

31960

5
2j



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS
PROFESIONALES IZTACALA

DISTRIBUCION HISTOLOGICA DE LA
PEROXIDASA Y POBLACION DE EOSINOFILOS
EN LA RATA DURANTE EL PERIODO DE
PREIMPLANTACION

T E S I S

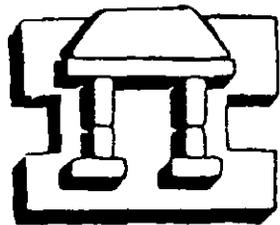
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA
DE LA REPRODUCCION

P R E S E N T A

SILVIA LETICIA VERDIN TERAN

DIRECTOR DE TESIS:

DR. LUIS ARTURO BAIZA GUTMAN



IZTACALA

0272016

LOS REYES IZTACALA TLALNEPANTLA, MEXICO 1999

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES IZTACALA

**DISTRIBUCIÓN HISTOLÓGICA DE LA PEROXIDASA Y POBLACIÓN DE
EOSINOFILOS EN LA RATA DURANTE EL PERIODO DE PREIMPLANTACION**

Tesis que para obtener el grado de Maestro en Ciencias en
Biología de la Reproducción
presenta:

Silvia Leticia Verdín Terán

Director de Tesis: Dr. Luis Arturo Baiza Gutman

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, México

1999.

CONTENIDO

I.	RESUMEN.....	3	
II.	AGRADECIMIENTOS.....	4	
III.	DEDICATORIAS.....	5	
IV.	PRESENTACION.....	6	
V.	INTRODUCCION		
	Interacción del conceptus con el endometrio.....	7	
	Receptividad endometrial	10	
	Respuesta uterina a los estímulos embrionarios.....	10	
	Adhesión del blastocisto y diferenciación del epitelio uterino.....	11	
	Citocinas e implantación.	12	
	Células migratorias durante la preñez temprana	13	
	Eosinófilos.	14	
VI.	ANTECEDENTES.....	19	
VII.	JUSTIFICACIÓN	22	
VIII.	HIPOTESIS.....	22	
IX.	OBJETIVOS.....	23	
X.	METODOLOGIA		
	Detección histoquímica de la peroxidasa.....	24	
	Detección de eosinófilos con la técnica de eritrosina.....	24	
	Cuantificación de células en compartimentos uterinos.	25	
	Análisis estadístico.	25	
XI.	RESULTADOS		
	Descripción histológica del útero de rata a través de los primeros seis días de preñez	26	
	Variaciones en la población de eosinófilos en la preñez temprana	31	
	Distribución de eosinófilos en las regiones uterinas	33	
	Distribución de eosinófilos en las distintas capas uterinas.....	36	
XII.	DISCUSION.....		
	40		
XIII.	CONCLUSIONES.....	45	
XIV.	BIBLIOGRAFIA.....	46	
XV.	APENDICES	50	

RESUMEN

Desde hace muchos años es conocida la presencia de los eosinófilos en el endometrio de roedores así como la variabilidad de su población, siendo más abundantes en la fase de estró del ciclo estral. Se sabe también que la migración y el aumento de estas células en el útero son inducidos por la administración de estrógenos en ratas inmaduras o maduras ovariectomizadas. La administración de estrógenos no solo promueve la migración eosinofílica sino también estimula el crecimiento, la síntesis de proteínas y la actividad de la peroxidasa uterinos. Sin embargo, se desconoce el papel fisiológico de la eosinofilia uterina y de la peroxidasa inducida por los estrógenos y menos aún la dinámica de la población de eosinófilos durante el periodo de preñez temprana en la rata y su probable relación con la actividad de la peroxidasa. En este trabajo se estudiaron las variaciones de la población de eosinófilos uterinos durante la preñez temprana empleando la tinción de la proteína básica mayor con eritrosina y la detección histoquímica de la peroxidasa, relacionándolas con los cambios poscoito, la fase de receptividad uterina (día 5) y el inicio de la respuesta del útero al blastocisto. Los resultados demuestran que la población de eosinófilos con ambas tinciones es significativamente más alta los días 1 y 2 de preñez que los otros días estudiados, no se encontraron variaciones los días intermedios pero sí un nuevo aumento el día 6 evidente sólo con la técnica de peroxidasa sin que haya diferencias entre la zona y la interzona de implantación. Asimismo, la mayor cantidad y las principales variaciones de la población de eosinófilos se localizaron en el estroma profundo y sólo hubo en el día 2 células migratorias positivas a peroxidasa inmersas en el epitelio luminal. Siendo éste reactivo a peroxidasa los días 1,2,3 y 6 de preñez. Se puede concluir que durante la preñez temprana, para la cepa Wistar la elevación preimplantacional de estrógenos en la tarde del día 4 de preñez no induce eosinofilia uterina y que la gran actividad de peroxidasa el día de receptividad uterina no es acompañada de un incremento paralelo en la población de eosinófilos uterinos. La eosinofilia que se presenta los primeros 2 días de preñez está más asociada a una reacción de tipo inflamatoria en respuesta a factores del semen ya reportada por otros autores. La similitud en la cantidad de eosinófilos entre las zonas e interzonas de implantación sugiere que estas células no participan en la respuesta temprana del útero al blastocisto.

AGRADECIMIENTOS

Al Doctor L. Arturo Baiza Gutman por el apoyo y comprensión para la realización de este trabajo.

Al Biol. Jorge Gersenowicks que muy amablemente me asesoró en el trabajo estadístico.

Al Sr. Hernán Hernández Caballero por todo su apoyo técnico en la realización de este trabajo.

A mis compañeros de Laboratorio que gracias a su comprensión, paciencia y apoyo pude realizar este trabajo.

DEDICATORIAS

A mis hijos Joar y Axel por ser el motor de mi existencia, por todo su apoyo, comprensión, amor y las grandes dosis de paciencia.

