



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA DE PUEBLA**



FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

**“EXPRESIÓN GESTACIONAL Y POSTPARTO DEL
RECEPTOR KISS1R EN EL ÚTERO DE RATA WISTAR”**

**TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL GRADO DE:
LINCENCIADO EN QUIMICO FARMACOBIOLOGO.**

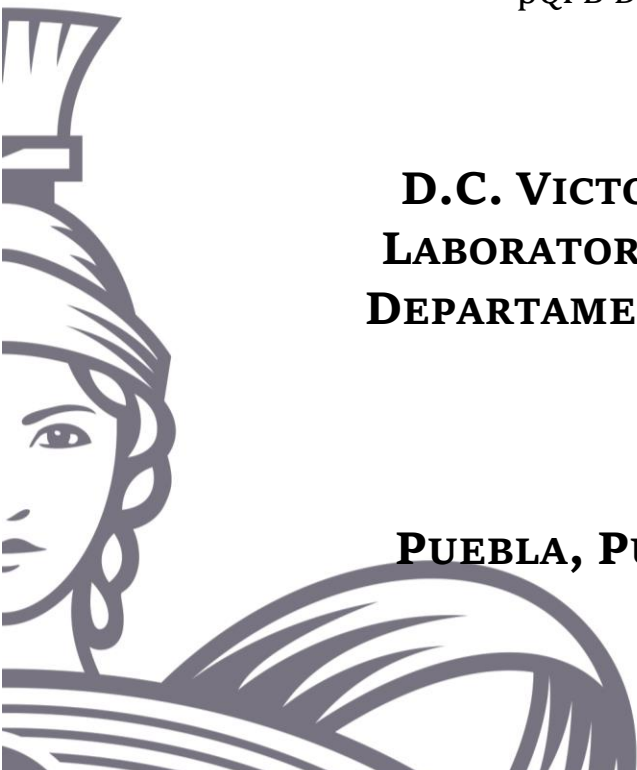
PRESENTA:

pQFB DIEGO JESÚS MAQUEDA BAUTISTA

DIRECTOR:

**D.C. VICTORINO G.S. ALATRISTE BUENO
LABORATORIO DE NEUROENDOCRINOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ANÁLISIS CLÍNICOS FCQ-
BUAP**

PUEBLA, PUE. DICIEMBRE DEL 2021



LISTA DE ABREVIATURAS	6
INTRODUCCIÓN	¡Error! Marcador no definido.
<i>Características reproductivas de la rata Wistar</i>	9
<i>Útero en roedores</i>	10
<i>Irrigación del útero en mamíferos</i>	11
<i>Arteria Uterina Derecha lateral y medial</i>	11
<i>Arteria Uterina Izquierda lateral y medial</i>	12
<i>Arteria Arco Cervical</i>	12
<i>Inervación simpática uterina en mamíferos</i>	12
<i>Inervación parasimpática uterina en mamíferos</i>	13
<i>Inervación sensorial aferente</i>	14
<i>Funciones del útero en mamíferos</i>	14
<i>Mantenimiento y desarrollo del embrión y feto durante la preñez.</i>	15
<i>Modulación del parto</i>	15
<i>Participación hormonal en el desarrollo de la preñez en mamíferos</i>	16
<i>Progesterona</i>	16
<i>Estradiol</i>	17
<i>Participación del Óxido Nítrico en el desarrollo de la gestación y en el parto</i>	18
BIOLOGIA DE LA REPRODUCCIÓN	19
<i>Crecimiento y desarrollo</i>	19
<i>Endocrinología del Ciclo ovárico</i>	19
<i>Ovulación</i>	20
<i>Conducta del apareamiento</i>	21
<i>Apareamiento</i>	22
<i>Fecundación</i>	22
<i>Transporte del ovocito</i>	23
<i>Desarrollo embrionario</i>	24
<i>Número de crías por camada</i>	25
KISSPEPTINA MODULADOR DEL DESARROLLO SEXUAL	26
<i>Kisspeptina</i>	26
<i>Mecanismo de acción de la kisspeptina</i>	26

<i>Kisspeptina durante la preñez de los mamíferos</i>	27
<i>Kisspeptina: modulador del inicio de la pubertad en mamíferos</i>	28
<i>Kisspeptina y pubertad</i>	29
<i>Antagonista del receptor Kiss1R: Sal de Kisspeptina-234 trifluoroacetato (p-234)</i>	29
JUSTIFICACIÓN	30
HIPÓTESIS	30
OBJETIVO GENERAL	30
OBJETIVOS PARTICULARES	31
METODOLOGÍA	31
<i>Diagrama de trabajo</i>	31
<i>Citología vaginal</i>	33
<i>Tinción rápida hematoxilina y eosina</i>	35
<i>Sacrificio y obtención de úteros</i>	35
<i>Inclusión en parafina</i>	35
<i>Cortes histológicos</i>	35
<i>Tinción de hematoxilina & eosina (H&E)</i>	36
<i>Análisis morfométrico de cortes histológicos</i>	37
<i>Conteo y análisis estadístico</i>	37
RESULTADOS	38
<i>Análisis de la morfología de las capas uterinas a diferentes edades gestacionales por tinción de hematoxilina y eosina.</i>	38
<i>Perimetrio, evaluación morfométrica durante el curso de la preñez en ratas Wistar intactas y comparativa del post-parto en ratas intactas y las administradas con antagonista de kisspeptina.</i>	40
<i>Miometrio, evaluación morfométrica durante el curso de la preñez en ratas Wistar intactas y comparativa del post-parto en ratas intactas y las administradas con antagonista de kisspeptina.</i>	42
<i>Endometrio, evaluación morfométrica durante el curso de la preñez en ratas Wistar intactas y comparativa del post-parto en ratas intactas y las administradas con antagonista de kisspeptina.</i>	44
<i>Epitelio luminal, evaluación morfométrica durante el curso de la preñez en ratas Wistar intactas y comparativa del post-parto en ratas intactas y las administradas con antagonista de kisspeptina.</i>	46

<i>Glándulas uterinas, conteo durante el curso de la preñez en ratas Wistar intactas y comparativa del post-parto en ratas intactas y las administradas con antagonista de kisspeptina.</i>	48
DISCUSIÓN	50
CONCLUSIÓN	56
BIBLIOGRAFÍA	57

Asegurar un hecho sin tener algún sustento o prueba que lo avale es caer en el efecto Dunning-Kruger, por el bien de la humanidad y el avance del conocimiento minimicemos la falacia narrativa; por este motivo pido a la ciencia siempre adelante, ni un paso atrás y lo que fuere menester, sea; in sæcula sæculorum.

LISTA DE ABREVIATURAS

Ach	Acetilcolina
AR	Receptor androgénico
AVPV	Núcleo anteroventral periventricular
Ca ⁺²	Ion calcio con estado de oxidación +2
CO ₂	Dióxido de carbono
COX	Ciclooxigenasas
DAG	Diacilglicerol
E2	Estradiol
EG	Edades gestacionales
Er α	Receptor estrogenico alfa
E.S.M.	Error estándar de la media
FSH	Hormona foliculoestimulante
G0	Día gestacional 0
G5	Día gestacional 5
G10	Día gestacional 10
G15	Día gestacional 15
GABA	Ácido gamma-aminobutírico
GC	Gránulos corticales
GCs	Guanilato ciclasa solubles
GMPc	Guanosín monofosfato cíclico
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropina
Gq	Proteína G estimuladora
GTP	Guanosín trifosfato
H&E	Hematoxilina & eosina
HGC	Hormona coriónica humana
HHO	Eje hipotalámico-hipofisario-gonadal
Icv	Intracerebroventricular
IP	Fosfato inositol
IP3	Inositol trifosfato
Kp	Kisspeptina
K ⁺	Ion potasio con estado de oxidación +1
Kiss1R	Receptor Kiss1
L2	Lumbar 2

LE	Epitelio luminal
LIF	Factor inhibidor de la leucemia
LH	Hormona luteinizante
MMP	Metaloproteinasas
NO	Óxido nítrico
NOS II	Isoformas de la enzima NOS
NOS III	Isoformas de la enzima NOS
NOS	Enzima precursora de óxido nítrico
NPY	Neuropéptido Y
P	Progesterona
p-234	Sal de Kisspeptina-234 trifluoroacetato
Post-p	Postparto
Par craneal III	Nervio Oculomotor
Par craneal IX	Nervio Glossofaríngeo
Par craneal VII	Nervio Facial
Par craneal X	Nervio Vago
PGs	Prostaglandinas
PIP ₂	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PLC	Fosfolipasa C
PR	Receptores de progesterona
RS	Retículo sarcoplásmico
S.S.I	Solución salina isotónica
S2	Vertebra sacra número 2
S4	Vertebra sacra número 4
T1	Torácico 1
VIP	Péptido intestinal vaso activo
ZP	Zona pelúcida

μm	Micrómetros
---------------	-------------

INTRODUCCIÓN

Entre los seres vivos, la reproducción es una función indispensable para la supervivencia y adaptación de la especie. Para alcanzar correctamente la fase reproductiva se requiere un correcto desarrollo sexual y gonadal. El cual, es impulsado por un complejo sistema neuronal y hormonal mediado por el eje hipotálamo, hipófisis, ovario en las hembras. En la edad prepuberal ocurre un cambio en los niveles de ácido glutámico que activa la liberación pulsátil de GnRH en el hipotálamo que da origen a nuevas interacciones bioquímicas y neuronales que incentiva el desarrollo y recambio celular del útero. (Muir A., *et al*, 2001; Liu X, *et al*, 2008; Teresawa & Ojeda, 2010).

Entre los principales cambios uterinos, destacan, el desarrollo y cambio celular de sus capas (endometrio, miometrio y perimetrio). El desarrollo del útero se ve influenciado principalmente por la progesterona (P) y el estradiol (E2), péptido intestinal vaso activo (VIP), péptido relacionado con el gen a la calcitonina (CGRP), (Néstor I Tovich, 2011) entre otros. Actualmente, existe un péptido que está revolucionando el estudio de la biología de la reproducción. Dicho péptido es la Kisspeptina, que influye en el inicio de la pubertad y el desarrollo celular periférico. Sin embargo, el papel de la Kisspeptina sobre el desarrollo de la preñez y cambios en el útero han sido poco estudiados. Para poder estudiar el papel de la Kisspeptina en el presente trabajo se usó a la Rata Wistar como el modelo animal. Este modelo animal a nivel uterino cumple con características anatómicas y fisiológicas muy semejantes a la del humano, también es un modelo animal de fácil manejo y permite el estudio del desarrollo sexual de una manera correcta y práctica. Todo esto nos permitirá realizar una buena caracterización histológica.

Características reproductivas de la rata Wistar

Las ratas hembra adultas de la cepa Wistar en condiciones controladas, con ciclos de luz/obscuridad de 12 horas, temperatura estable a 24°C y libre acceso al alimento y agua, poseen un cuerpo robusto con un peso que oscila entre 250 y 450 g y una longitud desde 18

hasta 25 cm y una vida media de 2 años. Son sexualmente activas al llegar a la 6 u 8^o semana de vida, su gestación dura entre 22 y 24 días y el tamaño promedio de camada es de 9,5 crías.

Es importante mantener a las hembras en grupos pequeños para aprovechar el efecto Whitten (guerra Araiza C. et al. 2000), este se produce cuando un grupo de hembras se pone en contacto con un macho y su ciclo estral se sincroniza, así la mayoría estarán receptivas al 3er día. Es importante rotar al macho con distintas hembras una vez por semana, para favorecer la atracción por las hembras (Flor de Ma. Fuentes, et al, 2008).

Útero en roedores

El útero de rata, es un órgano muscular hueco piriforme y de pared gruesa, al igual que el de los restantes roedores, es de tipo “bicornio”. Aunque los cuernos uterinos parecen estar unidos se mantienen separados y cada uno de ellos desemboca por sus respectivos conductos cervicales en el extremo superior de la vagina.

Función: El útero tiene dos funciones esenciales, mantener el embrión durante el embarazo y expulsarlo cuando el feto llega a término. Más adelante se amplía esta información.

Anatomía: es un órgano bicornual, ya que posee dos cuernos, un cuerpo y un cérvix. (Antonio I. Porras, *et al*, 2009)

El útero está constituido por tres capas de diferentes tejidos:

Perimetrio: capa serosa externa o cubierta peritoneal de tejido conectivo que se refleja a nivel del istmo para cubrir la cara superior de la vejiga, formando el espacio útero-vesical y por la pared posterior recubre el cuerpo uterino y la porción superior del cérvix extendiéndose hasta el recto, formando el espacio rectouterino o fondo de saco de Douglas (Parrondo P, *et al*, 2009).

Miometrio: es la porción muscular externa de útero, está compuesto primariamente de manojos de células de musculo liso incorporadas en una matriz extracelular junto con vasos sanguíneos y nervios abasteciendo o pasando a través de este musculo. En la mayoría de las especies el miometrio está formado por una capa longitudinal de musculo paralela al eje

largo del útero y una capa interna de musculo circular que esta perpendicular al eje largo del útero. El musculo longitudinal proviene del tejido conectivo subcerosal mientras que el musculo circular está formado de los ductos paranéfricos (E. Knobil, *et al*, 1994).

Endometrio: es la mucosa que recubre el interior del útero y consiste en un epitelio simple cilíndrico con o sin cilios, glándulas y un estroma. Es rico en tejido conjuntivo y está altamente vascularizado. Su función es la de alojar al cigoto o blastocisto después de la fecundación, permitiendo su implantación. Es el lugar donde se desarrolla la placenta y presenta alteraciones cíclicas en sus glándulas y vasos sanguíneos en preparación para la implantación del embrión (Pérez-Media, *et al*, 2011).

Irrigación del útero en mamíferos

La irrigación deriva principalmente de las arterias uterinas que proviene de la iliaca interna. Las venas uterinas discurren en el ligamento ancho, drenando en el plexo venoso uterino a cada lado del útero y la vagina, y estas venas a su vez drenan en las venas ilíacas internas (Ana Ma. C, 2011).

La arteria Uterina corre lateralmente a lo largo del cérvix, cuerpo uterino y los cuernos; en su recorrido por el borde lateral del tracto reproductor, la arteria uterina se bifurca en arteria uterina lateral y arteria uterina medial (Eric L, 2009).

Arteria Uterina Derecha lateral y medial

Lateral: Tiene un recorrido a lo largo del borde lateral del cuerpo y cuerno uterinos, emitiendo varias ramas colaterales pequeñas encargadas de la irrigación de las estructuras antes mencionadas. A nivel de la porción final del cuerno uterino, cercano al origen del oviducto; la arteria lateral se une con la porción final de la arteria medial procedente de la arteria ovárica, formando un tronco común (Sato A, *et al*. 2016).

Medial: De mayor grosor que la anterior, su dirección es al lado izquierdo por la superficie ventral del cuerpo uterino. Ésta arteria a nivel de la bifurcación de los cuernos uterinos emite 2 ramas; la rama derecha se ubica en la superficie ventral del cuerno uterino derecho, en su recorrido emite pequeñas ramas colaterales; la rama izquierda se orienta hacia la superficie ventral del cuerno uterino izquierdo emitiendo pequeñas ramas colaterales y en

su porción final a nivel de la transición entre el cuerno uterino y el oviducto izquierdos, se une con la arteria uterina lateral izquierda (Vilá *et al.*, 2007).

Arteria Uterina Izquierda lateral y medial

Arteria Uterina Lateral Izquierda: Recorre todo el borde lateral del cuerpo y cuernos uterinos emitiendo pequeñas ramas colaterales como su análoga derecha. En su recorrido en dirección craneal, en su porción final se fusiona con la rama izquierda de la arteria uterina medial derecha (Eric L, 2009).

Arteria Uterina Medial Izquierda: Es de calibre pequeño y se pierde en el borde ventral del cuerpo uterino, en su recorrido emite pequeñas ramas colaterales hacia el cuerpo del útero (Sato A, *et al.* 2016).

Arteria Arco Cervical

Arteria que emerge de las arterias uterinas mediales o bien de la misma arteria uterina, discurrió por la superficie ventral del cérvix a manera de arco, sirviendo como anastomosis entre ambas arterias uterinas mediales derecha e izquierda o simplemente entre las arterias uterinas. En su camino emitió pequeños ramos arteriales dirigidos al cérvix (Eric L, 2009).

Inervación simpática uterina en mamíferos

La inervación simpática del útero y cuello uterino de los mamíferos proviene de neuronas postganglionares ubicadas en ganglios simpáticos prevertebrales y paravertebrales, principalmente del plexo útero-vaginal que se extiende desde el plexo hipogástrico inferior hasta las vísceras de la pelvis. A través de este pasan fibras simpáticas, parasimpáticas y aferentes.

Inervación simpática proviene del plexo pélvico, es un grupo de fibras nerviosas y de ganglios provenientes del plexo hipogástrico superior. Las fibras ingresan a la médula espinal torácica inferior y atraviesa los nervios espláncnicos lumbares. Los nervios simpáticos tienen origen en la médula espinal entre los segmentos (L2-L4) y desde aquí se dirigen a la cadena simpática paravertebral y finalmente a los tejidos y órganos periféricos (Houdeau, *et al.*, 1998; Moore, *et al.*, 2007; Papka & Treurig, *et al.*, 1993; M. Brauer, *et al.*, 2015)

En la rata, la porción cefálica del cuerno uterino recibe la mayor parte de su inervación simpática desde la región tóraco-lumbar de la cadena paravertebral y el ganglio prevertebral suprarrenal, a través del plexo nervioso ovárico. También recibe una pequeña contribución de los ganglios prevertebrales celíaco y aórtico renal (Vera *et al*, 1997; Houdeau *et al*, 1998). La porción caudal del cuerno uterino y el cuello reciben inervación de la cadena simpática, principalmente de la región lumbar, a través de los nervios espláncnicos, los cuales conectan posteriormente con los hipogástricos. Asimismo, existe una pequeña contribución de los ganglios mesentéricos inferiores y suprarrenales, así como de las neuronas del plexo pélvico. Estos distintos orígenes y rutas permiten un control región-específico de la motilidad uterina. (Vera, *et al*, 1997; Houdeau, *et al*, 1998; M. Brauer, *et al*, 2015).

Los neurotransmisores que intervienen en la inervación simpática son el neuropéptido Y (NPY) y la acetilcolina (Ach) estos se ubican en neuronas de los ganglios paracervicales que inervan el cuello uterino (Traurig y Papka, 1993; M. Brauer, *et al*, 2015).

Inervación parasimpática uterina en mamíferos

Las fibras nerviosas parasimpáticas tienen origen en el tronco encefálico, en los núcleos de los pares craneales III (oculomotor), VII (facial), IX (glossofaríngeo) y X (vago) y en la médula sacra: segundo y tercero nervios sacros, y a veces también del primero y cuarto.

Los impulsos parasimpáticos provienen de S2-S4 a través de los nervios pélvicos espláncnicos que recorren para unirse a los plexos hipogástricos a través de la pared lateral de la pelvis (Keith L. Moore, 2007; Adi Gasner, *et al*, 2020).

El plexo hipogástrico inferior consta de tres áreas: el plexo vesical, el plexo útero vaginal y el plexo medio rectal. El plexo útero vaginal se encuentra en el lado medial de los vasos uterinos, lateral a los ligamentos uterosacros de los anexos del útero y continúa cefálico a lo largo del útero y caudal a lo largo de la vagina. Estas fibras caudales inervan el vestíbulo y el clítoris, y se encuentran en el tejido parametrial lateral a la arteria uterina y arteria uterosacra (Keith L. Moore, 2007; Adi Gasner, *et al*, 2020).

El sistema nervioso parasimpático juega un papel muy importante en la regulación de las funciones fisiológicas uterinas. Los nervios parasimpáticos de la pared uterina son procesos de neuronas localizados principalmente en el ganglio hipogástrico inferior y el ganglio paracervical. El neuromediador crucial de esta parte del sistema nervioso es la acetilcolina. Se sabe que la acetilcolina puede actuar sobre receptores de membrana específicos, como cinco tipos de muscarínicos (M_{1-5}) y receptores nicotínicos (Hedrick y Waters, 2015), y en la pared uterina solo se han descrito los receptores muscarínicos M2 y M3 (Yasuda, *et al*, 2014). Las principales funciones de la acetilcolina en el útero consisten en estimular los efectos de los músculos. Estudios anteriores han demostrado que la acetilcolina provoca un aumento en la frecuencia e intensidad de la contracción del músculo uterino sin fluctuaciones significativas en el tono (Shu, *et al*, 2017). Además, la acetilcolina afecta a los vasos sanguíneos intrauterinos provocando su dilatación (Lamireau, *et al*, 2002), además de estimular la actividad secretora de la mucosa uterina (Paris, *et al*, 2000).

Inervación sensorial aferente

Los nociceptores viscerales responden a estímulos capaces de causar dolor visceral, pero solamente a través de una estimulación por encima de un rango específico, mientras que los receptores sensoriales responden tanto a estímulos nocivos como a intensidades inofensivas. Los nociceptores viscerales son hasta ahora los menos conocidos por lo difícil de su estudio, se han documentado en diferentes órganos incluyendo el útero, estas fibras no solo son receptoras, sino que también liberan sustancias, como glutamato y la sustancia P que transmiten las sensaciones en potenciales de acción hacia el SNC. Las fibras aferentes que transmiten impulsos desde las vísceras son las de tipo $A\beta$, $A\delta$ y C; las fibras aferentes miélicas de grueso calibre $A\beta$ tienen una distribución definida en las vísceras, conectadas a receptores de bajo umbral y las fibras de tipo $A\delta$ y C son el vehículo del estímulo. (Spencer, *et al*, 2016; Cerveró, *et al*, 1995; Willis WD, *et al*, 1994)

Funciones del útero en mamíferos

El útero tiene diferentes funciones, sin embargo, abordaremos 2 muy importantes que contribuyen con el presente proyecto.

