

Variación en los índices de mitosis y apoptosis del epitelio uterino de la coneja durante los días previos a la implantación^a

Santiago René Anzaldúa Arce^b, Mario Pérez Martínez^b, Julieta Ivone Castro Romero^c

RESUMEN

Anzaldúa ASR, Pérez MM, Castro RJI. *Téc Pecu Méx* 2001;39(1):59-68. Durante los primeros días de la gestación, el endometrio experimenta múltiples cambios morfológicos y funcionales que le permiten proporcionar al producto el microambiente necesario para que se inicie el proceso de implantación. El presente estudio se efectuó con el fin de conocer los índices de proliferación y apoptosis de las células epiteliales del endometrio de la coneja gestante, en el período de preimplantación. En el día 2 postcoito, se observó un incremento significativo ($P < 0.05$) en los índices de mitosis tanto en el epitelio luminal como en el glandular, con respecto al grupo de animales no gestantes; además hubo un segundo pico de proliferación el día 4, pero éste no resultó ser significativo. Por otro lado, entre los días 2 y 5 se observó una disminución significativa del índice de apoptosis en el epitelio luminal y glandular, en relación con el día 1. Estos resultados indican que durante el periodo de preimplantación de la coneja, los procesos de proliferación celular y apoptosis que tienen lugar son eventos interaccionados, de modo que cuando predomina uno el otro se inhibe. Este comportamiento se observa tanto en el epitelio de revestimiento como en el glandular. La proliferación epitelial que se presenta a nivel luminal y glandular durante los días 2 y 4 de la gestación, va acompañada de un proceso de diferenciación celular que culmina en la transformación a un epitelio secretor, fisiológicamente necesario para la implantación del blastocisto en el día 7.

PALABRAS CLAVE: Mitosis, Apoptosis, Epitelio uterino, Coneja, Gestación temprana.

Durante los primeros días de la gestación ocurren múltiples cambios morfofisiológicos en la mucosa uterina, necesarios para que tenga lugar la implantación. En este periodo, el endometrio de la coneja secreta una proteína llamada uteroglobina (UTG)

o blastocinina que constituye entre el 40 y el 60 % de las proteínas totales del fluido uterino. La secreción de UTG es detectable desde el tercer día de la gestación y registra un pico alrededor del cuarto y quinto día⁽¹⁾, disminuyendo drásticamente al décimo día, y su concentración se mantiene a niveles muy bajos durante el resto de la gestación⁽²⁾. Por lo anterior, se ha propuesto que la UTG ejerce diversos efectos sobre el blastocisto, que facilitan su implantación^(2,3,4,5). En la coneja la implantación

^a Recibido el 12 de junio de 2000 y aceptado para su publicación el 5 de octubre de 2000.

^b Departamento de Morfología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. Circuito exterior de C.U., Coyoacán, 04510 Tel/fax 6-16-65-63 México D.F. Correspondencia y solicitud de separatas al primer autor.

^c Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Perinatología. México D.F.

tiene lugar en el día 7 de la gestación⁽⁶⁾, momento en el que aún existen niveles altos de UTG.

Otra molécula que ha sido identificada durante el periodo de preimplantación en esta especie es la relaxina (RL). Mediante técnicas de inmunohistoquímica se sabe que la RL está presente entre el día 4 y 9 de la gestación, exclusivamente en las glándulas localizadas en los sitios de implantación y posteriormente entre los días 11 y 23, además de estar presente en las glándulas, también se detecta en las células del epitelio luminal del útero^(7,8). Por lo anterior, hoy en día se considera que esta molécula al igual que la UTG, pueden tener un papel relevante en la preparación de la mucosa uterina para la nidación del blastocisto.

La apoptosis o muerte celular programada es un proceso fisiológico importante, particularmente en los sitios que requieren una continua renovación celular como la mucosa intestinal y uterina^(9,10,11).

En la actualidad, se sabe que todos los cambios estructurales que implican la maduración funcional del endometrio durante la gestación temprana, involucran procesos de proliferación celular y apoptosis de diversas poblaciones celulares del epitelio uterino secretor, tanto glandular como de revestimiento.

A la fecha, se han efectuado estudios de proliferación celular⁽¹²⁾ en conejas no gestantes, ovariectomizadas y en estado de pseudogestación⁽¹³⁾; sin embargo, no existen estudios tendientes a esclarecer la dinámica de las células del epitelio uterino, durante el periodo de preimplantación de

la coneja, por lo que el propósito del presente estudio fue analizar la dinámica de los índices de proliferación celular y apoptosis en la mucosa uterina de la coneja, durante los días 1 al 5 y 8 de la gestación.