A mis padres por siempre haber creído en mí.

A Leonor por apoyarme incondicionalmente.

A Lety Moreno por su apoyo y permanente estímulo.

A Hernán por las horas que estuvo conmigo, por todos los días después de tantos años que ha estado apoyándome con gusto y eficiencia, por ser un verdadero amigo.

A mis hijos-alumnos, Carla, Maty, Maribel, Cuau, Alfredo y Josué por haberme brindado la exquisita experiencia de aprender de ellos y con ellos, por creer en mí.

A ti, quién a pesar de todo estas siempre conmigo

A mi misma, porque pude hacer de un sueño de la adolescencia una realidad

Y finalmente otra vez: "Gracias a la vida que me ha dado tanto"

Este trabajo fue realizado en los Laboratorios de Biología del Desarrollo y de Histopatología de la Unidad de Morfología y Función de la Universidad Nacional Autónoma de México Campus Iztacala bajo la asesoría del Doctor en Ciencias Luis Arturo Baiza Gutmán con el apoyo del PAPIIT, DGAPA, Proyecto IN222398

INTRODUCCION

El proceso de implantación ha sido ampliamente estudiado en los últimos años debido al gran desarrollo de los procedimientos de reproducción asistida. El término "implantación" se aplica a una serie de eventos que conducen a la fijación del *conceptus* al endometrio. Después de que el óvulo es fecundado por el espermatozoide generalmente a nivel del ámpula, el cigoto se segmenta para formar la mórula, en esta forma llega a la cavidad uterina donde se convierte en blastocisto, en él se ha formado una cavidad llena de líquido y sus células se distribuyen en dos poblaciones, las células del trofoéctodermo y las del macizo celular interno. Por lo general el blastocisto es el que interactúa con el endometrio adquiriendo una posición fija en él.

Interacción del *conceptus* con el endometrio.

Se ha descrito un patrón secuencial de eventos durante la preñez temprana que consta para el ser humano en 9 estadios y 3 fases (tabla 1). (Tabibzadeh y Babaknia 1995). El estadio 1 se inicia con la fertilización del huevo, el 2 se asocia con la segmentación del cigoto. El estadio 3 y la fase 1, implican la entrada de la mórula a la cavidad uterina, y su transformación a blastocisto, el cual madura y pierde la zona pelúcida. Después de esta pérdida las células del trofoéctodermo mural cercanas al macizo celular interno presentan cambios en su superficie para formar el trofoblasto sincicial. El estadio 4 y la fase 2 se inician cuando el blastocisto entra en contacto con la superficie del epitelio luminal uterino (aposición). Las membranas plasmáticas del trofoéctodermo y del epitelio uterino corren paralelas y separadas por una distancia de 20 nm, posteriormente ambas se adhieren entre sí y una red de filamentos submembranosos especializados mantienen entonces una unión célula-célula estable. Después de esta fase de adhesión continúa la de penetración del endometrio

Dependiendo de la especie es como se da la penetración del epitelio. Existen tres diferentes tipos al respecto:

a) Penetración por desplazamiento; se presenta cuando un número de células epiteliales superficiales que presenta muerte celular programada, se desprenden de su membrana basal, degeneran y son fagocitadas por las células trofoblásticas. Como consecuencia estas últimas quedan en contacto con la membrana basal. Extensiones de las células deciduales penetran a la membrana basal. Esto se presenta en la rata y el ratón.

b) Penetración por fusión: este tipo de invasión se caracteriza por la fusión del sinciotrofoblasto con la superficie de las células epiteliales formando un híbrido que penetra a la membrana basal del epitelio superficial. Se presenta en el conejo, los rumiantes.

c) Penetración por intrusión: consiste en la penetración de procesos celulares de las células del sinciotrofoblasto entre las células superficiales. Esto permite la pérdida de las uniones entre las células epiteliales circunvecinas y la formación de uniones entre las células epiteliales y trofoblásticas. Estas últimas se interponen entre ellas y las epiteliales penetrando a través de la membrana basal sobrepasando la superficie del epitelio. Se presenta en los carnívoros, el mono rhesus y el humano (Schlake y col. 1975).

La fase tres implica la formación de la placenta, en esta fase se localizan los estadios 5,6,7,8 y 9. En el estadio 5 se desarrollan las vellosidades primarias; y se subdivide en 5a,5b y 5c. En el 5a las células del trofoblasto se expanden hacia el endometrio, en 5b y 5c estas mismas células invaden las paredes de los vasos sanguíneos y forman parte de ellas.

En el estadio 6 se presenta la formación de las vellosidades placentarias secundarias y el saco vitelino secundario. Durante el estadio 7 ocurre la ramificación de las vellosidades y los estadios 8 y 9 involucran el desarrollo y ramificación de las vellosidades terciarias.

Tabla. 1. Fases tempranas de la implantación y placentación

	Estadio 1	Fertilización del huevo
	Estadio 2	División del cigoto
Fase 1	Estadio 3	Entrada de la mórula a la cavidad endometrial y transformación a blastocisto
Fase 2	Estadio 4	Adhesión y penetración del blastocisto al epitelio y después al estroma
Fase 3	Estadio 5 – 9	Placentación

Para que el proceso de implantación se desarrolle se ejercen múltiples influencias entre los tejidos uterinos y el trofoblasto. Las células epiteliales responden directamente a las hormonas esteroides maternas y las células estromales responden a los cambios que se inducen en las epiteliales, el blastocisto también emite señales hacia el estroma que son transmitidas a través del epitelio. Los cambios en las células estromales repercuten sobre las epiteliales (Denker 1990).

