está roja ovulan en un porcentaje del 84,6%, y quedan gestantes 95,6% de estas. Comparando estos datos con los que se dan con la vulva blanca, donde menos del 5% ovulan, y un porcentaje aún menor quedan gestantes (9).

Se puede deducir que todo el aparato genital de la coneja está preparado en el período de celo para recibir el embrión, y que esta preparación podría incluir la presencia o ausencia de determinados carbohidratos de superficie. Con este estudio, intentamos conocer la variación de los azúcares endometriales en el momento del celo; y determinar cuáles son específicamente estos azúcares. Estos resultados permitirán sentar las bases para identificar el papel de los azúcares en la mayor receptividad del útero al ataque del blastocisto.

MATERIAL Y MÉTODO

Se usaron 15 conejas de raza Ruso-Californiano de cinco libras de peso, criadas en cautiverio. De éstas, 5 tenían vulva roja, 5 rosa y 5 blanca, lo cual fue determinado por tres examinadores diferentes. Posteriormente, las conejas fueron sacrificadas para la extracción en bloque del útero, del cual se disecaron y marcaron las diferentes zonas a estudiar como oviducto, útero distal, útero medio y cuello uterino.

Las muestras se fijaron en preparación de Carnoy durante tres horas y se procesaron para su estudio. Los bloques fueron seccionados y a los cortes resultantes se les agregó en forma secuencial lectina específica biotilada por 1 hora, posteriormente, se hizo una solución con 12 μ l de neutravidina, 12 de peroxidasa biotilada, y 2,4 ml de PBS, y se dejó una hora sobre las muestras, por último se reveló la presencia de lectina con una solución de ácido etil carbamida (AEC). Las lectinas (Sigma) que se utilizaron fueron: eritrina cristagalli (ECL) específica para el disacárido galactosa β 1-4 N-acetil glucosalina; dolichos biforus agglutinin (DBA) específica para el disacárido N-acetilgalactosamina β 1-3N-acetilgalactosamina; ulex europaeus aglutinin-1 (UEA-1) específica para L-fucosa; pisum sativum agglutinin (PSA) el cual se une los azúcares manosa/ α glucosa; y artocarpus integrifolia (Jacalin) la cual une a β -galactosa.

Para confirmar la especificidad de la lectina por el azúcar respectivo, algunas secciones histológicas adyacentes se incubaron con una mezcla de la lectina biotilada (5 μ gr/dl) con el azúcar inhibitorio apropiado 0,1M. La mezcla lectina

biotilada más el azúcar se preparó dos horas antes de usarse. Los azúcares inhibitorios que se utilizaron fueron los siguientes: galactosa para ECL y jacalina; N acetil galactosamina para DBA; manosa y glucosa para PSA; y fucosa para UEA-1 (10).

El material que se obtuvo se analizó al microscopio de luz por tres observadores diferentes. El grado de tinción de carbohidratos se evaluó de acuerdo a una escala subjetiva desde ninguna reacción (0 cruces), trazas (una cruz +); moderada (dos cruces ++) y máxima tinción (tres cruces +++). Se aplicó esta escala para cada una de las lectinas analizadas, en todas las partes estudiadas. Una vez establecidos estos valores, se reagruparon en dos grupos principales: el primero, de alta reacción que incorpora los grupos de tinción moderada y máxima (++, +++); el segundo de baja reacción reúne los de tinción mínima (0, +).

Finalmente se realizaron comparaciones entre las muestras, para lograr establecer diferencias entre los perfiles glicosídicos de las muestras estudiadas.

RESULTADOS

A nivel macroscópico se encontró diferencia entre los úteros y oviductos de las conejas con vulva blanca, rosa y roja. La primera tenían un útero largo, delgado, cauchoso y blanco; mientras que la de vulva roja tenían un útero edematoso, grueso, acortado y rojizo (Figuras 1 y 2).