Se utilizaron 21 conejas Nueva Zelanda adultas (3.5 a 4.5 kg de peso), alojadas en jaulas individuales con alimento comercial, agua *ad libitum* y mantenidas en condiciones de bioterio. A cada animal se le cruzó dos veces en un mismo día, utilizando dos sementales experimentados. El día de la cruce fue designado como el día 0 del experimento. Las conejas fueron divididas en seis grupos de tres conejas cada uno, correspondientes a los días 1, 2, 3, 4, 5 y 8 postcoito. Se utilizó un grupo de animales que sirvieron como testigo para los distintos días evaluados en el estudio (n= 3). Este grupo consistió de conejas adultas nulíparas no gestantes (NG). Los animales de cada grupo fueron sacrificados mediante sobredosis de pentobarbital sódico (90 mg/kg)⁽¹⁴⁾. Con la finalidad de verificar la existencia de gestación en las conejas correspondientes a los días 1 al 3 de la gestación, se efectuó un lavado del oviducto con solución salina fisiológica y el líquido se colectó en una caja de Petri, a fin de observar los embriones con un microscopio estereoscópico. Este procedimiento también se efectuó en los cuernos uterinos de los animales gestantes en los días 4, 5 y 8, debido a que en la coneja los productos permanecen en el oviducto hasta el día 3 de la gestación. Por lo anterior, la existencia de los embriones fue el principal criterio de inclusión de los animales. Posteriormente se tomaron dos fragmentos

INDICES DE MITOSIS Y APOPTOSIS DEL EPITELIO UTERINO DE LA CONEJA

de tejido del tercio medio de cada uno de los cuernos uterinos de los animales de todos los grupos, e inmediatamente se fijaron durante 8 h en una solución de ácido pícrico (15%) y paraformaldehído (4%), en un amortiguador de fosfatos (PBS), pH 7.4⁽¹⁵⁾.

Después del periodo de fijación, los tejidos se colocaron en PBS por 24 h y se procesaron mediante la técnica de inclusión en parafina, utilizando para este fin un histoqueinette automático (American Optical p 800). Posteriormente se realizaron cortes semiseriados de 5 a 7 mm de grosor mediante un microtomo (Spencer 820) y se tñieron con hematoxilina y eosina.

Con un microscopio fotónico, se contaron células del epitelio luminal y glandular en apoptosis y en mitosis. Para esto se evaluaron 10 campos microscópicos en el epitelio luminal e igual número de campos en el epitelio glandular, utilizando un aumento total de 400X. En cada campo se contaron 100 células del epitelio luminal uterino y 100 células del epitelio glandular^(13,16).

Se consideraron células en apoptosis cuando presentaron citoplasma basófilo y condensado, núcleo fragmentado (cariorexsis), disminución en el volumen citoplásmico, presencia de cuerpos apoptóticos globulares y acidófilos con o sin restos nucleares, que en ocasiones están rodeados por halos claros, de acuerdo al criterio seguido por Nawaz *et al.*⁽¹³⁾. Por otro lado, las células en mitosis presentan forma esférica y cromatina condensada (profase o telofase) o bien con la presencia

de cromosomas en diferentes fases (prometafase, metafase y anafase)^(17,18).

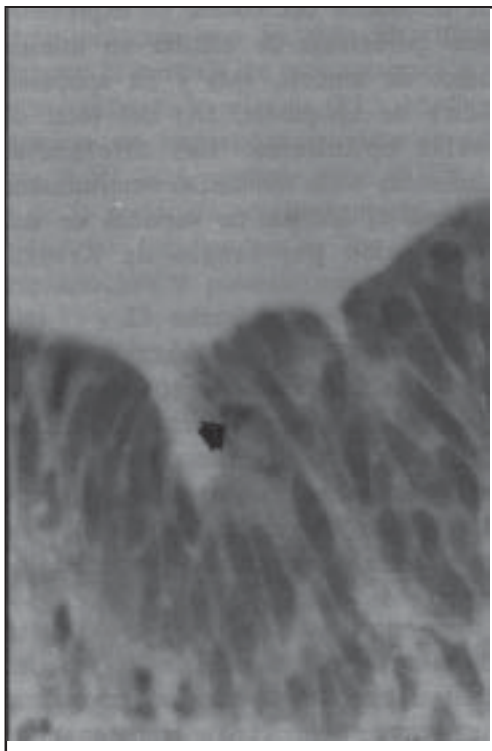
Los resultados del conteo se expresaron como porcentaje de células en mitosis (índice de mitosis, IM) y en apoptosis (índice de apoptosis, IA) del total de células epiteliales. Las diferencias estadísticas entre medias se determinaron mediante el análisis de varianza de una clasificación por rangos de Kruskal Wallis⁽¹⁹⁾.