Las interacciones de adhesividad e invasividad entre el trofoblasto y el endometrio pueden ser iniciadas únicamente si ambas entidades han alcanzado condiciones fisiológicas específicas: de adhesividad en el caso del trofoblasto y el estado receptivo o permisivo para el endometrio. El estado receptivo es mantenido por un tiempo limitado y se define como "ventana de implantación".

Receptividad endometrial.

Se conoce como receptividad endometrial a la condición en que este tejido es capaz de aceptar el embrión y responder a sus estímulos. El epitelio uterino parece jugar un papel central en determinar el estado receptivo y no receptivo del endometrio. Además de actuar como una barrera contra la invasión del trofoblasto en el estado no receptivo, el epitelio uterino sirve como un transductor de señales entre el sistema embrionario y el materno en la inducción de la decidualización, por lo menos en roedores (Lejeune 1980).

El proceso de implantación depende más del endometrio "permisivo" que del trofoblasto "invasivo". La receptividad del endometrio es regulada por hormonas esteroides ováricas (principalmente por la progesterona y los cambios en la proporción entre progesterona y estradiol); y la invasividad del trofoblasto se adquiere cuando este ha alcanzado cierto grado de diferenciación (Denker 1993). En la rata y el ratón una elevación postovulatoria de estrógeno es requerida para la adquisición de un estatus endometrial adecuado. En estas especies la implantación del blastocisto es acompañada por la transformación de las células estromales a deciduales en respuesta a los estímulos embrionarios.

Durante la fase de receptividad hay una reorganización del citoesqueleto y un aumento en la actividad de transporte intracelular/transcelular del epitelio. Este último evento se relaciona con los cambios en la actividad secretoria endometrial que pueden servir para proveer un medio adecuado para el desarrollo del blastocisto (Sauer 1976, Robertson 1994).

Una característica constante del endometrio receptivo es su alta reactividad a los estímulos del blastocisto o a un estímulo artificial. Esta reactividad conduce a un aumento local de

permeabilidad capilar y a la reacción decidual, los que parecen ser dos fenómenos unidos. La respuesta vascular al parecer resultar de un efecto en cascada que involucra sustancias vasoactivas como la histamina y las prostaglandinas (Tachi y col. 1976, Psychoyos 1986).

La mitosis de las células estromales ocurre antes de la implantación en el humano y en los roedores y puede considerarse también como parte de la preparación de la receptividad uterina; junto con algunos otros cambios morfológicos tales como la adquisición de una posición basal del núcleo epitelial y el edema estromal. En la rata se ha observado la presencia de pinopodos en el epitelio involucrados en los procesos de pinocitosis y endocitosis. Se observa en el útero el aumento en la actividad de dos enzimas dependientes de la progesterona como la monoaminoxidasa (MAO) y la catecol-O-metiltransferasa (COMT) y posteriormente a estas la activación de la estradiol deshidrogenasa (EDH). En la rata, las actividades de la MAO y COMT aumentan bruscamente sobre el día 3 de pseudopreñez y la EDH aumenta 16 veces el día 6 (Psychoyos 1986).

Durante la preparación de la receptividad uterina la progesterona también induce un aumento en la cantidad de sitios de unión al estradiol en las células estromales que permiten su respuesta a los estrógenos y redirige los efectos de esta hormona del epitelio al estroma. Este cambio en la acción de los estrógenos está bien demostrada en la rata y el ratón y es importante para la regulación de la mitosis en los tejidos endometriales. Esta hormona también aumenta hasta un 500% los sitios de unión de RNA polimerasa disponibles para la iniciación de la síntesis de RNA (Psychoyos 1986).

Respuesta uterina a los estímulos embrionarios.

Una característica constante del endometrio receptivo es su alta reactividad a los estímulos del blastocisto o a un estímulo artificial. Esta reactividad conduce a un aumento local de permeabilidad capilar y a la reacción decidual, los que parecen ser dos fenómenos unidos. La respuesta vascular al parecer resultar de un efecto en cascada que involucra sustancias vasoactivas como la histamina y las prostaglandinas (Tachi y col. 1976, Psychoyos 1986).

Como se mencionó anteriormente, una de las respuestas endometriales más tempranas a la presencia del blastocisto es el aumento en la permeabilidad vascular limitado a las regiones uterinas cercanas al mismo, se le considera el primer signo visible que permite localizar las zonas de interacción con el embrión. Esta respuesta ocurre en el tiempo de máxima sensibilidad a la inducción decidual y es un prerrequisito para dicha reacción y por lo tanto para la implantación. En

la mayoría de las especies estudiadas está presente y se considera una respuesta universal del endometrio a las señales del blastocisto y puede ser fácilmente detectada utilizando colorantes vitales como el azul de Evans o el azul de Pontamina intravenosamente. En la rata esto ocurre alrededor de 110 h después de la ovulación/fertilización, durante este período, la permeabilidad aumentada se observa no solamente en presencia del blastocisto sino también como respuesta a señales no específicas como estímulos traumáticos. Para el día 6 de preñez la capacidad del útero para la respuesta vascular termina y entonces este órgano se vuelve hostil para el embrión (Psychoyos, 1973).

Adhesión del blastocisto y diferenciación del epitelio uterino.

El contacto del blastocisto con el epitelio uterino depende de una serie de modificaciones tanto de las células trofoblásticas del conceptus como de las epiteliales. Los primeros cambios involucrados se presentan en la composición de las membranas plasmáticas del ápice del epitelio uterino y del trofoblasto y comienzan con un adelgazamiento del glicocáliz y con cambios en las cargas de superficie. En el blastocisto disminuyen notablemente las cargas negativas.

Es poco conocida la naturaleza de los compuestos que participan, la superficie apical del epitelio normalmente no es un sitio de interacciones intercelulares o de afinidad a otras células, sin embargo durante la preñez se han detectado moléculas como las integrinas (Aplin 1996), la cadherina E y la CAM 129/189, lectinas y glicosiltransferasas (Chávez 1990; Denker 1993, Guzmán y col. 1993). También se modifica la capacidad de esta superficie para reconocer algunas lectinas como la concanavalina A (Salazar-Rubio, 1980).

