

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

**REGULACION HORMONAL DE LAS CITOCINAS DERIVADAS DE
EOSINOFILOS Y CELULAS CEBADAS EN EL UTERO DE RATA ADULTA**

BO 1352/97
Ej. 1

Tesis para optar por el grado de

Maestra en Biología de la Reproducción

presentada por

Méd. Cir. MARIA VICTORIA MATA SANTIBÁÑEZ

Directora de tesis: Dra. María G. Campos Lara

Octubre de 1997



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo de investigación se realizó en la
Unidad de Investigación Médica en Farmacología
Hospital de Especialidades
Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS

Gracias a
la Universidad Nacional Autónoma de México y
al Instituto Mexicano del Seguro Social
por otorgarme apoyo económico durante mis estudios
de Maestría en Biología de la Reproducción
y la realización de esta tesis.

Gracias a mis sinodales por sus sugerencias:

Dra. Ma. Cristina Revilla

Dra. María G. Campos

M. en C. Martha V. Oropeza

Dra. Leticia Moreno

Dr. Héctor Ponce

Esta tesis se la dedico con todo mi amor a Ana Luz

Hija recuerda que

No se puede huir del viento

afronta el viento, baja la

vela y sigue adelante.

Agradezco a mis padres y hermana porque
lo he logrado con su amor y apoyo incondicional

Gracias a la Dra. **María G. Campos Lara**, por darme el apoyo, enseñanzas y orientación para seguir adelante. Que Dios la bendiga.

Gracias al Dr. **Héctor Ponce Monter** por creer en mí y darme la oportunidad.

Gracias a la Dra. **Marta V. Oropeza Blando** por ser mi amiga y maestra.

Gracias a la Dra. **Sandra Orozco** por su inmensa y desinteresada ayuda.

Agradezco especialmente a la Dra. Catalina Chávez
su permanente apoyo académico.

Gracias a mis amigos y compañeros:

Patricia Campos, Marco Antonio Durán, Angeles Figueroa,

Aurelia Mata, Bertha Ortega, Martha Reynoso,

Antonio Valencia, Josefá Vargas y Teodoro Villanueva.

A todas y cada una de las personas que
participaron en la realización de
este maravilloso sueño

CONTENIDO

Resumen	10
I. Antecedentes	11
I.1 Citocinas	11
I.1.a Generalidades	11
I.1.b Citocinas y reproducción	13
I.1.c Citocinas y células uterinas residentes	14
I.1.d Citocinas y leucocitos uterinos	15
I.2 Células cebadas	16
I.2.a Células cebadas en fenómenos inflamatorios	16
I.2.b Células cebadas y citocinas	17
I.2.c Células cebadas uterinas	18
I.3 Eosinófilos	18
I.3.a Eosinófilos en fenómenos inflamatorios	18
I.3.b Eosinófilos y citocinas	20
I.3.c Eosinofilia uterina	21
I.4 Morfología del útero de roedores	23
II. Planteamiento del problema	26
III. Hipótesis	27
IV. Objetivos	27
V. Métodos	28
V.1 Animales	28
V.2 Ovariectomía	28
V.3 Tratamiento hormonal	29
V.4 Obtención del útero	30
V.5 Inmunocitoquímica	30
V.6 Conteo de células	32
V.7 Análisis estadístico	33
VI. Resultados	34
VI.1 Regulación estrogénica de células inmunoreactivas a IL-4, IL-5 y de células cebadas	34
VI.2 Distribución anatómica y regulación hormonal de las células cebadas en el útero	35
VI.3 Regulación hormonal de células inmunoreactivas a IL-5 y de eosinófilos	36
VI.4 Distribución anatómica y regulación hormonal de los eosinófilos en el útero	37
VII. Discusión	51
VII.1 Regulación estrogénica de células inmunoreactivas a IL-4, IL-5 y células cebadas	51
VII.2 Efecto inhibitorio de la progesterona sobre el incremento de células inmunoreactivas a IL-4, IL-5 y de células cebadas inducido por estradiol	53
VII.3 Variación regional de las células cebadas uterinas	54
VII.4 Regulación hormonal de eosinófilos e IL-5	55
VII.5 Interacción células cebadas - eosinófilo	56
VII.6 Conclusiones	58
VIII. Referencias	60

RESUMEN

Los órganos reproductivos tienen una gran población de leucocitos cuya composición y distribución responde a los cambios hormonales cíclicos. En el útero los estrógenos producen un dramático aumento en el número de eosinófilos y una disminución significativa en el número de células cebadas. Sin embargo, se ignoran los mecanismos involucrados en la activación de estas células así como en la infiltración eosinofílica. Estudios recientes han mostrado que IL-4 tiene como fuente celular a las células cebadas y linfocitos T, y que IL-5 tiene como blanco principal a los eosinófilos para promover su maduración y activación. Estas citocinas podrían participar durante los procesos reproductivos, actuando autócrina y/o parácrinamente como inmunoreguladores en la fisiología uterina. El propósito del presente trabajo fue determinar por inmunohistoquímica la expresión de IL-4 e IL-5 en células cebadas y la de IL-5 en eosinófilos, en útero de rata en diferentes estados endócrinos. Se utilizaron ratas Sprague-Dawley vírgenes de 200-250 g de peso corporal, mantenidas en ciclos de luz/obscuridad de 12/12 h con libre acceso a alimento y agua. Los animales fueron ovariectomizados (OVX) y 15 días después recibieron una dosis de 10 μ g de benzoato de estradiol (BE_2), y fueron sacrificados a las 0,6,12,24 y 48 h, después de la administración de la hormona. Un sexto grupo recibió 0.5 mg de progesterona 44 h después de la administración de BE_2 y se sacrificó 4 h después. Se obtuvieron cortes seriados (10 μ m) que se asignaron de manera alternada para inmunohistoquímica (anticuerpos para IL-4 e IL-5) o para histología (azul de toluidina y hematoxilina de Harris). Para el conteo de eosinófilos y células cebadas, así como de células inmunoreactivas a IL-4 ó IL-5 se analizaron 4 campos en cada corte y 3 cortes por cada animal (n=4 por grupo) con microscopio fotónico. Los resultados se analizaron utilizando análisis de varianza de una vía, prueba de comparación múltiple de Bonferroni y *t* de Student no pareada. La asociación entre células teñidas histológicamente y células inmunoreactivas para cada citocina se estableció por medio del coeficiente de correlación de Spearman. Los resultados muestran que, en el útero de rata, IL-4 se encuentra en las células cebadas, mientras que IL-5 se localizó en células cebadas y eosinófilos, y que, al igual que los leucocitos, son reguladas por estrógenos (E_2) y progesterona (P_4). El tratamiento con E_2 y con E_2 - P_4 aumentó el número de células cebadas e inmunoreactivas a IL-4 e IL-5 en la región mesometrial, en cambio la P_4 revirtió el efecto de E_2 en la región antimesometrial ($p < 0.01$). En relación a eosinófilos, se encontró un número alto de eosinófilos en el útero de ratas OVX, tanto en el conteo total como en las regiones estudiadas; mientras que el tratamiento con E_2 incrementó el número de eosinófilos y células positivas a IL-5 de manera dependiente de la duración del mismo (de 6 a 48 h), y alcanzó su pico máximo con la administración combinada de E_2 - P_4 . Se propone que IL-4 e IL-5 así como células cebadas y eosinófilos son potencialmente partícipes de una red de citocinas que comunica a las células uterinas durante los procesos reproductivos.

I. ANTECEDENTES

I.1 CITOCINAS

I.1.a Generalidades

Los límites que mantenían separados los campos de la biología de la reproducción, la endocrinología, la inmunología y la neurobiología se han desvanecido recientemente. El eslabón faltante que ahora une estas disciplinas es el conocimiento de que el lenguaje por el que las células se comunican entre esos sistemas es la red de citocinas.

Las citocinas son glucoproteínas o péptidos (habitualmente glucoproteínas) de bajo peso molecular (raras veces mayor de 8 a 25 kDa) que constan a menudo de una sola cadena, que pueden actuar de manera autócrina y/o parácrina, regulando la función de la célula huésped a través de receptores membranales a los que se unen con gran afinidad por lo que en concentraciones mínimas (picomoles a nanomoles) muestran su actividad biológica (Abbas et al., 1994).

Las citocinas integran redes muy complejas de manera que no solo participan en la regulación cuantitativa y cualitativa de la respuesta inmune, e intervienen en los procesos de hematopoyesis, inflamación y cicatrización (Miller y Krangel, 1992), sino que también están involucradas en la fisiología normal de otros sistemas en el organismo.

Aunque las citocinas se consideran como una "familia" éste es más un concepto funcional que estructural, ya que no todas estas proteínas se hallan relacionadas químicamente.

Las diferentes citocinas son secretadas por los linfocitos T y otras células, y se clasifican en interleucinas (IL), interferones (IFN), factores de necrosis tumoral (TNF), hemopoyetinas y quimiocinas. Esta clasificación es

hasta cierto punto artificial ya que algunas citocinas clasificadas como interleucinas son hemopoyetinas (IL-3), quimiocinas (IL-8), etcétera, mientras que el IFN, el TNF y el factor inhibidor de las leucemias (LIF) son verdaderas interleucinas con múltiples efectos funcionales sobre otras células del sistema inmune, de otros sistemas y en el proceso inflamatorio. No obstante, aun con estas limitaciones, la clasificación es útil. Con excepción de la IL-6, las citocinas no deben ser consideradas como hormonas, ya que su acción es, habitualmente, sólo a nivel local, en el sitio donde son secretadas (Moreno, 1996).

La secreción de citocinas es resultado de la activación (específica o no) de los linfocitos T. Una vez secretadas, las citocinas no tienen especificidad inmunológica ya que actúan sobre cualquier célula con receptores para ellas, independientemente del estímulo inicial (Moreno, 1996).

Propiedades generales de las citocinas

Aunque las citocinas son un grupo diverso de proteínas, comparten varias propiedades (Abbas et al., 1994):

1. Las citocinas se producen durante las fases efectoras de la inmunidad natural y específica, y sirven para mediar y regular las respuestas inmunes e inflamatorias.
2. La secreción de citocinas es breve y autolimitada.
3. Muchas citocinas son producidas por muchos tipos celulares.
4. Las citocinas son pleiotrópicas, es decir actúan sobre diferentes tipos celulares.
5. Las citocinas tienen a menudo múltiples efectos diferentes sobre la misma célula diana.

6. Las acciones de las citocinas son a menudo redundantes.
7. Las citocinas frecuentemente influyen en la síntesis de otras citocinas.
8. Las citocinas a menudo influyen en la acción de otras citocinas.
9. Las citocinas, como otras hormonas polipeptídicas, inician su acción uniéndose a receptores específicos en la membrana plasmática de la célula diana.
10. La expresión de muchos receptores de citocinas está regulada por señales específicas.
11. La mayor parte de las respuestas celulares a las citocinas precisan RNAm nuevo y la síntesis proteica.
12. Las citocinas actúan como reguladores de la división celular, es decir, como factores de crecimiento en muchas células diana.

I.1.b Citocinas y reproducción

En la fisiología reproductiva se ha observado que redes orquestadas de citocinas, que están estrechamente relacionadas con las señales de las hormonas esteroideas, participan en procesos dependientes de hormonas como la ovulación, la menstruación, la implantación y el parto, fenómenos en los que la inflamación y/o la regeneración tisular están presentes. Las respuestas uterinas tempranas inducidas por estrógenos, como imbibición de agua, incremento de la permeabilidad vascular e infiltración eosinofílica semejan de muchas maneras a la clásica respuesta inflamatoria (Tchernitchin, 1979). Así, es indudable que las citocinas están involucradas en el mantenimiento del delicado balance del eje hipotálamo-hipófisis-gónada-endometrio (Robertson et al., 1992; Tabibzadeh, 1994).

I.1.c Citocinas y células uterinas residentes

Las citocinas se sintetizan en todo el útero incluyendo la glándula metrial, que es potencialmente una fuente importante de LIF y CSF-1 (factor estimulante de colonias-1), y el estroma endometrial y la decidua, que tienen el potencial de secretar CSF-1, factor de células progenitoras, TNF, IL-6, IL-1, TGF-1 y TGF-2 (factor transformante del crecimiento). De acuerdo con Robertson et al., 1992, se desconoce si estas citocinas se originan de células residentes o de poblaciones hematopoyéticas transitorias.

Recientemente se ha reportado que las células residentes de los tejidos reproductores son fuente de diversas citocinas que tienen la capacidad de reclutar y modular la función de macrófagos, granulocitos, linfocitos y células endoteliales (Robertson et al., 1992).

Las células epiteliales del útero producen CSF-1, TNF α , TGF-1, GM-CSF (factor estimulante de las colonias de granulocitos y macrófagos), IL-6 y LIF (Robertson et al, 1992, 1992a).

Los fibroblastos del estroma uterino humano secretan IL-6 y dicha secreción es regulada por 17 β -estradiol e IL-1 (Tabibzadeh et al., 1989). Esta regulación es congruente con el concepto de que IL-6 media o potencia la respuesta celular a varias citocinas, incluyendo IL-1 (Wong y Clark, 1988), e ilustra el enlace entre los sistemas endócrino e inmune.

Así, además de las citocinas producidas por poblaciones linfohematopoyéticas transitorias como IL-1 que es producida por macrófagos uterinos subepiteliales (Takacs et al., 1988), IL-6 y otras citocinas producidas por células uterinas no-inmunes pueden regular la fisiología uterina (Tabibzadeh et al., 1989).

Un claro ejemplo de que las citocinas están relacionadas con los cambios cíclicos inducidos por estradiol y progesterona en el útero es el hallazgo de que la expresión de IL-1, IL-6 y TNF α en el útero de ratón es cíclica, y la concentración de cada citocina aumenta conforme el estadio del ciclo pasa de diestro a proestro y a estro en una secuencia regulada en que IL-1 se produce primero seguida de IL-6 y de TNF α ; al parecer IL-1 participa en la inducción de IL-6 y TNF α (De et al., 1992).

I.1.d Citocinas y leucocitos uterinos

Los órganos reproductores contienen una gran población de leucocitos, cuya composición y distribución responde dramáticamente al medio hormonal cíclicamente cambiante, al grado que junto con los cambios vasculares asociados, la ovulación y la implantación semejan eventos inflamatorios y de reparación.

Las células hematopoyéticas uterinas activadas son capaces de realizar funciones inmunológicas y no inmunológicas en su microambiente (Hunt, 1994). Las citocinas linfohematopoyéticas, a través de su capacidad intrínseca de ser producidas transitoriamente y de actuar local y específicamente, comprenden una parte importante del lenguaje que facilita la comunicación intercelular que subyace a los procesos inflamatorios. Datos recientes muestran que las células residentes en los tejidos reproductores son una potente fuente de citocinas pleiotrópicas, las cuales tienen la capacidad de reclutar y modular la actividad de macrófagos, granulocitos, linfocitos y células endoteliales (Robertson et al., 1992). En los humanos, los esteroides también regulan la infiltración de granulocitos en el útero, fenómeno que se asemeja en muchos aspectos a la respuesta inflamatoria clásica a un daño o estímulo. Aunque estos fenómenos

se conocen desde hace 20 años, poca información existe acerca del mecanismo involucrado en controlar la migración leucocitaria en el útero o el papel que esos leucocitos juegan en la fisiología uterina (Zheng et al., 1988).