Los resultados, según el grado de reacción alto (++, +++), o bajo ausente (0, +) para cada lectina están expresados en las Tablas I y II. Como

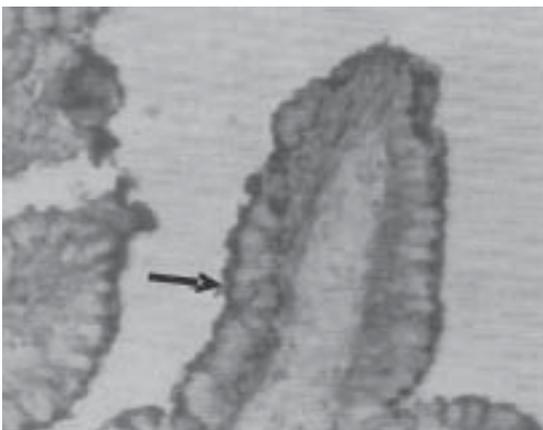


Figura 1. Oviducto de coneja con vulva blanca, con grado de reacción de +++. Con DBA (10X).

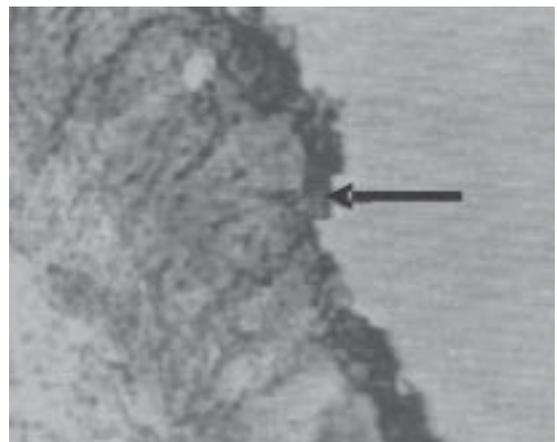


Figura 2. Oviducto de coneja con vulva blanca, con grado de reacción de +++. Con DBA (40X).

Tabla I

DESCRIPCIÓN DEL PERFIL GLICOSÍDICO EN LOS DIFERENTES LUGARES DEL APARATO REPRODUCTOR DE LAS CONEJAS SEGÚN EL PERÍODO DEL CICLO, PARA UNA ALTA CONCENTRACIÓN DE AZÚCARES (n=15)

Lugar del aparato reproductor	Vulva blanca (n=5)		Vulva rosa (n=5)		Vulva roja (n=5)	
	Azúcar	n	Azúcar	n	Azúcar	n
Oviducto	GalNAc α 1-3GalNAc	5	GalNAc α 1-3GalNAc	5	GalNAc α 1-3GalNAc	5
	Gal β 1-3GalNAc	5	Gal β 1-3GalNAc	5	Gal β 1-3GalNAc	5
			α Man/ α Glu	5	α Man/ α Glu	5
Útero distal	GalNAc α 1-3GalNAc	5	GalNAc α 1-3GalNAc	5	GalNAc α 1-3GalNAc	5
			α Man/ α Glu	5	Gal β 1-3GalNAc	5
Útero medio	GalNAc α 1-3GalNAc	5	GalNAc α 1-3GalNAc	5	Gal β 1-3GalNAc	5
Cuello uterino	GalNAc α 1-3GalNAc	5	GalNAc α 1-3GalNAc	5	GalNAc α 1-3GalNAc	5

Reacción calificada como dos y tres cruces (++, +++).

se puede observar en las dos tablas, el grado de tinción de la lectina DBA (galNAc α 1-3galNAc) permanece alto en todos los sitios y períodos del ciclo reproductivo, sin diferencias entre éstos, sólo siendo desplazado por la jabalina (gal β 1-3galNAc) durante el período de vulva roja, en el útero medio. Otro hallazgo interesante, es la presencia de

tinción moderada con la lectina PSA (α man/ α gluc) y la jacalina (gal β 1-3galNAc) en el oviducto, en los períodos de vulva rosa y roja, acompañando la reacción de la DBA. En cuanto a las lectinas ECL (gal β 1-4glcNAc) y UEA 1 (α L-fucosa), presentaron baja expresividad en todos los sitios y períodos.