Los proteoglicanos del tipo de los lactosaminoglicanos, como la lacto-N-fucopentosa I han sido demostrados en la superficie del epitelio uterino durante el período de implantación y su síntesis es dependiente del 17- β -estradiol. En el blastocisto un posible receptor para este glicoconjugado se detecta el día 5 en su región abembrionaria y ambas pueden participar en la adhesión entre ellas (Guzmán y col 1993).

Durante la fase de receptividad en el ratón se ha demostrado que se expresan receptores de proteoglicanos de heparan-sulfato en la membrana apical del epitelio uterino y se ha sugerido que estas moléculas están involucradas en las vías de invasión del trofoblasto (Robertson 1996).

Todos estos cambios observados en las membranas apicales también se han observado en las zonas laterales y basales del epitelio uterino y tienden a disminuir la polaridad del mismo, por

lo que se considera que todas estas modificaciones se llevan a cabo debido a que hay un cambio en la expresión del fenotipo general del epitelio, que le confiere un potencial mesenquimatoso (Denker 1990,1993).

Se ha propuesto que durante la implantación las hormonas esteroides pueden directa o indirectamente por medio de los mensajes sobre el estroma uterino cambiar el programa genético expresado en el epitelio uterino. La pérdida de la polaridad es particularmente obvia en la cámara de implantación en contraste con las zonas en que esta no ocurre. Parece ser, que las señales dadas por el blastocisto disparan eventos ya activados previamente por los esteroides maternos. La naturaleza de tales señales aun son materia de discusión, pero se incluyen moléculas tipo interferón como la α TP-1 y la β TP-1, citocinas, factores del crecimiento y prostaglandinas entre otras (Tabibzadeh y Babaknia 1995).

Citocinas e implantación

Diversas citocinas originalmente identificadas como parte del sistema linfohematopoyético también coordinan o dirigen la rápida y dramática reorganización del tejido uterino en respuesta a las hormonas esteroideas durante el ciclo ovárico y la preñez. Estas incluyen diversas citocinas sintetizadas en las células epiteliales luminales o glandulares del endometrio, entre otras al factor estimulante de colonias de macrófagos (GM-CSF), el factor estimulante de colonias-1 (CSF-1), factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), la interleucina-6 (IL-6), el factor inhibidor de leucemia (LIF), y el factor de crecimiento transformante β (TGF β). El GM-CSF y las otras citocinas epiteliales, actúan reclutando y activando las poblaciones de leucocitos locales, regulan el desarrollo del embrión antes de su implantación y conducen a la formación y mantenimiento de la placenta (Robertson y col. 1996).

El papel de algunas citocinas en la proliferación y diferenciación de las células endometriales está bien establecido; en particular, el factor inhibidor de la leucemia (LIF) y la interleucina 1 (IL-1). En el ratón el LIF se encuentra específicamente en las glándulas endometriales el día 4 de preñez. Su expresión, previa a la implantación del blastocisto, se ve aumentada bajo control materno. El humano también secreta el LIF siendo más abundante en el epitelio luminal. Es posible que este factor esté involucrado en la adquisición de la receptividad endometrial.

La interleucina 6 (IL6) en la rata, tiene una elevación corta durante el proceso de "respuesta aguda inflamatoria" postcoito, junto con la interleucina I y el TNF α . Este último se detecta también durante los días tres a nueve y hay un pico en los días 5 y 6 de preñez. La presencia de IL6 no es indispensable para la implantación lo que no ocurre con la IL1, puesto que la inyección de un antagonista del receptor a esta última impide la implantación, aunque el papel de este factor aun no se ha determinado. La participación del TNF α en la implantación aún es controversial (Robertson y col. 1996).

EL GM-CSF tiene un papel regulador sobre el movimiento, conducta secretora, y función de los macrófagos, granulocitos como neutrofilos y eosinófilos y de las células dendríticas. Tiene además un papel importante en la regulación inducida por estrógenos de la infiltración de macrófagos al útero en el ciclo sexual. Existen evidencias de que su elevación en el epitelio es factor clave en la activación de los granulocitos y macrófagos durante la respuesta inflamatoria poscoito (De M y col. 1991).

Células migratorias durante la preñez temprana.

Se considera que las respuestas uterinas al blastocisto durante la implantación tienen ciertas similitudes con las clásicas reacciones inflamatorias. Estas respuestas proinflamatorias son el resultado de reacciones inmunológicas maternas hacia el embrión, el que se considera como un "injerto". Las respuestas incluyen aumento en la permeabilidad vascular estromal, edema y aumento en las producción de prostaglandinas y de leucotrienos (LTB₄ y LTC₄), formación de especies reactivas, remodelación de tejidos incluyendo la degradación de la colágena y la infiltración de macrófagos, linfocitos, neutrófilos y eosinófilos en las regiones de la implantación del blastocisto (Mathur y Kennedy 1993, Parr y Parr 1985).

La presencia de macrófagos y neutrofilos en roedores en estos sitios está bien documentada (McMaster y col. 1993). Si bien es cierto que los macrófagos y los linfocitos son habitantes comunes del útero en mamíferos, otros tipos celulares derivados de la médula ósea también se localizan como los neutrofilos, los eosinófilos, los linfocitos T del tipo γ/δ y mastocitos en ciertas condiciones. Entre las funciones que tienen incluyen resistencia a las infecciones y a las condiciones inflamatorias asociadas con el apareamiento y la preñez (Hunt 1994).