En el examen del fluido oviductal y uterino de los días 1 al 5 se observó la presencia de embriones, lo que nos permitió verificar que las conejas se encontraban gestantes. En los animales no gestantes del grupo testigo no se observaron diferencias en los dos parámetros evaluados en el tejido uterino.

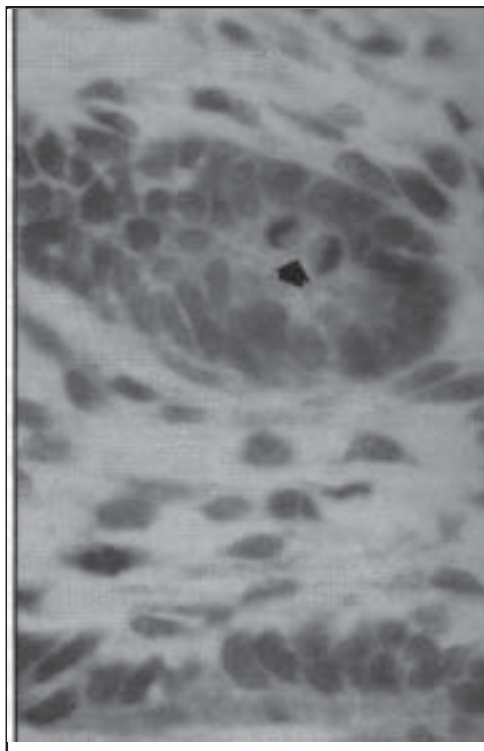
Los valores obtenidos del índice mitótico del día 1 al 5 del experimento registraron fluctuaciones notorias. Sin embargo, en el grupo testigo se observó poca actividad mitótica, siendo el IM inferior al 1% en las células del epitelio luminal y glandular (Figura 1).

En el día 1 postcoito, el IM se duplicó en ambos epitelios, llegando a valores cercanos al 2% en las células de las glándulas endometriales. En el día 2 se presentó un pico en el índice de proliferación, tanto en las células del epitelio luminal y glandular, siendo superior al 4 y 5.5% respectivamente (Figura 2). Estos incrementos fueron significativos ($P < 0.01$) con respecto a las conejas testigo y los valores obtenidos en los demás días. Estos valores disminuyeron drásticamente en el día 3 hasta llegar a

Figura 1 : Células en mitosis (flechas) en el epitelio del lumen uterino (A) y en glándulas endometriales (B) . Tinción de hematoxilina férrica. Aumento 1250 X



A



B

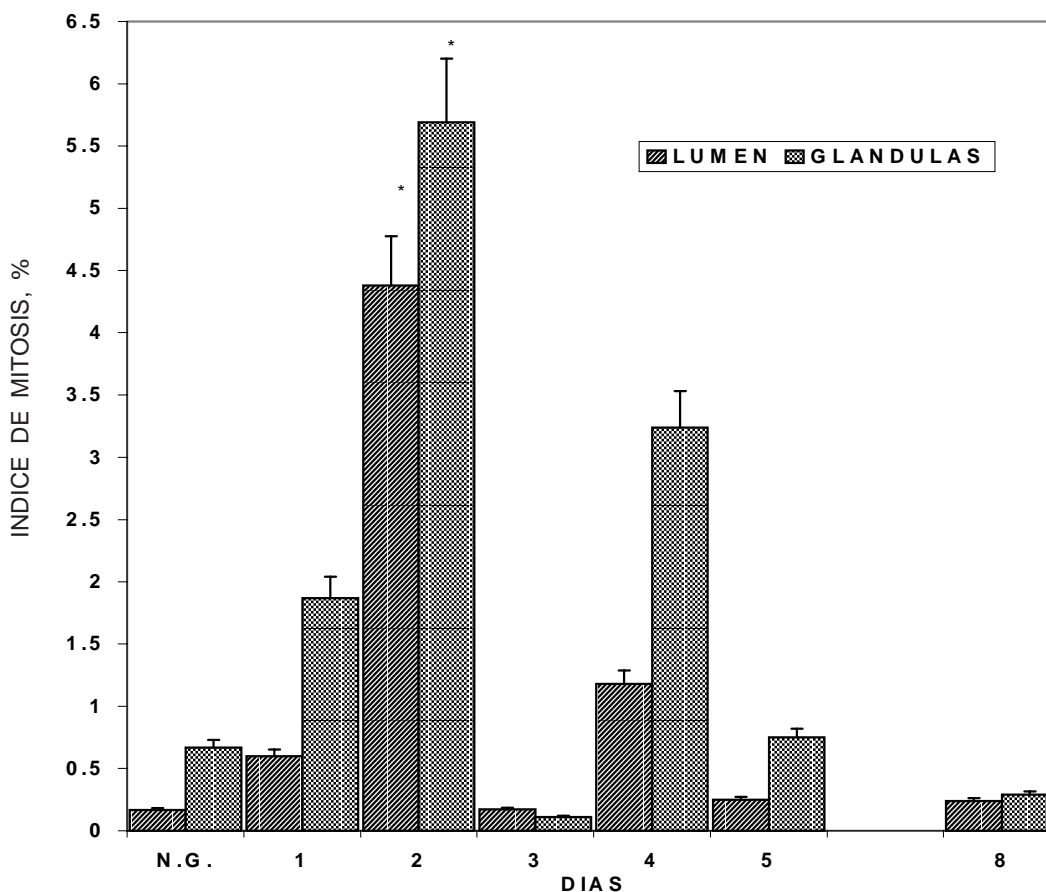
valores cercanos al 0%. Durante el día 4 se presentó otro incremento en el IM de las células del epitelio luminal (superior al 1%) y de las células glandulares (superior al 3%). Este valor disminuyó notoriamente en el quinto día de la gestación, en el que ocurrió una disminución en el porcentaje del IM (menor al 1%) similar al observado en las conejas NG, para ambas poblaciones celulares. En el día 8 de la gestación se mantuvieron valores menores al 1% en ambos tipos celulares.