Tabla II

DESCRIPCIÓN DEL PERFIL GLICOSÍDICO EN LOS DIFERENTES LUGARES DEL APARATO REPRODUCTOR DE LAS CONEJAS SEGÚN EL PERÍODO DEL CICLO, PARA UNA BAJA CONCENTRACIÓN DE AZÚCARES (n=15)

Lugar del aparato reproductor	Vulva blanca (n=5)		Vulva rosa (n=5)		Vulva roja (n=5)	
	Azúcar	n	Azúcar	n	Azúcar	n
Oviducto	Gal β 1-4GluNAc	5	Gal β 1-4GluNAc	4	Gal β 1-4GluNAc	5
	α Fuc	5	α Fuc	5	α Fuc	4
	α Man/ α Glu	5				
Útero distal	Gal β 1-4GluNAc	5	Gal β 1-4GluNAc	4	Gal β 1-4GluNAc	5
	α Fuc	5	α Fuc	5	α Fuc	5
	α Man/ α Glu	5			α Man/ α Glu	5
	Gal β 1-3GalNAc	5	GalB1-3GalNAc	5		
Útero medio	Gal β 1-4GluNAc	4	Gal β 1-4GluNAc	5	Gal β 1-4GluNAc	5
	α Fuc	5	α Fuc	4	α Fuc	5
	α Man/ α Glu	5	α Man/ α Glu	5	α Man/ α Glu	5
	Gal β 1-3GalNAc	4			GalNAc α 1-3GalNAc	5
Cuello uterino	Gal β 1-4GluNAc	5	Gal β 1-4GluNAc	4	Gal β 1-4GluNAc	5
	α Fuc	4	α Fuc	5	α Fuc	5
	α Man/ α Glu	4	α Man/ α Glu	4	α Man/ α Glu	5
	Gal β 1-3GalNAc	5	Gal β 1-3GalNAc	4	Gal β 1-3GalNAc	3

Reacción calificada como ninguna y una cruz (0, +).

DISCUSIÓN

La investigación realizada, tiene su importancia en la evaluación del perfil glicosídico tanto en los diferentes sitios del aparato reproductor como en los diferentes períodos del ciclo, lo cual nos permite determinar con mayor certeza y con menos distractores, la presencia o ausencia de los azúcares de superficie durante el ciclo estral y el proceso de implantación.

Algunos estudios en hámsteres han demostrado la variación de los residuos glicosídicos según el período del ciclo, reportando el aumento de las glicosiltransferasas en el período de peri-implantación (11); al mismo tiempo, en conejas, se han encontrado aumentados determinados tipos de azúcares en el mismo período (12). Nuestros resultados están acorde con esos hallazgos, pues muestran que la expresión de ciertos residuos glicosídicos: galactosa β 1-3-N-acetil galactosamina (Jacalina), α manosa/ α glucosa (PSA) y el disacárido N-acetilgalactosamina α 1-3N-acetilgalactosamina son dependientes del período del ciclo en que se encuentra la coneja. Otros azúcares permanecen constantes en poca cantidad, como la α -L Fucosa (UEA-1) y la galactosa β 1-4-N-acetilglucosamina (ECL).

Igualmente estudios anteriores han reportado predominio de N-acetil galactosamina y galactosa en la época de peri-implantación (13,14). Nuestro estudio muestra el predominio de la N-acetilgalactosamina α 1-3N-acetilgalactosamina (DBA) en todos los períodos, exceptuando el de vulva roja a nivel del útero medio lo que ratifica la importancia de su desaparición por sus propiedades de antiadhesividad del blastocisto al endometrio cuando este disacárido hace parte de las mucinas (15). Además es importante el predominio de la galactosa β 1-3N-acetil galactosamina sobre la N acetilgalactosamina α 1-3 N acetilgalactosamina durante el período de vulva roja en el útero medio, los cuales representan la época de más fertilidad y la zona de mayor receptividad, respectivamente. Esto apoya la importancia de la β galactosa en la implantación descrita por otros autores (16).

Por otro lado, los residuos de α -L-fucosa y galactosa β 1-4 N-acetil glucosamina presentan una expresión muy baja en las muestras, lo cual está de acuerdo con trabajos previos (14), sin embargo nuestro estudio no muestra variaciones en relación con los distintos períodos del ciclo. Esto puede deberse al carácter cualitativo del estudio, que no nos permite detectar cambios mínimos. Al parecer, los cambios descritos en otros estudios

acerca de la galactosa β 1-4 N-acetil glucosamina se debe a la presencia de residuos de ácido siálico, que cubren normalmente la cadena glicoprotéica en su parte superior, evitando la interacción de las mismas con la lectina ECL y las "sustancias" externas (16,17).