Mantenimiento y desarrollo del embrión y feto durante la preñez.

Durante el proceso de fecundación el útero incrementa el desarrollo de las glándulas uterinas. En caso de existir la implantación (unión del ovulo fecundado al útero) el útero a través de las glándulas uterinas nutre y mantiene al embrión. Dichos nutrientes son principalmente liberados por el endometrio. Después de 3-4 días de la implantación, el ovocito fecundado se transforma en blastocisto, y está rodeado por células trofoblásticas secretoras de enzimas proteolíticas. Estas enzimas licuan el endometrio, liberándose gran cantidad de sustancias nutritivas y formándose una cavidad donde anida el blastocisto. Durante las primeras semanas, el embrión se alimenta fundamentalmente a través de las células trofoblásticas, hasta que se desarrolla la placenta, unida al feto por las arterias y la vena umbilical. La irrigación de la placenta proviene de los senos venosos del endometrio, dependientes de la arteria y la vena uterinas, con sangre materna, que tienen como función el transporte de nutrientes y el intercambio de oxígeno y CO₂ (A Córdova, *et al*, 2003). El oxígeno y los nutrientes pasan de la sangre materna a la fetal por difusión simple y otros sistemas de transporte. Finalmente hay dos reguladores que mantienen el funcionamiento del endometrio, la progesterona y la hormona coriónica humana (HGC). La progesterona induce que las células del endometrio se mantengan aptas para el desarrollo del embarazo, mientras que la HGC mantiene las capacidades nutricionales del mismo (A Córdova, *et al*, 2003).

Modulación del parto

La capa uterina estrechamente relacionada en el proceso de parto es el miometrio ya que esta capa está formada principalmente de fibras musculares que en el proceso del parto por estímulos hormonales, maternos y fetales se distiende. La neurohipófisis de la madre sintetiza a la oxitocina y la oxitocina es capaz de provocar directamente las contracciones uterinas, por otro lado, se ha observado que los estrógenos incrementan la acción de la oxitocina y por último una vez que se inicia el parto, la cabeza fetal dilata el cuello uterino, lo que provoca un reflejo de secreción de oxitocina por la neurohipófisis. La oxitocina contrae las fibras musculares del miometrio, haciendo descender al feto por el canal del parto, lo que dilata aún más el cuello uterino y se repite el ciclo. Las contracciones en el parto

comienzan en el fondo del útero y se dirigen hacia abajo, la frecuencia de las contracciones va de menor a mayor intensidad esto con el fin de expulsar al feto y la placenta. Inmediatamente después del parto, el útero comienza a involucionar, volviendo a su tamaño previo al embarazo, este proceso en ratas se lleva a cabo de manera rápida (A Córdova, *et al*, 2003).

Participación hormonal en el desarrollo de la preñez en mamíferos

Las hormonas gonadales, el estradiol (E2) y la progesterona (P) que son sintetizadas por los ovarios a partir del colesterol y por la placenta que parte de cortisol, son predominantes en la preparación para la copula y la fecundación (Guerra-Araiza C. 2000; Fang X, *et al*. 2002).

Progesterona

Es una hormona esteroide que se liga principalmente cuestiones reproductivas debido a sus numerosas funciones antes y durante la preñez, es secretada principalmente por el cuerpo lúteo y en menores cantidades por las células granulosas y por la placenta durante la preñez (Guerra-Araiza C. 2000; Fang X, *et al*. 2002).

Algunas de las funciones que cumple en la reproducción de los roedores son: Regular el ciclo estral, en asociación con E2 induce el estro y la receptibilidad sexual, induce la atresia folicular y permite el desarrollo de folículos.

También esta hormona esteroidea después de la fecundación, inicia la proliferación y decidualización del endometrio para que sea propicio para la implantación, inhibe de las contracciones uterinas y regula la secreción de citosinas; aumenta la concentración de glándulas secretoras en el endometrio, también estimula el desarrollo de los tejidos mamarios y por último contribuye a la ganancia de reservas energéticas de la madre (Fang X, *et al*. 2002; Ragusa, *et al*, 2004).

Contribuye a establecer una tolerancia inmunológica en el útero que evita que el blastocito sea rechazado por la placenta, durante el embarazo las concentraciones de los diferentes tipos celulares que median la implantación, son susceptibles a los efectos de la progesterona, debido a la alta producción de esta hormona y sus receptores, promueve la

retención del feto regulando el reconocimiento de antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad, las células T efectoras, la sensibilidad de las células presentadoras de antígeno y suprime la actividad de los macrófagos (Peltier, et al, 2003; Piccini, et al, 1996).

Los receptores de progesterona (PR), al igual que los receptores de glucocorticoides, mineralocorticoides, andrógenos, estrógenos y vitamina D, es un ligando natural de la superfamilia de los receptores nucleares para el control de las funciones biológicas a través de la regulación de genes específicos involucrados en el desarrollo embriológico, reproducción, crecimiento, diferenciación tisular y homeostasis hormonodependiente (Evans RM. 1998; Suárez-Calderón, *et al*, 2008).

El PR presenta dos isoformas, PR-A y PR-B, dependiendo de la acción de dos promotores diferentes (hPR-A y hPR-B) que determinan su expresión celular como homodímeros (AA-BB) o heterodímero (AB). Como la relación hPR-A/hPR-B varía en diferentes situaciones fisiológicas y patológicas, la respuesta está determinada por la concentración celular de la isoforma específica. Por ejemplo, en mama y endometrio el PR-A inhibe al PR-B y a los receptores de estrógeno (ER) reduciendo la proliferación epitelial (Suárez-Calderón, *et al*, 2008).

Estradiol

Se produce en ovarios y en menor cantidad por la glándula adrenal; induce proliferación celular sobre órganos, principalmente en el endometrio, pero también en las mamas y sobre el mismo ovario (Guerra-Araiza C. 2000) (Fang X, *et al*. 2002).

Sus funciones son regular la ovulación y liberación de hormona luteinizante (LH) y hormona folículo estimulante (FSH), por otro lado, junto con P induce el comportamiento de celo y la de libido, también estimula el crecimiento endometrial y aumenta irrigación de los órganos provocando hipertrofia, por último, aumenta el diámetro del útero y la secreción de mucosa. Durante la gestación sus funciones cambian y en este caso desarrolla el sistema de conductos mamarios, como también estimula la síntesis de oxitocina en el útero. En el estado de Peri-parto relaja el cérvix y Estimula la expulsión de placenta (Fang X, *et al*. 2002).

Mecanismo de acción estrogénico de 17 β -estradiol (estradiol), depende de la presencia de receptores intracelulares. Se ha demostrado la existencia de estos receptores

citoplasmáticos para estrógenos en células del útero, vagina, glándulas mamarias, trompas, hipotálamo, hipófisis, suprarrenales, testículo, riñón, y otros órganos y sistemas. Dada su liposolubilidad, los estrógenos atraviesan fácilmente la membrana celular, y se ligan al receptor citoplasmático, formando el complejo esteroide-receptor. El cambio conformacional, permite o facilita el ingreso del complejo, al compartimiento nuclear. Una vez en el núcleo, el estrógeno, se une a la cromatina nuclear, gracias a la presencia en esta estructura nuclear de un sitio “aceptor”, que reconoce el complejo esteroide-receptor, uniéndolos con gran afinidad. Es una proteína fijadora de DNA homóloga, con receptores para hormonas esteroideas y tiroideas. La presencia de este complejo en el núcleo, estimula así la actividad de RNA polimerasas, con la consiguiente transcripción del DNA. Los RNAm producidos, pasan al citoplasma, donde su traducción origina la síntesis de proteínas estructurales, enzimáticas, o de secreción, que caracterizan al tejido en cuestión, y que en definitiva representan el efecto fisiológico (Arevalo MA, *et al*, 2015).

Participación del Óxido Nítrico en el desarrollo de la gestación y en el parto

El óxido nítrico (NO) es un radical libre que está presente en varios tipos de células como el músculo liso, las mesangiales, las neuronas, las plaquetas, los macrófagos, los fibroblastos, las células epiteliales. La síntesis del NO se produce a través de una familia de enzimas, denominadas NOS, que se encuentran ampliamente distribuidas en los tejidos. Hasta el momento, se han reportado tres isoformas de la enzima NOS, de las cuales NOS II juega un rol en la contractibilidad y quiescencia de los tejidos uterinos (Mariana F. 2003; Josep J. *et al* 2004). En útero, la NOS ha sido localizada en el sistema vascular del epitelio glandular, células del estroma endometrial y miometrial (Telfer *et al*, 1995). El NO presentes en el tejido uterino es importante, por el hecho de que la concentración determina su mecanismo de acción (Buhimschi, *et al*, 2000). Dicho lo anterior se sugirió que un sistema NO-progesterona intervienen en el mantenimiento de la preñez ya que coincide con elevados niveles de progesterona y niveles bajos de NO; ya hacia el término de la gestación, la disminución de los niveles de progesterona induce el incremento de los niveles de NO en miometrio (Sladek *et al*, 1996).

BIOLOGIA DE LA REPRODUCCIÓN

Crecimiento y desarrollo

Las ratas como cualquier otro ser vivo pasa por etapas de desarrollo, al nacer se le denomina neonato en esta primera etapa se forman vínculos con la madre ya que el neonato es cien por ciento dependiente de ella en cuestiones de alimentación, protección y estimulación; la siguiente etapa es la infantil en donde la dependencia de la madre es menor y el sujeto se empieza a desarrollar como un ente individual y desarrolla cambios físicos y sociales; la etapa subsecuente de la infancia es la pubertad, esta es la fase donde se inicia el desarrollo sexual de los mamíferos con la que se inicia la capacidad reproductiva. La pubertad se caracteriza por los cambios anatómicos, fisiológicos, conductuales y hormonales de los sujetos en donde inicia un fenómeno en las hembras llamado ciclo ovárico (Ojeda y Terasawa, 2002).

Endocrinología del Ciclo ovárico

Durante la pubertad comienzan los ciclos estrales o ciclos ovulatorios que son el resultado de la acción integrada del hipotálamo, la hipófisis, el ovario y el endometrio. El hipotálamo marca el ritmo del ciclo ovulatorio mediante la liberación pulsátil de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH). Los pulsos de GnRH ocurren en la fase folicular del ciclo y en la fase lútea del ciclo. La secreción pulsátil de GnRH estimula la glándula pituitaria para que secrete la hormona luteinizante (LH) y la hormona estimulante del folículo (FSH). La glándula pituitaria traduce lo establecido por el hipotálamo en una señal y esto lleva a la secreción de LH y FSH, que puede ser entendida por el folículo ovárico. El folículo ovárico está compuesto por tres células clave: las células de la teca, las células de la granulosa y el ovocito. En el folículo ovárico, la LH estimula las células de la teca para producir androstenediona. En las células de la granulosa de los folículos antrales pequeños, la FSH estimula la síntesis de aromatasa que cataliza la conversión de androstenediona derivada de teca en estradiol. Una concentración crítica de estradiol, producida a partir de un gran folículo antral dominante, provoca retroalimentación positiva en el hipotálamo, probablemente a través del sistema de kisspeptina, lo que da como resultado un aumento en

la secreción de GnRH y un pico de LH. El pico de LH provoca el inicio del proceso de ovulación. Después de la ovulación, el folículo se transforma en el cuerpo lúteo, que es estimulado por LH o gonadotropina coriónica (HGC) en caso de que ocurra un embarazo para secretar progesterona. La progesterona prepara el endometrio para la implantación. El estradiol estimula la proliferación del endometrio. El estradiol y la progesterona hacen que el endometrio se diferencie en un epitelio secretor. Durante la fase lútea media del ciclo, cuando la producción de progesterona está en su punto máximo, el endometrio secretor está preparado de manera óptima para la implantación de un embrión (Barbieri RL. 2014; T.W. Sadler. 2001).

Ovulación

Si el ovocito sigue la línea de la fecundación; justo antes de que ocurra la ovulación se completara la primera división meiótica y se forma el primer cuerpo polar, la segunda división meiótica inicia inmediatamente después de la fertilización, pero se detiene en la metafase. Un incremento masivo en la LH lleva al ovocito primario a completar la meiosis I y a ingresar en el estadio pre-ovulatorio. Como siguiente evento da comienzo a la meiosis II y es detenido en metafase. La elevada concentración de LH aumenta la actividad de colagenasa y se produce la digestión de las fibras de colágeno que rodean al folículo. Los niveles de prostaglandinas se elevan en respuesta al pico de LH y causan contracciones musculares locales en la pared del ovario, además de la presión intra-folicular que se desarrolla. Estas concentraciones expulsan al ovocito, junto con las células de la granulosa y flotan fuera del ovario del ovario; los óvulos pueden permanecer viables por 10-15 horas (T.W. Sadler. 2001).

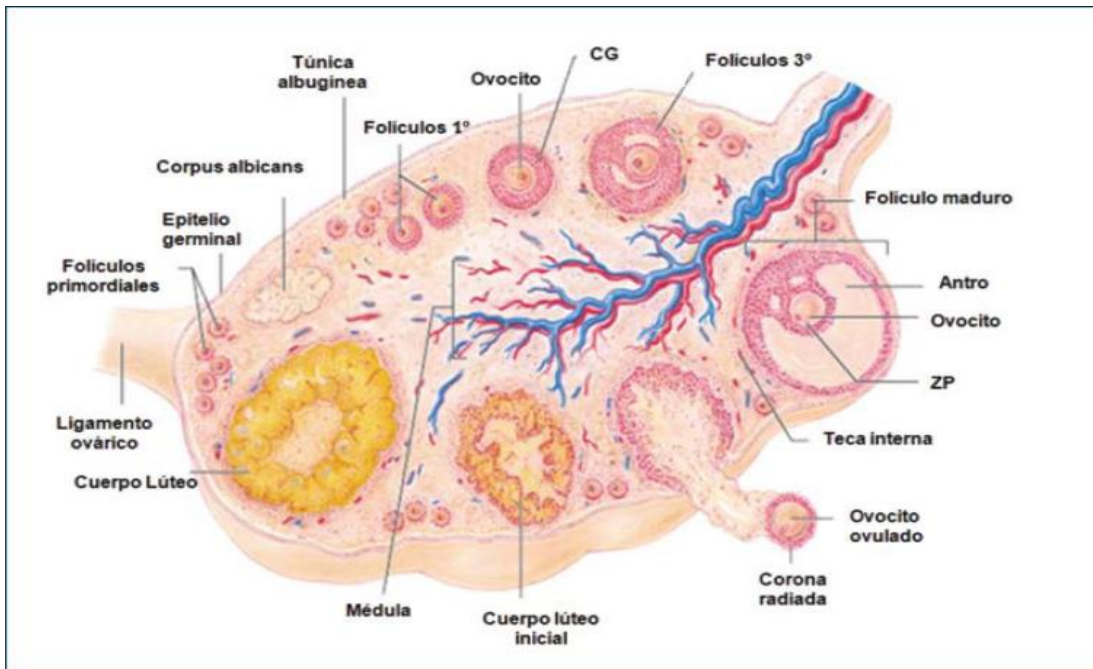


Figura 1. Diagrama de un ovario de mamífero, en el cual se han esquematizado los estados progresivos del crecimiento y desarrollo folicular (D. Vantman. *et al*, 2010).

Conducta del apareamiento

Cabe señalar que el contexto del ambiente en donde se observó esta conducta, fue un ambiente controlado (con ciclos de luz/obscuridad de 12 horas, temperatura estable a 24°C y libre acceso al alimento y agua).

La conducta sexual no se inicia en el cerebro como se creía y tampoco es una conducta meramente hormonal, sino que es una cuestión de narices: depende de cómo se reciben en el órgano olfativo las feromonas, esas sustancias químicas producidas por las glándulas sexuales de algunos animales para atraer a una posible pareja. Al menos, así ocurre en las ratas hembra y el órgano sensorial encargado de esto es llamado vomeronasal (OVN), éste detecta las feromonas ajenas en numerosos vertebrados terrestres, está detrás de la actitud femenina o de la masculina. En este punto es cuando el comportamiento cambia, cuando se tiene una aceptación y se lleva el ciclo de cópula (Emily R. *et al*, 2007).

Apareamiento

Un ciclo de copula se puede dividir en tres partes, la fase precopulatoria, la fase copulatoria y la fase ejecutiva. Durante la fase precopulatoria, la rata macho y la hembra receptiva (es decir, en celo hormonal o conductual) se dedicarán al olfateo anogenital. La fase copulatoria posterior consiste en que la hembra atrae la atención del macho con un comportamiento paracopulatorio: saltos (saltos cortos con las cuatro piernas fuera del suelo) y lanzamientos (movimientos cortos y repentinos de fuga, en los que presenta su cuerpo al macho). En reacción a estos movimientos, la rata macho intentará montar la hembra: se monta a horcajadas sobre la hembra por detrás y empuja sus caderas en un intento de localizar la vagina con su pene. En el caso de la inserción del pene en la vagina, la rata macho continúa empujando con un repentino empuje más profundo. Luego desmonta a la hembra, visible como un pequeño salto hacia atrás, alejándose de la hembra, a veces levantando sus patas delanteras en el proceso. Este comportamiento se reconoce como una intromisión. La estimulación física provocada por los montajes y las intromisiones puede hacer que la hembra arquee la espalda para facilitar la entrada vaginal, un fenómeno receptivo conocido como lordosis. Estos comportamientos tienden a desarrollarse en rápida sucesión, solo para ser interrumpidos por el aseo personal, el descanso y el ritmo. Por la hembra (comportamiento fugitivo). Finalmente, la eyacuación constituye la fase ejecutiva para el macho, a la que sigue un período de inactividad masculina, que suele durar alrededor de 5 min. El comienzo de un nuevo ciclo de comportamiento sexual marca el final del intervalo posteyaculatorio (Roy H. *et al*, 2017).

Fecundación

La fecundación es el proceso por el cual dos células altamente diferenciadas, ovocito y espermatozoide, con dotación cromosómica haploide (n) van a interaccionar, unirse y activarse mutuamente para dar lugar a un cigoto con dotación cromosómica diploide ($2n$) (Hunter, 1991). En la fecundación se pueden diferenciar algunos fenómenos, tales como, A) Penetración en la corona radiada, en donde solo algunos de los espermatozoides son capaces de fecundar al ovulo y los demás solo ayudaran a atravesar las barreras que protegen al gameto femenino (T.W. Sadler. 2001). B) Activación del ovocito; los cuales son

metabólicamente inactivos, pero mediante una serie de cambios morfológicos y bioquímicos, los conducen a una diferenciación y formación de los nuevos individuos (Yanagimachi, 1988). C) La activación de los ovocitos da lugar a la liberación hacia el espacio perivitelino del contenido de los gránulos corticales (GC), las enzimas hidrolíticas y glicoproteínas liberadas modifican las características fisicoquímicas de la ZP de manera que se impide la entrada de nuevos espermatozoides. D) Reanudación de la meiosis, el ovocito desencadena su activación nuclear, a través del aumento intracelular de Ca^{2+} . E) Cuando el espermatozoide se encuentra dentro de cada ovocito, rompe su membrana nuclear. Se produce la sustitución de protaminas por histonas, la cromatina se descondensa y se forma una nueva membrana nuclear. F) Una vez formados, los pronúcleos de la hembra y el macho, se desintegran sus membranas nucleares y sus cromosomas se asocian antes de efectuar la primera división mitótica. G) Concentraciones crecientes de progesterona van a causar la dilatación del oviducto y, como resultado, el paso de los embriones hacia el útero (Dziuk, 1985). H) Formación del blastocisto Las células del trofoblasto tienen permeabilidad selectiva, lo cual va a favorecer el transporte de sodio y agua que contribuirá a la formación del blastocelo; momento a partir del cual el embrión alcanza el estadio de blastocisto (Borland, 1977). J) Implantación de blastocisto El blastocito sale de la zona pelúcida y se establece en la mucosa uterina en un proceso llamado implantación (Borland, 1977).

Transporte del ovocito

En un evento de preñez se desencadenan procesos en el útero como el transporte del ovocito esto inicia cuando el ovocito es liberado, es acogido por las fimbrias de las trompas uterinas, en este evento las células epiteliales de las trompas aumentan el número de cilios y también aumentan las contracciones del musculo liso. Durante la liberación, las trompas se acercan al ovario y los cilios ayudan a capturar el óvulo, ya una vez en la trompa, el ovocito se encuentra embebido en un líquido tubárico producido por las células epiteliales de la trompa (T.W. Sadler. 2001).