Se considera que los neutrofilos tienen la capacidad de modificar las respuestas uterinas al blastocisto o al estímulo decidualogénico, además tienen la capacidad de modificar la síntesis de

prostaglandinas por la producción de radicales de oxígeno, controlar la permeabilidad vascular y degradar los componentes de la matriz celular favorecida también por vía de la producción de radicales de oxígeno y la secreción de la mieloperoxidasa (Mathur y Kennedy, 1993). A los macrófagos uterinos se les asigna el papel de proteger al embrión contra infecciones ya que matan virus y bacterias, además de su capacidad fagocítica, también se postula que pueden controlar la invasión de células tumorales del trofoblasto por la capacidad que tienen de producir las citocinas TNF α y la TGF- β 1 que inhiben la síntesis de DNA de las células del trofoblasto, este papel también se le da los linfocitos. Otra acción que recientemente se ha descrito en los macrófagos durante la preñez es la producción de proteasas tales como la colagenasa y elastasa que pueden facilitar la remodelación del tejido uterino requerido para la penetración y acomodamiento del embrión en crecimiento (Hunt 1994).

Se ha postulado que para que ocurra la implantación del blastocisto en el endometrio se requiere de la histamina, puesto que cuando se bloquean sus receptores se inhibe la implantación, lo mismo sucede cuando se inhibe su síntesis, por lo que se ha considerado que esta molécula participa en la decidualización del tejido uterino. Los mastocitos son los liberadores de histamina por lo que se cree que estas células participan activamente en la implantación (Ionov 1990).

El papel de los eosinófilos durante la implantación o la preñez temprana aun es incierto, se considera que pueden participar como promotores de la remodelación uterina ó como protectores del tracto genital femenino en la respuesta de tipo inflamatoria poscoito y finalmente como la mayor fuente de peroxidasa uterina (Perez y col 1996, Parr y Parr 1985, McMaster y col. 1992).

Desde hace muchos años se sabe que los eosinófilos en los roedores son abundantes en el endometrio durante el estro y se han demostrado receptores de estrógenos en dichas células. En el hombre, los eosinófilos no parecen tener receptores a estrógenos y únicamente hay un pequeño número en el endometrio. El número de eosinófilos en el útero varía con el ciclo menstrual y son menos durante la fase lutea, cuando la implantación ocurre. Están principalmente localizados, junto con gran números de neutrófilos en el endocérvix y el segmento bajo del útero. La presencia de grandes cantidades de eosinófilos en el tracto genital femenino humano es casi siempre anormal. Se considera la eosinofilia uterina como un desorden y se presenta en el carcinoma de cérvix. (Gleich y Adalpson 1986).

La presencia de los eosinófilos en el útero de roedores es inducida por los estrógenos, estas hormonas provocan que ellos se ubiquen y degranulen en la pared del útero, se considera que tales

células contribuyen a las grandes cantidades de peroxidasa uterina en el estro tardío, o después de la administración de estrógenos en ratas prepuberes u ovariectomizadas. También se ha demostrado la presencia de una eosinofilia uterina poscoito y se confiere a este fenómeno una acción de tipo alérgico a la presencia del semen (Parr y Parr, 1985).

Eosinófilos.

Los eosinófilos son células producidas en la médula ósea y migran por la sangre hacia los tejidos, donde tienen una amplia variedad de funciones. Es un tipo celular muy bien definido y son fácilmente distinguibles en cortes histológicos, además éstos se tiñen fuertemente con eosina, la cual es utilizada con hematoxilina para definir estructuras citoplasmáticas y los núcleos en las células. Se han encontrado en todas las especies de vertebrados que se han estudiado y son usualmente clasificados como leucocitos polimorfonucleares porque su núcleo en la forma sanguínea tiene dos o tres lóbulos, además poseen gránulos característicos.

Se desarrollan de células madre primitivas que están presentes en la médula ósea. Estas células progenitoras se dividen y diferencian, adquiriendo los gránulos distintivos con la forma especial de los eosinofilos. Después de unas cuantas horas de madurar en la médula ósea, entran al torrente sanguíneo y son distribuidos a través del cuerpo, donde primero se unen al endotelio vascular y migran a sitios perivascuales, que es su sitio normal de residencia en los tejidos, aunque en muchas enfermedades migran hacia áreas de inflamación. Hay normalmente muy pocos eosinófilos en la sangre (menos de $0.6 \times 10^9/L$) y en los tejidos, pero en ciertas enfermedades se pueden producir en grandes cantidades. Los eosinofilos son estimulados por una o más señales de las células adyacentes, incluyendo a las células reticulares, células endoteliales, linfocitos, macrófagos y otras células, las cuales inducen su diferenciación y activación. La estimulación con complejos como la IgG, IgE o C3b y otros productos de la inflamación, causa la secreción del contenido almacenado en sus gránulos. Estos eventos pueden durar horas y pueden continuar tanto como ellas se mantengan vivas, el cual puede ser únicamente unas pocas horas en algunos casos o muchos días o semanas en otros.

La principal función de los eosinófilos es sintetizar y depositar sus moléculas almacenadas y las recién sintetizadas en áreas de inflamación aguda y crónica. También son capaces de fagocitar partículas como bacterias, después de que han sido activados, aunque esta función es

principalmente realizada por los neutrófilos y otras células fagocíticas. Los eosinófilos están principalmente asociados con respuestas alérgicas, parasíticas y de inflamación crónica y toman parte en reacciones de hipersensibilidad aguda y crónica y se encuentran cerca de las células intactas (Spry 1988).

Entre los factores que pueden estimular la producción de eosinófilos en la médula ósea se encuentran los factores estimulantes de colonias (CSFs) como la GM-CSF- α , la interleucina 5 (IL-5) producida por los linfocitos T, de manera indirecta la interleucina 2 (IL-2) y la interleucina-3 (IL-3) (Mata 1997).