1.2 Células cebadas

1.2.a Células cebadas en fenómenos inflamatorios

Las células cebadas son células tisulares que se encuentran ampliamente distribuidas en todos los tejidos de los mamíferos. Clásicamente se les ha involucrado en fenómenos alérgicos y de hipersensibilidad. La mayoría de estos fenómenos son iniciados por la interacción de un antígeno con los anticuerpos IgE sintetizados contra él y localizados en la superficie membranal. El proceso de desgranulación es complejo y generalmente requiere de la formación de un puente entre dos receptores a IgE, aunque otros agentes, como la polimixina, pueden iniciar la desgranulación actuando directamente sobre la membrana. La secreción de los mediadores preformados (histamina, elastasa, galactosidasa, triptasa, IL-3, IL-4, IL-5, IL-8, etc.) o formados *de novo* (leucotrienos C₄, D₄, E₄, factor activador de plaquetas, prostaglandina D₂) influye en el microambiente y origina las manifestaciones clásicas como comezón, edema o contracción del músculo liso (Bienenstock et al., 1987).

Sin embargo, las células cebadas también pueden desempeñar un papel central en muchos tipos de fenómenos inflamatorios no alérgicos. Por ejemplo, su número está incrementado en la artritis reumatoide, la enfermedad inflamatoria de la vejiga y en respuesta a las infecciones por nemátodos. También se les ha involucrado en el proceso de reparación tisular pues su número aumenta en la formación de cicatrices, reparación de fracturas óseas, y en tumores sólidos (Bienenstock et al., 1987).

En los roedores, existen al menos dos poblaciones fenotípicas diferentes de células cebadas que son aparentes cuando se comparan las células cebadas del tejido conectivo con las de las capas superficiales de las mucosas. Los criterios para establecer dicha heterogeneidad son ligeras diferencias en tamaño, contenido de histamina, número de gránulos secretores, respuesta a secretagogos y antagonistas específicos y propiedades de tinción (Rudolph et al., 1993). Recientemente se ha probado que las poblaciones de células cebadas no se basan solamente en su localización tisular, sino que existen factores inmunofisiológicos que claramente distinguen las poblaciones de células cebadas, pues no todas maduran de la misma manera, es decir, el crecimiento de las células cebadas de la mucosa, pero no de las del tejido conectivo, es dependiente de IL-3 (Galli, 1990).

I.2.b. Células cebadas y citocinas

El reciente descubrimiento de que las células cebadas pueden producir y liberar una variedad de citocinas multifuncionales señala hacia mecanismos por los que las células cebadas podrían participar en las respuestas dependientes o independientes de IgE (Gordon et al., 1990).

Se ha detectado aumento de RNAm para IL-3, IL-4, IL-5 e IL-6 en células cebadas de ratón, así como IL-3, IL-4 e IL-6 bioactiva (Plaut et al., 1989), mientras que células con características de basófilos/células cebadas de médula ósea humana también producen IL-4 y IL-5 (Piccini et al., 1991). Usando inmunohistoquímica, se ha reportado recientemente que las células cebadas de piel y pulmón humano contienen IL-4 preformada que se libera tras activación celular dependiente de IgE (Bradding et al., 1992). Walsh et al.

(1991) demostraron la presencia de TNF- α preformada en células cebadas de piel humana que es liberada por activación inmunológica de las células.

1.2.c Células cebadas uterinas

Muchos investigadores han reportado la presencia de células cebadas en el útero de mamíferos. En algunas especies como rata (McKercher et al., 1973; Gibbons y Chang, 1972; Maraspin y Bo, 1971) y cobayo (Harvey, 1964) su número y distribución parece estar regulado por hormonas sexuales. Algunos autores han observado un incremento en el número de células cebadas uterinas cuando predomina la progesterona y una disminución por la acción de los estrógenos (Maraspin y Bo, 1971). Asimismo, se ha observado que el menor número de células cebadas localizadas en estro que en diestro se relaciona con un aumento en la secreción de estrógenos durante el proestro y el estro temprano (Levier y Spaziani, 1966; Padilla et al., 1990).

1.3 Eosinófilos

1.3.a Eosinofilia en fenómenos inflamatorios

El eosinófilo es un leucocito diferenciado que reside principalmente en tejidos de la submucosa y es reclutado a los sitios de reacciones inmunes específicas incluyendo enfermedades alérgicas. Los eosinófilos se producen en la médula ósea bajo la influencia de varios factores de diferenciación como IL-1, IL-3, IL-5 y GM-CSF. Los eosinófilos pueden elaborar mediadores lipídicos específicos, incluyendo leucotrieno C₄ (LTC₄), factor activador de las plaquetas y lipoxinas que son mediadores de reacciones alérgicas agudas. Además los eosinófilos liberan proteínas catiónicas que pueden causar daño tisular local y disfunción, contribuyendo a la patogénesis de la inflamación local (Weller, 1994).

El ciclo de vida de los eosinófilos se divide en fase medular, sanguínea y tisular, y aunque el eosinófilo es un elemento de la circulación periférica, diferentes estudios indican que primariamente es una célula residente en los tejidos. El tiempo de tránsito por la médula ósea es de 4.3 días en promedio. En la sangre periférica los eosinófilos tienen una vida media menor a un día (12-18 h) y migran a los tejidos por diapédesis a través de las uniones intercelulares en el endotelio, por lo que los cambios en la permeabilidad vascular pueden afectar grandemente la capacidad de los eosinófilos de infiltrar los tejidos y esto puede contribuir a la patogénesis de los síndromes clínicos. Una vez que entran a los tejidos ya no recirculan. Su permanencia en los tejidos todavía no está bien estudiada, pero parece ser de dos a cinco días, dependiendo del tejido estudiado. Los eosinófilos tienden a residir en los tejidos cuya superficie epitelial está expuesta al medio ambiente, como lo hacen también las células cebadas. El intestino es el sitio con mayor número de eosinófilos; normalmente hay pocos eosinófilos en los pulmones, útero y ninguno en la piel. Sin embargo, en los procesos patológicos se encuentran infiltrados muchos órganos, y su cinética de producción también puede estar alterada (Zucker-Frankin, 1980).

Varios estudios han demostrado que en las enfermedades concomitantes con eosinofilia, como el síndrome hipereosinofílico, parasitosis, asma, enfermedades alérgicas o neoplasias, existen dos poblaciones de eosinófilos periféricos que pueden distinguirse con base a su perfil de densidad. La densidad a la luz en los eosinófilos hipodensos tiene su pico en 1.075-1.077, mientras que el de los eosinófilos normodensos es de 1.88. En la sangre periférica de personas normales se encuentra sólo un 10% de eosinófilos hipodensos circulantes, pero en los pacientes con enfermedades

concomitantes con eosinofilia se encuentra una proporción mucho más alta de eosinófilos hipodensos circulantes, y su número correlaciona positivamente con el grado de eosinofilia (Sur et al., 1993; Holgate et al., 1993).

Se han implicado varios factores quimiotácticos en la modulación de la afluencia y acumulación de los eosinófilos en los tejidos o en los sitios de inflamación. Debido a la correlación que existe entre los eosinófilos tisulares y las reacciones de hipersensibilidad inmediata, se ha puesto atención a los factores quimiotácticos liberados de células cebadas como el factor quimiotáctico de eosinófilos y neutrófilos (ECF-A) que en estudios recientes se ha propuesto que corresponde al leucotrieno B₄ (LTB₄) (Schemi et al., 1991).

Los eosinófilos cultivados con células endoteliales muestran un aumento en su viabilidad y activación, se cree que esto se debe a la producción de factores solubles por las células endoteliales, como GM-CSF, PAF y otros no conocidos que pueden volver más adhesivos a los eosinófilos. Estos hallazgos dan lugar a la hipótesis de que la abundancia de eosinófilos durante la inflamación puede deberse a un reclutamiento no selectivo de leucocitos combinado con la liberación de factores locales por las células endoteliales que promueven la supervivencia de los eosinófilos, pero no de las otras células (Holgate et al., 1993).

1.3.b. Eosinófilos y citocinas

Estudios recientes han mostrado que los eosinófilos también son fuente de citocinas y capaces de cooperar con linfocitos y otras células. Las posibles actividades de las citocinas derivadas de eosinófilos son pleiotrópicas, e incluyen factores de crecimiento de posible regulación autócrina y otras citocinas participantes en respuestas inflamatorias agudas y crónicas (Weller,

1994). Los eosinófilos pueden sintetizar IL-3, IL-5 y GM-CSF y se ha detectado el RNAm correspondiente (Kita et al., 1991; Desreumauz et al., 1992). Otras citocinas elaboradas por eosinófilos que pueden tener actividad en las respuestas inflamatorias crónicas y agudas son IL-1, IL-6, IL-8 y TNF (Braun et al., 1993; Costa et al., 1993; Del Pozo et al., 1990; Melani et al., 1993).

1.3.c Eosinofilia uterina

El hallazgo de receptores a estrógenos en los eosinófilos y la observación de que los eosinófilos migran al útero bajo acción de los estrógenos sugiere una estrecha relación eosinófilo-estrógeno (Tchernitchin et al., 1989). Estudios subsecuentes permitieron el desarrollo de la hipótesis de que los eosinófilos median varias respuestas uterinas no genómicas inducidas por estrógenos. De acuerdo con esta hipótesis, los eosinófilos migran de la sangre hacia el útero bajo estimulación de estrógenos, se redistribuyen en el órgano, y desgranulan liberando varios agentes en el útero. Estos agentes median el edema uterino, el incremento en la permeabilidad vascular, la liberación de histamina y otras respuestas mediadas por estrógenos, independientemente de las respuestas genómicas (Tchernitchin, 1983).

Después del tratamiento con estradiol, el útero de la rata muestra infiltración de varios tipos celulares incluyendo macrófagos y otros leucocitos, aunque el incremento más dramático es en el número de eosinófilos. Zheng et al. (1988) encontraron que el influjo leucocitario en el útero de ratas inmaduras tras dos días de tratamiento con estradiol comprendió un incremento significativo de eosinófilos, linfocitos T auxiliares y macrófagos.

Existen estudios que corroboran la migración eosinofílica de la sangre hacia el útero por estimulación estrógena en la rata (Tchernitchin y Galand,

1983). En la rata inmadura, la migración de eosinófilos inducida por estrógenos hacia el útero y su retención en él se ha detectado desde cinco minutos después de la administración intravenosa de la hormona; 12 a 24 horas después del tratamiento con estradiol el útero de rata inmadura presentó tantos eosinófilos como los que se encuentran normalmente en la circulación periférica de la rata. Esta migración es dependiente de la dosis y está mediada por un mecanismo no-genómico (Tchernitchin et al., 1974; Grunert et al., 1986).

La eosinofilia uterina inducida por estrógenos también se ha confirmado en ratones y vacas (Baker et al., 1967; Matsuda et al., 1983) y en humanos (Press y King, 1986); en estos últimos se ha observado que la eosinofilia uterina se correlaciona con los niveles de estrógenos en la sangre (Press y King, 1986). Asociadas con el crecimiento uterino estimulado por estradiol en la rata, existen respuestas específicas incluyendo la síntesis de RNAm, síntesis proteica y actividad de peroxidasa. El aumento en la actividad de la peroxidasa uterina que es inducido por estradiol no proviene principalmente de las células uterinas residentes, sino de la infiltración de eosinófilos en el útero tras la estimulación de estradiol (Keeping y Lyttle, 1984; King et al., 1981; Ross y Klebanoff, 1966). El útero inmaduro o al final del embarazo de la rata tiene relativamente pocos eosinófilos. Bjersing y Borglin (1964) mostraron que en estro el útero contiene aproximadamente ocho millones de eosinófilos, mientras que en diestro solamente se reportaron 150,000. Aunque este fenómeno se ha conocido por casi 25 años, poco se ha profundizado en los mecanismos que subyacen a la infiltración eosinofílica y al papel de los eosinófilos en la función uterina.

I.4 Morfología del útero de roedores

El útero es un órgano impar de paredes gruesas que forma parte del aparato reproductor de las hembras de los mamíferos, localizado entre el oviducto y la vagina. El útero de los roedores consta de dos cuernos uterinos independientes; el cérvix fusionado externamente tiene dos canales separados o bien uno en forma de Y. Histológicamente, la pared del útero de los mamíferos está constituida de tres capas: endometrio (interna y mucosa), miometrio (media y muscular) y perimetrio (externa y serosa). El endometrio participa en la implantación del embrión y la formación de la placenta e incluye en su estructura epitelio, glándulas tubulares simples y tejido conjuntivo subyacente. El miometrio está formado de dos capas: una capa gruesa e interna de músculo liso circular en la que los haces están arreglados alrededor del eje longitudinal y cuya contracción constriñe el lumen uterino, y una capa externa donde los haces están arreglados de manera paralela al eje longitudinal y cuya contracción tiende a acortar al útero en dirección céfalo-caudal. Como tejido de sostén de las capas musculares está el tejido conectivo situado entre los haces musculares y constituido por colágena, fibroblastos, células cebadas y fibras elásticas. El perimetrio se compone de tejido conectivo laxo, recubierto de mesotelio peritoneal (Delmann y Brown, 1976; Banks, 1986) (Figura A1).

Anatómicamente el útero puede dividirse en dos regiones: la región antimesometrial que parece una estría traslúcida que corre a lo largo del cuerno uterino y conduce el estímulo eléctrico a un índice más rápido que el resto del miometrio, y la región mesometrial que se encuentra en el límite opuesto y externo del tejido y es altamente vascularizada (Melton y Saldívar, 1964, 1965; Sterin-Speziale et al., 1981). Se ha descrito que en la región mesometrial del

útero de rata existe un incremento en la respuesta de relajación inducida por agonistas β -adrenérgicos (Sterin-Speziale et al., 1981), y un incremento en la respuesta a oxitocina (Borda et al., 1978) y serotonina (Campos et al., 1995), en comparación con la región antimesometrial.

Por otro lado, existe una mayor proporción de células cebadas y eosinófilos y un mayor suplemento sanguíneo en la región mesometrial del útero y en animales tratados con estrógenos, por lo que el mesometrio uterino es una región importante en el control vascular y en la permeabilidad uterina (Gibbons y Chang, 1972). Se ha propuesto que las variaciones morfofisiológicas descritas en las regiones mesometrial y antimesometrial podrían explicarse por un incremento en el número de receptores o por un incremento en la afinidad de los receptores a los agonistas (Sterin-Speziale et al., 1981).

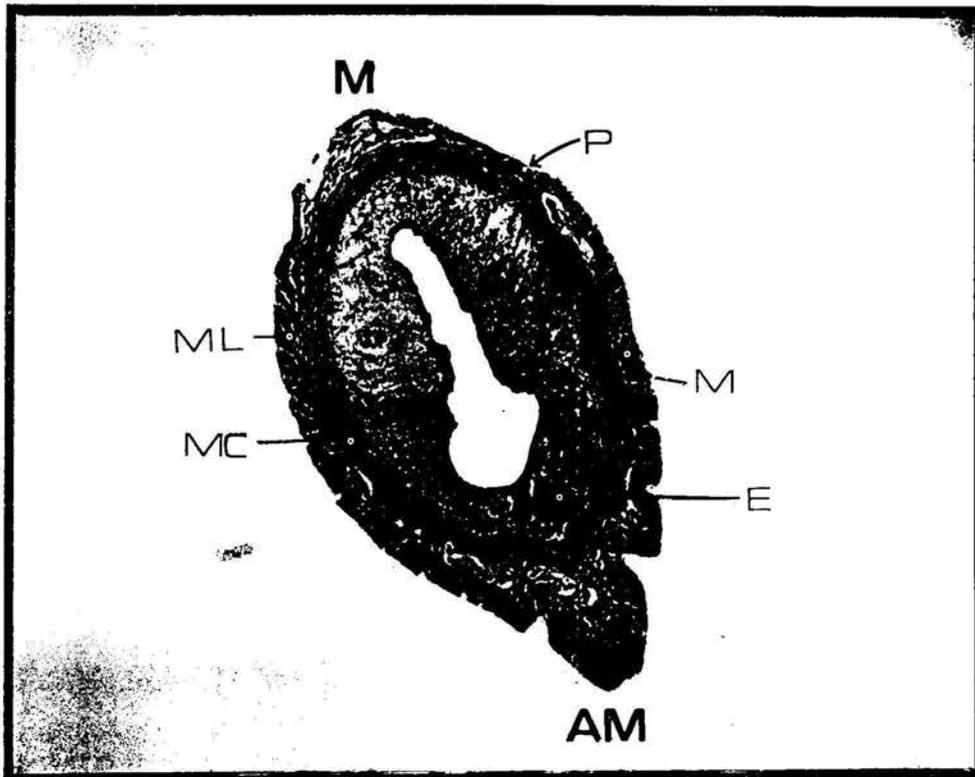


Figura A1. Corte transversal de la región media de útero de rata donde se observan la región mesometrial (M) y la región antimesometrial (AM), así como las tres capas histológicas: perimetrio o serosa (P), miometrio (M) y endometrio (E), y las subcapas miometriales: longitudinal (ML) y circular (MC).