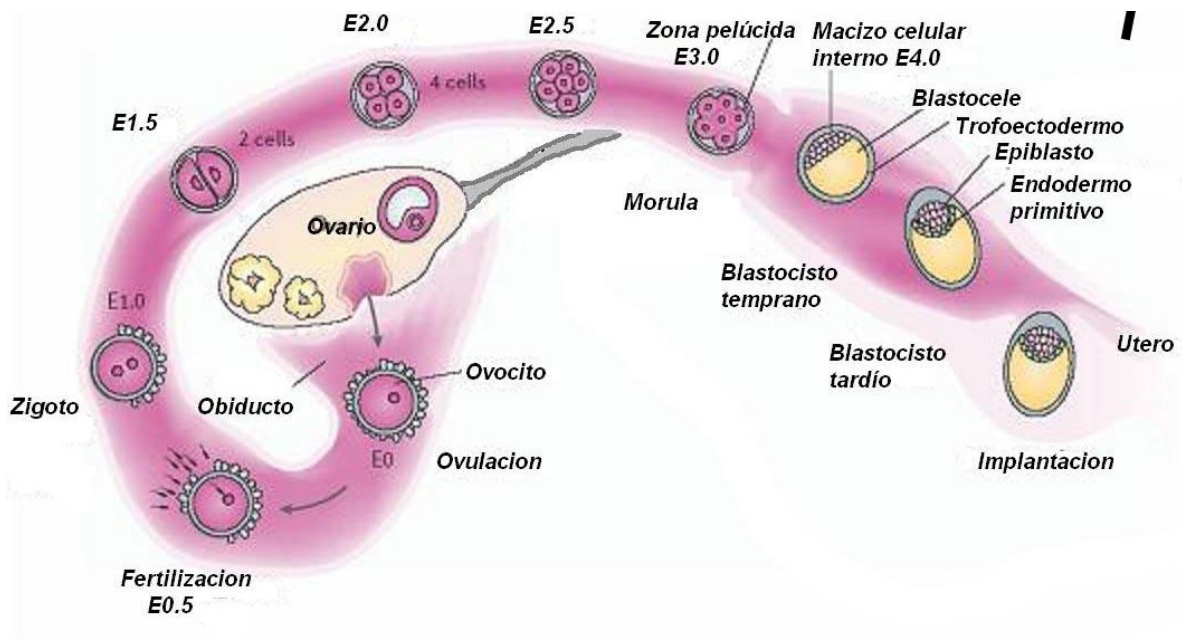


Figura 2. El transporte del ovocito por el oviducto se produce por acción ciliar y las contracciones musculares de sus paredes; permanece en la parte inferior de la ampolla donde se encuentra con el espermia gracias a las contracciones ascendentes del istmo que ayudan a la progresión del espermia hasta este lugar. Se produce la fecundación y después el cigoto pasa rápidamente por el istmo hasta llegar a los cuernos uterinos donde se produce la implantación (T.W. Sadler. 2001).

Desarrollo embrionario

El desarrollo embrionario involucra una gran proliferación y diferenciación celular. Luego de la fertilización del óvulo y hasta el día 4, los óvulos comienzan a moverse hacia el útero. En el día 5, todos los óvulos están ya en el útero (Forcelledo, et al., 1981). Dicho término de la migración implica el comienzo del proceso de implantación. Este proceso de implantación comienza en el día 5, cuando la mayoría de los blastocitos pierden su zona pelúcida y por el día 7 las células del trofoblasto están en contacto íntimo con el estroma uterino (Dubin et al., 1979). El periodo de gastrulación (del día 8 al 9 en la rata) comprende el desarrollo del disco germinal bilaminar (epiblasto e hipoblasto) a la formación de una capa primitiva trilaminar (ectodermo, mesodermo y endodermo) del embrión. Las estructuras formadas durante este periodo comprenden la notocorda y la placa neural (día gestacional 9). Al término del noveno día una activa proliferación celular en la zona ectodérmica caudal

del embrión sufre un engrosamiento distinto, formando la línea primitiva que definirá el eje anteroposterior del embrión. Dentro de este proceso una ligera curvatura axial (llamada surco primitivo) también se desarrolla. Posteriormente este eje comienza a rotar de una curvatura dorsal cóncava a una convexa, donde la cola toma su posición del lado derecho con respecto al eje antero-posterior del cuerpo (Suckow et al., 2006). Desde el día 9 al 10 de preñez en la rata, el embrión incrementa significativamente el número de somitas, se lleva a cabo la rotación axial, se visualiza el latido cardíaco además del cierre completo del tubo neural; del día 11 al día 15 se encuentra la gestación media y muy próximo el término de la organogénesis (Edwards MJ. et al, 2003). Finalmente se lleva a cabo el último tercio de la gestación que va del día 16 al 21.5 este engloba el término de la maduración embrionaria, en donde se ven fenómenos como el incremento de masa del embrión y el termino de maduración de los órganos (Celis E., 2014).

Número de crías por camada

Las ratas son mamíferos muy prolíferos, a lo cual colabora el hecho de que tengan un período gestacional tan corto que va de los 22 a los 24 días. Una hembra puede tener de 8 a 12 nidadas en un solo año, y de cada una de ellas nacen alrededor de 8 a 12 ejemplares con una media de 9 (Celis E., 2014).

KISSPEPTINA MODULADOR DEL DESARROLLO SEXUAL

Kisspeptina

El gen Kiss1 fue descrito por primera vez en 1996 como un gen supresor de la metástasis y su expresión en células tumorales no metastásicas de melanoma, su nombre es compuesto por “ss” que significa “secuencia supresora” y el prefijo “Ki” para coincidir con el famoso chocolate “KISS” dado que fue descubierto en Hershey, Pensilvania (Ohtaki, et al, 2001). El gen se localiza en el cromosoma 1q32, con cuatro exones, de los cuales traduce los dos últimos y codifica a pre-pro-kisspeptina de 145 aminoácidos (Skorupskaite, et al, 2014) resultado de sus cortes proteolítico origina péptidos llamados kps de tamaño de 54, 14, 13 y 10 aminoácidos. En 2001 el receptor GPR54 y sus variables, AXOR12, hOT7T173 y HH8, ahora llamados KISS1R se vincularon con los productos del gen Kiss1 (Tng, 2015).

Mecanismo de acción de la kisspeptina

El receptor KISS1R está ligado a una proteína Gq. Se expresa ampliamente por el cuerpo, además de varias regiones del cerebro; en placenta, páncreas, riñón, etc... es parte fundamental del eje hipotálamo-hipófisis-ovario ya que es quien activa a GnRH para iniciar la pubertad y la vida reproductiva de un sujeto adulto (Muir A., et al, 2001 y Liu X, et al, 2008).

La unión de kisspeptina a el receptor KISS1R activa a una proteína Gq dependiente de GTP, que desplaza su subunidad α para activar a fosfolipasa C (PLC), al activarla estimula la transformación de PIP₂ en IP₃ y diacilglicerol (DAG). La presencia de IP₃ produce el aumento en los niveles de Ca⁺² intracelular, favoreciendo la salida de Ca⁺² desde el RS hacia el citoplasma (Clarke, et al, 2015) (figura 4). Como consecuencia del aumento de Ca⁺² bloquea los canales de K⁺ de la membrana, impidiendo la entrada al citoplasma produciendo una despolarización de la membrana celular que genera un potencial de acción que activa a las neuronas GnRH y a nivel local la secreción de hormonas (Pinilla, et al, 2012; TNg, et al, 2015 & Hu KL, et al, 2019).

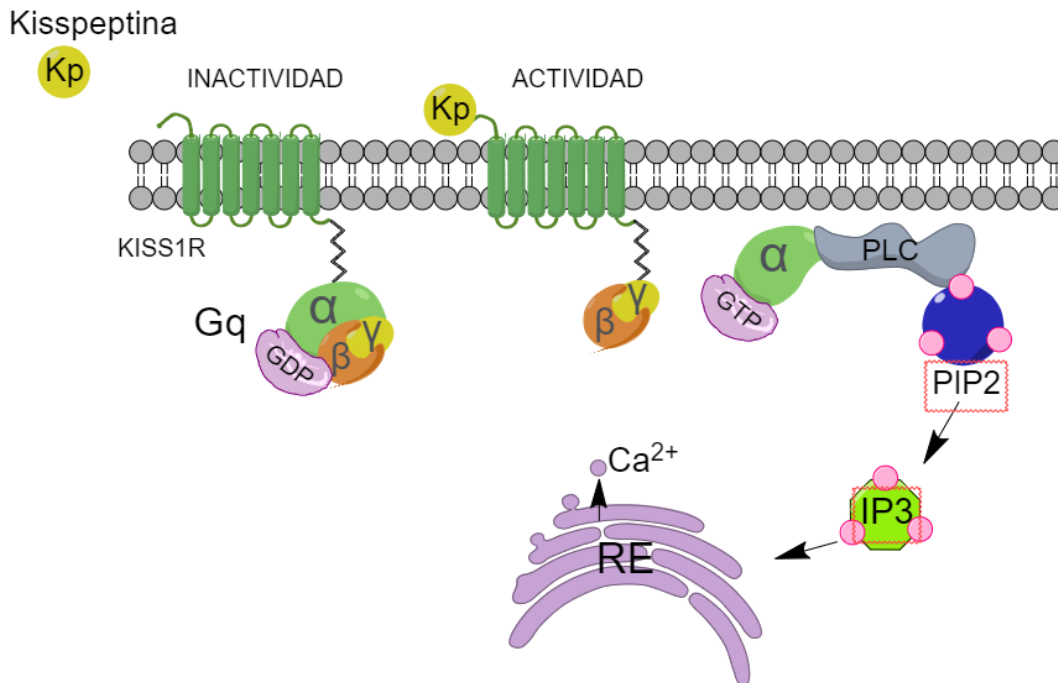


Figura 3. Modelo mediado por kisspeptina, se une a GPR54 activando su proteína Gq para aumentar los niveles intracelulares de Ca²⁺. (Hu KL, *et al.* 2019).

Kisspeptina durante la preñez de los mamíferos

Recientemente se ha demostrado que el sistema kisspeptina-kiss1R es fundamental para el desarrollo reproductivo normal (Dhillon, *et al.*, 2006); lo que nos lleva a un nuevo campo de estudio del sistema Kisspeptina-Kiss1R y poder decir que no solo está presente en el eje HHO y en el inicio de la pubertad, sino que desempeña un papel en el embarazo, puesto que al inicio del embarazo los niveles de kisspeptina tienen un aumento considerable debido a que el mayor productor de la kisspeptina que se encuentra en suero, son las células trofoblásticas ubicadas en la placenta (Kotani m, 2001; Bilban m, 2004) (Horikoshi, *et al.*, 2003); lo que se relaciona con una actividad placentaria (Dhillon, *et al.*, 2006) y coincide con la regulación de la invasión del trofoblasto (Staun-Ram, *et al.*, 2004) así mismo se han asociado bajos niveles de kisspeptina en suero con el aumento de riesgo de aborto en el primer trimestre de embarazo (Jayasena CN, 2014 y Sullivan-Pyke c 2018) conforme el embarazo avanza la kisspeptina sigue presente ya que en la etapa final del primer trimestre

se encuentra en el sincitiotrofoblasto (Bilban, *et al*, 2004), pasado el primer trimestre de gestación los niveles de kisspeptina y su receptor disminuyen gradualmente durante la maduración placentaria y kisspeptina no es detectable en el embrión (Terao, *et al*, 2004) y reaparece el sistema kisspeptina en el trabajo de parto específicamente a nivel placentario (Torricelli *et al* . 2008) para suprimir la angiogénesis al disminuir el factor de crecimiento endotelial vascular e inhibir crecimientos placentarios anormales (Saadeldin *im*, 2012).

Kisspeptina: modulador del inicio de la pubertad en mamíferos

La kisspeptina estimula la secreción de gonadotropinas por activación de su receptor en neuronas GnRH hipotalámicas, y aunque no hay pruebas inequívocas que demuestren contacto sináptico directo entre sus neuronas, el bloqueo con acyline (antagonista GnRH) en ratas, ratones y primates impide el aumento de LH y FSH asociado con la administración central o periférica de kisspeptinas1 (Julieta C, *et al*, 2011).

Actualmente se sabe que Kisspeptina modula el inicio de la pubertad, mediante la activación de neuronas GnRHérgicas en hipotálamo. Promoviendo la liberación de la hormona liberadora de Gonadotropinas (GnRH). Además de estimular la secreción de LH (Messenger, *et al*, 2005)

La secreción de GnRH se encuentra regulada por esteroides sexuales, pero las neuronas GnRH no expresan receptor estrogénico alfa (ER α) ni receptor androgénico (AR) (Smith, *et al*, 2005). Kisspeptina tiene un efecto sobre el núcleo arcuato el cual se traduce como un feedback negativo sobre los esteroides gonadales en el eje HHO y sobre el núcleo anteroventral periventricular (AVPV) se vincula al feedback positivo de los estrógenos y es responsable del pico de LH preovulatorio (Hameed S & Dhilo WS., *et al*, 2001; Calé, *et al*, 2011).

Kisspeptina y pubertad

Para iniciar debemos dejar claro que conforme a los datos experimentales arrojados el único péptido de la familia kisspeptina con la mejor actividad biológica es el péptido kisspeptina-10. Dado que fue el único que logró activar la liberación de Ca^{2+} intracelular, además, es el más conservado a lo largo de las especies (Bilban M. 2004). Kisspeptina ejerce su efecto a través de la activación del receptor GPR54, el que está acoplado a proteína G (Lee JH. 1996).

El inicio de la pubertad es gatillado por la activación de neuronas cerebrales que producen GnRH e inducen la liberación hipofisaria de LH y FSH para el despertar gonadal. Durante muchos años, en el intento de hallar el verdadero inicio del eje gonadal, se investigaron neuropéptidos cerebrales como el neuropéptido Y (NPY), el ácido gamma-aminobutírico (GABA) y la leptina. Estas investigaciones solo sumaron ambigüedad hasta la aparición de las kisspeptinas.

La inyección crónica intermitente de kisspeptina induce la pubertad en ratas inmaduras y en monos Rhesus, lo que sugiere que la activación de GPR54 es aparentemente suficiente para gatillar la liberación de GnRH puberal (Julieta C, *et al*, 2011).

Antagonista del receptor Kiss1R: Sal de Kisspeptina-234 trifluoroacetato (p-234)

Kisspeptin-234 es un péptido sintético con potente actividad antagonista en KISS1R y compite directamente en el sitio de unión de Kisspeptina-10. Kisspeptina-234 es el primer antagonista informado para el sistema de señalización kisspeptina / KISS1R.

JUSTIFICACIÓN

Durante los recambios celulares úterinos que se dan a lo largo del embarazo diversos factores que coadyuvan al inicio, desarrollo y término de la gestación. Entre estos reguladores tenemos a los factores hormonales como el estradiol y la progesterona, así como el óxido nítrico y la inervación simpática y parasimpática. Sin embargo, actualmente existe una molécula, llamada Kisspeptina que a través de su receptor Kiss1R favorece el inicio de la pubertad en el hipotálamo, también se tienen indicios de esta sustancia a nivel periférico en eventos como la gestación. Por lo cual, proponemos que la Kisspeptina por medio de su receptor Kiss1R puede regular el desarrollo del útero y modular la gestación de ratas Wistar preñadas.

A través, del estudio de la Kisspeptina y su receptor Kiss1R, podremos saber cómo es la expresión del receptor durante diferentes edades gestacionales (0, 5, 10, 15 y al parto). Ayudándonos a recabar más información sobre la regulación del sistema Kisspeptinérgico. Para evaluar nuestra investigación bloquearemos al receptor Kiss1R con el antagonista de kisspeptina (P-234) que será administrado vía dorsal e “*in situ*” previo a la copula en ratas Wistar. Evaluando así el efecto histológico de bloquear el receptor Kiss1R en el útero de ratas gestantes. El resultado obtenido, nos ayudará entender más sobre el sistema Kisspeptina/KISS1R a nivel periférico, su antagonista P-234 y su relevancia en la gestación.

HIPÓTESIS

La administración del antagonista de kisspeptina modifica el desarrollo celular de las capas del útero de ratas Wistar gestantes.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar el desarrollo uterino durante las edades gestacionales 0, 5, 10, 15 y al parto en ratas Wistar.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Conocer los grosores del endometrio, miometrio y perimetrio durante las edades gestacionales (EG) 0, 5, 10, 15 y post-parto en ratas Wistar intactas y en el caso de los grupos administrados con antagonista de Kisspeptina conocer dichos grosores a la edad post-parto.
2. Cuantificar el número de glándulas uterinas durante las edades gestacionales (EG) 0, 5, 10, 15 y post-parto en ratas Wistar intactas y cuantificar el número de glándulas uterinas a la edad post-parto en ratas administradas con antagonista de Kisspeptina.

METODOLOGÍA

Diagrama de trabajo

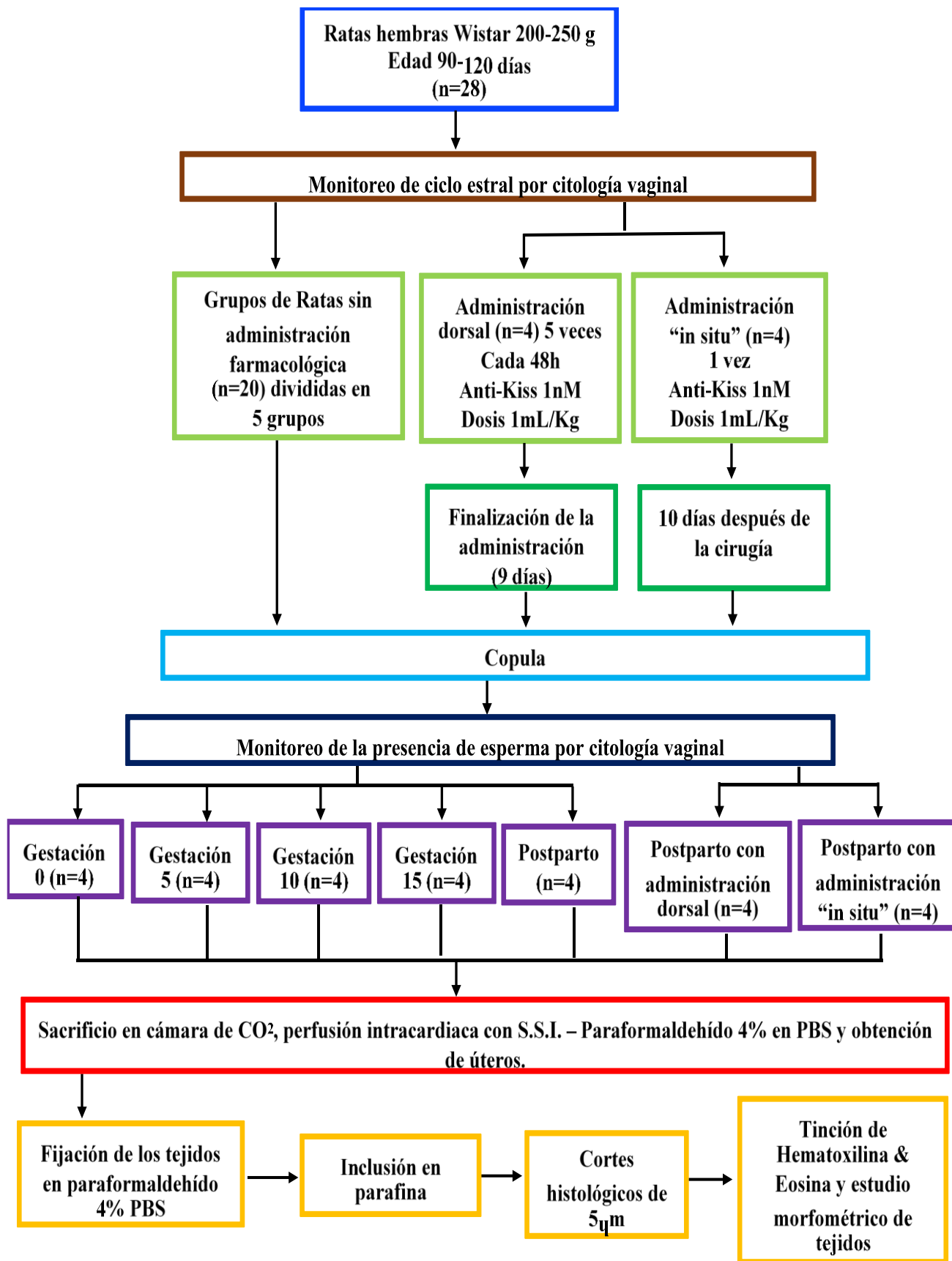


Figura 4. Diagrama de trabajo.

En este trabajo usamos 28 ratas hembras Wistar, provenientes del Bioterio Claude Bernard, las cuales se mantuvieron en ciclos continuos de luz/obscuridad, 12/12 horas con acceso libre de agua y alimento, la rata es sexualmente activa entre los 45 y 60 días después de su nacimiento. Se recibieron con un peso de 90-100g a una edad correspondiente en promedio de 45 días de nacidas. Se monitorearon diariamente para registrar el peso, con el objetivo de llegar hasta el peso de 250g correspondiente con una edad promedio de 90-120 días, de acuerdo, a la literatura (F.J. Benavides, *et al*, 2003) a esta edad y peso, las ratas son sexualmente activas y pueden entrar en preñez. Cuando las ratas llegaron a los 200g, se inició el monitoreo del ciclo estral, mediante un raspado vaginal y posteriormente la realización de un frotis, el cual fue teñido con la técnica rápida de Hematoxilina & Eosina (más adelante se detalla). Con ello, evaluamos las fases del ciclo estral, (estro, diestro, proestro y metaestro). Lo cual nos permitió conocer, si las ratas son cíclicas estralmente hablando. Para posteriormente someterlas a copula con el macho, cuando llegaron a los 250g y determinar bajo un raspado vaginal la presencia de esperma y de este modo determinar las edades gestacionales.

Dividimos nuestro trabajo en dos grupos, un grupo control y un grupo con administración farmacológica.

Grupo control: Una vez cumplidos los requerimientos de edad y peso de la rata, esta sostuvo ciclo estrales estables, por tanto, se sometieron a copula, donde un grupo de ratas (n=4) fueron puestas junto al macho, seguido de esto se monitoreo con frotis vaginales para la observación de esperma, de ser observado se cuenta como el día 0 y se calculan las demás edades gestacionales (5, 10, 15 y Post-parto). Se formaron 5 grupos cada uno con n=4, los cuales se dividieron en las edades gestacionales EG0, EG5, EG10, EG15 y Post-parto.

Grupo con administración farmacológica: Grupos a edad gestacional post-parto, con administración farmacológica (dorsal n=4 e “in situ” n=4).