El citoplasma de los eosinófilos contiene una gran cantidad de componentes, de los cuales únicamente unos cuantos de estos han sido bien caracterizados Y su biosíntesis, estructura y funciones son todavía desconocidos. Se encuentran cuerpos lipídicos que al parecer son sitios importantes en el metabolismo de ácido araquidónico y pueden ser sitios de almacén para los lípidos de la membrana plasmática. Los gránulos cristaloides que pueden dividirse en “pequeños” y “microgránulos” contienen grandes cantidades de peroxidasa, también β -glucuronidasa, fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida, arilsulfatasa, lisofosfolipasa (o cristales de Charcot-Leyden), histaminasa, catalasa, colagenasas, elastasa y proteína básica mayor (PBM) que es característica de estas células y se ha detectado y caracterizado en un gran número de animales. Se cree que esta proteína es un importante mediador del daño producido por los eosinófilos a los parásitos y a los tejidos huésped. No tiene una actividad enzimática, sino más bien tóxica. También es un importante mediador en la inflamación del tracto respiratorio, especialmente en el asma, disminuye la actividad de los axonemas ciliares traquéales lo que produce acumulación de moco bronquial, y liberación de histamina de los basófilos en el humano, las características de esta proteína son utilizadas como un marcador específico para este tipo celular, principalmente por su afinidad a colorantes ácidos como la eosina ó eritrosina (Benitez- Bribiesca 1990).

La proteína catiónica eosinofílica (ECP) es otra de las principales proteínas básicas encontradas en los eosinófilos y funciona principalmente como una ribonucleasa que se ha considerado una potente molécula citotóxica (McLaren y col. 1981). Otra proteína contenida en los gránulos de los eosinófilos es la neurotóxina derivada de eosinófilos (NDE) que al parecer interfiere con las funciones de las células de Schwann del sistema nervioso (Gleich y col. 1986).

La peroxidasa es una de las enzimas más abundantes en los eosinófilos y se considera que estas células son su principal fuente, es una hemoproteína altamente básica de dos cadenas, que

pierde mucha de su actividad enzimática cuando es purificada. Los trabajos iniciales sobre sus propiedades se realizaron en roedores, después en caballos y los subsecuentes estudios en humanos dieron información más clara acerca de su tamaño, estructura, la naturaleza del componente hemo dentro de la molécula y sus características biofísicas. Tiene un gran contenido de arginina, leucina y ácido aspártico y un punto isoeléctrico mayor de 11. Los carbohidratos asociados están sólo en la cadena pesada. Su peso molecular en humano se encuentra entre 71 y 77 kDa, su cadena pesada se encuentra entre los 50-58 kDa y la cadena ligera entre 14-15 kDa. Se encuentra cercanamente relacionada a la peroxidasa de rábano, lactoperoxidasa y peroxidasa intestinal. Se considera que los eosinófilos contienen 15 μg de peroxidasa por 10^6 células (Caulfield y col. 1980).

Los métodos empleados para determinar la actividad de la peroxidasa son con el guayacol por su actividad para oxidarlo o con ortofenildiamina con H_2O_2 , o con inmunoensayo con anticuerpos, aunque tiene la desventaja de que debido a su basicidad, la peroxidasa puede unirse inespecíficamente a las superficies.

Esta enzima se localiza en la matriz de los gránulos cristaloides de los eosinófilos y en cantidades menores en los pequeños gránulos. Tiene la propiedad de catalizar la formación de iones HClO^- y H_2O_2 . Se ha estudiado principalmente por su capacidad de actuar en presencia de peróxido de hidrógeno como un sistema efector de citotoxicidad. Este es un potente mecanismo para matar algunos parásitos, bacterias, células y tumores *in vitro*. También puede disminuir los papeles efectores de las células inflamatorias. El principal papel de la peroxidasa es oxidar sustancias por su acción catalítica con H_2O_2 que también es generada por los eosinófilos. En presencia de yodo, bromo y cloro también actúa para matar una gran variedad de microorganismos. Bajo ciertas condiciones, como otras peroxidases, puede inactivar leucotrienos como la LTB_4 y la LTD_4 (Spry, 1988).

Los eosinófilos en los animales se han estudiado desde Ehrlich en 1879. Se presentan en todas las especies examinadas incluyendo diversos anfibios y aves. La morfología de los eosinófilos en los diferentes vertebrados tiene una considerable variación y pueden distinguirse de otras células por gran su capacidad para unirse a la eosina. La investigación de los eosinófilos ofrece la oportunidad de determinar sus propiedades y papeles *in vivo*, así como para definir sus relaciones con otros tipos celulares bajo condiciones controladas. Hay especies cuya comparación puede causar dificultades si los descubrimientos se comparan con el hombre. Por ejemplo, los eosinófilos peritoneales en roedores tienen capacidad fagocítica. En algunos animales, incluyendo

miembros de la familia de los gatos, rinocerontes, hienas y algunas aves, no hay peroxidasa eosinofílica y los eosinófilos en las hienas no se tiñen con eosina (Spry, 1988).

ANTECEDENTES

Los eventos involucrados en la fase de receptividad uterina y su regulación hormonal fueron primeramente descritos en roedores y más tarde validados para otras especies. En ellos el endometrio puede ser mantenido en varios estados en cuanto a su capacidad de aceptar al embrión incluyendo una fase neutra, una fase receptiva y una fase no receptiva o refractaria. En la rata, la inducción de la receptividad endometrial requiere de un mínimo de tres días de preparación del endometrio con progesterona y pequeñas cantidades de estrógenos al final de este período.