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La variación de las poblaciones de células cebadas y eosinófilos uterinos se conoce desde hace tiempo, así como su regulación por las hormonas ováricas. Diferentes mecanismos pueden estar involucrados en el control de la infiltración leucocitaria a los tejidos, como la participación de factores quimiotácticos. Sin embargo, los mecanismos moleculares responsables de mediar la infiltración de eosinófilos uterinos y la regulación de las células cebadas se desconocen, así como el papel que estos leucocitos juegan en la fisiología uterina.

Por otro lado, actualmente se sabe de la diversidad multifuncional de las citocinas detectadas en los leucocitos, y del amplio espectro de respuestas biológicas que pueden ser influidas por dichas citocinas. Asimismo, se presume la posibilidad de que la expresión de la bioactividad de dichas citocinas esté regulada por estímulos que activan a los leucocitos.

Las citocinas IL-4 e IL-5 son de particular interés en la regulación y activación de las poblaciones de células cebadas y eosinófilos. La IL-4, que inicialmente se denominó factor de diferenciación eosinofílica, actúa en la activación y maduración de eosinófilos y es producida en las células cebadas. Por su parte, IL-5 es expresada por eosinófilos y células cebadas, y se ha reportado que es quimiotáctica y activadora de eosinófilos (Galli, 1993; Weller 1991).

En base a la información anterior, es razonable proponer que IL-4 e IL-5 estén presentes en células cebadas y eosinófilos uterinos y que se encuentren sujetas a la regulación hormonal de los leucocitos uterinos.

III. HIPOTESIS

1. Nula (H_0): IL-4 y/o IL-5 no se localizan en las células cebadas uterinas y no están reguladas por estrógenos y progesterona.

Alternativa (H_a): IL-4 y/o IL-5 se localizan en las células cebadas uterinas y están reguladas por estrógenos y progesterona.

2. Nula (H_0): IL-5 no se localiza en eosinófilos uterinos y no está regulada por estrógenos y progesterona.

Alternativa (H_A): IL-5 se localiza en eosinófilos uterinos y está regulada por estrógenos y progesterona.

IV. OBJETIVOS

1. Determinar inmunohistoquímicamente la expresión de IL-4 e IL-5 en el útero de rata adulta.

2. Si IL-4 e IL-5 están presentes, determinar la fuente celular considerando células cebadas y eosinófilos principalmente.

3. Si se cumplen los objetivos 1 y 2, determinar inmunohistoquímicamente si la expresión de IL-4 e IL-5 en el útero de rata adulta está regulada por estradiol y progesterona.

V. MÉTODOS

V.1 Animales

Se utilizaron ratas Sprague-Dawley vírgenes de 200-250 g de peso corporal, mantenidas en ciclos de luz/obscuridad de 12/12 h con libre acceso a alimento (Purina) y agua.

V.2 Ovariectomía

Se realizó ovariectomía bilateral bajo anestesia general (xilacina 20 mg/kg de peso corporal, Bayer, y ketamina 45 mg/kg de peso corporal, Sector Salud). administrada por vía intramuscular.

Previa asepsia de la región, se incidió piel y tejido celular subcutáneo sobre la región lumbar por la línea media, apoyándose sobre la columna vertebral, desde la última vértebra dorsal hasta la primera sacra. Hecho este corte, se hizo tracción de la piel incidida primero a un lado y después al contrario, de manera que fuera posible efectuar una segunda y tercera incisión de aproximadamente 0.8 a 1.2 cm, que afectaran únicamente planos musculares (músculos transverso y oblicuo del abdomen) en dirección antero-posterior y trazando una bisectriz del ángulo que forman la última costilla y la masa muscular sacro lumbar. Se expuso el ovario que se encuentra adosado al polo posterior de cada riñón por medio de tejido adiposo sobre el cual se ejerció tracción. A continuación se realizó una ligadura con seda negra 5-0 por debajo del ovario, y se cortó con tijeras finas entre la ligadura y el ovario, retirándose éste y cuidando de no tocar el útero. Se procedió a la reconstrucción de plano,

suturando con un punto en cruz con seda negra 00 el músculo, y la piel con puntos separados o en U especial.

V.3 Tratamiento hormonal

El día 15 después de la ovariectomía, se integraron 7 grupos, cada uno compuesto de 4 animales, de la manera siguiente:

- 1) Grupo de ratas ovariectomizadas, sin ningún tratamiento hormonal, con administración subcutánea de 100 μ l del vehículo de los esteroides (aceite de maíz).
- 2) Grupo de ratas ovariectomizadas, tratadas con 40 μ g de 3-benzoato de 17 β -estradiol (E_2) / kg de peso corporal vía subcutánea y sacrificadas 6 horas después.
- 3) Grupo con el mismo tratamiento de E_2 que el grupo 2, y sacrificadas 12 horas después.
- 4) Grupo con el mismo tratamiento de E_2 que el grupo 2, y sacrificadas 24 horas después.
- 5) Grupo con el mismo tratamiento de E_2 que el grupo 2, y sacrificadas 48 horas después.
- 6) Grupo de ratas ovariectomizadas, tratadas con la misma concentración de E_2 que el grupo 2 durante 44 horas, subsecuentemente tratadas con 2 mg de progesterona/kg de peso corporal, y sacrificadas 4 horas después de la administración de progesterona.

V.4 Obtención del útero

Transcurrido el tiempo del tratamiento hormonal, las ratas se sacrificaron por decapitación. Se realizó una incisión ventral en el abdomen, y se disecó el útero, el cual se colocó en una caja de Petri que contenía solución fisiológica (NaCl 0.09%) para disecar grasa y tejido conectivo. De cada uno de los cuernos uterinos, se disecaron aproximadamente 1.5 a 2 cm de longitud de la región media; estos segmentos se colocaron en papel de estaño que contenía criopreservador (CRYOform, IEC) y se almacenaron individualmente a -70°C hasta que se procesaron inmunocitoquímicamente.

V.5 Inmunocitoquímica

De las secciones de cuernos uterinos conservadas en criopreservador, se cortaron rebanadas de 10 μm de grosor, las cuales se montaron sobre laminillas con adhesivo poli-L-lisina y se mantuvieron en congelación hasta su procesamiento. Los cortes a estudiar se eligieron al azar, se fijaron con acetona (-15 °C) y se enjuagaron con agua desionizada (3 lavados de 5 min cada uno) para quitar el exceso de criopreservador.

Para realizar propiamente la inmunocitoquímica, los cortes se lavaron con PBS-T (solución salina amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 7.4 y Tritón 100 al 0.01%) durante media hora. Con esta solución se realizaron todos los lavados entre cada paso de la técnica. La peroxidasa endógena se inhibió con peróxido de hidrógeno 0.03% durante 5 min. Se realizaron 5 lavados de 5 min cada uno con PBS-T. Para reducir la tinción de fondo producida por unión

inespecífica del anticuerpo, se procedió a bloquearla incubando las secciones durante 1h con suero normal de rata (VECTOR) por 2 h, a temperatura ambiente en cámara húmeda. Posteriormente, se retiró el exceso y se incubó el anticuerpo primario (anticuerpo monoclonal de IL-4 ó IL-5 de ratón, producido en rata, Genzyme) diluido en PBS-BSA(1%) -T (0.01%) (PBS-T con albúmina de suero bovino al 1%, con esta solución se realizaron todas las diluciones) dilución 1:1000, durante 24 h en cámara húmeda a 4°C. Tras lavar con PBS-T tres veces durante 10 min cada vez, se incubó el segundo anticuerpo (anticuerpo biotinilado de inmunoglobulina G de rata, producido en conejo, VECTOR) dilución 1:200 durante 2 h. Se lavaron los cortes tres veces durante 10 min con PBS-T y se incubaron durante una hora con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (5µg/ml). Finalmente, los cortes se lavaron abundantemente con PBS-T y se reveló la reacción con el sustrato de la peroxidasa de rábano, 3'-3'-diaminobenzidina (Sigma), por 10 minutos (5mg en 10 ml de amortiguador PBS-T y 30 µl de H₂O₂ al 30%). Por último se lavó con PBS-T en tres ocasiones de 10 min cada una, y la inmunocitoquímica a IL-4 e IL-5 fue seguida por contratinción con azul de toluidina en el caso de las células cebadas o con hematoxilina de Harris en el caso de los eosinófilos. En el caso de células cebadas así como de IL-4 e IL-5 en células cebadas, se deshidrató con alcoholes graduales de 60%, 70%, 80%, 90%, etanol absoluto, xilol-etanol y xilol 1 y 2 por 5 min en cada cambio. Para eosinófilos se inició el tren con agua bidestilada por 2 min seguido de agua carbonatada por 10 min y después nuevamente con agua bidestilada por 5 min, y se continuó con los alcoholes y

xilol a las mismas concentraciones y tiempos que para células cebadas. En todos los casos se montó con resina sintética (Sigma).

Paralelamente se realizaron cortes control, los que se incubaron con el amortiguador sin anticuerpo primario. Las laminillas fueron revisadas en el microscopio de luz (OLYMPUS), determinándose la reacción positiva al anticuerpo como una coloración ámbar, la tinción con azul de toluidina se detectó en color rosa púrpura, mientras que los eosinófilos se observaron en color rojo ladrillo.

V.6 Conteo de células

La distribución numérica de las células cebadas (teñidas con azul de toluidina), de los eosinófilos (teñidos con hematoxilina de Harris), así como el número de células inmunoreactivas a IL-4 e IL-5 se evaluó en 4 campos uterinos: el mesometrial (donde se localizan los ligamentos que conforman la inserción mesometrial), el antimesometrial (opuesto al mesometrial) y dos laterales. Para el conteo se utilizó un microscopio fotónico (Olympus B071) con un aumento de 400X para las células cebadas y 1000X para eosinófilos. En cada caso se examinaron 3 cortes por animal y se fotografiaron ejemplos representativos de los diferentes tratamientos.

V.7 Análisis estadístico

Se contaron las células de cada campo de tres cortes uterinos medios de cada animal (n=4 para cada grupo). Los datos se analizaron con análisis de varianza, seguido de análisis de comparación múltiple de Bonferroni. Cuando se realizaron comparaciones entre dos grupos se usó prueba de Mann-Whitney. La asociación entre células inmunoreactivas para cada citocina con células teñidas histológicamente se estableció por medio del coeficiente de correlación de Spearman.

VI. RESULTADOS

VI.1 Regulación estrogénica de células inmunoreactivas a IL-4, IL-5 y de células cebadas

En cada corte analizado, las células que mostraron inmunoreactividad a IL-4 ó a IL-5 fueron las mismas que se tiñieron con azul de toluidina (Figuras 1, 2, 5 y 6). De tal manera que hubo una correlación positiva entre el número de células teñidas con azul de toluidina y el número de células inmunoreactivas a IL-4 y a IL-5 ($r = 0.9767$, $p < 0.0001$ y 0.9591 , $p < 0.0001$ respectivamente).

Los resultados del análisis de las células cebadas teñidas con azul de toluidina y positivas a IL-4 e IL-5 en el útero tanto de ratas ovariectomizadas como tratadas con estradiol (de 6 a 48 h) y con estradiol y progesterona (44h + 4h) se encuentran representados en la figuras 13-15. Puede observarse que el número total de células cebadas aumentó de manera directamente proporcional a la duración del tratamiento estrogénico; sin embargo, este incremento fue estadísticamente significativo solamente en los tratamientos de 24 y 48 horas en comparación con las ratas ovariectomizadas (28.32 ± 3.90 y 31.16 ± 4.00 vs. 11.32 ± 1.50 ; $p < 0.05$).

El tratamiento de estrógenos y progesterona redujo el número de células cebadas a niveles semejantes al del útero de ratas ovariectomizadas (17.66 ± 2.00 y 11.32 ± 1.50 respectivamente; $p > 0.05$).

VI.2 Distribución anatómica y regulación hormonal de las células cebadas en el útero

En las figuras 3 y 4 se muestran fotografías de cortes representativos de la inmunohistoquímica a IL-4 y la tinción con azul de toluidina en las regiones mesometrial y antimesometrial del útero de rata ovariectomizada y tratada con estrógenos durante 6 h. Fotografías semejantes para la inmunolocalización de IL-5 se muestran en las figuras 7 y 8.

El análisis de la distribución de las células cebadas en las regiones mesometrial, lateral y antimesometrial puede observarse en la figura 13 . Mientras que en la región lateral las células mantienen un número más o menos constante tanto en el útero de ratas ovariectomizadas como en el de tratamiento hormonal, hay una clara diferencia en el número de células cebadas y su regulación hormonal en las regiones mesometrial y antimesometrial

En la región mesometrial el número de células cebadas e inmunoreactivas a IL-4 ó IL-5 fue significativamente menor en ratas ovariectomizadas en comparación con el resto de los grupos ($p < 0.01$). Es decir, el restablecimiento hormonal aumentó significativamente el número de células cebadas en todos los casos (Figuras 9, 13-15).

Por el contrario, en la región antimesometrial, el número de células cebadas y positivas a IL-4 ó IL-5 no varió con el tratamiento de estradiol, aunque hubo una tendencia a aumentar que no fue estadísticamente significativa. Sin embargo, la combinación con estrógenos y progesterona

disminuyó significativamente el número de células en comparación con el resto de los grupos tratados con estradiol ($p < 0.01$) (Figuras 10, 13-15).

Al realizar comparaciones directas entre las regiones mesometrial y antimesometrial, se observa que mientras en el útero de ratas ovariectomizadas la región antimesometrial presenta un número significativamente mayor de células cebadas y positivas a IL-4 ó IL-5 en comparación con la región mesometrial (7.67 ± 0.77 vs. 1.82 ± 0.40 ; $p < 0.01$, figura 16), dicho patrón se invierte en el útero de ratas tratadas con la combinación de las dos hormonas ováricas, estrógenos y progesterona, donde es la región mesometrial la que presenta un número significativamente mayor de células (3.00 ± 0.57 vs. 10.16 ± 1.00 ; $p < 0.01$, figura 16).

Por otro lado, en la región antimesometrial, el tratamiento de la combinación estrógenos-progesterona revierte el efecto de los estrógenos solos (48 horas), disminuyendo significativamente el número de células cebadas (3.00 ± 0.57 vs. 10.75 ± 1.30 ; $p < 0.01$, figura 16).