Grupo con administración dorsal: Llegado el peso y edad ideal de la rata, esta presento ciclos estrales estables, este grupo de ratas (n=4), se sometieron a una administración dorsal por encima de la ubicación anatómica en donde se encuentran

las vértebras (L2 y L4) en este lugar se administró el antagonista de kisspeptina a una concentración de 1nM y a una dosis (1mL/Kg) la cual se administró cada 48 horas, esto por 5 veces.

Grupo con administración “in situ”: Llegado el peso y edad ideal de la rata, esta presento ciclo estrales estables, por tanto este grupo de ratas (n=4) se sometió a cirugía, los sujetos recibieron una dosis de ketamina/xilacina (2mL/Kg) para sedación, se efectuó una incisión de aproximadamente 1 cm en la piel del dorso por encima de la ubicación anatómica de los ovarios, se separó la piel del musculo con ayuda de las tijeras tipo Slender, sobre el musculo se hizo también una incisión y se expuso el ovario y la parte proximal del cuerno uterino, usando una jeringa para insulina de 1mL se procedió a la administración del antagonista de kisspeptina sobre ambos cuernos del útero a una concentración de 1nM y una dosis de (1mL/Kg). Los sujetos que se sometieron a cirugía se supervisaron hasta el cierre completo de la incisión.

Posteriormente ambos grupos se sometieron a copula y mediante un raspado vaginal se determinó la presencia de esperma y así se pudo apreciar lo que fuese el inicio de la preñez y el día de parto, si es que este último existiera, dada la actividad del antagonista de kisspeptina.

Citología vaginal

El muestreo vaginal se llevó a cabo cada 24 horas por tiempo indefinido, puesto que se busca observar una regularidad en las distintas fases del ciclo estral; el muestreo se realizó en horario matutino.

Para la toma de muestra se utilizó un asa bacteriológica calibrada; previamente esterilizada, se introdujo en la vagina y con movimientos suaves y circulares se tomó la muestra de las paredes vaginales, esta muestra se depositó en un portaobjeto que anteriormente se le coloco una pequeña gota de solución salina isotónica (S.S.I), la muestra se extendió y posteriormente se fijó con calor.

Tinción rápida hematoxilina y eosina

Después de que la muestra se fijó, se llevó a cabo una tinción rápida de hematoxilina y eosina.

Las muestras se introdujeron en un vaso de coplin que contiene hematoxilina y se dejó reposar por 4 minutos posteriormente en un siguiente vaso de coplin que contiene eosina se dejó reposar por 3 minutos, terminado esto las muestras se observaron al microscopio y se evaluaron bajo los criterios de Long y Evans.

Sacrificio y obtención de úteros

Se realizó al día de parto o a la edad gestacional asignada; el sacrificio de los sujetos se efectuó por medio de una cámara de CO₂, posteriormente se hizo una perfusión intracardiaca y se introdujo solución salina isotónica (100 mL), minutos después se procedió con la administración de solución con paraformaldehído al 4% (100mL). Se diseccionó de forma ventral para obtener el útero, registrar el peso del mismo y colocarlos en solución con paraformaldehído 4%, posteriormente se deshidrataron e incluyeron en parafina para después obtener cortes histológicos.

Inclusión en parafina

La inclusión es el proceso por el cual se incrementa la dureza y consistencia del tejido para permitir su corte. La sustancia habitualmente utilizada en este proceso es la parafina. El reto consiste en sustituir el agua que hay en el interior y exterior de las células por parafina. La forma más sencilla es usar un molde en el que se vierte la parafina y en el que se introduce la muestra procesada y se deja enfriar para que el conjunto se solidifique y así obtener un bloque listo para un corte histológico.

Cortes histológicos

Una vez incluido el material y realizados los bloques se puede pasar a obtener los cortes. En principio requiere una temperatura del medio que oscile entre los 18 y 20 grados,

después los bloques se enfriaron en barras de hielo para que la parafina tenga una temperatura óptima que permita obtener cortes histológicos de calidad; el bloque se colocó en el micrótopo de cuchilla deslizante Leica® SR2010R el cual está calibrado para hacer cortes de 5µm de grosor, posteriormente se obtuvieron los cortes histológicos y se depositaron en un baño maría para remover el exceso de parafina y para una mejor extensión de los tejidos seguido de esto los tejidos se pescaron en portaobjetos y se dejaron secar por 5 minutos, después se colocaron en una plancha que se encontraba a 38° C esto con el fin de fijar el tejido al portaobjetos y éste quede listo.

Tinción de hematoxilina & eosina (H&E)

De los bloques de parafina que contienen inmerso los cuernos uterinos se obtuvieron cortes transversales de 5µm de grosor en donde se aprecien las diferentes capas que conforman el útero, usando un micrótopo Leica® SR2010R las condiciones para realizar los cortes histológicos, es un previo enfriamiento de los bloques de parafina, también una temperatura del medio que oscile entre los 18 y 20 grados, esto para que los cortes histológicos mantengan su forma ya que altas temperaturas afectan el estado de la parafina. Posterior se procede a la tinción de H&E con los siguientes tiempos:

1. 10' en xilol
2. 5' en xilol
3. 5' Alcohol- xilol 1:1
4. 2' Alcohol 100%
5. 2' Alcohol 96%
6. 1' agua destilada
7. 4' hematoxilina
8. Baños en Agua destilada
9. Diferenciar con alcohol ácido
10. Virar con solución saturada de carbonato de litio
11. 3' eosina
12. 2' alcohol 96%
13. 2' alcohol 100%
14. 10' xilol

15. Cubrir con resina sintética y colocar cubre objetos
16. Colocar en platina caliente (45-50 ° C) para evaporar xilol y se adhiera la resina

Análisis morfométrico de cortes histológicos

Se utilizaron cortes histológicos de 5 µm de espesor obtenidos a intervalos de 100 µm que incluyeron al útero completo, los cuales fueron desparafinados, hidratados y teñidos con hematoxilina-eosina. Los cortes se analizaron con un microscopio de campo claro. De cada laminilla se observaron siete campos fotografiados con el objetivo 40X para la evaluación del epitelio basal del endometrio y con el objetivo de 20X el grosor de la capa cerosa, muscular y de tejido conectivo.

Conteo y análisis estadístico

Las mediciones se realizaron con el software Image J (NIH) el cual se calibro en µm por pixel con ayuda de una imagen de patrón, usando la función de análisis de datos por pixel se obtiene la longitud de cada tejido, las mediciones obtenidas se procesaron en hoja de cálculo. Para el cálculo o medición del grosor del endometrio, miometrio, perimetrio, glándulas endometriales, los datos se sometieron a una prueba de ANOVA de una vía, seguida de U de Mann-Witney. Comparando los valores de dos grupos y considerándose diferentes cuando $*p \leq 0.05$.

RESULTADOS

Análisis de la morfología de las capas uterinas a diferentes edades gestacionales por tinción de hematoxilina y eosina.

Realizamos un análisis cuantitativo del grosor de las capas uterinas de ratas gestantes a las edades 0, 5, 10, 15 en comparativa con ratas post-parto todas estas sin administración farmacológica. Por otro lado, también se analizaron las capas uterinas de ratas administradas con antagonista de kisspeptina vía dorsal e “*in situ*” versus ratas post-parto intactas. De cuyo análisis se estudió el efecto post-término del antagonista de kisspeptina sobre el desarrollo uterino de ratas Wistar.

La evaluación estadística, se dividió con forme a las capas uterinas, perimetrio, miometrio, endometrio y epitelio basal.

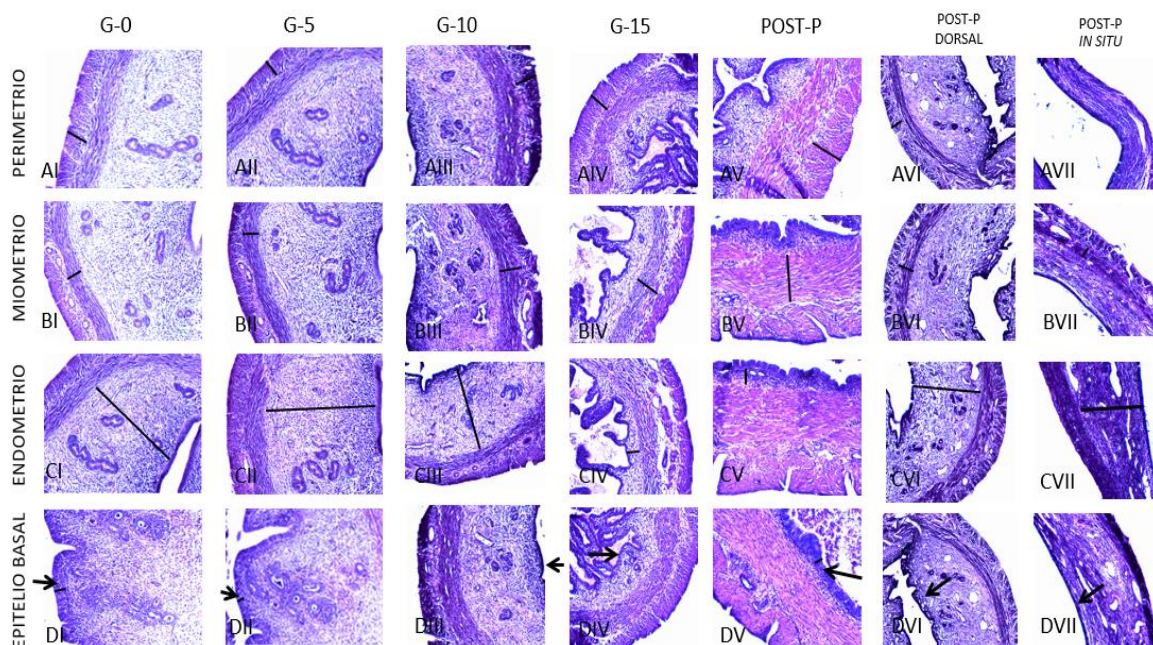


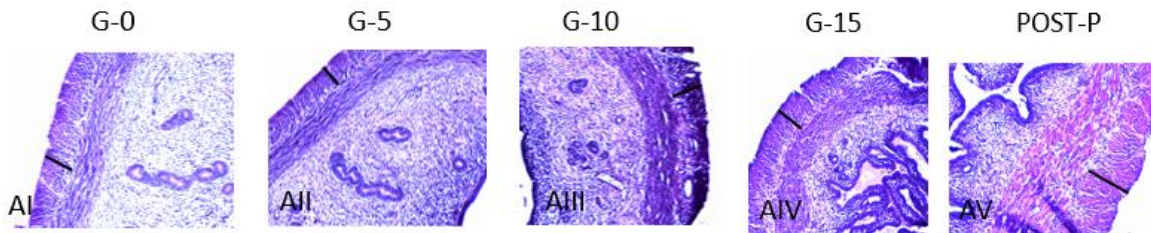
Figura 5. El panel de imágenes de H&E muestra el desarrollo progresivo de las capas uterinas de rata Wistar en sus edades gestacionales G0 (AI, BI, CI, DI), G5 (AII, BII, CII, DII), G10 (AIII, BIII, CIII, DIII), G15 (AIV, BIV, CIV, DIV), y post-parto en ratas intactas (AV, BV, CV, DV); administradas con antagonista de kisspeptina vía dorsal (AVI, BVI, CVI, DVI); administradas vía *in situ* (AVII, BVII, CVII, DVII). Imágenes tomadas con un objetivo de 10X en microscopio de campo claro. En AI a AV se muestra el desarrollo temporal del perimetrio durante la gestación hasta llegar a el parto; en AVI, también postparto, se muestra el efecto de la administración del antagonista de kisspeptina vía dorsal en el perimetrio y en AVII muestra el efecto con la administración *in situ*. En BI a BV se muestra el desarrollo temporal del miometrio durante la gestación hasta llegar a el parto; en BVI, también postparto, se muestra el efecto de la administración del antagonista de kisspeptina vía dorsal en el miometrio y en BVII muestra el efecto con la administración *in situ*. En CI a CV se muestra el desarrollo temporal del endometrio durante la gestación hasta llegar a el parto; en CVI, también postparto, se muestra el efecto

de la administración del antagonista de kisspeptina vía dorsal en el endometrio y en CVII muestra el efecto con la administración *in situ*. . En DI a DV se muestra el desarrollo temporal del epitelio durante la gestación hasta llegar a el parto; en DVI, también postparto, se muestra el efecto de la administración del antagonista de kisspeptina vía dorsal en el epitelio basal y en DVII muestra el efecto con la administración *in situ*.

Dicho esto, abordaremos los resultados arrojados de la primera capa externa uterina evaluada (perimetrio), en donde se obtuvieron graficas una que mostraron el grosor del perimetrio a diferentes edades gestacionales (G0, G5, G10, G15 y Posp-parto) y la otra el grosor del perimetrio post-parto con administración de antagonista de kisspeptina a una concentración de 1nM y a una dosis (1mL/Kg), vía dorsal e "*in situ*" con respecto a la distribución normal del grupo post-parto intacto.

Perimetrio, evaluación morfométrica durante el curso de la preñez en ratas Wistar intactas y comparativa del post-parto en ratas intactas y las administradas con antagonista de kisspeptina.

Figura 6. El grosor del perimetrio presento las siguientes mediciones: úteros en edades G0 91.21 $\mu\text{m} \pm 2.18$ e.s.m., G5 99.33 $\mu\text{m} \pm 2.78$ e.s.m., G10 83.48 $\mu\text{m} \pm 1.9$ e.s.m., G15 110.27 $\mu\text{m} \pm 2.66$ e.s.m. * vs G0 y post-parto 158.61 $\mu\text{m} \pm 2.46$ e.s.m.* vs G0; n=4 para todos los grupos. Se aplicó un análisis de varianza ANOVA para un solo factor * $p \leq 0.05$ seguida U de Mann-Witney.



GROSOR DEL PERIMETRIO DIFERENTES EDADES GESTACIONALES

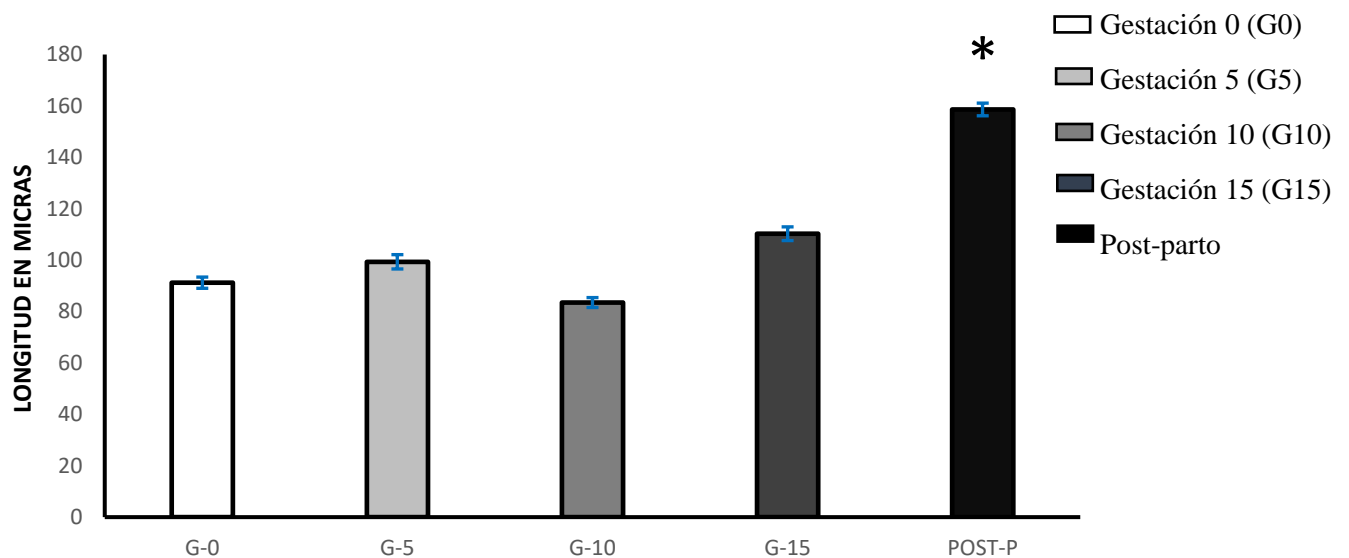


Figura 6. Comportamiento del perimetrio durante la gestación de ratas Wistar intactas, divididos aleatoriamente en grupos n=4, gestación 0, gestación 5, gestación 10, gestación 15 y post-parto. Se aplicó prueba estadística ANOVA para un solo factor $p \leq 0.05$ seguida U de Mann-Witney.

Figura 7. El grosor del perimetrio de los grupos administrados vía *in situ* y dorsal vs post-parto intactas presento las siguientes mediciones: post-parto intactas $158.61 \mu\text{m} \pm 2.46$ e.s.m., post-parto administradas con antagonista del receptor Kiss1R (p-234) 1nM vía dorsal $59.46 \mu\text{m} \pm 4.20$ e.s.m.* vs post-parto intactas y post-parto administrados con antagonista del receptor Kiss1R (p-234) 1nM vía *in situ* $80.43 \mu\text{m} \pm 2.23$ e.s.m.* vs post-parto intactas; n=4 para todos los grupos. Se aplicó un análisis de varianza ANOVA para un solo factor * $p \leq 0.05$ seguida U de Mann-Witney.

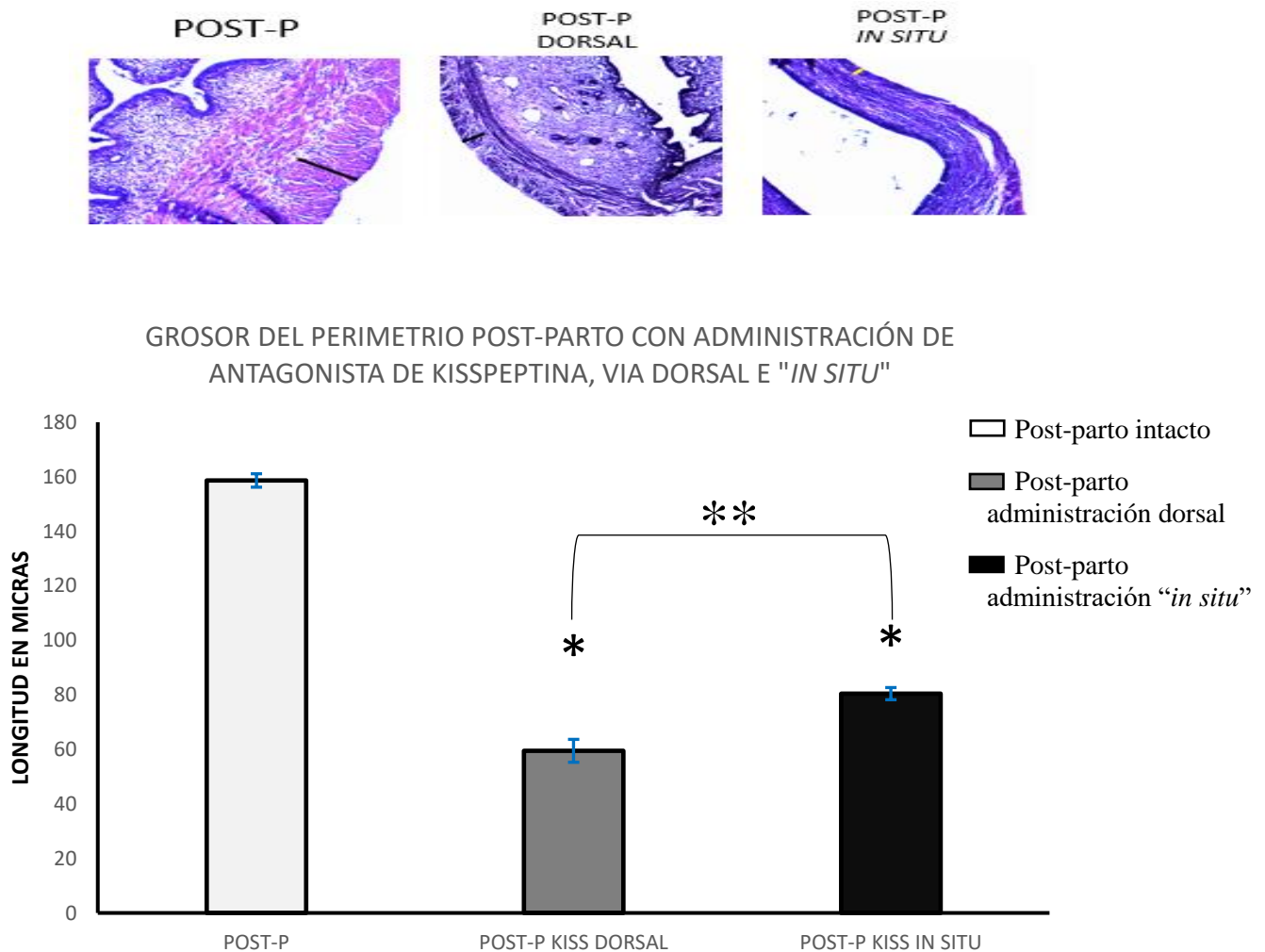


Figura 7. Comportamiento del perimetrio post-parto en ratas intactas y administradas vía dorsal e "*in situ*" con p234. Post-parto intactas □, post-parto con administración de antagonista de kisspeptina vía dorsal ■, post-parto con administración de antagonista de kisspeptina vía "*in situ*" ■. Se aplicó prueba estadística ANOVA para un solo factor * $p \leq 0.05$ seguida U de Mann-Witney.

Miometrio, evaluación morfométrica durante el curso de la preñez en ratas Wistar intactas y comparativa del post-parto en ratas intactas y las administradas con antagonista de kisspeptina.