Respecto al índice de apoptosis observado, ambas poblaciones celulares tuvieron

comportamientos contrastantes; mientras que en el epitelio luminal no hubo presencia de apoptosis, en el epitelio glandular ésta fue ligeramente superior al 1.5% (Figuras 3 y 4).

En el día 1 de la gestación se observó un incremento en la apoptosis, tanto en las células epiteliales del lumen (con valores próximos al 1.5%) como en las células glandulares (valores superiores al 2.5%). Durante los días 2, 4 y 5 se observó una disminución significativa en el IA en las células glandulares ($P < 0.05$) con respecto a los valores obtenidos en el día 1. En el día 3 el valor del IA del epitelio glandular

Figura 2: Índice de mitosis en las células epiteliales del lumen uterino y en las glándulas endometriales durante los primeros días de la gestación (Media ± error estándar)



NG= conejas no gestantes (testigo).

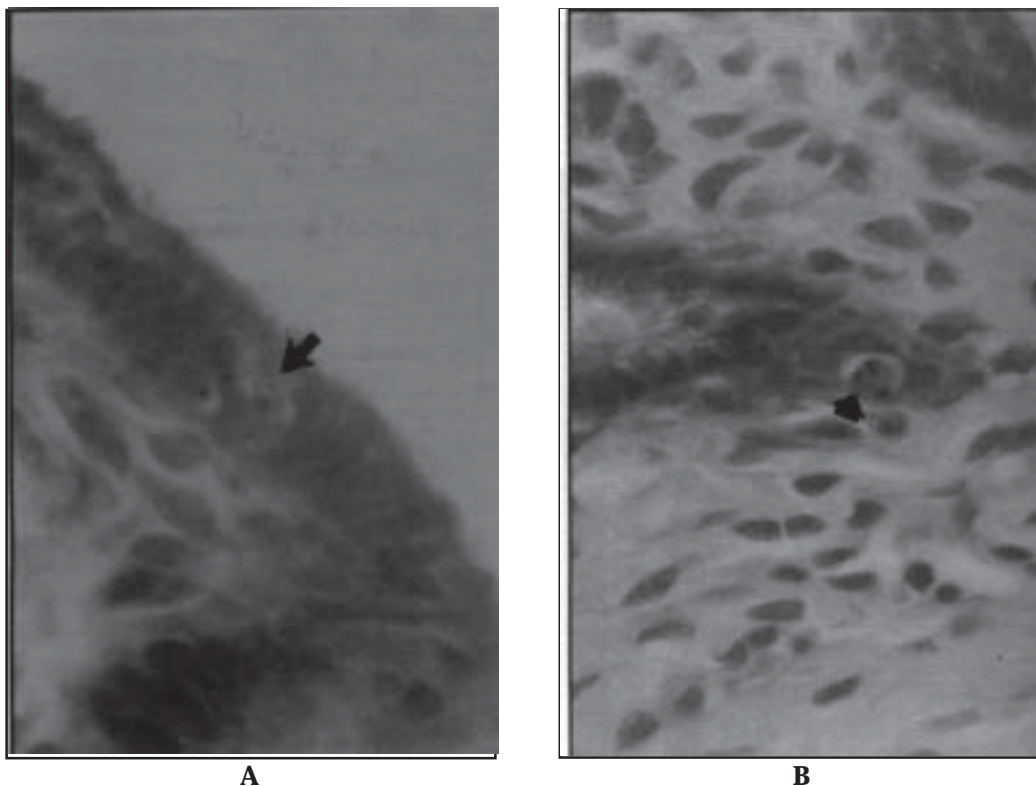
* Los asteriscos indican diferencia entre medias en relación con el grupo testigo ($P < 0.05$).