VI.3 Regulación hormonal de células inmunoreactivas a IL-5 y de eosinófilos

En cada corte analizado, las células que se tiñeron con hematoxilina de Harris y que morfológicamente se clasificaron como eosinófilos, también mostraron inmunoreactividad a IL-5. Hubo una correlación positiva entre el número de eosinófilos y el número de células inmunoreactivas a IL-5 ($r = 0.8324$, $p < 0.01$).

Los resultados del análisis del número de eosinófilos y las células positivas a IL-5 en el útero tanto de ratas ovariectomizadas como tratadas con estradiol (de 6 a 48 h) y con estradiol y progesterona (44h + 4h) se encuentran representados en la figura 17. Puede observarse que el número total de eosinófilos encontrado en el útero de ratas ovariectomizadas es más alto que en los úteros de ratas tratadas con estradiol (123.00 ± 16.13 vs. 43.75 ± 5.98 y 42.67 ± 13.96 E₂ 6 y 12h, $p < 0.01$; vs. 81.08 ± 6.98 y 79.5 ± 2.4 E₂ 24 y 48h $p < 0.05$). El tratamiento estrogénico a partir de las 6 horas incrementó el número de eosinófilos y células positivas a IL-5 de manera dependiente de la duración del estímulo estrogénico. Finalmente, el tratamiento estrógenos-progesterona reforzó el efecto estrogénico aumentando significativamente el número de eosinófilos (128.16 ± 7.32 : $p < 0.01$ vs. E₂ 6 y 12 h; $p < 0.05$ vs. E₂ 24 y 48 h) (Figuras 11 y 12).

VI.4 Distribución anatómica y regulación hormonal de los eosinófilos en el útero

El análisis de la distribución de los eosinófilos en las regiones mesometrial, lateral y antimesometrial puede observarse en la figura 17. El patrón numérico tiene la misma distribución que el descrito para el número total de células, es decir un alto número de células en el útero de ratas ovariectomizadas ($p < 0.01$), y un aumento progresivo del número de las mismas por efecto del estradiol, que alcanza significado estadístico con el tratamiento combinado de estradiol-progesterona ($p < 0.05$ y $p < 0.01$) al compararlo con los diferentes tiempos de exposición a estradiol. De acuerdo con estos resultados, la distribución de los eosinófilos en el útero no presenta variación regional.

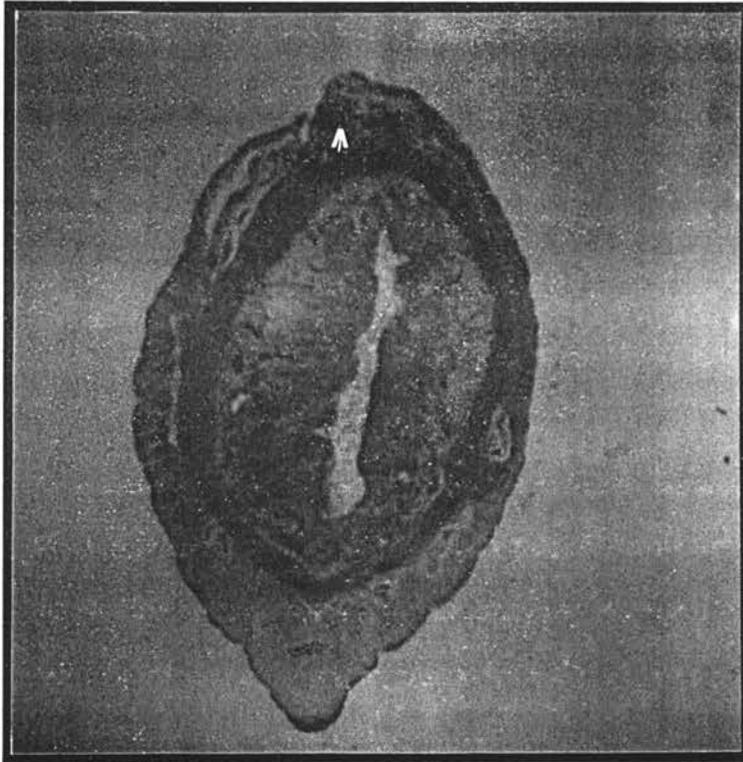


Figura 1. Panorámica de un corte transversal de útero de rata ovariectomizada y tratada con estrógenos durante 6 h. Se observan células cebadas inmunoreactivas al anticuerpo de IL-4 y contrateñidas con azul de toluidina (40x)



Figura 2. Acercamiento de la región antimesometrial de la figura 1 que muestra la localización inmunohistoquímica de IL-4 que coincide con la tinción posterior de células cebadas con azul de toluidina (1000 x).

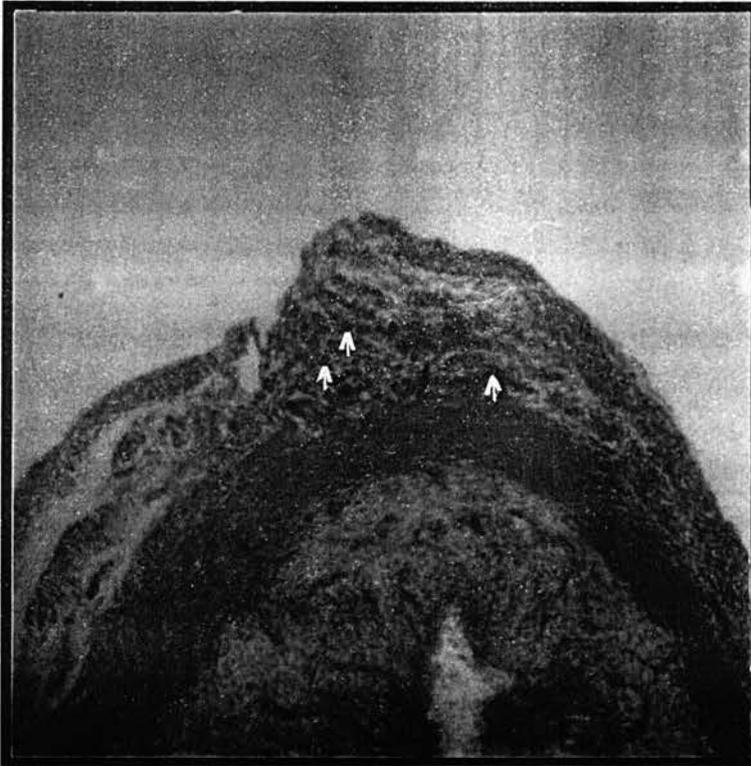


Figura 3. Células cebadas inmunoreactivas al anticuerpo de IL-4 y contrateñidas con azul de toluidina, localizadas en la región *mesometrial* de útero de rata ovariectomizada y tratada con estrógenos durante 6h (100x).



Figura 4. Células cebadas inmunoreactivas al anticuerpo de IL-4 y contrateñidas con azul de toluidina, localizadas en la región *antimesometrial* uterina de rata ovariectomizada y tratada con estrógenos durante 6h (100x).



Figura 5. Panorámica de un corte transversal de útero de rata ovariectomizada y tratada con estrógenos durante 6 h. Se observan células cebadas inmunoreactivas al anticuerpo de IL-5 y contrateñidas con azul de toluidina (40x)



Figura 6. Acercamiento de la región mesometrial de la figura 5 que muestra la localización inmunohistoquímica de IL-5 que coincide con la tinción posterior de células cebadas con azul de toluidina (1000 x).

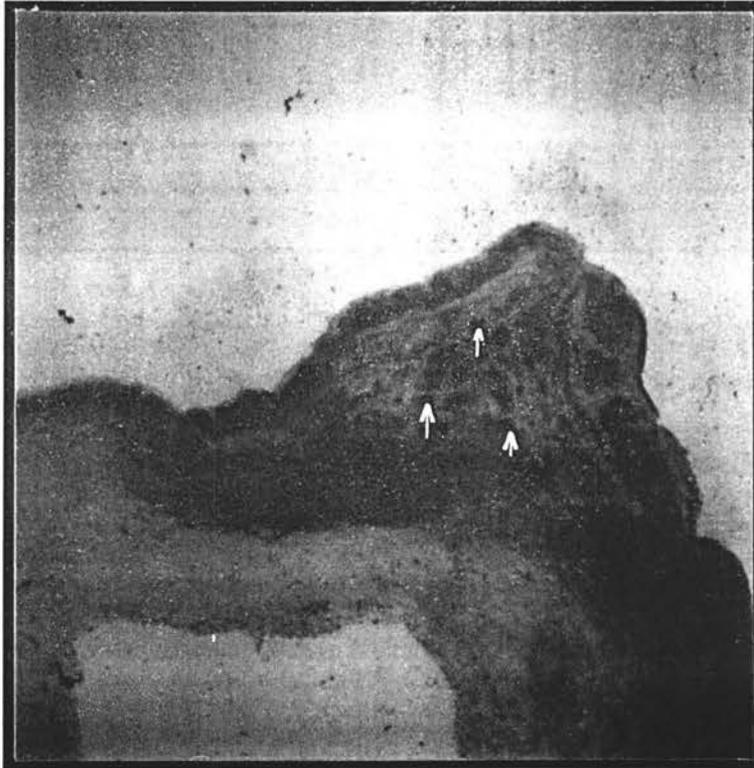


Figura 7. Células cebadas inmunoreactivas al anticuerpo de IL-5 y contrateñidas con azul de toluidina, localizadas en la región *mesometrial* de útero de rata ovariectomizada y tratada con estrógenos durante 6h (100x).

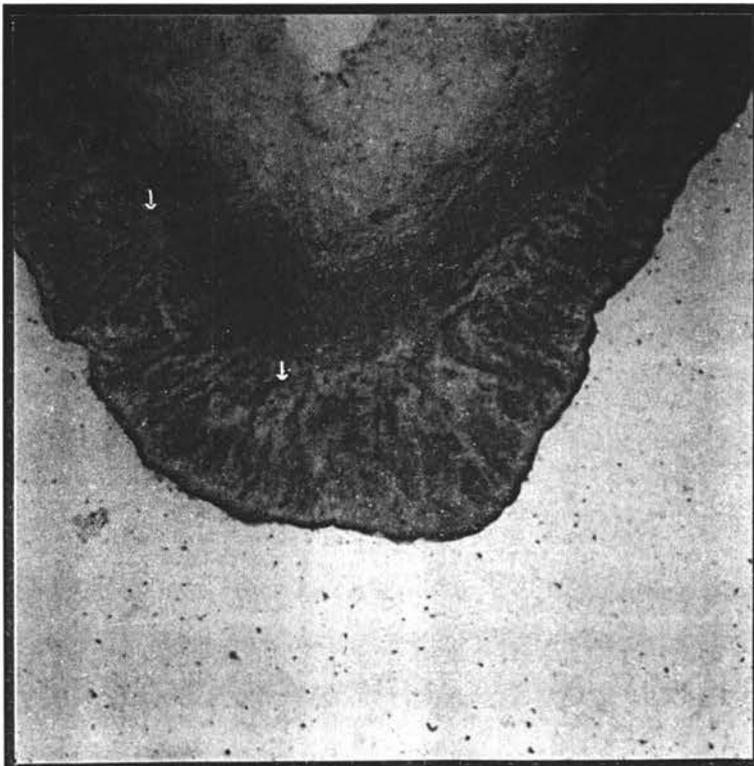


Figura 8. Células cebadas inmunoreactivas al anticuerpo de IL-5 y contrateñidas con azul de toluidina, localizadas en la región *antimesometrial* uterina de rata ovariectomizada y tratada con estrógenos durante 6h (100x).

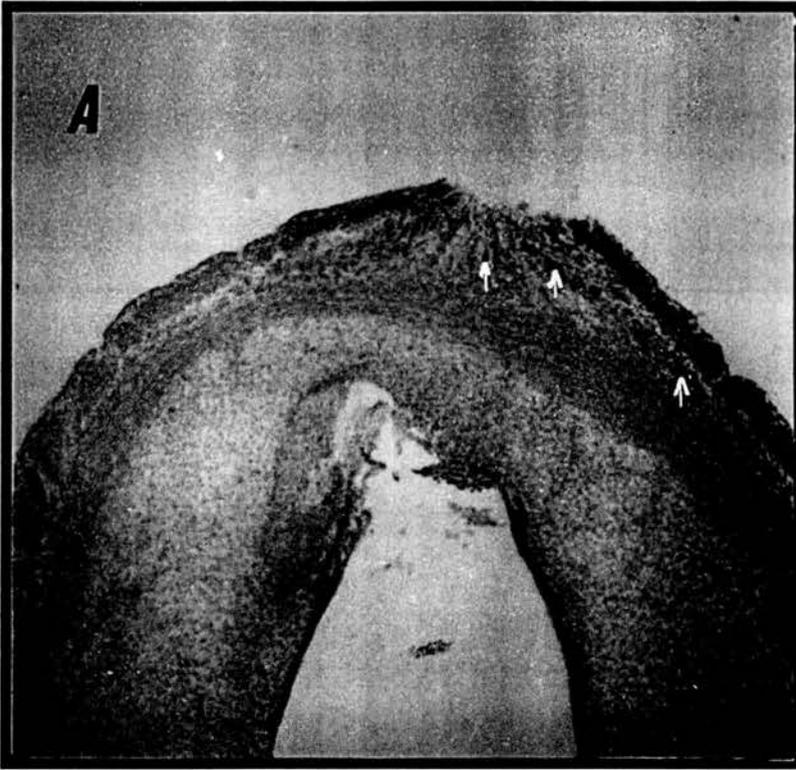


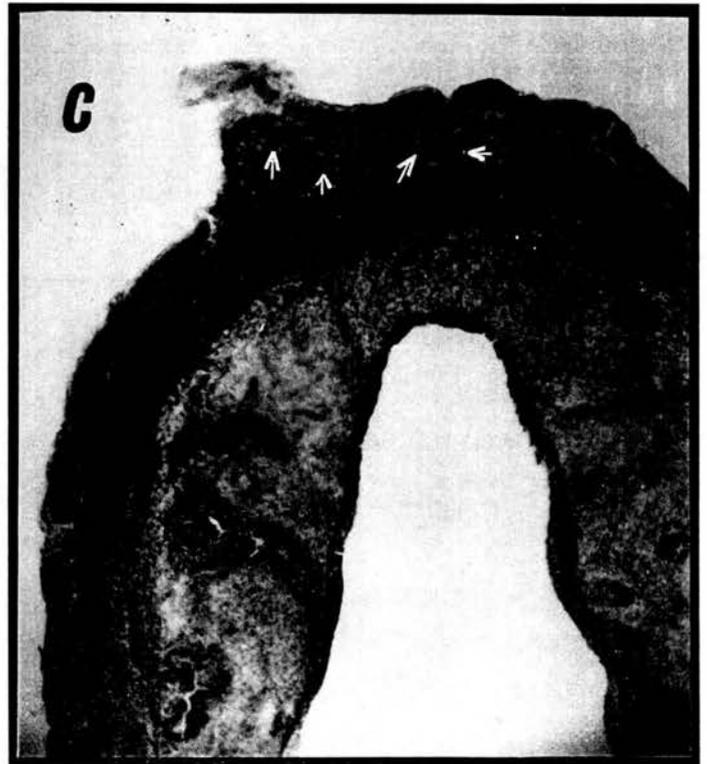
Figura 9. Células cebadas de la región *mesometrial* de útero de rata:

A: ovariectomizada (100 x),

B: tratada con estradiol durante 48 h (10 x) y

C: tratada con estradiol durante 44 h más progesterona durante 4h (10 x).

Nótese el aumento significativo en el número de células cebadas tras el tratamiento hormonal.