Figura 8. El grosor del miometrio presento las siguientes mediciones: úteros en edades G0 121.93 $\mu\text{m} \pm 3.53$ e.s.m., G5 103.34 $\mu\text{m} \pm 2.13$ e.s.m., G10 112.59 $\mu\text{m} \pm 3.58$ e.s.m., G15 114.60 $\mu\text{m} \pm 3.60$ e.s.m. * vs G0 y post-parto 236.98 $\mu\text{m} \pm 3.76$ e.s.m.* vs G0; n=4 para todos los grupos. Se aplicó un análisis de varianza ANOVA para un solo factor *p \leq 0.05 seguida U de Mann-Witney.

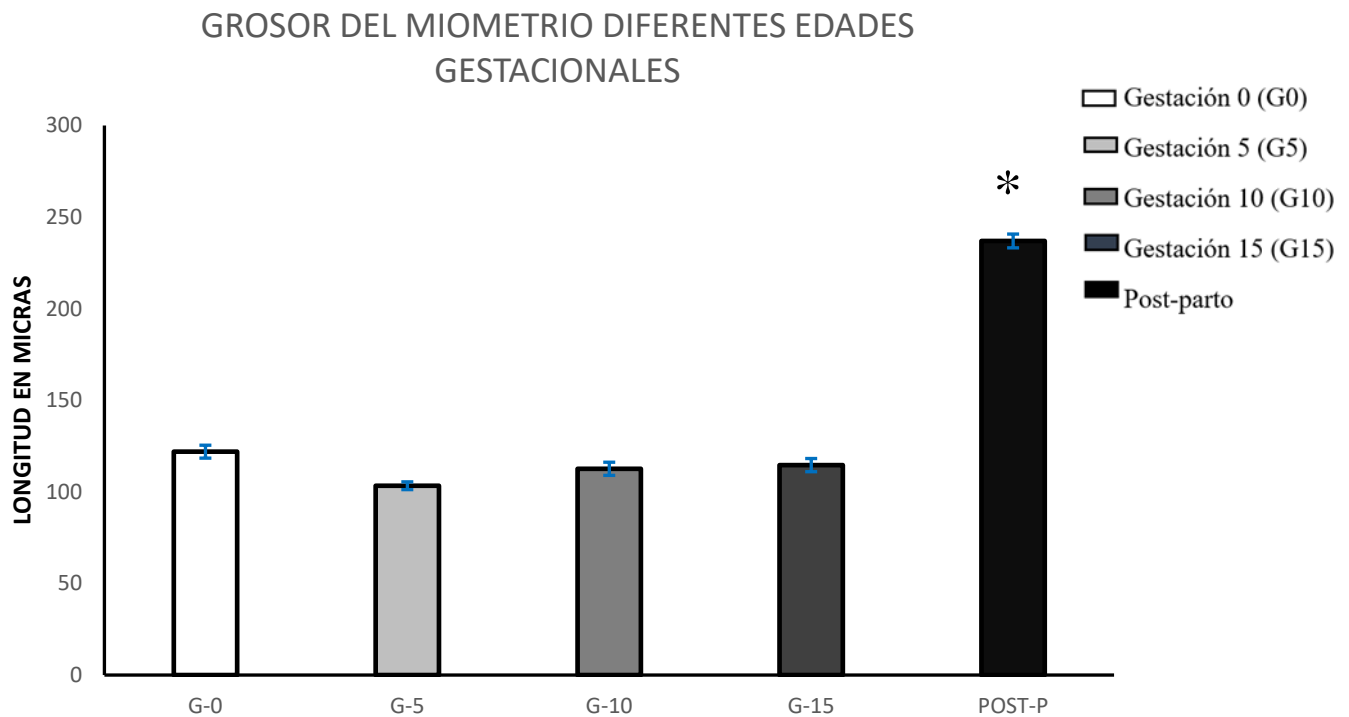
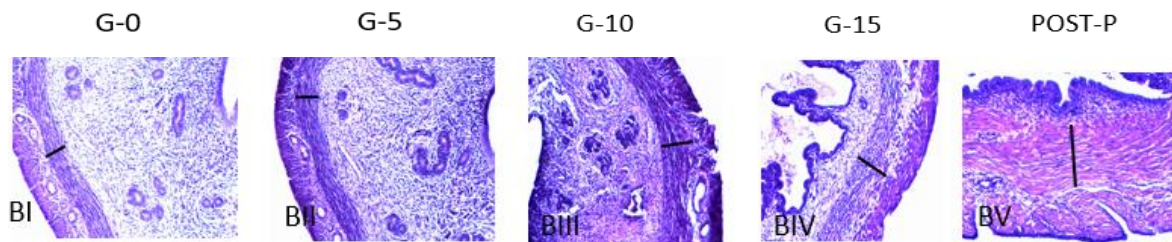


Figura 8. Comportamiento del miometrio durante la gestación de ratas Wistar intactas. Gestacional 0, gestacional 5, gestacional 10, gestacional 15 y post-parto. Se aplicó prueba estadística ANOVA para un solo factor *p \leq 0.05 seguida U de Mann-Witney.

Figura 9. El grosor del miometrio de los grupos administrados vía *in situ* y dorsal vs post-parto intactas presento las siguientes mediciones: post-parto intactas $236.98 \mu\text{m} \pm 3.76$ e.s.m., post-parto administradas con antagonista del receptor Kiss1R (p-234) 1nM dorsal $82.92 \mu\text{m} \pm 5.86$ e.s.m. * vs post-parto intactas y post-parto administrados con antagonista del receptor Kiss1R (p-234) 1nM *in situ* $121.22 \mu\text{m} \pm 4.24$ e.s.m. * vs post-parto intactas; n=4 para todos los grupos. Se aplicó un análisis de varianza ANOVA para un solo factor * $p \leq 0.05$ seguida U de Mann-Witney.

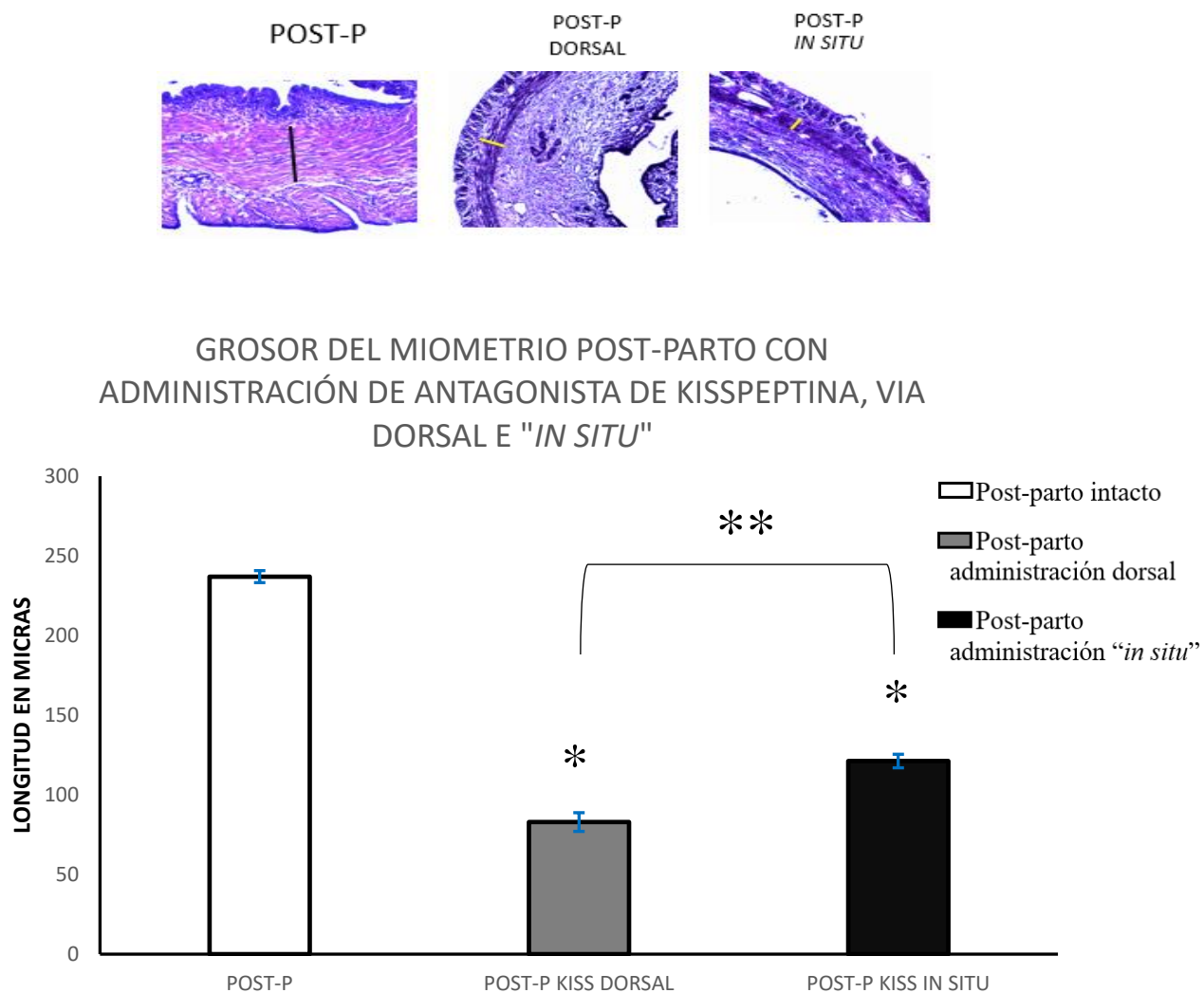


Figura 9. Comportamiento del miometrio post-parto en ratas intactas y administradas vía dorsal e "*in situ*" con p234. Post-parto intactas, □ post-parto con administración de antagonista de kisspeptina vía dorsal, ▒ post-parto con administración de antagonista de kisspeptina vía "*in situ*". ■ Se aplicó prueba estadística ANOVA para un solo factor * $p \leq 0.05$ seguida U de Mann-Witney.

Endometrio, evaluación morfométrica durante el curso de la preñez en ratas Wistar intactas y comparativa del post-parto en ratas intactas y las administradas con antagonista de kisspeptina.

Figura 10. El grosor del endometrio presento las siguientes mediciones: úteros en edades G0 $486.5 \mu\text{m} \pm 11.62$ e.s.m., G5 $459.69 \mu\text{m} \pm 11.14$ e.s.m., G10 $356.66 \mu\text{m} \pm 10.55$ e.s.m., G15 $186.32 \mu\text{m} \pm 5.29$ e.s.m. * vs G0 y post-parto $149.63 \mu\text{m} \pm 4.98$ e.s.m. * G0; n=4 para todos los grupos. Se aplicó un análisis de varianza ANOVA para un solo factor * $p \leq 0.05$ seguida U de Mann-Witney.

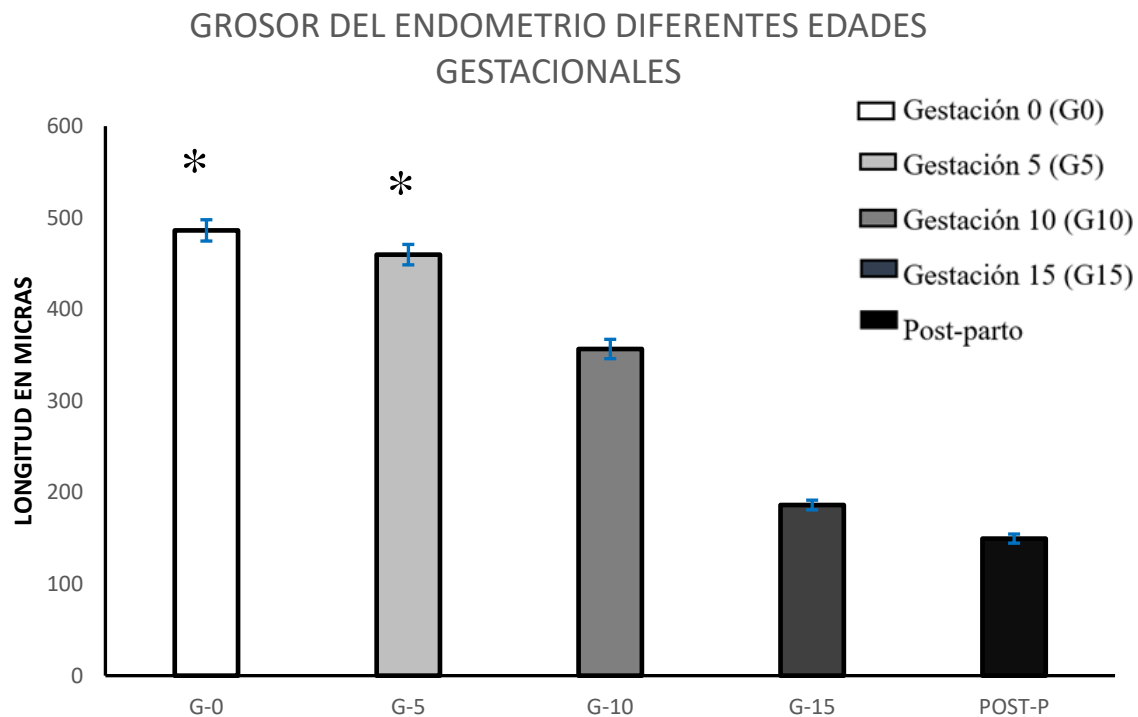
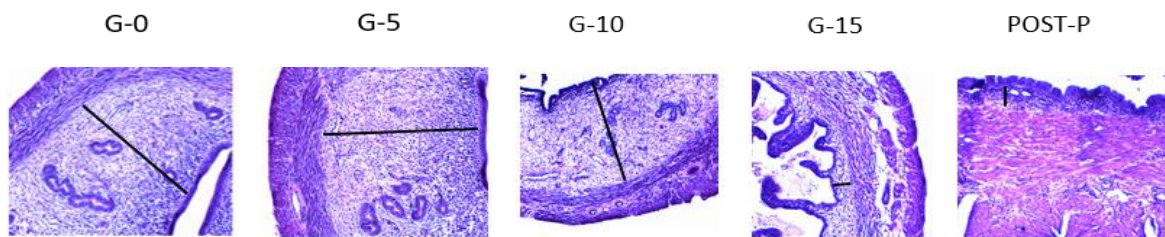


Figura 10. Comportamiento del endometrio durante la gestación de ratas Wistar intactas, gestacional 0, gestacional 5, gestacional 10, gestacional 15 y post-parto. Se aplicó prueba estadística ANOVA para un solo factor * $p \leq 0.05$ seguida U de Mann-Witney.

Figura 11. El Grosor del endometrio de los grupos administrados vía *in situ* y dorsal vs post-parto intactas presento las siguientes mediciones: post-parto intactas $149.63 \mu\text{m} \pm 4.98$ e.s.m., post-parto administrados con antagonista del receptor Kiss1R (p-234) 1nM vía dorsal $322.43 \mu\text{m} \pm 22.79$ e.s.m. * vs post-parto intactas y post-parto administrados con antagonista del receptor Kiss1R (p-234) 1nM vía *in situ* $269.74 \mu\text{m} \pm 12.9$ e.s.m. * vs post-parto intactas; n=4 para todos los grupos. Se aplicó un análisis de varianza ANOVA para un solo factor * $p \leq 0.05$ seguida U de Mann-Witney.

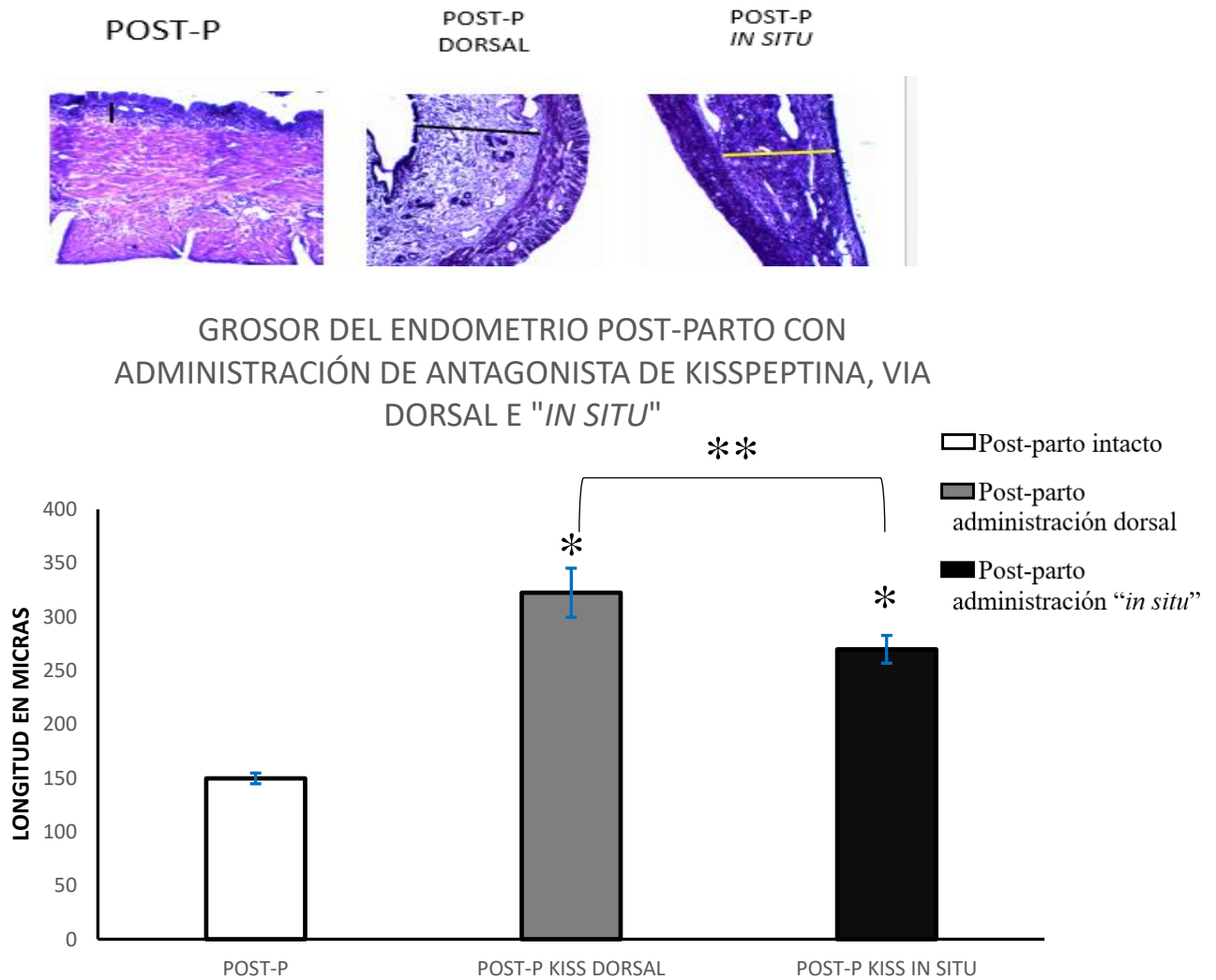


Figura 11. Comportamiento del endometrio post-parto en ratas intactas y administradas vía dorsal e "*in situ*" con p234. Post-parto intacto, □ post-parto con administración de antagonista de kisspeptina vía dorsal, ▒ post-parto con administración de antagonista de kisspeptina vía "*in situ*". ■ Se aplicó prueba estadística ANOVA para un solo factor * $p \leq 0.05$ seguida U de Mann-Witney.

Epitelio luminal, evaluación morfométrica durante el curso de la preñez en ratas Wistar intactas y comparativa del post-parto en ratas intactas y las administradas con antagonista de kisspeptina.

Figura 12. El grosor del epitelio luminal presento las siguientes mediciones: úteros en edades G0 $29.13 \mu\text{m} \pm 0.45$ e.s.m., G5 $16.13 \mu\text{m} \pm 0.25$ e.s.m., G10 $14.87 \mu\text{m} \pm 0.26$ e.s.m., G15 $14.56 \mu\text{m} \pm 0.29$ e.s.m. * vs G0 y post-parto $36.24 \mu\text{m} \pm 1.09$ e.s.m. * vs G0; n=4 para todos los grupos. Se aplicó un análisis de varianza ANOVA para un solo factor * $p \leq 0.05$ seguida U de Mann-Witney.