Durante el inicio de la preñez temprana, la preparación con progesterona se alcanza en la tarde del día cuatro de preñez o pseudopreñez. Durante este tiempo, el endometrio se encuentra en la fase "neutra". Este estado también puede provocarse por la administración diaria de progesterona (2 mg/día) en ratas ovariectomizadas en la fase temprana de la preñez. Los embriones de los estadios preblastocisto pueden desarrollarse en el útero a blastocistos y sobrevivir por largos períodos de tiempo en un estado de latencia como si el proceso de implantación fuera congelado en la fase de aposición. La disponibilidad de los estrógenos al final de la preparación con progesterona en las ratas preñadas o pseudopreñadas provoca el estado "receptivo" del día 5. La entrada de la mórula al cuerno uterino ocurre en la tarde del día 4, cuando el endometrio está en fase neutral. Sin embargo, de esta fase se llega rápidamente a la fase receptiva del día 5. Este período es seguido por el estado "no-receptivo" del día 6. Estos cambios también pueden inducirse artificialmente. Si la progesterona se administra para inducir el estado neutral y entonces se aplica el estrógeno, la fase receptiva es inducida primero y se alcanza dentro de 36 h. La administración continua de progesterona puede prolongar el período no-receptivo indefinidamente. La reprogramación de la receptividad endometrial requiere de un mínimo de dos días de la supresión de la administración de progesterona (Psychoyos 1973, 1976, 1986).

Las respuestas uterinas a los estrógenos son comúnmente divididas en dos: llamadas "tempranas" y "tardías" dependiendo del tiempo de respuesta relativa después de la administración de la hormona. Las respuestas tempranas como la oxidación de glucosa, la síntesis de glucógeno, la imbibición de agua y la eosinofilia son detectadas desde los pocos minutos hasta horas después de la exposición a estrógenos (Jensen y De Sombre 1972). Las respuestas tardías, como el incremento en la síntesis total de proteínas, síntesis de ácido ribonucleico y mitosis requieren de una retención a mayor plazo de los estrógenos en su receptor (King y col. 1981).

Para la implantación, la estimulación del útero en la rata por los estrógenos provoca una cascada de eventos bioquímicos que culminan en la síntesis de macromoléculas y el crecimiento uterino (King y col. 1981). Las características bioquímicas que actualmente se reconocen como marcadoras del efecto del estradiol, para las especies que requieren de esta hormona, incluyen la eosinofilia uterina, aumento del volumen uterino, del número de células mitóticas y de la actividad de la peroxidasa (Gupta y col. 1998, Pérez y col. 1997).

El tratamiento de ratas inmaduras u ovariectomizadas con estradiol produce la estimulación de diversos parámetros uterinos, como el peso total, la síntesis de proteínas, la actividad de la peroxidasa y los sitios de unión nuclear tipo II (Lucas F. y col. 1955, Anderson y Fosberg 1988, Lytle y col. 1989, Farley y col. 1992)

Desde 1955, Lucas y colaboradores reportan por vez primera la presencia de peroxidasa en el útero de ratas ovariectomizadas tratadas con estrógenos. En la actualidad se sabe que la actividad de la peroxidasa en la rata y el humano varía cíclicamente bajo control hormonal endógeno y también está presente en el líquido uterino (Jellink y col. 1974, Hosoya y Saito 1981, Lee 1982, Kimura y col 1983).

Con estudios histoquímicos de microscopía óptica y electrónica se han caracterizado los sitios donde se localiza la peroxidasa, siendo principalmente en el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi de las células estromales, así como en células del epitelio glandular y luminal (Brokelman y Fawcett 1969, King y col. 1981, Anderson y col. 1986, Gabriel y col. 1986).

Existen evidencias que muestran que la peroxidasa puede provenir de dos fuentes: de células del tejido uterino y la derivada de los eosinófilos. Fue en 1954 cuando se reportó el aumento de eosinófilos uterinos en ratas inmaduras u ovariectomizadas después de un tratamiento de estrógenos. Veinte años mas tarde se demostró que la inyección intravenosa de estradiol en ratas inmaduras induce un aumento dramático de la eosinofilia uterina a los 5 minutos. En trabajos posteriores se reporta un pico máximo de eosinófilos después de la administración de estrógenos a las 12 horas y una disminución progresiva a las 24 horas (Lucas y col. 1955, Tchernitchin 1974).

Se ha propuesto que la regulación por estrógenos de la eosinofilia uterina es mediada por un factor quimiotático uterino (ECF-U), cuya síntesis es regulada por el estradiol. Se ha observado que hay un aumento significativo en la actividad del ECF-U, tres horas después de la inyección de 1 µg de estradiol. Paralelo a esto se ha reportado la presencia de una peroxidasa eosinofílica en el útero tres horas después de la administración de estrógenos, lo que sugiere que la elevación en la

actividad de peroxidasa uterina a los pocos minutos después de la exposición estrogénica es debida por tanto, a la peroxidasa endógena (Hosiya y Saito 1981). El aumento de los eosinófilos en respuesta al estradiol se presenta hasta los 11 días de edad en el ratón, sin embargo se ha detectado la presencia de peroxidasa de origen epitelial a los 5 días (Newbold 1992). También se ha demostrado que los estrógenos inducen una mayor respuesta de la peroxidasa a menor edad, primero en la región cervical y después en los cuernos uterinos y que el cérvix tiene una mayor cantidad de peroxidasa y una mayor eosinofilia (Anderson y Fosberg 1988). En cortes de útero de ratas normales maduras o con tumores se presenta una actividad dos veces más alta en el cérvix que en los cuernos uterinos después de la administración de estrógenos (Affeck y col. 1981)

El significado biológico de la peroxidasa dependiente de estrógenos no ha sido aclarada, sin embargo, se ha postulado que puede intervenir en el metabolismo de los estrógenos. En mamíferos los estrógenos sufren dos hidroxilaciones más que el resto de los vertebrados, en las posiciones 2 y 4 del anillo aromático A para formar los catecolestrogenos (2 y 4 hidroxiestrógenos). Además de la peroxidasa involucrada en estas hidroxilaciones se incluyen a las tirosinasas y monooxigenasas inespecíficas. Se ha propuesto que los catecolestrogenos inhiben el metabolismo de las catecolaminas y que dicha acción prolonga y potencia las acciones fisiológicas de las catecolaminas especialmente sobre la presión sanguínea y liberación de gonadotropinas (Ball y Knuppen 1990). También se asocia la acción de los estrógenos durante la implantación embrionaria con la formación de catecolestrógenos y las prostaglandinas (Bibhash y col. 1990).