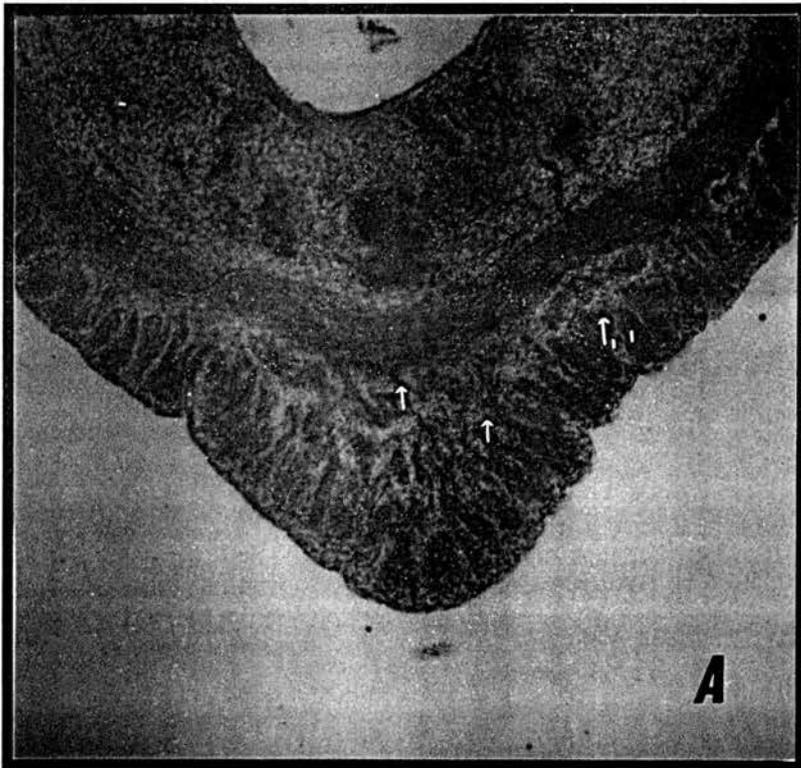


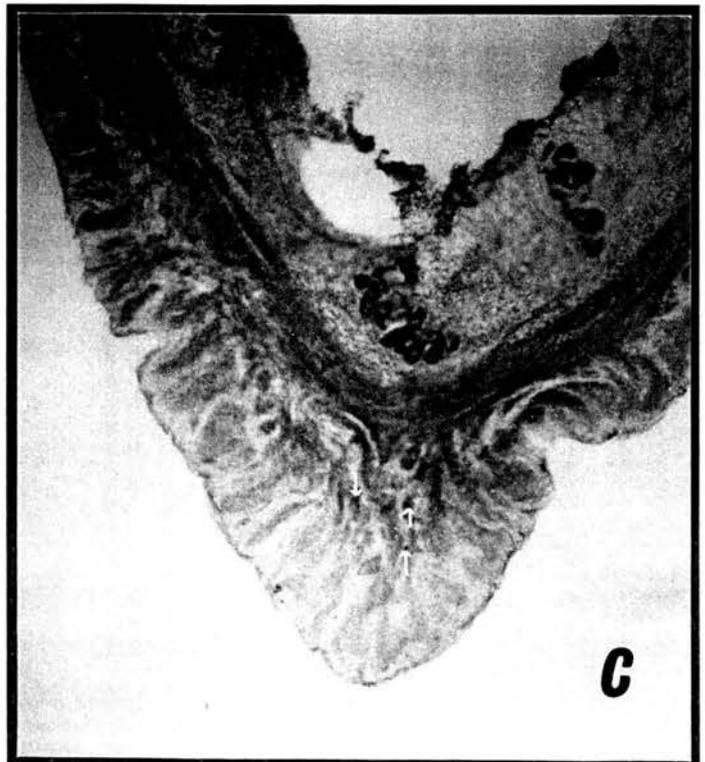
Figura 10. Células cebadas de la región *antimesometrial* de útero de rata:

A: ovariectomizada (100 x),

B: tratada con estradiol durante 48 h (10 x) y

C: tratada con estradiol durante 44 h más progesterona durante 4h (10 x).

Nótese la disminución significativa en el número de células cebadas tras el tratamiento hormonal de estradiol más progesterona.



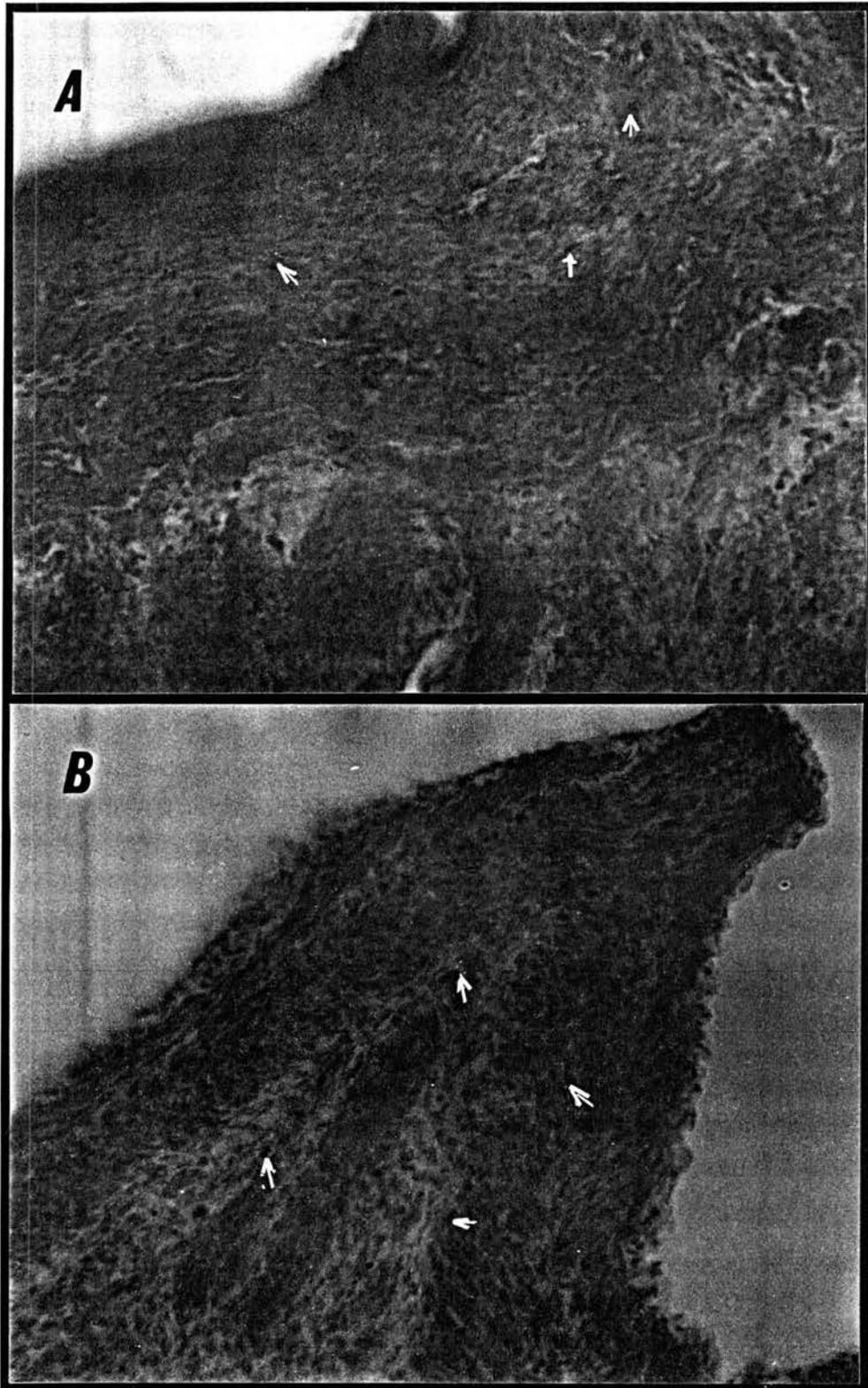


Figura 11. Localización inmunohistoquímica de IL-5 que coincide con la tinción de eosinófilos con hematoxilina de Harris.

A: Región mesometrial de útero de rata ovariectomizada (400 x).

B: Región mesometrial de útero de rata tratada con estradiol 44 h más progesterona 4h (400 x).

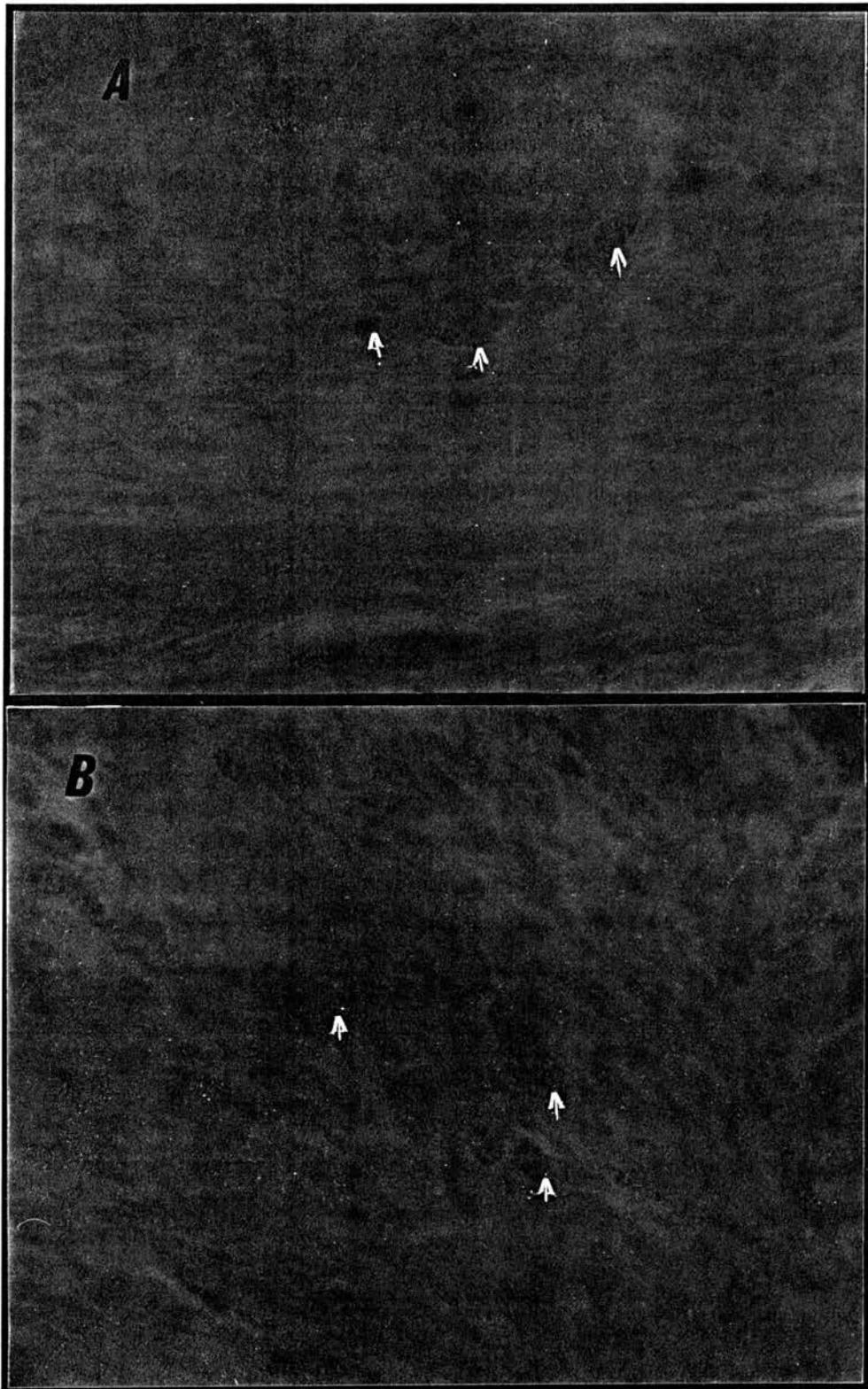


Figura 12. Localización inmunohistoquímica de IL-5 que coincide con la tinción de eosinófilos con hematoxilina de Harris.

A: Región mesometrial de útero de rata ovariectomizada (1000 x).

B: Región mesometrial de útero de rata tratada con estradiol 44 h más progesterona 4h (1000 x).

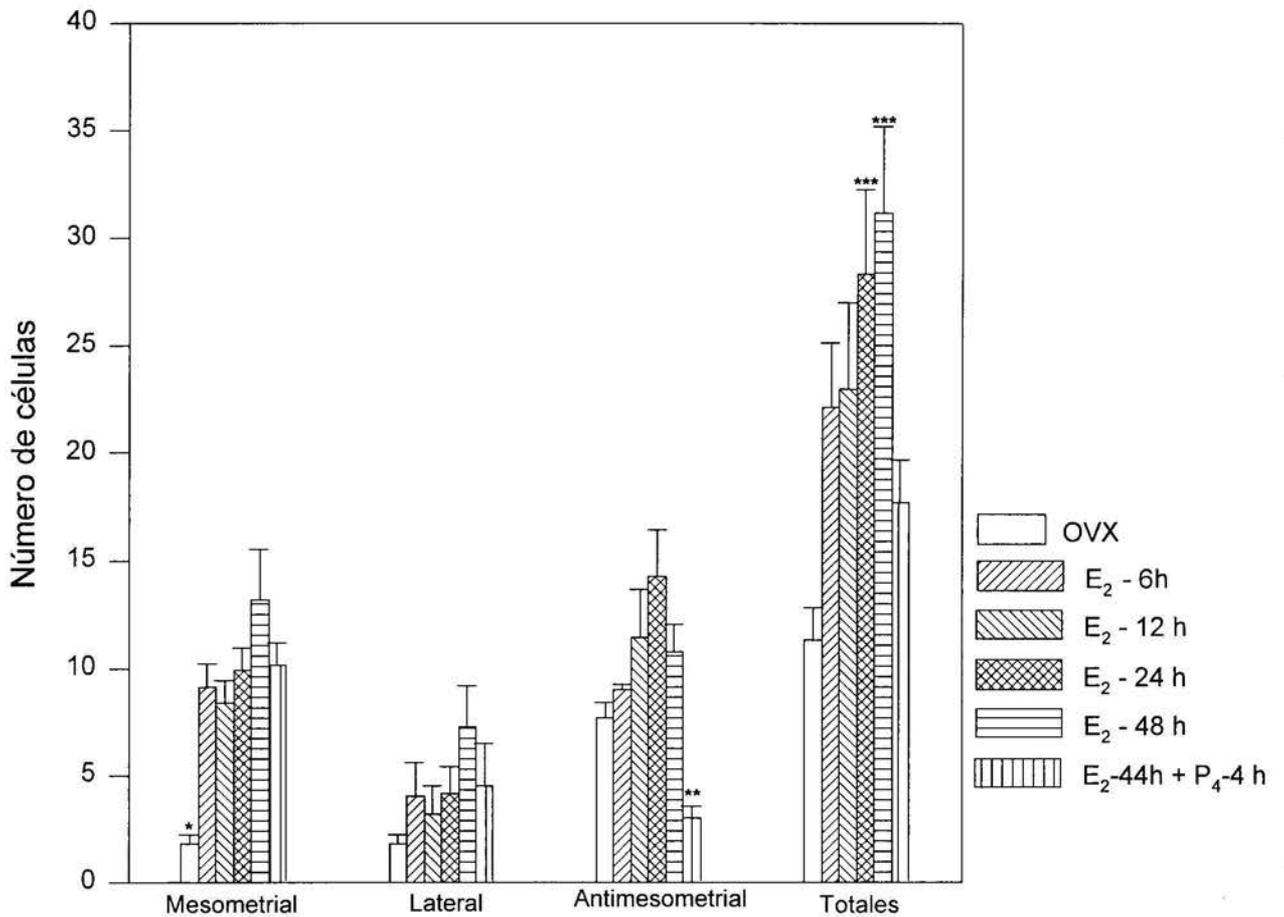


Figura 13. Número de células cebadas que coincidieron con la localización inmunohistoquímica de IL-4 y de IL-5 de la región media del útero de ratas ovariectomizadas (OVX) y ovariectomizadas con tratamiento hormonal E₂=estradiol; P₄=progesterona).