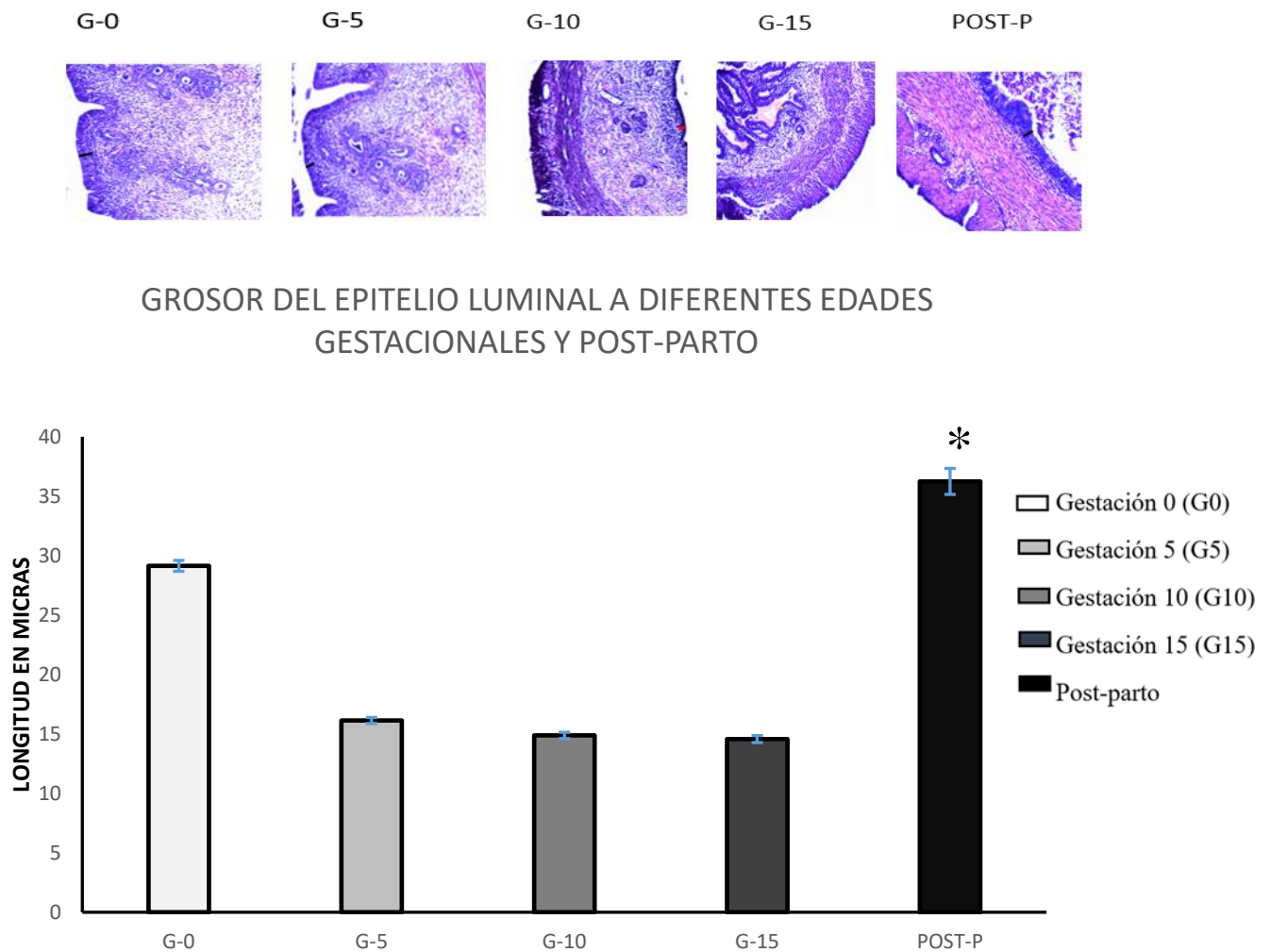


Figura 12. Comportamiento del epitelio luminal durante la gestación de ratas Wistar intactas, gestacional 0, gestacional 5, gestacional 10, gestacional 15 y post-parto. Se aplicó prueba estadística ANOVA para un solo factor * $p \leq 0.05$ seguida U de Mann-Witney.

Figura 13. El grosor del epitelio luminal de los grupos administrados vía *in situ* y dorsal vs post- parto intactas presento las siguientes mediciones: post-parto intactas $36.24 \mu\text{m} \pm 1.09$ e.s.m., post-parto administrados con antagonista del receptor Kiss1R (p-234) 1nM vía dorsal $20.15 \mu\text{m} \pm 1.42$ e.s.m. * vs post-parto intactas y post-parto administrados con antagonista del receptor Kiss1R (p-234) 1nM vía *in situ* $16.96 \mu\text{m} \pm 0.27$ e.s.m. * vs post-parto intactas; n=4 para todos los grupos. Se aplicó un análisis de varianza ANOVA para un solo factor * $p \leq 0.05$ seguida U de Mann-Witney.

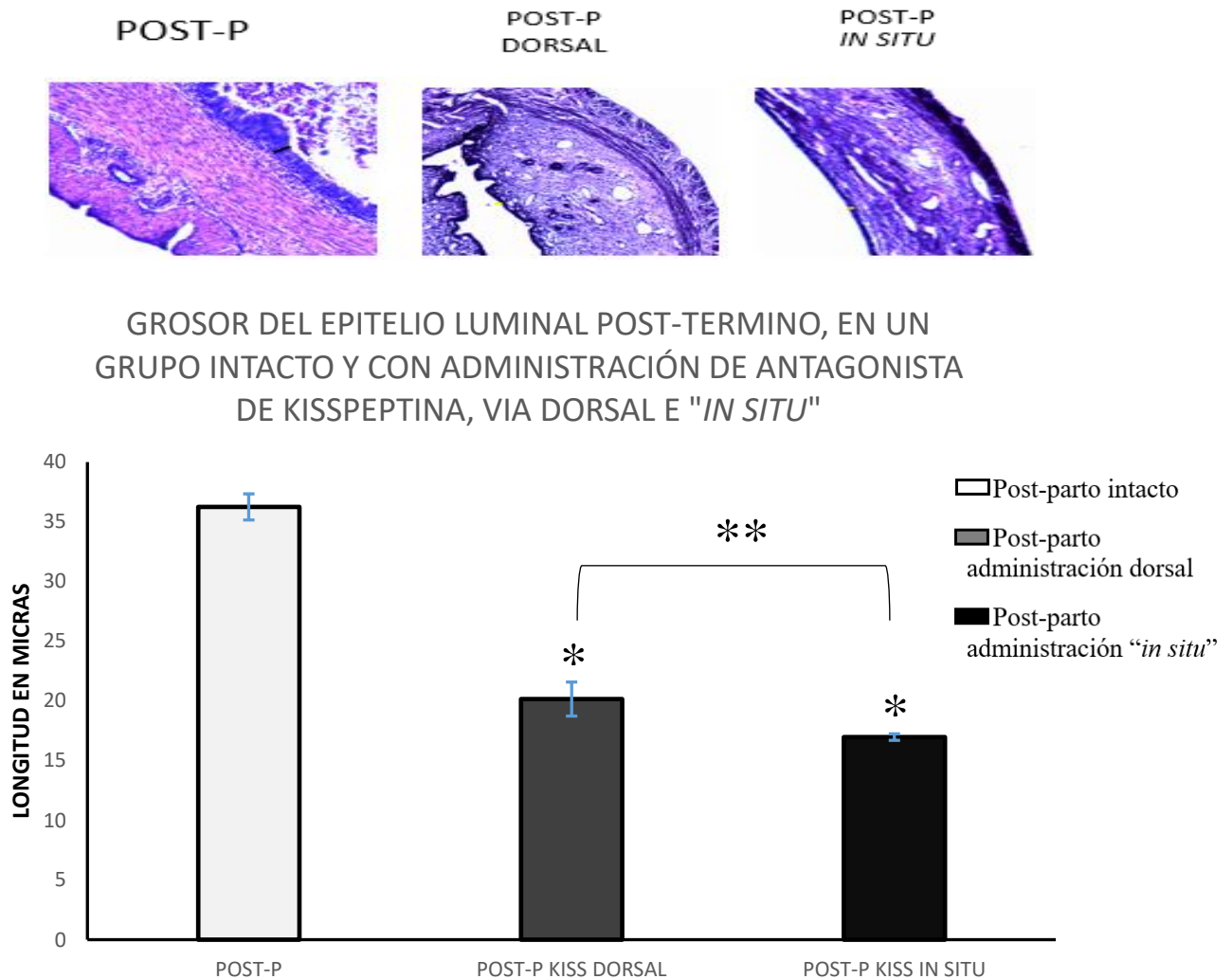


Figura 13. Comportamiento del epitelio luminal post-parto en ratas intactas y administradas vía dorsal e "*in situ*" con p234. Post-parto intactas, post-parto con administración de antagonista de kisspeptina vía dorsal, post-parto con administración de antagonista de kisspeptina vía "*in situ*". Se aplicó prueba estadística ANOVA para un solo factor * $p \leq 0.05$ seguida U de Mann-Witney.

Glándulas uterinas, conteo durante el curso de la preñez en ratas Wistar intactas y comparativa del post-parto en ratas intactas y las administradas con antagonista de kisspeptina.

Figura 14. El número de glándulas uterinas presento los siguientes datos: úteros en edades G0 5.1 ± 1.04 e.s.m., G5 6.25 ± 1.38 e.s.m., G10 8.75 ± 1.65 e.s.m., G15 2.2 ± 0.79 e.s.m. * vs G0 y post-parto 0 ± 0 e.s.m. * vs G0; n=4 para todos los grupos. Se aplicó un análisis de varianza ANOVA para un solo factor * $p \leq 0.05$ seguida U de Mann-Witney.

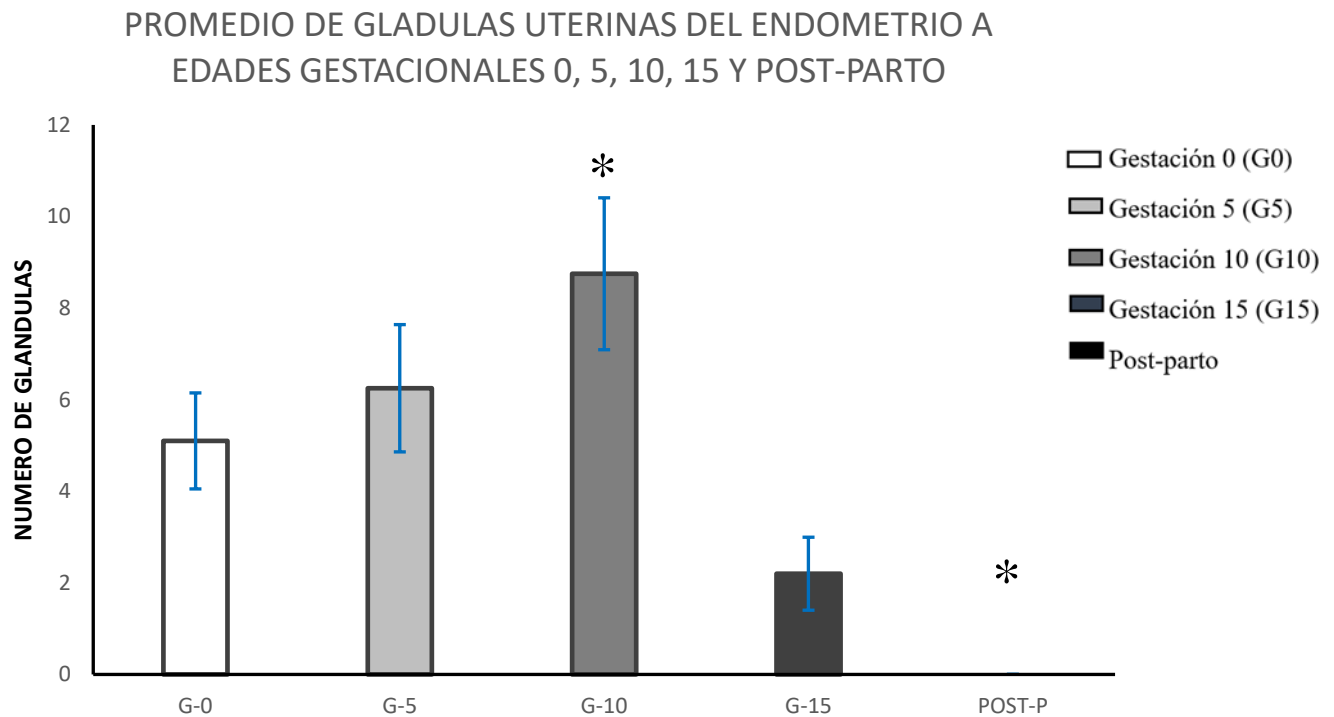


Figura 14. Conteo de glándulas endometriales durante la gestación de ratas Wistar intactas, gestacional 0, gestacional 5, gestacional 10, gestacional 15. Se aplicó prueba estadística ANOVA para un solo factor * $p \leq 0.05$ seguida U de Mann-Witney.

Figura 15. El número de glándulas uterinas presento los siguientes datos, grupos administrados vía *in situ* y dorsal vs post-parto intactas: post-parto intactas 0 ± 0 e.s.m., post-parto administradas con antagonista del receptor Kiss1R (p-234) 1nM vía dorsal 4.45 ± 1.28 e.s.m. * vs post-parto intactas y post-parto administradas con antagonista del receptor Kiss1R (p-234) 1nM vía *in situ* 1.2 ± 0.5 e.s.m. * vs post-parto intactas; n=4 para todos los grupos. Se aplicó un análisis de varianza ANOVA para un solo factor * $p \leq 0.05$ seguida U de Mann-Witney.

PROMEDIO DE GLANDULAS UTERINAS DEL ENDOMETRIO POST-PARTO, INTACTAS Y CON ADMINISTRACIÓN DE ANTAGONISTA DE KISSPEPTINA, VIA DORSAL E "IN SITU"

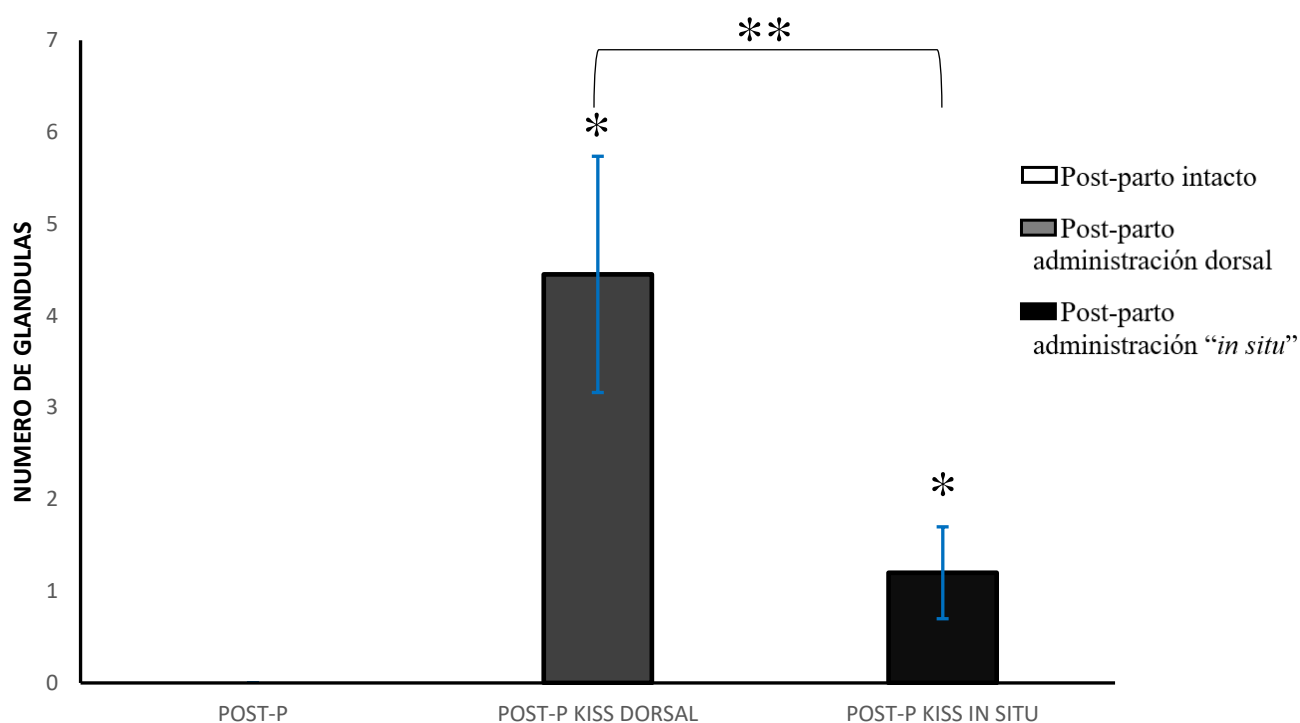


Figura 15. Conteo de glándulas endometriales post-parto en ratas intactas y administradas vía dorsal e "in situ" con p234. Post-parto intactas, □ post-parto con administración de antagonista de kisspeptina vía dorsal, ▒ post-parto con administración de antagonista de kisspeptina vía "in situ". ■ Se aplicó prueba estadística ANOVA para un solo factor * $p \leq 0.05$ seguida U de Mann-Witney.

DISCUSIÓN

En la última década, estudios emergentes han encontrado que a nivel hipotalámico la kisspeptina (Kiss1) y su receptor (Kiss1R) es el detonante para la liberación de GnRH, indispensable en la reproducción de mamíferos, incluida la secreción de gonadotropinas y el inicio de la pubertad (Roa *et al.*, 2008; Pinilla *et al.*, 2012; Hu KL *et al.*, 2017).

Kisspeptina ha sido evaluada y se ha observado que tiene acciones extra hipotalámicas, como lo es la modulación del desarrollo ovárico. (Ohtaki *et al.*, 2001; Arai *et al.*, 2005; Castellano *et al.*, 2012). Por lo cual, su estudio en los úteros de ratas Wistar grávidas es de interés para nuestro grupo de investigación.

En el presente trabajo usamos al antagonista p234 para bloquear al receptor Kiss1R y poder evaluar el papel del sistema Kisspeptina/KISS1R en el desarrollo celular de las capas del útero de las ratas Wistar gestantes.

En la figura No. 10 vemos el comportamiento del endometrio de las ratas Wistar en el curso natural de la gestación a las edades gestacionales G0, G5, G10, G15 y Post-P. Entre las edades gestacionales G0 a G10 se da la mayor actividad del endometrio lo que nos indica que durante este lapso el endometrio realiza procesos de nutrición y desarrollo; a la edad gestacional 15 (G15) la actividad endometrial se ve disminuida puesto que su función ha sido sustituida por la placenta por ultimo a la edad Post-P el endometrio se encuentra en su estado basal. Estos resultados tienen relación con lo descrito por; Gray *et al.*, 2001.

En lo concierne a los resultados obtenidos de los grupos Post-P administrados vía dorsal e “*in situ*” con p234 versus Post-P intactas, figura No.11 el grupo Post-P intacto; muestra un grosor basal del endometrio mientras que los grupos administrados vía dorsal e “*in situ*” muestran un grosor endometrial incrementado esto a pesar de que ambos grupos jamás entraron en proceso gestante; lo que nos lleva a sostener que el presente trabajo demuestra que p234 si bloquea el sistema

Kisspeptina/Kiss1R hallado en endometrio impidiendo su participación en el proceso de implantación; esto nos conduce a plantear la siguiente pregunta, ¿Si p234 bloquea al sistema Kisspeptina/Kiss1R que enzimas y proteínas reguladas por el sistema Kisspeptina/Kiss1R dejan de participar en el proceso de implantación, de ser así a que se debe el aumento en el grosor del endometrio de los grupos administrados vía dorsal e “*in situ*”? el sistema Kisspeptina/Kiss1R promueve la adhesión embrionaria y la decidualización mediante la regulación positiva de las moléculas de adhesión celular y LIF (factor inhibidor de la leucemia) y mediante regulación negativa inhibe la invasión del trofoblasto bajo la regulación de MMPs (metaloproteinasas de matriz) así mismo regula a la baja VEGFA (Factor de crecimiento endotelial vascular A) impidiendo la angiogénesis; por ende, si el sistema Kisspeptina/Kiss1R se ve bloqueado dichos procesos se presentan sin regulación alguna, por tanto inferimos una invasión trofoblásticas temprana que es insostenible y una angiogénesis temprana, fuera de lugar que es inviable. Con respecto a la regulación positiva de las moléculas de adhesión celular, estas no se expresan en el epitelio luminal cuando el sistema Kisspeptinergico es bloqueado, sin embargo, si se da un reconocimiento del epitelio luminal por parte del producto ya que nuevos estudios señalan que el trofoblasto en su superficie expresa moléculas de adhesión celular, pero este reconocimiento es breve e insostenible ya que el epitelio luminal no reconoce al producto. Con relación a la segunda parte de la pregunta el acontecimiento está muy relacionado al proceso de decidualización ya que independientemente del bloqueo del sistema Kisspeptina/Kiss1R que a su vez resulta en una falta de regulación sobre LIF, esto no impide que vías de señalización ajenas al sistema Kisspeptinergico se lleven a cabo, ejemplo de esto, son las vías de señalización de estradiol y progesterona en endometrio de roedores con mutaciones en el sistema Kisspeptina/Kiss1R. Tomando en cuenta lo antes mencionado y resaltando que progesterona está involucrada en el desarrollo celular del endometrio estaríamos frente a una conjetura muy acertada; cabe señalar que progesterona solo

se ha relacionado con el desarrollo endometrial pero no con la funcionalidad del mismo.; estos resultados se correlacionan con lo expuesto por Calder *et al.*, 2014; Matsumoto H, 2017; Hu KL *et al.*, 2019.

Glándulas uterinas figura No. 14 células estrechamente relacionadas con el endometrio ya que se encuentran inmersas en este tejido, el endometrio a través de las glándulas uterinas realiza el proceso de nutrición del producto el cual se lleva a cabo en la primera mitad de la gestación (G0, G5, G10), a la edad gestacional 10 (G10) las glándulas uterinas alcanzan su punto máximo en número y a su vez en actividad; para luego disminuir el número de glándulas y su función para la edad gestacional 15 (G15) ya que en este punto la placenta suple su actividad y por ultimo a la edad Post-P el número de glándulas uterinas se reduce a 0 puesto que hasta el día del parto la nutrición y desarrollo del producto depende enteramente de la placenta; este comportamiento es observado en la figura No. 14 coincide con lo descrito por Spencer TE, 2004; Spencer TE, 2014; Spencer TE *et al.*, 2019.

La información obtenida de los grupos Post-P intacto versus los grupos administrados vía dorsal e “*in situ*” con p234; figura No.15, el grupo post-parto intacto muestra un conteo nulo de glándulas uterinas al final del parto mientras que los grupos administrados vía dorsal e “*in situ*” muestran un conteo elevado de glándulas uterinas en la etapa post-parto lo que nos lleva a plantear que p234 no impide el desarrollo de glándulas uterinas, por tanto podemos decir que el comportamiento observado en la figura No.15 se atribuye a una señalización independiente del sistema Kisspeptina/Kiss1R. Este resultado concuerda con lo expuesto por Gray CA *et al.*, 2001; Kelleher AM *et al.*, 2018.