fue similar al del grupo de animales NG. Durante los cinco primeros días de la gestación ocurrió una disminución progresiva en el IA en las células del epitelio luminal; dichos valores oscilaron aproximadamente entre el 1.5% y el 0.5% del IA entre los días 1 y 5 respectivamente. En el día 8 de la gestación, los valores

del IA en ambos tipos celulares nuevamente registraron un incremento con respecto al día 5 de la gestación.

Al analizar el comportamiento de proliferación y apoptosis entre las células glandulares y luminales se observó un paralelismo, es decir, cuando se presentó

Figura 3: Células en apoptosis (flechas) en el epitelio del lumen uterino (A) y en las glándulas endometriales (B). Tinción de H & E. Aumento 1250 X



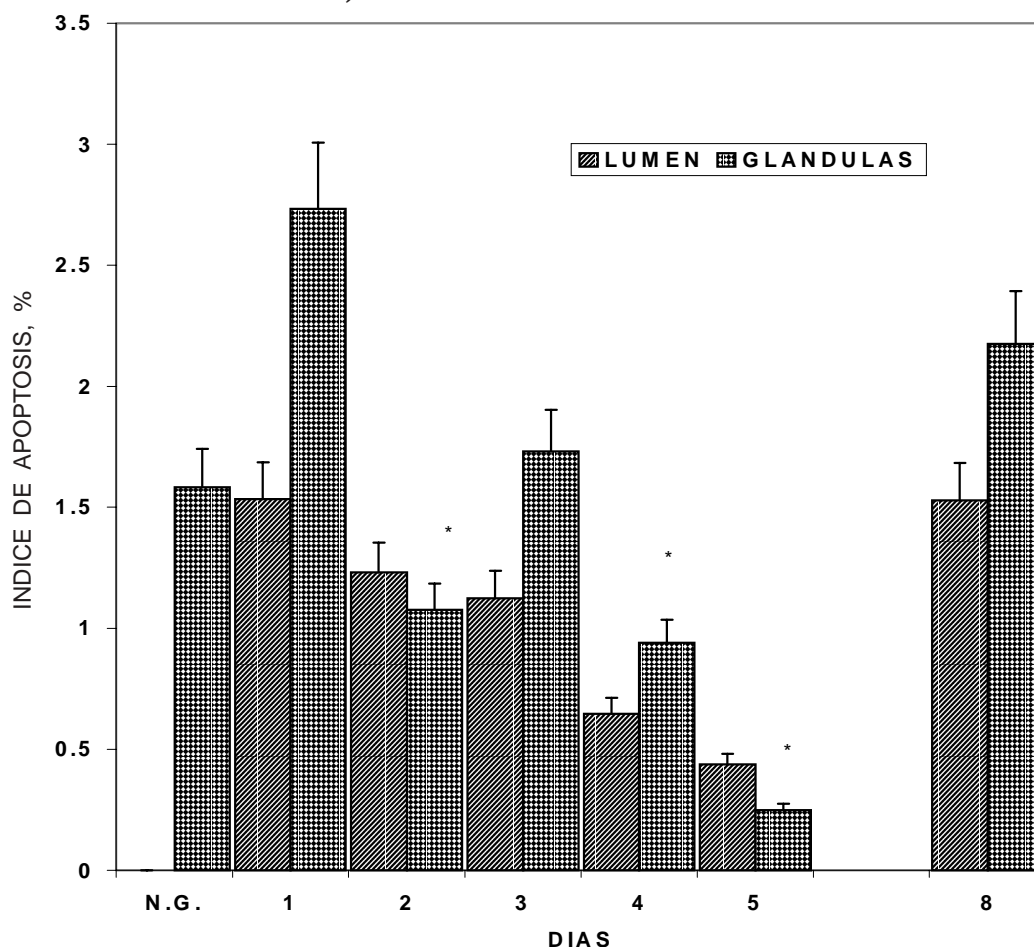
un incremento de alguno de los índices evaluados en el epitelio luminal, éste también se observó en el epitelio glandular y viceversa, lo que sugiere que ambos sitios histológicos se comportan como una unidad funcional, que responden de manera muy similar a los estímulos tisulares durante el periodo de preimplantación.