* = $p < 0.01$ OVX vs. el resto.

** = $p < 0.01$ E₂ + P₄ vs. todos excepto OVX.

*** = $p < 0.05$ vs. OVX.

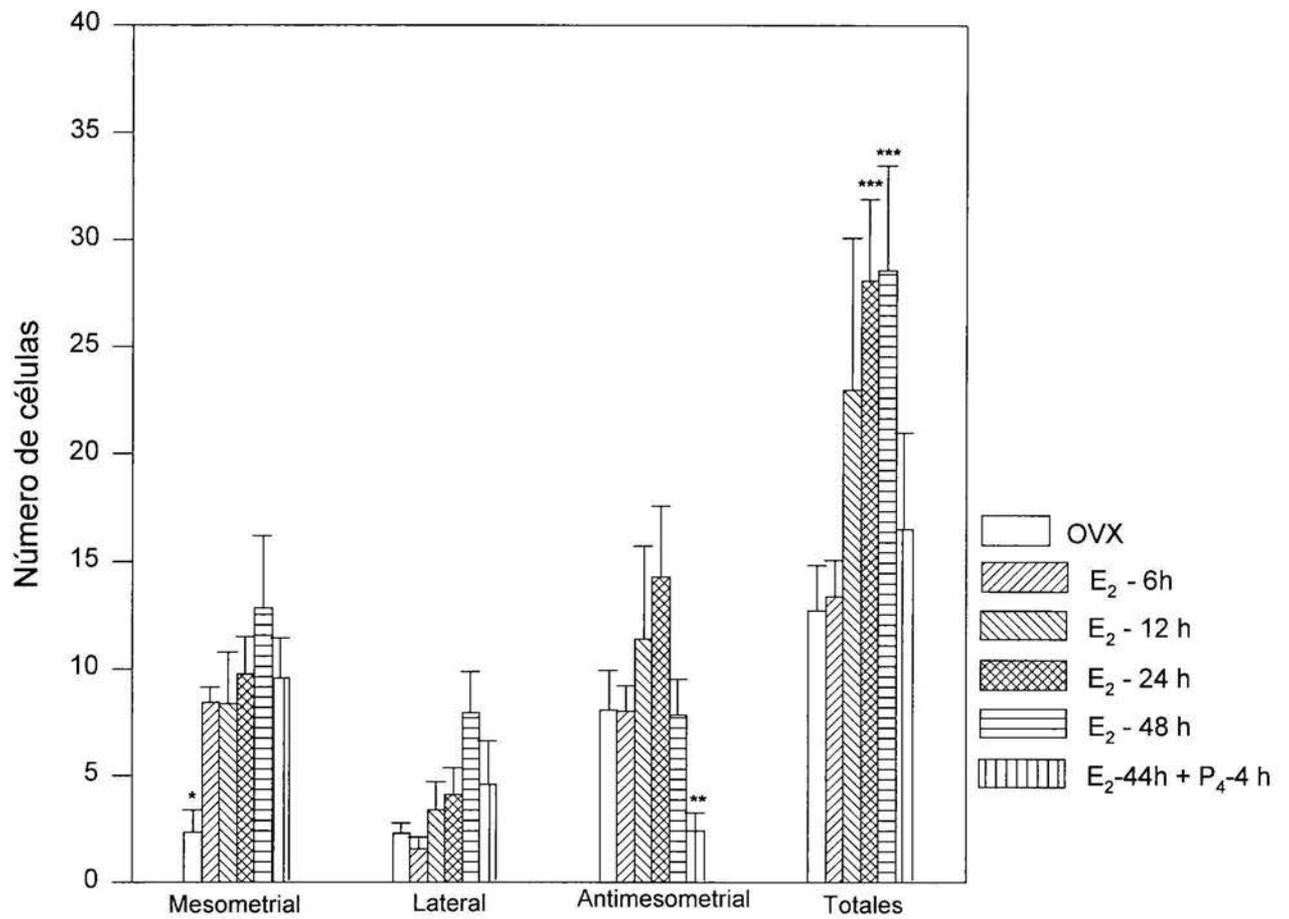


Figura 14. Número de células cebadas positivas a IL-4 en la región media del útero de ratas ovariectomizadas (OVX) y ovariectomizadas tratadas con estradiol (E₂) y progesterona (P₄).

* = $p < 0.01$ OVX vs. E₂ 24 y 48 h.

** = $p < 0.05$ E₂ + P₄ vs. E₂ 12 y 24 h.

*** = $p < 0.05$ vs. OVX.

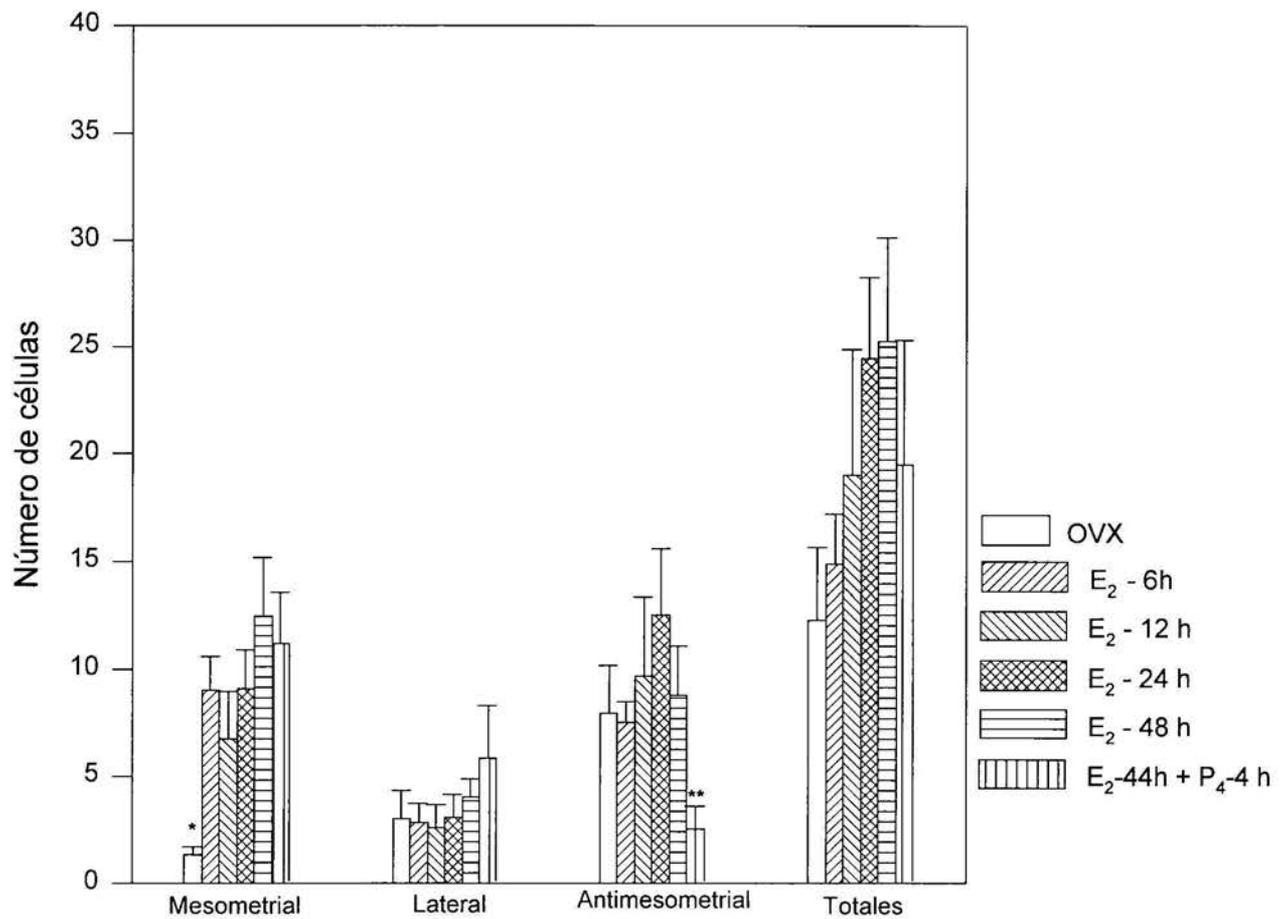


Figura 15. Número de células cebadas positivas a IL-5 de la región media del útero de ratas ovariectomizadas (OVX) y ovariectomizadas tratadas con estradiol (E₂) y progesterona (P₄).

* = $p < 0.01$ OVX vs. E₂ 6, 24, 48 h y E₂+P₄.

** = $p < 0.01$ E₂ + P₄ vs. E₂ 12, 24 y 48 h.

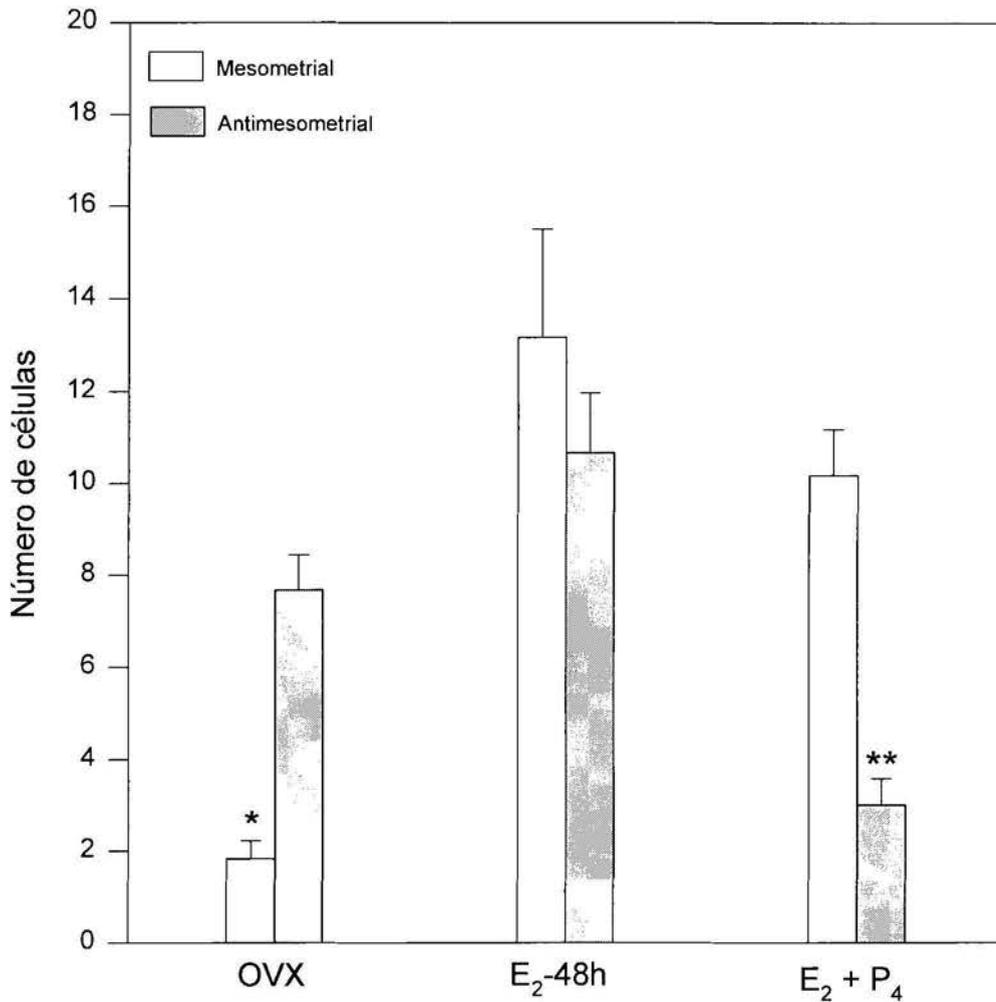


Figura 16. Efecto del tratamiento de estradiol más progesterona en el número de células cebadas e inmunoreactivas a IL-4 e IL-5. Nótese que el tratamiento de ambos esteroides invierte el patrón del número de células en las regiones mesometrial y antimesometrial del útero de ratas ovariectomizadas, y que la progesterona revierte el efecto del estradiol a las 48 h en la región antimesometrial.

* = $p < 0.01$ OVX mesometrial vs. OVX antimesometrial.

** = $p < 0.01$ E₂ + P₄ antimesometrial vs. E₂ + P₄ mesometrial y vs. E₂ 48 h antimesometrial

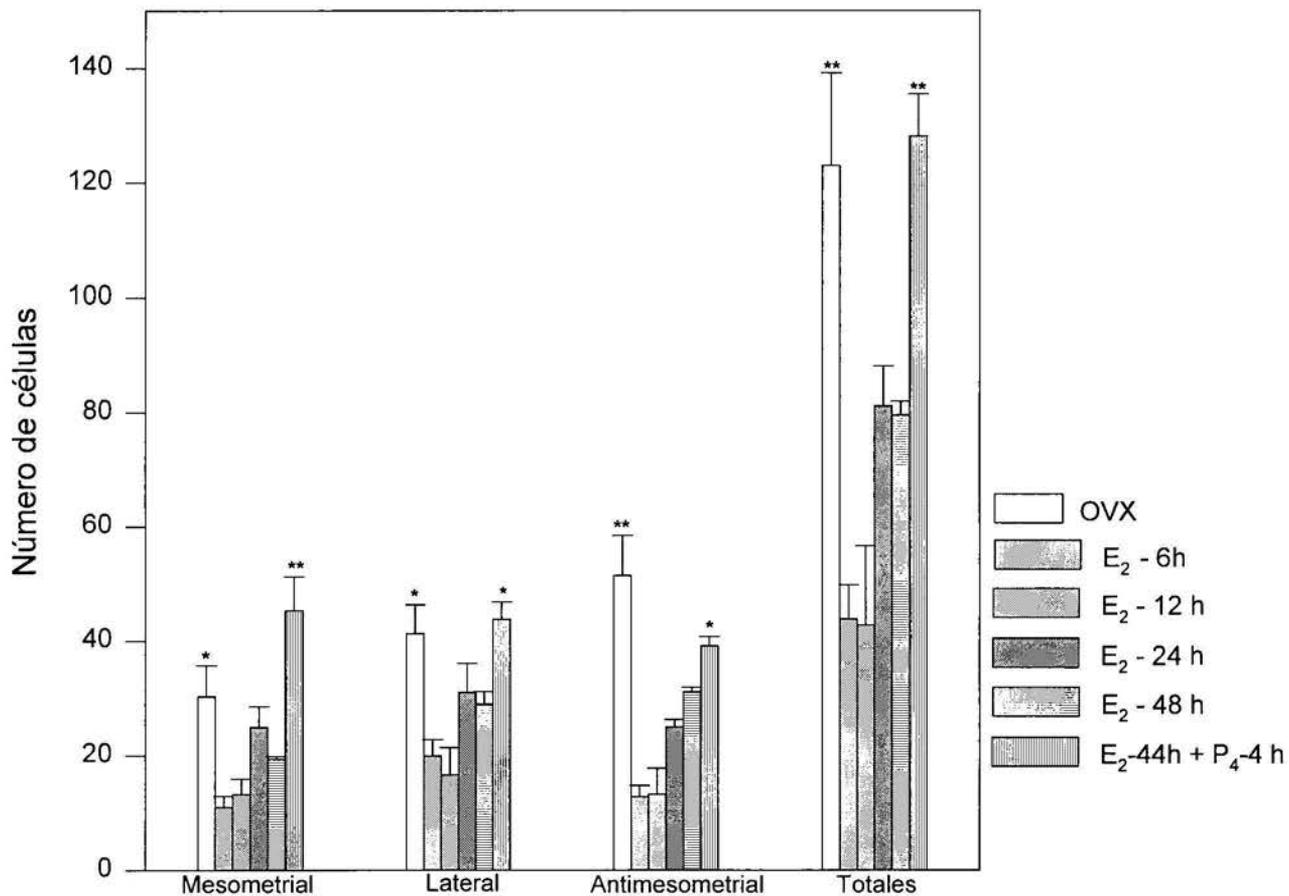


Figura 17. Número de eosinófilos que coincidieron con la localización inmunohistoquímica de IL-5 en el útero de ratas ovariectomizadas (OVX) y ovariectomizadas con tratamiento hormonal (E₂ = estradiol; P₄ = progesterona).