Epitelio luminal figura No. 12 a pesar de observarse histológicamente como una capa uterina independiente esto no es así ya que dicha capa forma parte del endometrio, es el tejido más próximo a la luz uterina; sin embargo, podríamos llamarla subcapa puesto que el epitelio luminal cumple con funciones muy específicas a pesar de formar parte del endometrio. En el proceso gestante normal el epitelio luminal (LE) es la puerta de entrada transitoria para el producto; a la edad

gestacional 0 (G0) unas horas después del coito exitoso el LE se prepara y sufre cambios celulares (Ej., modificación de adhesividad) es por ello que en la figura No. 12 la actividad de LE a la edad G0 se ve aumentada, para la edad gestacional 5 (G5) el producto se encuentra implantado superficialmente en epitelio luminal, nuevamente esto concuerda con lo mostrado en la figura No. 12 dado que a partir de la edad gestacional 5 (G5) hasta la edad gestacional 15 (G15) el grosor del LE se ve disminuido y con un espesor constante debido a que su participación y funcionalidad es nula, hasta la edad post-parto en donde se observa un aumento súbito de LE lo cual se atribuye a un comportamiento en los roedores llamado estro post-parto, todo lo mencionado anteriormente concuerda con lo descrito por Ye X *et al.*, 2020.

En la figura No.13 del grupo Post-P intacto versus los grupos administrados vía dorsal e “*in situ*” con p234, se nota un grosor incrementado en el grupo Post-P intacto comportamiento descrito anteriormente, en el caso de los grupos administrados con p234 se observa un grosor disminuido en los dos grupos esto indica el antagonismo de p234 sobre sistema Kisspeptina/Kiss1R que a su vez afecta directamente el desarrollo celular del epitelio luminal, también impide la expresión de las moléculas adhesión celular ubicadas en el LE dado que la actividad de dichas moléculas es controlado por el sistema Kisspeptina/Kiss1R; este resultado es afín a lo descrito por Hu KL *et al.*, 2019; Matsumoto H, 2017.

Partiendo de lo descrito hasta ahora sobre endometrio, glándulas uterinas y epitelio luminal y afianzando por estudios previos que precisan el hallazgo y actividad del sistema Kisspeptina/Kiss1R en estos tejidos, es importante señalar que administración produjo mejores resultados en cuanto al bloqueo de p234 sobre el sistema Kisspeptina/Kiss1R. Este estudio indica que la administración “*in situ*” reflejo un mejor bloqueo sobre el sistema Kisspeptina/Kiss1R, lo que nos lleva a sugerir que dada la administración en la luz uterina de ratas Wistar potencialmente fértiles y con ciclos estrales estables y tomando en cuenta que p234 es el péptido con mayor afinidad sobre los receptores Kiss1R por lo cual estamos frente a un

péptido capaz de unirse a los receptores Kiss1R con una afinidad similar a Kisspeptina, receptores encontrados en epitelio luminal y endometrio induciendo el bloqueo y anulando la actividad del sistema Kisspeptina/Kiss1R.

Mientras que una posible explicación sobre la baja eficacia de la administración dorsal es que la aplicación del péptido p234 se realizó por encima de la ubicación anatómica en donde se encuentran las fracciones espinales (L2 y L4) las cuales inervan a órganos sexuales y específicamente en el caso del útero al miometrio el cual recibe la inervación simpática, parasimpática y sensorial, dicha capa muscular que hasta el momento no se ha reportado evidencia que la relacione con el sistema Kisspeptina/Kiss1R, lo que nos lleva a colegir que la ineficiencia del péptido p234 es por concentrarse en una capa uterina con pocos o nulos receptores y alcanzando tejidos uterinos afines ya con una menor concentración peptídica.

Figura No. 8 miometrio capa muscular del útero que en entre las edades G0-G15 su grosor se mantiene estable y uniforme, hasta que llega el día del parto en donde esta capa entra en función desarrollando procesos de tensión (acortamiento y elongación) a lo que llamamos comúnmente como contracción uterina, esto coincide con lo observado en la figura No. 8 a la edad Post-P, ya que el sacrificio de la rata se llevó a cabo horas después del parto en donde se observa un grosor de miometrio aumentado. En el caso del grupo Post-P intacto versus los grupos administrados con p234 vía dorsal e “*in situ*” figura No.9 se nota un grupo Post-P intacto con un miometrio engrosado mientras que se observan los dos grupos administrados con p234 con un miometrio disminuido, en este punto no podemos atribuir específicamente la acción local o el antagonismo de p234 en miometrio puesto que hasta el momento no se ha reportado evidencia que relacione el desarrollo del miometrio con el sistema Kisspeptina/Kiss1R, lo que nos lleva a inferir que el comportamiento del miometrio es consecuente de la actividad de capas internas; Cao Y *et al.*, 2019.

Por ultimo hablaremos de la capa más externa del útero, figura No. 6 vemos el comportamiento del perimetrio de las ratas Wistar a las edades gestacionales G0,

G5, G10, G15 y Post-P. Entre las edades G0 a G15 no hay cambios celulares del perimetrio, lo cual nos indica que durante este proceso el perimetrio no tienen un papel importante en desarrollo de la preñez. Sin embargo, a la edad Post-P ha incrementado su actividad celular, esto puede ser debido a un estro Post-P en donde se inicia una remodelación celular del útero y el perimetrio debe apoyar al miometrio y al endometrio, también inicia procesos de lubricación del útero en caso de existir coito post parto. Estos resultados están en correlación con lo reportado por J. Benavides *et al.*, 2004 sobre la conducta post parto de los roedores. En lo que respecta al grupo Post-P intacto versus los grupos administrados con p234 vía dorsal e “*in situ*” figura No. 7 se percibe un grupo Post-P intacto con un aumento en el grosor del perimetrio mientras que se observan los dos grupos administrados con p234 con un perimetrio disminuido en grosor, este comportamiento no se puede atribuir a la acción local o el antagonismo de p234 en perimetrio dado que esta capa uterina comparte el mismo caso que el miometrio puesto que no se ha reportado evidencia que relacione el desarrollo del perimetrio con el sistema Kisspeptina/Kiss1R, lo que nos lleva a deducir que el comportamiento del perimetrio está sujeto a la actividad de capas uterinas internas.

CONCLUSIÓN

Se estudio el desarrollo de las capas uterinas durante las diferentes edades gestacionales en ratas Wistar intactas y en el caso de los grupos administrados con antagonista de Kisspeptina se logro conocer dicho desarrollo a la edad post-parto, tambien se consiguió cuantificar el numero de glándulas uterinas durante las diferentes edades gestacionales en ratas Wistar intactas y en el caso de los grupos administrados con antagonista de Kisspeptina se realizo dicho conteo a la edad post-parto; notando asi que el sistema Kisspeptina/KISS1R juega un papel importante en el útero y esto es evidente cuando dicho sistema es inhibido por el antagonista p234, donde nuestro estudio proporciona evidencia de los efectos sobre el grosor de los tejidos cuando la participación de sistema kisspeptinergico a nivel local es inhibida; además plantea que el sistema Kisspeptina/KISS1R extra hipotalámico, contribuye a las funciones reguladoras de la fertilidad y que esta no recae solo en el eje HHO.

Sugiriendo futuros análisis sobre el sistema Kisspeptina/KISS1R en tejidos relacionados con la reproducción, donde una comprensión integral de la expresión, función y mecanismos potenciales en el sistema reproductor contribuirá al diagnóstico, tratamiento y prevención de enfermedades reproductivas; por otro lado, también sugerimos futuros análisis enfocados a p234 para poder considerarlo un anticonceptivo no hormonal.

BIBLIOGRAFÍA

A. Naganawa. (2006). Optimization of sulfonamide derivatives as highly selective EP1 receptor antagonists *Bioorg. Med. Chem.*, 14 pp. 7774-7789.

Adi Gasner. (2020). *Fisiología, útero*. Academic Press, Orlando, USA, 1985; Vol 3: 127- Aatsha PA. Ali M, Buhimschi I, Chwalisz K, Garfield RE. (1997). Changes in expression of the nitric oxide synthase isoforms in rat uterus and cervix during pregnancy and parturition. *Mol. Hum. Reprod.* 3 (11): 995-1003.

Ana Ma. CC. (2011) *Anatomía del aparato reproductor femenino*. Biol. Med. 1-4.

Antonio I. Porras, Rosa M. Paramo Ramírez (2009) *manual de prácticas de reproducción animal*. 7-19.

Arai AC, Xia YF, Suzuki E, Kessler M, Civelli O, Nothacker HP. (2005). Cancer metastasis-suppressing peptide metastin upregulates excitatory synaptic transmission in hippocampal dentate granule cells. *J Neurophysiol*; 94:3648–3652.

Arevalo MA, Azcoitia I, Gonzalez-Burgos I, Garcia-Segura LM. (2015). Signaling mechanisms mediating the regulation of synaptic plasticity and memory by estradiol. *Horm Behav.* 2015. doi: 10.1016/j.yhbeh.2015.04.016. PMID: 25921586.

B. David Vantman, B. Margarita Vega. (2010). *Fisiología reproductiva y cambios evolutivos con la edad de la mujer*, Revista Médica Clínica Las Condes, Volume 21, Issue 3, Pages 348-362.

Bain DL, Heneghan AF, Connaghan-Jones KD, Miura MT. (2007). Nuclear receptor structure: implications for function. *Annu Rev Physiol*; 69: 201-20.

Barbieri RL. (2014). The endocrinology of the menstrual cycle. *Methods Mol Biol*.

Bilban M, Ghaffar-Tabziri N. (2014). Kisspeptin-10, a Kiss1/ metastin derived decapeptide, is a physiological invasion inhibitor of primary human trophoblast. *J Cell Sci.* 2004;117(8):1319-28 *Biol.*; 143: 81–89.

Borland, RM. (1977). Transport processes in the mammalian blastocyst. In: *Development in*

Mammals. Ed: MH Jonhson. North Holland, Amsterdam, Netherlands; vol 1: 31-68.

Broermann, DM.; Xie, S.; Nephew, KP. y Pope, WF. (1988). Ability of the oviduct to delay enzymatic digestion of the zona pellucida. *J Anim Sci*; 66 (Suppl 1): 416 (Abstr).

C. Bergeron. (2006). *Histología y fisiología del endometrio normal*, EMC - Ginecología-Obstetricia, Volume 42, Issue 4, Pages 1-8, ISSN 1283-081X.

Calder M, Chan YM, Raj R, Pampillo M, Elbert A, Noonan M, Gillio-Meina C, Caligioni C, Bérubé NG, Bhattacharya M, Watson AJ, Seminara SB, Babwah AV. (2014). Implantation failure in female Kiss1^{-/-} mice is independent of their hypogonadic state and can be partially rescued by leukemia inhibitory factor. *Endocrinology*. Aug;155(8):3065-78. doi: 10.1210/en.2013-1916. Epub May 30. PMID: 24877624; PMCID: PMC4098000.

Cao, Y., Li, Z., Jiang, W. (2019). Funciones reproductivas de los sistemas Kisspeptin / KISS1R en la periferia. *Reprod Biol Endocrinol* 17, 65. <https://doi.org/10.1186/s12958-019-0511-x>. 17: 65.

Carrera MC, Riobo N, Lisdero C, Poderoso JJ. (1999). El óxido nítrico y el óxido nítrico sintasas. *Antioxidantes y Calidad de Vida* 6: 5.

Cartwright JE, Williams PJ. (2012). Altered placental expression of kisspeptin and its receptor in preeclampsia. *Journal endocrinol.*:214(1):79-85.

Castellano JM, Gaytan M, Roa J, Vigo E, Navarro Cejudo Roman A, Pinto FM, Dorta I, Almeida TA, Hernandez M, Illanes M, et al. (2012). Análisis de la expresión de neuroquinina B, kisspeptina y sus receptores afines NK3R y KISS1R en el tracto genital femenino humano. *Fertil Steril.*; 97.

Celis Edmont. (2014). Efecto del enriquecimiento ambiental materno sobre el desarrollo *in útero* de la camada en la rata Wistar., pp 7-10.

Cerveró F, Laird JMA. *Fisiología del dolor*. En: Aliaga L. Baños JE, Barutell C, et al (eds). (1995). *Tratamiento del dolor: teoría y práctica*. Barcelona, MCR: 9-25.

- Chauhuri G. (1987). Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 9265.
- Chemtob S. (2002). Función vascular alterada en la programación fetal de la hipertensión. *Carrera.*; 33, 2992–2998.
- Clarke H, Dhillon WS, Jayasena CN. (2015). Comprehensive Review on Kisspeptin and Its Role in Reproductive Disorders. *Endocrinol Metab (Seoul)*. Jun;30(2):124-41. doi: 10.3803/enm.2015.30.2.124. pmid: 26194072; pmcid: pmc4508256.
- Davis, DL. (1985). Culture and storage of pig embryos. *J Reprod Fertil*; 33 (Suppl): 115-124
- De Roux N, Genin E, Carel JC, Matsuda F, Chaussain JL, Milgrom E. (2003). Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the Kiss1-derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl.*
- Dhillon WS, Savage P, Murphy KG, Chaudhri O B, Patterson M, Nijher GM, Foggo VM, Dance y GS, Mitchell H & Seckl MJ et al. (2006). La kisspeptina plasmática aumenta en pacientes con neoplasia trofoblástica gestacional y caídas durante el tratamiento.
- Ding, J.; Moor, RM. y Foxcroft, GR. (1992). Effects of protein synthesis on maturation, sperm penetration, and pronuclear development in porcine oocytes. *Mol Reprod Dev* 33: 59-66.
- Dubin H, Baros A, Cox T, King M. (1979). Implantation and Fetal Survival in the Rat as Affected by Intrauterine Injection of Normal Sterile Saline. *Biol Reproduc* 21: 47-52.
- Dziuk, PJ. (1985). Effect of migration, distribution and spacing of pig embryos on pregnancy and fetal survival. *J Reprod Fertil*; 33 (Suppl): 57-63.
- E. Knobil and J.D. Neill. (1994). *the physiology of reproduction*, second edition. Raven Press, Ltd., New York. Chapter 55 *Parturition*, Jhon R.G. Challis and Stephen J. Lye. 985-1018.
- Edwards MJ, Saunders RD, Shiota K. (2003). Effects of heat on embryos and fetuses. *Int J Hyperthermia* 19: 295-324.
- Emily R. Liman, Catherine Dulac. (2007). TRPC2 y la biología molecular de la detección de feromonas en mamíferos.
- Eric Houdeau Antoinette Rousseau Chantal
Eric León. (2009). Anatomía macroscópica, irrigación y drenaje venoso del aparato reproductor femenino de la llama (*Lama glama*). 16-23.
- Evans RM. (1998). The steroid and thyroid hormone receptor super-family. *Science*; 240:889-95.
- Fang X, Wong S, Mitchell BF. (2002). Messenger RNA for progesterone receptor isoforms in the late gestation rat uterus. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 283(6): E1167-72.
- Fernandez-Sanchez M, Martin-Lozano D, Illanes Fernando J. Benavides, Jean-Louis Guénet. (2003). Manual de genética de roedores de laboratorio. Capítulo 2, pag. 59-62.
- Fernando J. Benavides, Jean-Louis Guénet. (2003). Manual de genética de roedores de laboratorio. Universidad de Alcalá, SECAL, Laboratory Animals Ltd.
- Filant J, Spencer TE. (2013). Endometrial glands are essential for blastocyst implantation and decidualization in the mouse uterus. *Biol Reprod.* 88(4):93. doi: 10.1095/biolreprod.113.107631. PMID: 23407384.
- Flint, APF. (1981). An unifying hypothesis for the control of blastocyst growth based on observations on the pig. *J Reprod Fertil*; 29 (Suppl): 215-227
- Forcelledo ML, Vera R, Croxatto H. (1981). Ovum transport in Pregnant, Pseudopregnant and Cyclic rats and its Relationship to Estradiol and Progesterone Blood Levels. *Biol Reproduc* 24: 760-765.
- Förstermann U, Schmidt SHH, Pollock JS, Sheng H, Mitchell JA, Warner TD, Nakame M. (1991). Isoforms of nitric oxide synthase. Characterization and purification of different cell types. *Biochem. Pharmacol.* 42: 1849.
- Franchi AM, Chaud M, Rettori V, Suburo A, McCann SM, Gimeno, M. (1994). Role of nitric oxide in eicosanoid synthesis and uterine motility in estrogen-treated rat uteri. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 539- 543.

- Fukui, Y.; Glew, AM.; Gandolfi, F. y Moor, RM. (1988). In vitro culture of sheep oocytes matured and fertilized in vitro. *Theriogenology*; 29: 883.
- Furchgott RF, Zawadzki JV. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288 (5789): 373-6.
- G, Parmentier M, Gaddum-Rosse, P. Mammalian. (1985). Gamete interactions: What can be gained from observations on living eggs. *Am J Anat* 173: 347-356.
- Garverick HA, Zollers WG, Smith MF. (1992). Mechanisms associated with corpus luteum lifespan in animals having normal or subnormal luteal function. *Anim Reprod Sci.*28:111124.
- Germán P. (2005). Fecundación. *RV.* 38-44.
- Goldblatt MW. The Clinica del Lavoro. *J. Soc. Chem. Ind.* 52: 1056.
- Gorkem U, Togrul C, Arslan E, Sargin Oruc A, Buyukkayaci Duman N. (2018). Existe un papel para la kisspeptina en la patogenia del síndrome de ovario poliquístico *Gynecol Endocrinol.* 34 (2): 157–160. doi: 10.1080 / 09513590.2017.1379499.
- Gray CA, Bartol FF, Tarleton BJ, Wiley AA, Johnson GA, Bazer FW, Spencer TE. (2001). Developmental biology of uterine glands. *Biol Reprod.* Nov;65(5):1311-23. doi: 10.1095/biolreprod65.5.1311. PMID: 11673245.
- Guerra-Ariza C, Cerbón MA, Morimoto S, Camacho-Arroyo I. (2000). Progesterone receptor isoforms expression pattern during the estrous cycle in the rat brain. *LifeSci.* 66: 1743-52.
- H. Azaïs, C. Gonther, J. Wassermann, N. Meillan, G. Rocher, A. Favier, S. Egels, M. Nikpayam, J. Belghiti, C. Uzan, G. Canlorbe. (2021). Tratamiento de los cánceres de endometrio. *EMC - GinecologíaObstetricia*, Volume 57, Pages 1-15, ISSN 1283-081X.
- Ham AW. (1970). H. Efectos del tratamiento con hormonas ováricas sobre la expresión génica de los receptores muscarínicos de acetilcolina en el miometrio de rata ovariectomizada. *J Steroid Biochem Mol Tratado de Histología.* Nueva Editorial Interamericana S. A. México. pp 1025.
- Hameed S, Jayasena CHN, Dhillon WS. (2001). Review: Kisspeptin and fertility. *Journal of Endocrinology*; 208:97-105.
- Harper, KM. (1988). Gamete and zygote transport. In: *The Physiology of Reproduction*. Ed: Knobil E, Neill JD.
- Hedrick T, Waters J. (2015). La acetilcolina excita las neuronas piramidales neocorticales a través de receptores nicotínicos. *J Neurophysiol.*; 113. 2195–2209. doi: 10.1152 / jn.00716.2014.
- Hedrick, JL.; Wardrip, NJ. y Berger, T. (1987). Differences in the macromolecular composition of the zona pellucida isolated from pig oocytes, eggs, and zygotes. *J Exp Zool*; 241: 257-262.
- Hu KL, Hongcui Zhao , Hsun-Ming Chang, Yang Yu , y Jie Qiao. (2017). Sistema receptor de kisspeptina / kisspeptina en el ovario, *Endocrinol frontal (Lausana)* .; 8: 365.
- Hu KL, Hsun-Ming Chang, Hong-Cui Zhao, Yang Yu, Rong Li, Jie Qiao. (2019). Potential roles for the kisspeptin/kisspeptin receptor system in implantation and placentation, *Human Reproduction Update*, Volume 25, Issue 3, May-June, Pages 326–343.
- Huang PL, Dawson TM, Brecht DS, Snyder SH, Fishman MC. (1993). Targeted disruption of the neuronal nitric oxide synthase gene. *Cell* 75 (7): 1273-86.
- Hunter, RHF. (1974). Chronological and cytological details of fertilization and early embryonic development in the domestic pig, *Sus scrofa*. *Anat Rec*; 178: 169-186.
- Hunter, RHF. (1991). Oviduct function in pigs, with particular reference to the pathological condition of polyspermy. *Mol Reprod Dev*; 29: 385-391.
- Hunter, RHF. (1999). Polyspermy. In: *Encyclopedia of Reproduction*. Ed: E. Knobil and JD. Neill. Academic Press, San Diego, USA; Vol 3: 930-937.
- Ignaro L, Buga GM, Wood KS, Byms RE. (2012). Immunocytochemical localization of kisspeptin neurons in the rat forebrain with special reference to sexual dimorphism and interaction with GnRH neurons. *Endocr J*; 59:161–171.
- J Benavides, Fernando J. & Guénet, Jean-Louis. (2004). Manual de genética de roedores de laboratorio. The University of Texas M. D. Anderson Cancer Center, Science Park-Research Division, Park Road 1C, P.O. Box 389, Smithville, Texas 78957, Estados Unidos. *Unité de Génétique*

des Mammifères, Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux F-75724 Paris, Cedex 15, Francia.

Jayasena CN, Abbara A, Izzi-Engbeaya C, Comminos AN, Harvey RA, Gonzalez Maffe J, Sarang Z, Ganiyu-Dada Z, Padilha AI, Dhanjal M, Williamson C, Regan L, Ghatei MA, Bloom SR, Dhillon WS. (1983). Reduced levels of plasma kisspeptin during the antenatal booking visit are associated with increased risk of miscarriage.

JF. Academic Press, New York, USA: 453.