Por último, se encontró una alta reacción para α manosa/ α glucosa(PSA) en el oviducto y en el útero distal en los períodos de vulva rosa y roja, lo cual puede representar cierta importancia de estos azúcares en la conducción del embrión implantado a su destino.

En conclusión, siendo la presencia o ausencia de los carbohidratos uno de los factores que influyen a la implantación, es posible que la alteración de estos azúcares sea en parte responsable de la incapacidad de algunas mujeres para llevar el embarazo a término. Esta hipótesis, puede ser desarrollada en futuras investigaciones que lleven a dilucidar el papel de los azúcares en el proceso reproductivo humano.

BIBLIOGRAFÍA

1. Minas V, Loutradis D, Makrigiannakis A. Factors controlling blastocyst implantation. *Reprod Biomed Online* 2005;10(2):205-16
2. Hasty L, Lambris J, Lessev B, Pruksananonda K, Lyttle C. Hormonal regulation of complement and receptors throughout the menstrual cycle. *Am J Obstet Gynecol* 1994;170:168-75.
3. Svalander P, Odion P, Nilsson B, Obrink B. Expression of Cell CAM-105 in the apical surface of rat uterine epithelium is controlled by ovarian steroid hormones. *J Reprod Fertil* 1990;88(1):213-21.
4. Lai T, Shih I, Vlahos N, Liang CH, Wallach E, Zhao Y. Differential expression of L-selectin ligand in the endometrium during the menstrual cycle. *Fertil Steril* 2005;83(1):1297-302.
5. Hoffman L, Olson G, Carson D, Chilton B. Progesterone and implanting blastocysts regulate Muc1 expression in rabbit uterine epithelium. *Endocrinology* 1998;139(1):266-71.
6. Heap R. Role of embryonic signal in the establishment of pregnancy. *Br Med Bull (Cambridge)* 1989; 35:129-35.
7. Srinivasan K, Dwivedi A, Jain S, Mehrotra P. Demonstration of uterine receptivity in vitro by co-culture of rat epithelial cells and blastocyst. *Cell Tissue Res* 2006;325(1):135-41.
8. Lai T, Zhao Y, Shih I, Ho Ch, Bankowski B, Vlahos N. Expression of L-selectin ligands in human endometrium during the implantation window after controlled ovarian stimulation for oocyte donation. *Fertil Steril* 2006;85(3):761-3.
9. Alvario MR. Control de la reproducción en la Coneja. Madrid, España: Mundi-Prensa 1993;17-9.

10. García J, Guerrero A, Lemus R, Fuenzalida M, Lemus D. Análisis histoquímico de células neoplásicas mediante lectinas conjugadas con peroxidasa de rábano. *Rev Méd Chile* 1995;13(2):177-82.
 11. Tulsiani D, Chayko C, Orgebin-Crist M, Araki Y. Temporal surge of glycosyltransferase activities in the genital tract of the hamster during the estrous cycle. *Biol Reprod* 1996;54(5):1032-7.
 12. Olson G, Wintrev V, Matrisian P, Melner M, Hoffman L. Specific expression of haptoglobin mRNA in implantation-stage rabbit uterine epithelium. *J Endocrinol* 1997;152(1):69-80.
 13. Yang Z, Le S, Chen D, Yasukawa K, Harper M. Expression patterns of leukaemia inhibitory factor receptor (LIFR) and the gp130 receptor component in rabbit uterus during early pregnancy. *J Reprod Fertil* 1995;103(2):249-55.
 14. Anderson T, Olson G, Hoffman L. Stage-specific alterations in the apical membrane glycoproteins of endometrial epithelial cells related to implantation in rabbits. *Biol Reprod* 1986;34(4):701-20.
 15. Hoffman L, Olson G, Carson D, Chilton B. Progesterone and implanting blastocysts regulate Muc1 expression in rabbit uterine epithelium. *Endocrinology* 1998;139(1):266-71.
 16. Weitlauf HM. Biology of implantation. In: Knobil E, Neill JD (eds). *The Physiology of Reproduction*, 2a ed. New York: Raven Press Ltd, 1994;391-440.
 17. Griffith C, Sanders E. Changes in glycoconjugate expression during early chick embryo development: A lectin-binding study. *Anat Rec* 1991;231(2):238-50.
-