El pico en el IM observado durante el segundo día de la gestación, también ha sido mencionado en conejas pseudogestantes tratadas con gonadotropina coriónica humana^(12,13); sin embargo, en estos estudios no se describe la drástica caída en la actividad mitótica que se observó en

el presente estudio durante el día 3, y tampoco se menciona el incremento observado el día 4. Estas variaciones pueden deberse a que el comportamiento de los niveles de estrógenos de los animales gestantes es distinto al de las conejas pseudogestantes⁽²⁰⁾ y ovariectomizadas⁽¹³⁾. Por otro lado, los valores del IM encontrados en los días 5 y 8 de la gestación son similares a los existentes en animales no gestantes.

Los niveles máximos del IM se registraron en el día 2 de la gestación y también se presentó un segundo pico de proliferación celular en el día 4, aunque este último

Figura 4: Índice de apoptosis en las células epiteliales del lumen y en las glándulas endometriales durante los primeros días de la gestación. (Media \pm error estándar)



NG = conejas no gestantes (testigo).

* Los asteriscos indican diferencia entre medias en relación con el día 1 de la gestación ($P < 0.05$).

menos acentuado. En los días restantes el IM disminuyó drásticamente.

Durante la gestación temprana de diversos mamíferos es común la ocurrencia de picos en el IM. En el ratón estos picos se presentan en el día 3, tanto en las células del lumen como en las glándulas, seguido

de un incremento en el día 4 y 5 en el estroma⁽²¹⁾. Por otro lado, en la gata el nivel máximo del IM se presenta en el día 2 después de la cruce⁽²²⁾. Estos días de máximos incrementos mitóticos se dan de manera temprana en el útero y forman parte del proceso fisiológico de transformación y diferenciación celular,

para convertir el endometrio en un tejido secretor y receptivo al blastocisto, propiciar su nutrición antes de la implantación y anidarlos posteriormente.

En las hembras no gestantes se observó un mayor porcentaje del IM en el epitelio glandular con respecto al epitelio luminal; esta mayor proliferación en el epitelio glandular, apoya la hipótesis de Conti *et al.*⁽¹²⁾, que señala que los estrógenos modifican preferentemente la cinética de las células epiteliales glandulares del endometrio, las que normalmente migran hacia el lumen. El efecto estrogénico se manifiesta en una menor pérdida de células luminales, por lo que se genera un efecto neto de proliferación epitelial. Brown *et al.*⁽²⁰⁾ señalan un incremento en los niveles plasmáticos de estrógenos (en particular del 17 β estradiol) desde el día 1 hasta el día 14 de la gestación, o bien pseudogestación en la coneja, por lo que el efecto estrogénico pudiera ser relevante para generar el crecimiento del tejido epitelial en el periodo de preimplantación.

Los incrementos que ocurren en el IM están acompañados de una marcada disminución en el IA entre los días 2 y 5 de la gestación, resultados que son consistentes con otro estudio⁽¹³⁾ y son indicativos de la acción coordinada de estos dos procesos celulares. Se han descrito algunos genes supresores de tumores como es el caso del gen p53⁽²³⁾, que codifica para la proteína p53, la cual participa en la coordinación de los procesos de mitosis y apoptosis. Esta proteína actúa cuando ocurre algún daño en el DNA, y es capaz de detener el proceso mitótico de la célula y conducirla hasta la consumación del proceso de apoptosis⁽¹⁸⁾. Rotello *et al.*⁽²⁴⁾

han demostrado que en el epitelio uterino de la coneja existe una regulación coordinada de los procesos de apoptosis y proliferación celular. En ambos procesos parece tener un papel relevante el factor de crecimiento transformante $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$). Esta molécula es capaz de disminuir la proliferación celular e inducir apoptosis en condiciones de cultivo celular. En el epitelio uterino de ratones, previo a la implantación, se ha demostrado la expresión de TGF- $\beta 1$ y $\beta 2$ y se ha informado que la expresión de TGF- $\beta 2$ es inducida por estradiol y no así por progesterona^(25,26).

Los estrógenos también se incrementan durante la gestación temprana⁽²⁰⁾. Está bien establecido que los estrógenos estimulan el crecimiento del epitelio uterino, mientras que la progesterona estimula su diferenciación. En estudios realizados en el epitelio uterino de la rata se ha observado que los estrógenos inducen la síntesis del ácido ribonucleico mensajero del receptor para el factor de crecimiento epidermal (EGF), el cual promueve la proliferación del tejido uterino^(27,28).