* = p < 0.01 vs. E₂-6 y 12h.

** = p < 0.01 vs. E₂- 6, 12; p < 0.05 vs E₂- 24 y 48 h.

VII. DISCUSION

VII.1 Regulación estrogénica de células inmunoreactivas a IL-4, IL-5 y de células cebadas

Los resultados de este estudio muestran que las células cebadas uterinas en la rata, así como las proteínas IL-4 ó IL-5 son reguladas por estrógenos y progesterona. Estudios recientes en células cebadas en otros sistemas muestran que efectivamente dichas células son fuente de IL-4 e IL-5 (Bradding et al., 1994).

Aunque la regulación de las hormonas ováricas del número de células cebadas se conoce desde hace tiempo, el efecto de la administración de estrógenos parece depender de la dosis y duración del tratamiento así como de la especie. A diferencia de otros estudios donde se reporta que el tratamiento con estradiol disminuye el número de células cebadas observadas en el útero de ratas ovariectomizadas, en el presente estudio se ha encontrado un incremento del número de las mismas dependiente de las horas de tratamiento estrogénico, alcanzando significancia tras 24 y 48 horas de la aplicación subcutánea de una dosis única (40 µg/kg de peso corporal) de benzoato de estradiol (Figuras13-15). Por un lado, el estudio de Maraspin y Bo (1971) se realizó 72 horas después de la aplicación de 2 µg de dipropionato de estradiol durante 3 días consecutivos, mientras que LeVier y Spaziani (1966) reportan aplicación intravenosa de 0.5 µg/100 g de peso corporal de 17β-estradiol preparado en solución salina 24 horas antes de extraer el útero. Estas diferencias en tratamiento así como en la técnica de tinción de las células pueden explicar el contraste de resultados. McKercher et al. (1973), en cambio,

no encontraron variación en el número total de células cebadas tras 4 y 24 horas de tratamiento, y señalan textualmente que "para estimaciones confiables de número de células cebadas es necesario buscar las secciones cruzadas que tengan la máxima concentración de las mismas; no tomar este fenómeno en cuenta puede llevar a datos erróneos".

El hallazgo de este estudio es que las células cebadas uterinas hayan sido positivas a IL-4 ó IL-5 y que estas citocinas también hayan estado reguladas hormonalmente, ya que se sabe que la ovariectomía elimina la producción intrauterina de citocinas y, desde luego, la fuente cíclica de estrógenos y progesterona (De et al., 1992).

IL-4 juega un papel central en la regulación de la síntesis de IgE (Del Prete et al., 1988), regula positivamente la molécula 1 de adhesión a las células vasculares involucrada en reclutamiento de células T y eosinófilos (Masinovsky et al., 1990; Schleimer et al., 1992); junto con IL-3 promueve el crecimiento de eosinófilos (Favre et al., 1990), pero aun más importante es que la regulación positiva de IL-4 se traduce en eosinofilia tisular (Tepper et al., 1990). Por su parte, IL-5 es factor de crecimiento y diferenciación (Clutterbuck et al., 1988), así como activador y quimiotáctico para eosinófilos (López et al., 1988; Wang et al., 1989), y en consecuencia se le considera una citocina clave en las respuestas eosinofílicas.

La función de las células cebadas uterinas se ha estudiado principalmente en cuanto a su capacidad de liberar histamina y serotonina, por

lo que se cree que pudieran estar involucradas en los mecanismos de control de la contractilidad miometrial durante el parto (Rudolph et al., 1993).

VII.2 Efecto inhibitorio de la progesterona sobre el incremento de células inmunoreactivas a IL-4, IL-5 y de células cebadas inducido por estradiol

Otro de los resultados de este estudio en cuanto a células cebadas se refiere es la inhibición del efecto del estradiol al administrar progesterona simultáneamente con el estrógeno. Es decir, el número total de células cebadas que fue máximo con el tratamiento de estrógenos durante 48 horas, bajó a niveles semejantes a los del útero de ratas ovariectomizadas cuando se administró el tratamiento estradiol 44 horas más progesterona 4 horas. De la misma manera, la evaluación de la inmunoreactividad de células cebadas tras la ovariectomía y la sustitución hormonal reveló modulación hormonal IL-4 e IL-5 uterinas, repitiendo el patrón de incremento por efecto de los estrógenos y reversión por el tratamiento estrógenos-progesterona (Gráfica 2).

Se sabe que la progesterona inhibe muchos fenómenos inducidos por estrógenos, como síntesis proteica (Wheeler et al., 1987) y actividad enzimática (Swanson y Barker, 1983). Un posible mecanismo por el que la interacción de estrógenos y progesterona puede explicarse es la modulación de concentración de receptores. La concentración de receptores a progesterona es incrementada por estrógenos en el útero (Leavitt et al., 1977), mientras que la concentración de receptores a estrógenos es disminuida por la administración de progesterona (Okulicz et al., 1981). El trabajo de Wheeler et al. (1987) resulta particularmente interesante, pues el tratamiento *in vivo* con 1 µg de estradiol a ratas inmaduras incrementó la síntesis de dos proteínas cuyo peso molecular

era 65 y 115 kDa, en el medio de incubación del útero. Este incremento fue inhibido por 250 y 500 µg de progesterona cuando se administró en un lapso no mayor de 8 horas después de la administración de estradiol. La progesterona sola no tuvo dicho efecto. Un efecto semejante podría explicar la regulación hormonal dual de IL-4 e IL-5 observada en este estudio.

Se ha reportado que el tratamiento de células cebadas peritoneales de rata *in vitro* con progesterona da lugar a la liberación de serotonina sin la liberación de histamina y sin desgranulación celular (Vliagoftis et al., 1990). Asimismo, el estradiol aumenta la secreción de histamina y serotonina de las mismas células (Vliagoftis et al., 1992). Por lo tanto, los esteroides pueden modular la secreción de moléculas específicas de las células cebadas. Sin embargo, se desconoce si los esteroides regulan la síntesis, almacenamiento y/o secreción de citocinas, y nuestro hallazgo se concreta a la localización celular y regulación hormonal de IL-4 e IL-5.

VII.3 Variación regional de las células cebadas uterinas

La variación del número de células cebadas y positivas a IL-4 ó IL-5 de acuerdo con la región anatómica y en combinación con el tratamiento hormonal resultó particularmente interesante pues ambos factores, el anatómico y el hormonal, regularon de manera inversa (Figura 16). La región antimesometrial presentó un número de células significativamente mayor en el útero de ratas ovariectomizadas y significativamente menor en las tratadas con estradiol-progesterona, en comparación con la región mesometrial. Existen varios estudios que establecen que las regiones mesometrial y antimesometrial del miometrio son fisiológicamente diferentes. La región mesometrial es más

vascularizada que la antimesometrial y tiene una mayor concentración de receptores adrenérgicos- β (Sterin-Speziale et al., 1981). En cambio la región antimesometrial conduce los estímulos eléctricos con mayor velocidad que el resto del miometrio (Melton y Saldívar, 1965).

Considerando el posible papel fisiológico de las células cebadas uterinas, no es sorprendente la variación regional observada. El hecho de que la región antimesometrial sea donde se lleve a cabo la implantación, coincide con un bajo número de células cebadas cuando los niveles de progesterona son altos, y tal vez esto se relacione con la nidación del blastocisto (Sterin-Speziale et al., 1981).

VII.4 Regulación hormonal de eosinófilos e IL-5

En la rata, los leucocitos eosinófilos migran del torrente sanguíneo al útero y se acumulan bajo el efecto de la estimulación estrogénica (Tchernitchin et al., 1989). La eosinofilia uterina inducida por estrógenos también se ha observado en otras especies incluyendo al hombre (Baker et al., 1967; Matsuda et al., 1983; Press y King, 1986). Los numerosos trabajos del grupo de Tchernitchin (1989) han establecido este fenómeno así como la presencia de receptores a estrógenos en los eosinófilos. Aunque en el modelo de rata inmadura u ovariectomizada se reporta un número bajo de eosinófilos que se incrementa proporcionalmente al tiempo del tratamiento estrogénico (Tchernitchin et al., 1974), en este estudio encontramos un número inusualmente alto de eosinófilos en el útero de ratas ovariectomizadas, tanto en el conteo total como en las tres regiones analizadas (Figura 17).

Por otro lado, el tratamiento estrogénico de 6 a 48 horas incrementó el número de eosinófilos y células positivas a IL-5 de manera dependiente de la duración del tratamiento, y se alcanza la máxima presencia de eosinófilos con el tratamiento combinado de estradiol-progesterona. A diferencia de la

regulación de las células cebadas, la progesterona regula positivamente la población de eosinófilos uterinos como se ha reportado previamente (Grunert y Tchernitchin, 1982).

La observación de que los eosinófilos migran directamente al útero en animales tratados con estrógenos, infiltración que es promovida por un factor quimiotáctico eosinofílico uterino que también es regulado por estrógenos, sugiere la participación de los eosinófilos en la fisiología reproductiva normal de la rata. Ya que al momento de la ovulación, los eosinófilos desgranulan y liberan al estroma uterino numerosos mediadores incluyendo enzimas y prostaglandinas, podrían participar en la preparación del endometrio para la implantación con remodelado enzimático (Howe et al., 1990). El LTC₄ y el factor activador de las plaquetas son otros mediadores eosinofílicos que contraen el músculo liso, alteran la permeabilidad vascular y promueven la infiltración eosinofílica (Weller, 1991).

La regulación hormonal de la IL-5 eosinofílica, aunque no es sorprendente, es importante pues la IL-5 incrementa la sobrevivencia de eosinófilos maduros y estimula las funciones eosinofílicas en ratones y humanos (Weller, 1994).

VII.5 Interacción célula cebada - eosinófilo

La potencial participación de las citocinas en las respuestas asociadas con activación de células cebadas y con la infiltración y activación de eosinófilos, así como la regulación hormonal descrita en este y otros estudios, da lugar a una hipótesis de interacción célula cebada - eosinófilo regulada autócrina y parácrinamente por una cascada de citocinas tanto producidas por ellas mismas como por otras células uterinas, cuya producción es otro parámetro de la fisiología uterina regulado por estrógenos y progesterona.

Las células cebadas ya no deben ser vistas solamente como iniciadoras de reacciones alérgicas agudas al liberar mediadores como histamina y leucotrienos. Aunque existen interacciones importantes como el que la histamina y la prostaglandina D₂ de las células cebadas activan eosinófilos humanos (Raible et al., 1992), las células cebadas tienen además la capacidad de orquestar la infiltración de leucocitos a los tejidos donde se encuentren activadas, función que es, al menos parcialmente, dependiente de citocinas. La activación de la célula cebada podría dar lugar a una cascada de citocinas que contribuiría al influjo de eosinófilos, que a su vez liberarían citocinas que participarían en un determinado fenómeno fisiológico, formando así parte de la red de citocinas que comunica a las células uterinas que participan en los procesos reproductivos.

Por su parte, los eosinófilos tienen mediadores como la proteína básica principal que son capaces de inducir la liberación de histamina de células cebadas (Zheutlin et al., 1984). Las funciones efectoras de los eosinófilos pueden ser estimuladas por citocinas liberadas por otras células. La IL-3 y la IL-5, ambas liberadas por células cebadas, no sólo promueven la formación de eosinófilos en la médula ósea sino que aumentan las actividades efectoras de los eosinófilos maduros (Weller 1994).

En resumen, este estudio provee evidencia de la presencia de IL-4 e IL-5 en células cebadas y de IL-5 en eosinófilos, y su regulación por las hormonas ováricas. La apreciación de que las citocinas puedan ser responsables de muchas de las consecuencias biológicas de la activación de células cebadas y eosinófilos, aunada al enfoque endócrino ampliamente conocido, podría explicar más profundamente el papel de estas células en el útero y su función en los procesos reproductivos.

VII.6 Conclusiones

En cuanto a la regulación hormonal de células cebadas, se concluye:

1. Se observó una correlación positiva entre el número de células cebadas y el número de células inmunoreactivas a IL-4 e IL-5.
2. El tratamiento con estradiol durante 24 y 48 horas incrementó el número de células cebadas de útero de ratas ovariectomizadas significativamente
3. La progesterona revirtió el efecto del estradiol disminuyendo de manera significativa el número de células cebadas.
4. Tanto las células cebadas uterinas, que probablemente producen IL-4 e IL-5, así como la expresión de las citocinas mismas, son reguladas por las hormonas ováricas.

En cuanto a la variación anatómica de células cebadas, se concluye:

1. La región mesometrial del útero de ratas tratadas con estradiol-progesterona presenta un número significativamente mayor de células cebadas y células positivas a IL-4 e IL-5 que la región antimesometrial.
2. El tratamiento con estradiol-progesterona disminuyó significativamente el número de células cebadas y células inmunoreactivas a IL-4 e IL-5 en comparación con el grupo de ratas tratadas con estradiol durante 48 horas solamente en la región antimesometrial, aunque existe la misma tendencia en la región mesometrial.

En cuanto a la regulación hormonal de eosinófilos, se concluye:

1. Se observó una correlación positiva entre el número de eosinófilos y el número de células inmunoreactivas a IL-5.
2. Se encontró un número muy alto de eosinófilos en el útero de ratas ovariectomizadas.
3. El estradiol incrementó el número de eosinófilos de manera directamente proporcional al tiempo de tratamiento.
4. Se alcanza la máxima presencia de eosinófilos con el tratamiento combinado de estradiol-progesterona.
5. Los eosinófilos y la IL-5 que probablemente producen son regulados por estrógenos y progesterona.

En cuanto a la variación anatómica de eosinófilos, se concluye:

1. No se observó diferencia regional en la distribución de eosinófilos entre las regiones mesometrial, lateral y antimesometrial del útero de rata.