Johnson, MH. (1981). The molecular and cellular basis of preimplantation mouse development. *Biol Rev*; 56: 463-498

Josep J. Centelles, Cristina Estaban, Santiago Imperial. (2004). Oxido nítrico un gas toxido que actua como regulador de la presión sanguínea. 96102.

K. Tani. (2001). Design and synthesis of a highly selective EP2-receptor agonist. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 11 pp. 2025-2028.

Keith L. Moore, Arthur F. (2007). Anatomy whit clinical orientation. Mexico: Panamericana. 5 Ed, Chap 3, p. 429-432.

Kelleher AM, DeMayo FJ, Spencer TE. (2018). Uterine Glands: Developmental Biology and Functional Roles in Pregnancy. *Endocr Rev.* 2019 Oct 1;40(5):1424-1445. doi: 10.1210/er. -00281. PMID: 31074826; PMCID: PMC6749889.

Kobzik L, Reid MB, Brecht DS, Stamler JS. (1994). Nitric oxide in skeletal muscle. *Nature* 372 (6506): 546-8.

Kotani M, Dethoux M, Vandenbogaerde A, Communi D, Vanderwinden JM, Le Poul E, Brézillon S, Tyldesley R, Suarez-Huerta N, Vandeput F, Blanpain C, Schiffmann SN, Vassart Lamireau D, Nuyt AM, Hou X, Bernier S, Beauchamp M, Gobeil F, Jr, Lahaie I, Varma DR, Lee JH, Miele ME, Hicks DJ, Philips KK, Trent JM, Weissman BE, Welch DR. (1996). KiSS-1, a novel malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *J Natl Cancer Inst.*; 88:1731-37.

Lee JH, Miele ME, Hicks DJ, Phillips KK, Trent JM, Weissman BE, Welch DR. (1996) KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis suppressor gene. *J Natl Cancer Inst* 88:1731-1737.

Liu X, Lee K, Herbison AE. (2008). Kisspeptin excites gona- Kisspeptin excites gonadotropin

releasing hormone neurons through a phospholipase C/calcium dependent pathway regulating multiple ion channels. *Endocrinology*; 149:46054614.

M, Tena-Sempere M, Candenas ML. M. Asada. (2010). 3-(2-Aminocarbonylphenyl) propanoic acid analogs as potent and selective EP3 receptor antagonists. Part 3: synthesis, metabolic stability, and biological evaluation of optically active analogs *Bioorg. Med. Chem.*, 18 pp. 3212-3223.

M. Asada. (2010). Discovery of novel Nacylsulfonamide analogs as potent and selective EP3 receptor antagonists *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 20 pp. 2639-2643

Manuela Ricu. (2013). participación de kisspeptina en la función ovárica y sus cambios durante la activación del sistema nervioso simpático inducida por el estrés por frío en la rata. 9-13.

Mariana F. (2003). Participación de la progesterona en la regulación de factores moduladores de quiescencia y motilidad uterina durante la preñez y el parto. 24-33.

Matsumoto H. (2017). Molecular and cellular events during blastocyst implantation in the receptive uterus: clues from mouse models. *J Reprod Dev.* 2017 Oct 18;63(5):445-454. doi: 10.1262/jrd.2017-047. Epub Jun 22. PMID: 28638003; PMCID: PMC5649093.

Mattioli, M.; Lucidi, P. y Barboni, B. (1998). Expanded cumuli induce acrosome reaction in boar sperm. *Mol Reprod Dev*; 51: 445-453

McRae, A. (1988). The blood-uterine lumen barrier and exchange between extracellular fluids. *J Reprod Fertil*; 82: 857-873

Meister, A. (1983). Selective Modification of Glutathione Metabolism. *Science*; 220: 472- 477

Meister, A. y Anderson, ME. (1983). Glutathione. *An Rev Bioch*; 52: 711-760

Meister, A. y Tate, SS. (1976). Glutathione and the related γ -glutamyl compounds: biosynthesis and utilization. *Ann Rev Biochem*; 45: 559-604

Messenger, S., Chatzidaki, E.E. (2005). Kisspeptin directly simulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54.

- Meusnier Marie-Jeanne Prud'homme Jean-Paul Rousseau. (1999). Sympathetic innervation of the upper and lower regions of the uterus and cervix in the rat have different origins and routes. *J comp neurol* 399: 403-412.
- Mi, W. L., Mao-Ying, Q. L., Liu, Q., Wang, X.W., Li, X., Wang, Y.Q., & Wu, G. C. (2009). The distribution of kisspeptin and its receptor GPR54 in rat dorsal root ganglion and up-regulation of its expression after CFA injection. *Brain Research Bulletin*, 78 (1-5), 254-260.
- Mitchell HH, Shonle HA, Grindley HS. (1916). The origin of the nitrates in the urine. *J. Biol. Chem.* 24: 461.
- Moore, HDM. y Bedford, JM. The interaction of mammalian gametes in the female. In: *Mechanism and Control of Animal Fertilization*. Ed: Hartmann Moshimi, Whatson Andrew J. Seminara Stephanie B., Babwah Andy V. (2014). La falla de implantación en ratones femeninos Kiss1 es independiente de su estado hipogonádico y puede ser parcialmente rescatada con el factor inhibidor de la leucemia.
- Muir A, Chamberlain L, Elshourbagy NA, Michalovich D, Moore DJ, Calamari A, Szekeres PG, Sarau HM, Chambers JK, Murdock P. (2001). AXOR12 a novel human G protein coupled receptor, activated by the peptide Kiss1. *Journal of Biological Chemistry*; 276:28969-28975.
- Myles, DG. y Primakoff, P. (1997). Why did the sperm cross the cumulus? To get to the oocyte. Functions of the sperm surface proteins PH-20 and fertilin in arriving at, and fusing with, the egg. *Biol Reprod*; 56: 320-327
- Nathan C, Xie QW. (1994). Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J. Biol. Chem.* 269: 13725- 13728.
- Nathan C. (1992). Nitricoxide as a secretory product of mammalian cell. *FASEBJ.* 6: 3051.
- Nestor I Tovio. (2011). Efectos de la aplicación de eCG (Día 5 u 8) sobre el desarrollo del cuerpo lúteo, nivel de progesterona y tasa de preñez en hembras receptoras de embriones bovinos. 34-54.
- Nick J. Spencer, Vladimir Zagorodnyuk, Simon J Brookes, Tim Hibberd. (2016). Spinal afferent nerve endings in visceral organs: recent advances, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*; 311 (6): G1056-G1063.
- O'Rand, MG.; Welch, JE. y Fisher, SJ. (1986). Sperm membrane and zona pellucida interactions during fertilization. In: *Molecular and Cellular Aspects of Reproduction*. Ed: Dhindsa, DS. and Bahl, OP. Plenum Press, New York, USA: 131-144
- Ohtaki T, Shintani Y, Honda S, Matsumoto H, Hori A, Kanehashi K, Terao Y, Kumano S, Takatsu Y, Masuda Y, Ishibashi Y, Watanabe T, Asada M, Yamada T, Suenaga M, Kitada C, Usuki S, Kurokawa T, Onda H, Nishimura O, Fujino M. (2001). Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature*. May 31;411(6837):613-7. doi: 10.1038/35079135. PMID: 11385580.
- Ohtaki T, Shintani Y, Honda S, Matsumoto H, Hori A, Kanehashi K, et ál. Metastasis suppressor gene Okada, A.; Yanagimachi, R. y Yanagimachi, H. (1986). Development of a cortical granule-free area of cortex and the perivitelline space in the hamster oocyte during maturation and following fertilization. *J Submicrosc Cytol*; 18: 233-247
- Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxation factor. *Nature* 327: 524.
- Panza JA, Quyyumi AA, Brush JE, Epstein SE. (1990). Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *New Engl. J. Med.* 323 (1): 22-29.
- Papka, R.E., McNeill, D.L. (1993). Light- and electronmicroscopic study of synaptic connections in the paracervical ganglion of the female rat: special reference to calcitonin gene-related peptide-, galanin- and tachykinin (substance P and neurokinin A)-immunoreactive nerve fibers and terminals. *Cell Tissue Res* 271, 417.
- Paris JM, Williams KJ, Hermsmeyer KR, Delansorne R. (2000). Acetato de nomegestrol y reactividad vascular: experimentos con primates no humanos. *Esteroides.*; 65: 621-627. doi: 10.1016 / S0039-128X (00) 00118-5.
- Park D. W., Lee S.K., Hong S.R. (2012). Expression of kisspeptin and its receptor GPR54 in the first trimester trophoblast of women whit recurrent pregnancy loss. *American Journal of reproductive immunology*, 67(2), pp.132-139.
- Parrondo P, Pérez-Medina T, Alvare-Heros J. (2009). Capitulo I anatomia del aparato genital femenino. Pp. 15-26.

- Peltier MR. (2003). Immunology of term and preterm labor. *Reprod Biol Endocrinol*; 1: 122.
- Perez-Medida, Cayuela Font. (2011). *Diagnostic and operative hysteroscopy*, London, England: jaypee brothers medical publishers (P) ltd.
- Perreault, SD.; Barbee, RR. y Slott, VI. (1988). Importance of glutathione e in the adquisition and maintenance of sperm nuclear decondensation activity in maturing hamster oocytes. *Dev Biol*; 125: 181-186
- Piccinni MP, Romagnani S. (1996). Regulation of fetal allograft survival by a hormone-controlled Th1- and Th2-type cytokine. *Immunol Res*; 15: 141-50.
- Pinilla L, Aguilar E, Dieguez C, Millar RP, TenaSempere M. (2012). Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms. *Physiol Rev*; 92:1235–1316.
- Pinto FM, Cejudo-Román A, Ravina CG, Fernández-Sánchez M, Martín-Lozano D, Illanes M, Tena-Sempere M, Candenias ML. (2011). Characterization of the kisspeptin system in human spermatozoa. *Int J Androl*. 2012 Feb;35(1):63-73. doi: 10.1111/j.1365-2605.2011.01177.x. Epub Jun 9. PMID: 21651574.
- Polge, C. (1978). Fertilization in the pig and horse. *J Reprod Fertil*; 54: 461-470
- Pollock JS, Förstermann U, Mitchell JA, Warner TD, Schmidt SHH, Nakame M, Murad F. (1991). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 181: 1372. pp.649-656
- R. Pineda, D. García-Galiano, A. Roseweir, M. Romero, MA Sanchez-Garrido, F. Ruiz-Pino, K. Morgan, L. Pinilla, RP Millar, M. Tena-Sempere. (2010). Critical Roles of Kisspeptins en la pubertad femenina y las oleadas de gonadotropinas preovulatorias reveladas por un nuevo antagonista, *endocrinología* volumen 151, número 2, páginas 722–730.
- R. Ruel. (1999). New class of biphenylene dibenzazocinones as potent ligands for the human EP1 prostanoid receptor *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 9, pp. 2699-2704.
- Rafael Gutiérrez Núñez, Beatriz María Gutiérrez Alarcón. (2010). Embryonic implantation. Some molecular aspects in endometrial receptivity. Bibliographic review, IUniversidad de Ciencias Médicas. Manzanillo. Granma, Cuba.
- Ragusa A, de Carolis C, dal Lago A, Miriello D, Ruggiero G, Brucato A. (2004). Progesterone supplement in pregnancy: an immunologic therapy *Lupus*; 13: 639-42.
- Rees DD, Palmer RM, Moncada S. (2012). Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*86 (9): 3375-3378. *Reprod Fertil Dev*.
- Roa J, Aguilar E, Dieguez C, Pinilla L, TenaSempere M. (2008). New frontiers in kisspeptin/GPR54 physiology as fundamental gatekeepers of reproductive function. *Front Neuroendocrinol*; 29:48–69.
- Roseweir AK, Kauffman AS, Smith JT, Guerriero KA, Morgan K, Pielecka-Fortuna J, Pineda R, Gottsch ML, Tena-Sempere M, Moenter SM, Terasawa E, Clarke IJ, Steiner RA, Millar RP. (2009). Discovery of potent kisspeptin antagonists delineate physiological mechanisms of gonadotropin regulation. *J Neurosci*. Mar 25;29(12):3920-9.
- Roy Heijkoop, Patty T. Huijgens, Eelke MS Snoeren. (2017). Evaluación del comportamiento sexual en ratas: los potenciales y los peligros.
- Saadeldin IM, Koo OJ, Kang JT, Kwon DK, Park SJ, Kim SJ, Moon JH, Oh HJ, Jang G, Lee BC. (2012). Paradoxical effects of kisspeptin: it enhances oocyte in vitro maturation but has an adverse impact on hatched blastocysts during in vitro culture. *Reprod Fertil Dev.*;24(5):656-68. doi: 10.1071/RD11118. PMID: 22697116.
- Sato A, Montoya L. (1990). Aparato reproductor de la alpaca (Lama pacos). *Rev Camélidos*.
- Sato A, Nuñez Q, Valencia R. (1988). Estudio anatómico de las arterias del útero de la alpaca. *Rev Camélidos Sudamericanos* 6: 3-7.
- Schmidt SHH, Pollock JS, Nakame M, Gorsky LD, Förstermann U, Murad F. (1991). Purification of a soluble isoform of guanylylcyclase-activatingfactor synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 365.
- Seminara SB, Messenger S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierno JS, Jr., Shagoury JK, BoAbbas Y, Kuohung W, Schwino KM, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, Kaiser UB, Slaugenhaupt SA, Gusella JF, O'Rahilly S, Carlton MB, Crowley WF, Jr., Aparicio SA, Colledge WH. (2003) The GPR54

- gene as a regulator of puberty. *N Engl J Med* 349:1614-1627
- Shu SJ, Lei XG, Liang JH, Song YH, Xu Q, Chen XD, Mao LG, Li ZG. (2017). Los efectos del AMPc del segundo mensajero y sus componentes relativos sobre la contracción del músculo liso uterino de la rata. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 21 : 17091721.
- Sidler, X.; Zimmermann, W. y Leiser, R. (1986). Das normale zyklische Geschehen im endometrium des schweines. University of Bern, Bern.
- Simmen, RCM.; Ko, Y.; Liu, XH.; Wilde, MH.; Pope, WF. y Simmen, FA. (1988). A uterine cell mitogen distinct from epidermal growth factor in porcine uterine luminal fluids: characterization and partial purification. *Biol Reprod*; 38: 551-561
- Skorupskaitė, K., George, J.T. & Anderson, R.A. (2014). The kisspeptin-GnRH pathway in human reproductive health and diseases. *Human Reproduction Update*, 20(4), pp.485-500
- Smith, T. J., Cunningham, M. J., Rissman, E. F. (2005). Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of female mouse. *Endocrinology*, 146(9), pp.3686-92.
- Spencer TE, Bazer FW. (2004). Uterine and placental factors regulating conceptus growth in domestic animals. *J Anim Sci*.;82 E-Suppl: E4-13. doi: 10.2527/2004.8213_supplE4x. PMID: 15471813.
- Spencer TE, Kelleher AM, Bartol FF. (2019). Development and Function of Uterine Glands in Domestic Animals. *Annu Rev Anim Biosci*. Feb 15; 7:125-147. doi: 10.1146/annurev-animal-020518-115321. Epub 2018 Sep 5. PMID: 30183326.
- Spencer TE. (2014). Biological roles of uterine glands in pregnancy. *Semin Reprod Med*. Sep;32(5):346-57. doi: 10.1055/s-0034-1376354. Epub 2014 Jun 24. PMID: 24959816; PMCID: PMC4198167.
- Springall DR, Riveros-Moreno V, Buttery L, Suburo A, Bishop AE, Merrett M, Moncada S, Polak JM. (1992). Immunological detection of nitric oxide synthase(s) in human tissues using heterologous antibodies suggesting different isoforms. *Histochemistry* 98 (4): 259-66.
- Staun-Ram E, Goldman S, Gabarin D, Shalev E. (2004). Expression and importance of matrix metalloproteinase 2 and 9 in human trophoblast invasión. *Reprod Biol Endocrinol*.;2(1):59.
- Stroband, HWJ. y Van der Lende, T. (1990). Embryonic and uterine development during early pregnancy in pigs. *J Reprod Fertil*; 40 (Suppl): 261-277
- Stroband, HWJ.; Taverne, N.; Langenfeld, K. y Barends, PMG. (1986). The ultrastructure of the uterine epithelium of the pig during the estrous cycle and early pregnancy. *Cell Tiss Res*; 246: 81-89
- Suárez-calderon Diana Marcela, M.D, Ivonne Díaz yamal, MD. (2008). Antagonistas de receptores de progesterona (PRA) y moduladores selectivos de receptores de progesterone (SPRM). *Revista colombiana de obstetricia y ginecología* Vol. 59. No. 1. (31-37).
- Suckow MA, Weisbroth SH, Franklin CL. (2006) *The Laboratory Rat*, Elsevier, San Diego. 2006. pp. 1-885.
- Sullivan-Pyke C, Haisenleder DJ, Senapati S, Nicolais O, Eisenberg E, Sammel MD. (2014). Ganesh Prostanoid receptor EP2 as a therapeutic target *J. Med. Chem.*, 57 pp. 4454-4465
- T. Suzawa. (2000). The role of prostaglandin E receptor subtypes (EP1, EP2, EP3, and EP4) in bone resorption: an analysis using specific agonists for the respective EPs *Endocrinology*, 141, pp. 1554-1559
- Tannebaum SR, Fett D, Young VR. (1928). Nitrite and nitrate are formed by endogenous synthesis in the human intestine. *Science* 200: 1487.
- Telfer JF, Lyall F, Norman JE, Cameron IT. (1995). Identification of nitric oxide synthase in human uterus. *Hum. Reprod*. 10(1):19-23.
- Terasawa, E., & Ojeda, S. R. (2010). Neuroendocrine regulation of puberty. In *Hormones, Brain and Behavior Online* (pp. 2035-2113). Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-008088783-8.00064-4
- Thibault, C. y Gerard, M. (1973). Cytoplasmic and nuclear maturation of rabbit oocytes in vitro. *Ann Biol Anim Biochim Biophys*; 13: 145-156
- Tng, E. (2015). Kisspeptin signalling and its roles in humans. *Singapore Medicinal Journal*, 56(12),

- Tng, E., Kisspeptin signalling and roles in humans. *Singapore Medical Journal*, 56(12), pp.649-656.
- Torricelli M, Galleri L, Voltolini C, Biliotti G, Florio P, De BM y Petraglia F. (2008). Cambios en la expresión de ARNm de Kiss-1 placentario y niveles de kisspeptina maternos / del cordón umbilical en el parto prematuro.
- Traurig HH, Papka RE. (1993). Inervación sensorial eferente y visceral autónoma del sistema reproductor femenino: referencia especial a los roles funcionales de los nervios en los órganos reproductivos. En: Magi CA, editor. *Control nervioso del sistema urogenital*. Editores Académicos de Harwood; Suiza: págs. 103141.
- Vera PL, Haase EB, Schraman LP. (1997). origins of the sympathetic innervation of the cervical end of the uterus in the rat. *Brain Res*, 747:140-143
- Vilá V, Pérez M, Perozo E, Riera M, Rivera L. (2007). Vascularización del ovario durante el ciclo estral en ovinos. *Rev Científica LUZ* 17(4): 341348.
- VM, Bellido C, Dieguez C, Aguilar E, Sanchez Criado JE, Pellicer A et al (2006). Expression of KiSS-1 in rat ovary: ¿putative local regulator of ovulation? *Endocrinology*; 147:4852-4862.
- Vodovotz Y, Russel D, Xie QW, Bogdan C, Nathan CF. (1995). Vesicle membrane association of nitric oxide synthase in primary mouse macrophages. *J. Immunol*. 154: 2914.
- Von Euler US. (1934). Naunyn-Schmiedebergs Arch. Exp. Phatol. Pharmakol. 175: 78.
- Wang, WH.; Hosoe, M. y Shioya, Y. (1997). Induction of cortical granule exocytosis of pig oocytes by spermatozoa during meiotic maturation. *J Reprod Fertil*; 109: 247-255.
- Wiltbank MC, Niswender GD. (1992). Functional aspects of differentiation and degeneration of the steroidogenic cells of the corpus luteum in domestic ruminants. *Anim Reprod Sci*; 28:103-110.
- Xu Z, Kaga S, Mochiduki A, Tsubomizu J, Adachi Yallampalli C, Garfield RE, Byam-Smith M. (1993). Nitric oxide inhibits uterine contractility during pregnancy but not during delivery. *Endocrinology* 133 (4): 1899-902.
- Yanagimachi, R. (1981). Mechanisms of fertilization in mammals. In: *Fertilization and Embryonic Development In Vitro*. Ed: L. Mastroianni and JD. Biggers. Plenum Press, New York, USA.
- Yanagimachi, R. (1988). Mammalian fertilization. In: *The Physiology of Reproduction*. Ed: Knobil E and Neill JD. Raven Press, New York, USA, Vol 1: 135-185
- Yanagimachi, R. (1994). Mammalian fertilization. In: *The Physiology of Reproduction*. Ed: Knobil E and Neill JD. Raven Press, New York, USA, Vol 1: 189-317
- Ye X, Yasuda K, Sumi G, Kanamori C, Nakajima T, Tsuzuki T, Cho H, Nishigaki A, Okada H, Kanzaki. (2020). Uterine Luminal Epithelium as the Transient Gateway for Embryo Implantation. *Trends Endocrinol Metab*. Feb;31(2):165-180. doi: 10.1016/j.tem.2019.11.008. Epub 2019 Dec 20. PMID: 31866217; PMCID: PMC6983336.
- Zhang P, Tang M, Zhong T, Lin Y, Zong T, Zhong Zirkin, BR.; Perreault, SD. y Naish, SJ. (1989). Formation and function of pronucleus during mammalian fertilization. In: *The Molecular Biology of Fertilization*. Ed: Schatten H, Schatten G. Academic Press, San Diego, USA, 91-114.