Recientemente, se ha informado de la participación de diversas citocinas en el proceso de preparación del endometrio para la implantación⁽²⁹⁾, sin embargo, aún no se han llevado a cabo estudios que correlacionen *in vivo* estas moléculas con los fenómenos de proliferación celular y apoptosis, por lo que se abren muy diversas líneas de investigación en este sentido a fin de conocer su posible influencia y regulación.

Experimentos en conejas ovariectomizadas señalan un incremento del IA de hasta

124 veces en relación con los animales testigo, este fenómeno es prevenido significativamente por la aplicación de progesterona⁽¹³⁾; por otro lado, cuando se aplica RU-486, un compuesto antiprogestacional, a conejas pseudogestantes, se dispara la apoptosis, alcanzado niveles similares al de las hembras ovariectomizadas⁽³⁰⁾, por lo que la progesterona suprime la apoptosis; según algunos autores^(20,31) la concentración plasmática de esta hormona en la coneja comienza a incrementarse de manera exponencial a partir del día 2 o 3 y hasta el día 12, tanto en animales gestantes como pseudo-gestantes, lo que explicaría la disminución en el IA observado en este estudio. A diferencia de lo informado por Nawaz *et al.*⁽¹³⁾ en animales pseudogestantes, se observó un incremento de apoptosis en el epitelio glandular el día 3, además los porcentajes del IA fueron mayores a los descritos en conejas pseudogestantes.

Con base en los resultados obtenidos en el presente estudio, se puede concluir que durante el periodo de preimplantación existen variaciones en los procesos de proliferación celular y apoptosis del epitelio uterino de la coneja, estos procesos son eventos interaccionados, de modo que cuando predomina uno, el otro se inhibe; este comportamiento se presentó tanto en el epitelio de revestimiento como en el glandular. Por otro lado, los eventos de proliferación celular del epitelio luminal y glandular los días 2 y 4 forman parte de diversas transformaciones morfológicas y fisiológicas, que contribuyen a la presencia de un endometrio secretor, indispensable para que se lleve a cabo la implantación el día 7.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Técnico en histología Emilio Francisco López López el apoyo brindado durante el procesamiento histológico.

VARIATION OF THE MITOTIC AND APOPTOTIC INDEX IN THE RABBIT UTERINE EPITHELIUM DURING PREVIOUS DAYS OF IMPLANTATION

ABSTRACT

Anzaldúa ASR, Pérez MM, Castro RJI. *Téc Pecu Méx* 2001;39(1):59-68. During the first days of pregnancy the rabbit endometrium experiences multiple morphologic and functional changes, that provide to the blastocyst adequate environmental conditions necessary for the establishment of pregnancy. The present study was performed in order to know the proliferation index and apoptosis index of epithelial cells in the endometrium during the preimplantation period. In days 2 and 4 post-coitus, an increase ($P < 0.05$) in the mitotic index was observed in the luminal and glandular epithelium with respect to the control group (not pregnant). Between days 2 and 5 a decrease of the apoptotic index was observed in the luminal and glandular epithelia. These results indicate that during the preimplantation period in the rabbit, the cellular proliferation and apoptosis are a coordinated process, in such a way that when one of them increases, the other is inhibited. This behavior was observed in both, the coating and the glandular epithelia. The proliferation of cells observed at glandular and luminal epithelia level during the 2nd and 4th day of pregnancy is along with a process of cellular differentiation which ends up in a secretory epithelium that is necessary for nestling of embryos on day 7.

KEY WORDS: Mitosis, Apoptosis, Uterine epithelium, Rabbit, Early pregnancy.