VIII. REFERENCIAS

1. Abbas A, Lichtman AH, Pober JS. Cytokines. En: Cellular and Molecular Immunology. 2a ed. A Abbas, AH Lichtman y JS Pober (Eds.) W. B. Saunders Company, E.U.A., 1994, pp. 239-240.
2. Baker AP, Bergman F, Paul KG. Studies of eosinophil granulocytes. III Steroid hormones and number of eosinophil in the uterus of the mouse and rat. *Acta Endocrinol* 1967, 54:696-706.
3. Banks WJ. *Histología veterinaria aplicada. Manual Moderno.* México 1986, pp. 730.
4. Bienenstock J, Tomioka M, Matsuda H, Stead RH, Quinonez G, Simon GT, Coughlin MD, Denburg JA. The role of mast cells in inflammatory processes: Evidence for nerve/mast cell interactions. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1987, 82:238-243.
5. Bjersing L, Borglin NE. Effect of hormones on incidence of uterine eosinophilia in rats. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand* 1964, 60:27-35.
6. Borda E, Sterin-Barda L, Sterin-Speziale N, Gimeno MF, Gimeno AL. Functional, pharmacological and morphological characteristics of two regions of rat uterine horns. *Acta Physiol Latinoam* 1978, 28:223-233.
7. Bradding P, Feather IH, Howarth PH, Mueller R, Roberts JA, Britten K, Bews J, Hunt TC, Okayama Y, Heusser C, Bullock G, Church MK, Holgate ST. Interleukin 4 is localized to and released by human mast cells. *J Exp Med* 1992, 176:1381-1386.
8. Bradding P, Roberts JA, Britten KM, Montefort S, Djukanovic R, Mueller R, Heusser CH, Howarth PH, Holgate ST. Interleukin-4, -5, and -6 and tumor necrosis factor- α in normal and asthmatic airways: Evidence for the human mast cell as a source of these cytokines. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994, 10:471-480.
9. Braun RK, Franchini M, Erard F, Rihs S, De Uries UM, Blaser K, Hansel TT, Wilker C. Human peripheral blood eosinophils produce and release interleukin-8 on stimulation with calcium ionophore. *Eur J Immunol* 1993, 23:956-960.
10. Campos MG, Oropeza MV, Perusquía M, Quiroz SC, Ponce-Monter H. Different sensitivity to serotonin of mesometrial and antimesometrial region of isolated rat uterus. *Med Sci Res* 1995, 23:323-324.
11. Clutterbuck EJ, Hirst EMA, Sanderson CJ. Human interleukin 5 (IL-5) regulates the production of eosinophils in human bone marrow cultures: Comparison and interaction with IL-1, IL-3, IL-6, and GM-CSF. *Blood* 1989, 73:1504-1513.

12. Costa JJ, Matossian K, Bell WJ, Wong DTW, Gordon JR, Dvorak AM, Weller PF, Galli SJ. Human eosinophils can express the cytokines TNF- α and MIP-1 α . *J Allergy Clin Invest* 1993, 91:2673-2684.
13. De M, Sanford TR, Wood GW. Interleukin-1, interleukin-6 and tumor necrosis factor α are produced in the mouse uterus during the estrous cycle and are induced by estrogen and progesterone. *Dev Biol* 1992, 151:297-305.
14. Del Prete GF, Maggi E, Parronchi P, Chretien I, Tiri A, Macchia D, Ricci M, Banchereau J, De Vries JE, Romagnani S. IL-4 is an essential co-factor for the IgE synthesis induced in vitro by human t-cell clones and their supernatants. *J Immunol* 1988, 140:4193-4198.
15. Del Pozo V, De Andres B, Martin E, Maruri N, Zubeldia JM, Palomino P, Lahoz C. Murine eosinophils and IL-1: IL-1 mRNA detection by in situ hybridization production and release of IL-1 from peritoneal eosinophils. *J Immunol* 1990, 144:3117-3122.
16. Delmann HD, Brown EM. *Histología Veterinaria*. Ed. Acribia. España. 1976, pp. 529.
17. Desreumaux P, Janin A, Colombel JF, Prin L, Plumas J, Emilie D, Torpier G, Capron A, Capron M. Interleukin-5 messenger RNA expression by eosinophils in the intestinal mucosa of patients with coeliac disease. *J Exp Med* 1992, 175:293-296.
18. Eckstein P, Zuckerman S. Morphology of the reproductive tract. En: *Marshall's Phys of Reprod 1*. Parks, Logman, Green and Co. Nueva York, 1956.
19. Favre C, Saeland S, Caux C, Duvert V, De Vries J. Interleukin-4 has basophilic and eosinophilic cell growth-promoting activity on cord blood cells. *Blood* 1990, 75:67-73.
20. Galli SJ. New concepts about the mast cell. *New Eng J Med* 1993, 328: 257-265.
21. Galli SJ. New insights into "the riddle of the mast cells": Microenvironmental regulation of mast cell development and phenotypic heterogeneity. *Lab Invest* 1990, 62:5-33.
22. Gibbons AF, Chang MF. Number of mast cells in the rat uterus with special reference to its relation to hormonal treatment and decidual response. *Biol Reprod* 1972, 6:193-203.
23. Gordon JR, Burd PR, Galli SJ. Mast cell as a source of multifunctional cytokines. *Immunol Today* 1990, 11:458-464.
24. Grunert G, Porcia M, Tchernitchin AN. Differential potency of oestradiol -17 β and diethylstilboestrol on separate groups of responses in the rat uterus. *J Endocrinol* 1986, 110:103-114.

25. Harvey EB. Mast cell distribution in the uterus of cycling and pregnant hamsters. *Anat Rec* 1964, 148:507-515.
26. Holgate ST, Church MK. Allergy. Gower Medical Publishing, Londres, 1993, pp. 6.1-6.12.
27. Howe RS, Lee YH, Fischkoff SA, Teuscher C, Lyttle CR. Glucocorticoid and progestin regulation of eosinophil chemotactic factor and complement C3 in the estrogen-treated rat uterus. *Endocrinology* 1990,126:3193-3199.
28. Hunt JS. Immunologically relevant cells in the uterus. *Biol Reprod* 1994, 50: 461-466.
29. Keeping HS, Lyttle CR. Monoclonal antibody to rat uterine peroxidase and its use in identification of the peroxidase as being of eosinophil origin. *Biochem Biophys Acta* 1984, 802:399.
30. King WJ, Allen TC, DeSombre ER. Localization of uterine peroxidase activity in estrogen-treated rats. *Biol Reprod* 1981, 25:859.
31. Kita H, Ohnishi T, Okubo Y, Weiler D, Abrams JS, Gleich GJ. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3 release from human peripheral blood eosinophils and neutrophils. *J Exp Med* 1991, 174:745-748.
32. Leavitt WW, Chen TJ, Allen TC, Johnston JO. Regulation of progesterone receptor formation by estrogen action. *Ann NY Acad Sci* 1977, 286:210-225.
33. LeVier R, Spaziani E. The effect of estradiol on the occurrence of mast cells in the rat uterus. *Exp Cell Res* 1966, 41:244-252.
34. López AF, Sanderson JR, Gamble HR, Campbell HR, Young IG, Vadas MA. Recombinant human interleukin-5 is a selective activator of human eosinophil function. *J Exp Med* 1988, 167:219-224.
35. Maraspin LE, Bo WJ. Effects of hormones, pregnancy and pseudopregnancy on the mast cell count in the rat uterus. *Life Sci* 1971, 10:111-120.
36. Masinovsky B, Urdal D, Gallatin WM. IL-4 acts synergistically with IL-1 β to promote lymphocyte adhesion to microvascular endothelium by induction of induction of vascular cell adhesion molecule-1. *J Immunol* 1990, 145:2886-2895.
37. Matsuda H, Okuda K, Imori T. Tissue concentration of eosinophilia in the bovine oviduct and uterus of different stages of the oestrous cycle. *Rev Vet Sci* 1983, 34:360-370.
38. Mckercher TC, Van Orden III, Bhatnagar RK, Burke JP. Estrogen induced biogenic amine reduction in the rat uterus. *J Pharmacol Exp Ther* 1973, 185:514-522.

39. Melani G, Mattia GF, Silvani A, Cure A, Rivoltini L, Parmiani G, Colombo MP. Interleukin-6 expression in human neutrophil and eosinophil peripheral blood granulocytes . *Blood* 1993, 81:2744-2749.
40. Melton CE, Saldivar JT. Estrous cycle and electrical activity of rat myometrium. *Life Sci* 1965, 4:593-602.
41. Melton CE, Saldivar, JT. Impulse velocity and conduction pathways in rat myometrium. *Am J Physiol.* 1964, 207:279-285.
42. Miller MD, Krangel MS. Biology and biochemistry of the chemokines: A family of chemotactic and inflammatory cytokines. *Crit Rev Immunol* 1992, 12:17-46.
43. Moreno R. Respuesta inmune y mecanismos de autoinmunidad. Ed. Limusa. Grupo Noriega, México, 1996, pp.48-55.
44. Okulicz WC, Evans RW, Leavitt WW. Progesterone regulation of the occupied form of nuclear estrogen receptor. *Science* 1981, 213:1503-1505.
45. Padilla L, Reinicke K, Montesino H, Villena F, Asencio H, Cruz M, Rudolph M. Histamine content and mast cells distribution in mouse uterus: The effect of sexual hormones, gestation and labor. *Cell Mol Biol* 1990, 36: 93-100.
46. Piccini MP, Macchia D, Parronchi P, Giudizi M, Bani D, Alerini R, Grossi A, Ricci M, Maggi E, Romagnani S. Human bone marrow non B, non T-cells produce interleukin-4 in response to cross-linkage of Fcε and Fcγ receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991, 88:8656-8660.
47. Plaut M, Pierie J, Watson C, Hanley-Hyde J, Nordan R, Paul W. Mast cell lines produce lymphokines in response to cross-linkage of Fcε Ri or to calcium ionophores. *Nature* 1989, 339:64-67.
48. Press MF, King WJ. Distribution of peroxidase and granulocytes in the human uterus. *Lab Invest* 1986, 54:188-203.
49. Raible DG, Schulman E, DiMuzio J, Cardillo R, Post T. Mast cell mediators prostaglandin-D₂ and histamine activate human eosinophils. *J Immunol* 1992, 148:3536-3542.
50. Robertson SA, Bränstorm M, Seamark RF. Cytokines in rodent reproduction and the cytokine-endocrine interaction. *Curr Opinion Immunol* 1992, 4:585-590.
51. Robertson SA, Mayrhofer G, Seamark RF. Uterine epithelial cells synthesize granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-6 in pregnant and nonpregnant mice. *Biol Reprod* 1992a, 46:1069-1079.
52. Ross R, Klebanoff SJ. The eosinophilic leukocyte: Fine structure studies of changes in the uterus during the estrous cycle. *J Exp Med* 1966, 124:653.

53. Rudolph MI, Reinicke K, Cruz MA, Gallardo V, González G, Bardisa L. Distribution of mast cells and the effect of their mediators on contractility in human myometrium. *Br J Obstet Gynecol* 1993, 100:1125-1130.
54. Schemi R, Crowell O, Taylor GW. Identification of guinea pig eosinophil chemotactic factor of anaphylaxis as leukotriene B₄ and 8 (S), 15 (S)-dihydroxy - 5,6,11,13 (Z,E,Z,E) eicosanoic acid. *J Immunol* 1991, 147:2276.
55. Schleimer RP, Sterbinsky SA, Kaiser J, Bickel CA, Klunk DA, Tomioka K, Newman W, Luscinikas Fw, Gimbrone MA, McIntyre BW, Bochner BS. IL-4 induces adherence of human eosinophils and basophils but not neutrophils to endothelium. Association with expression of VCAM-I. *J Immunol* 1992, 148:1086-1092.
56. Sterin-Speziale N, Gimeno M, Borda E, Chaud M, Gimeno A. A different contractile response to catecholamine of two region (mesometrial y antimesometrial) of isolated rat uterine horns. *Pharmacol Res Comm* 1981, 13:401-410.
57. Sur S, Adolphson CR, Gleich GJ. Eosinophils. En: Middleton E Jr, Reed CE, Ellis EF, Adkinson NF (Eds.) *Allergy: Principles and Practice*. St Louis Mosby, E.U.A.,1993, pp.169-200.
58. Swanson LV, Barker KL. Antagonistic effects of progesterone on estradiol-induced synthesis and degradation of uterine glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Endocrinology* 1983, 112:459-466.
59. Tabibzadeh S, Santhanam U, SeHgal PB, May L. Cytokine-induced production of interferon β_2 / interleukin-6 by freshly explanted human endometrial stromal cells. Modulation by estradiol-17 β . *J Immunol* 1989; 142:3134-3139.
60. Tabibzadeh S. Cytokines and the hypothalamic-pituitary-ovarian-endometrial axis. *Human Reprod Update* 1994, 9:947-967.
61. Takacs L, Kovacs EJ, Smith RS, Young HA, Drum SK. Detection of IL-1 α and IL-1 β gene expression by *in situ* hybridization. Tissue localization of IL-1 mRNA in the normal C57BL/6 mouse. *J Immunol* 1988, 141:3081-3095.
62. Tchernitchin AN, Galand P. Oestrogen levels in the blood, not in the uterus, determine uterine eosinophilia and oedema. *J Endocrinol* 1983, 99:123-130.
63. Tchernitchin A, Mena MA, Soto J, Unda C. The role of eosinophils in the action of estrogens and other hormones. *Med Sci Res* 1989, 17:5-10.
64. Tchernitchin A, Roorijck J, Tchernitchin X, Vandenhende J, Galand P. Dramatic early increase in uterine eosinophils after oestrogen administration. *Nature* 1974, 248:142-143.
65. Tchernitchin A. Eosinophil-mediated non-genomic parameters of estrogen stimulation: A separate group of responses mediated by an independent mechanism. *J Steroid Biochem* 1983, 19:95-100.

66. Tchernitchin A. The role of eosinophil receptors in the non-genomic response to oestrogens in the uterus. *J Steroid Biochem* 1979, 11:417-424.
67. Tepper RI, Levinson BZ, Stranger BZ, Campos-Torres J, Abbas AK, Leder P. IL-4 induces allergic-like inflammatory disease and alters T-cell development in transgenic mice. *Cell* 1990, 62:457-467.
68. Vliagoftis H, Dimitriadou V, Theoharides TC. Progesterone triggers selective mast cell secretion of 5-hydroxytryptamine. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1990, 93:113-119.
69. Vliagoftis H, Dimitriadou V, Boucher W, Rozeniechi JJ, Correia I, Raam S, Theoharides TC. Estradiol augments while tamoxifen inhibits rat mast cell secretion. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1992, 98:398-409.
70. Walsh LJ, Trinchieri G, Waldorf H, Whittaker D, Murphy G. Human dermal mast cells contain and release tumor necrosis factor α , which induces endothelial leucocyte adhesion molecule-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991, 88:4220-4224.
71. Wang JM, Rambaldi A, Biondi A, Chen ZG, Sanderson CJ, Mantovani A. Recombinant interleukin-5 is a selective eosinophil chemoattractant. *Eur J Immunol* 1989, 19:701-705.
72. Wheeler C, Komm BS, Lyttle CR. Estrogen regulation of protein synthesis in the immature rat uterus: The effects of progesterone on proteins released into the medium during in-vitro incubations. *Endocrinology* 1987, 120:919-923.
73. Weller PF. The immunobiology of eosinophils. *New Eng J Med* 1991, 324:1110-1118.
74. Weller PF. Eosinophils: Structure and functions. *Curr Opin in Immunol* 1994, 6:85-90.
75. Wong GG, Clark S. Multiple actions of interleukin-6 within a cytokine network. *Immunol Today* 1988, 9:137-139.
76. Zheng Y, Zhou Z, Lyttle R, Teuscher C. Immunohistochemical characterization of the estrogen-stimulated leukocyte influx in the immature rat uterus. *J Leuko Biol* 1988, 44:27-32.
77. Zheutlin LM, Ackerman SJ, Gleich GJ, Thomas LL. Stimulation of basophil and rat mast cell histamine release by eosinophil granule-derived cationic proteins. *J Immunol* 1984, 133:2180-2185.
78. Zucker-Franklin D. Eosinophil structure and maturation. En: Mahmoud AA, Austen KF, (Eds.) *The Eosinophil in Health and Disease*. Grune and Stratton, Nueva York, 1980.