LITERATURA CITADA

1. Gutiérrez-Sagal R, Pérez-Palacios G, Langley E, Pasapera A, Castro RI, Cerbón CM. Endometrial expression of progesterone receptor and uteroglobin genes during early pregnancy in the rabbit. *Mol Reprod Develop* 1993;34:244-249.
2. Miele L, Cordella-Miele E, Murkherjee B. Uteroglobin: structure, molecular biology and new perspectives on its function as a phospholipase A2 inhibitor. *Endocr Rev* 1987;8(4):474-490.
3. Krishnan RS, Daniel Jr JC. "Blastyokinin" inducer and regulation of blastocyst development in the rabbit uterus. *Science* 1967;158:490-492.
4. Beier HM. A hormone-sensitive endometrial protein in blastocyst development. *Biochim Biophys Acta* 1968;160:239-291.
5. Krichner C. Uteroglobin in the rabbit I. Intracellular localization in the oviduct, uterus and preimplantation blastocyst. *Cell Tissue Res* 1976;170:415-424.
6. Hafez ESE. Reproducción e inseminación artificial en animales. 5ª ed. México: Interamericana Mc Graw-Hill; 1989.
7. Vaughan HL, Fields PA. Rabbit endometrial relaxin. Immunohistochemical localization during preimplantation, pregnancy and lactation. *Biol Reprod* 1990;42:737-745.
8. Vaughan HL, Fields PA. Rabbit relaxin: the influence of pregnancy and ovariectomy during pregnancy on the plasma profile. *Biol Reprod* 1991;45:209-214.
9. Wyllie AH. Apoptosis cell death in tissue regulation. *J Pathol* 1987;153:313-316.
10. Cohen JJ. Apoptosis: el proceso fisiológico de muerte celular. *Hosp Practice* 1994;3:439-448.
11. Wyllie AH. Apoptosis: an overview. *British Med Bull* 1997;53:451-465.
12. Conti J, Giménez-Conti IB, Conner EA, Lehman JM, Gerschenson LE. Estrogen and progesterone regulation of proliferation, migration and loss in different target cells of rabbit uterine epithelium. *Endocrinology* 1984;114:345-351.
13. Nawaz S, Lynch PM, Galand P, Gerschenson LE. Hormonal regulation of cell death in rabbit uterine epithelium. *Am J Pathol* 1987;127:51-59.
14. AVMA. Report of the AVMA panel on euthanasia. *JAVMA* 1993;202:230-249.
15. Stefanine E. Fijación de espermatozoa for E.M. *Nature* 1967;216:173-174.
16. Conti CJ, Giménez-Conti IB, Zerbe GO, Gerschenson LE. Differential effects of estradiol - 17 beta and progesterone on the proliferation of glandular and luminal cells of rabbit uterine epithelium. *Biol Reprod* 1981;24:643-648.
17. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Molecular biology of the cell*. 3ª ed. New York & London: Garland Publishing Inc;1994.
18. Karp G. *Biología celular y molecular*. 1ª ed. México: McGraw-Hill Interamericana; 1998.
19. Daniel, W. *Bioestadística*. 3ª ed. México: Limusa; 1993.
20. Browning JY, Keyes PL, Wolf RC. Comparison of serum progesterone, 20 α -dihydroprogesterone and estradiol-17 β in pregnant and pseudopregnant rabbit: evidence for postimplantation recognition of pregnancy. *Biol Reprod* 1980;23:1014-1019.
21. Finn CA, Martin L. Patterns of cell division in the mouse uterus during early pregnancy. *J Endocr* 1967;39:593-597.
22. West NB, Verhage HG, Brenner MRM. Changes in nuclear receptor and cell structure in the oviductal and uterus of the cats. *Biol Reprod* 1977;17:138-143.
23. Bellamy ChOC. "p53 and apoptosis" *British Med Bull* 1996;53:522-538.
24. Rotello RJ, Liberman RC, Purcho AF, Gerschenson LE. Coordinated regulation of apoptosis and cell proliferation by transforming growth factor β 1 in cultured uterine epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:3412-3415.
25. Das SK, Flanders KC, Andrews G, Dey SK. Expression of transforming growth factor- β isoforms (β 2 and β 3) in the mouse uterus: analysis of the perimplantation period and effects of ovarian steroids. *Endocrinology* 1992;130:3459-3466.
26. Thomson EB. Apoptosis and steroid hormones. *Mol Endocrinol* 1994;8:665-673.
27. Tomooka Y, DiAugustine RP, McLachlan JA. Proliferation of mouse uterine epithelial cells in vitro. *Endocrinology* 1986;118:1011-1018.
28. Lingham RB, Stancel GM, Loose-Mitchell DS. Estrogen regulation of epidermal growth factor receptor messenger ribonucleic acid. *Mol Endocrinol* 1988;2:230-235.
29. Díaz-Flores M, Baiza-Gutman LA, Hicks JJ. Los nuevos moduladores endometriales en el embarazo temprano. *Gac Méd Méx* 1996;132:519-528.
30. Rotello RJ, Liberman RC, Lepoff RB, Gerschenson LE. Characterization of uterine epithelium apoptotic cell death kinetics and regulation by progesterone and RU-486. *Am J Pathol* 1992;140:449-456.
31. Challis JR, Davies IJ, Ryan KJ. The concentrations of progesterone, estrone and estradiol-17 β in the plasma of pregnant rabbit. *Endocrinology* 1973;93:971-976.