La actividad de la peroxidasa uterina está probablemente correlacionada con la respuesta vascular temprana (hiperemia) causada por el estradiol, ya que el incremento de esta enzima precede el aumento de volumen sanguíneo uterino. Se ha sugerido que un cambio en la actividad de la peroxidasa puede estar involucrado con la iniciación de la vasodilatación uterina. La importancia biológica del aumento temprano en la actividad de la peroxidasa inducido por estrógenos y previa a la respuesta vascular puede ser crítica en el desarrollo de la hiperemia uterina. No sólo los catecolestrógenos dilatan la arteria uterina *in vivo*, sino que también otros compuestos estrogénicos son efectivos (Farley y col. 1992).

Durante la implantación en la rata y el ratón donde se requiere de un pico estrogénico para la preparación uterina se podría dar la siguiente secuencia de eventos: aumento de la actividad de peroxidasa (inducida por los estrógenos), hidroxilación de estrógenos (producida por la

peroxidasa), vasodilatación (respuesta típica de un útero preparado para la implantación) y subsecuente inactivación de la peroxidasa.

En la rata, durante el embarazo temprano, el aumento en los niveles de estrógenos al día 4 induce al día siguiente una marcada elevación en la actividad de peroxidasa uterina, junto con la receptividad del endometrio (Singh y col. 1996, Baiza-Gutman y col. en prensa). Un día después cuando la respuesta vascular se ha establecido, la actividad de esta enzima decae, tanto en la zona como en la interzona de implantación (Baiza-Gutman y col. en prensa).

JUSTIFICACIÓN

Los estudios donde se correlacionan los estrógenos, la peroxidasa, y la eosinofilia uterina se han hecho únicamente en ratas prepúberes u ovariectomizadas a las que se administra estradiol exógeno y en ratas normales durante el ciclo estral. Faltan estudios sistemáticos de las fluctuaciones de la población de los eosinófilos en el útero durante la adquisición de la receptividad endometrial y el inicio de la respuesta uterina a las señales del blastocisto; ya que es posible que estas células sean afectadas por la acción de los estrógenos preimplantacionales. Además no se conoce si son la fuente principal de la peroxidasa en la fase de receptividad uterina.

HIPÓTESIS

La acción de los estrógenos induce un aumento paralelo en la cantidad de eosinófilos y la actividad de peroxidasa uterina, es posible que el aumento en la actividad de la peroxidasa durante la fase de receptividad endometrial inducida por estrógenos esté acompañada del incremento en la población de eosinófilos y que éstos sean la fuente principal de la enzima en este período.

OBJETIVOS

1. - Determinar las variaciones en la población de eosinófilos durante los días 1 a 6 de la preñez temprana en la rata mediante las técnicas de eritrosina e histoquímica para peroxidasa.
2. - Comparar los resultados obtenidos con las dos técnicas de tinción empleadas.
3. - Analizar si los cambios en la población de eosinófilos tienen relación con la fase de receptividad uterina o con la acción del blastocisto en la zona de implantación.
4. - Observar las variaciones en la distribución de la peroxidasa uterina en los diferentes tejidos durante la preñez temprana.

METODOLOGIA

Se utilizaron ratas hembras vírgenes de la cepa Wistar de 200-250 g de peso mantenidas con agua y comida *ad libitum* y ciclo de luz oscuridad de 14-10 h. Fueron apareadas por el sistema de trío (dos hembras y un macho) y a la mañana siguiente se les practicó citología vaginal; se consideró como día 1 de preñez aquel en que se observaron espermatozoides. De las hembras preñadas se formaron 6 grupos de 4 ratas por día. Los animales se sacrificaron por dislocación cervical los días 1,2,3,4,5 y 6 de preñez. El día 6 se inyectó azul de Evans al 1% en solución salina fisiológica por la vena de la cola 10 minutos antes del sacrificio para detectar los sitios de implantación. Los organismos fueron perfundidos con 500 ml de solución salina isotónica. Se extrajeron los úteros por laparotomía, los tercios medios de cada cuerno uterino se cortaron en fragmentos de 1 mm de grosor y se fijaron en formol al 4% amortiguado con fosfatos ó con paraformaldehído al 4% en solución salina amortiguada con fosfatos (PBS) pH 7.6 fresco por 1 h, en el primer caso se procesaron para su inclusión en paraplast y la tinción con eritrosina, en el segundo se almacenaron por 24 h en tris 0.05 M pH 7.6 a 4°C para inclusión en Paraplast y realizar la técnica para la detección de peroxidasa.

Detección histoquímica de la actividad de peroxidasa.

La detección de la peroxidasa se efectuó utilizando la reacción histoquímica con H₂O₂ y diaminobencidina (3,3',4,4'tetraaminobiphenyl, Sigma Chem) en fragmentos de 1 mm de útero previamente fijado en paraformaldehído, incubando a 37 °C por 2 h en agitación (Newbold y col. 1992) (apéndice 1).

Después de la incubación se siguió la técnica histológica de rutina, utilizando aceite de cedro como liquido intermedio e inclusión en paraplast (Fisher Co.).

(Apéndice 2).

Detección de eosinófilos con la técnica de eritrosina.

Para determinar la población de eosinófilos los úteros se procesaron con la técnica histológica de rutina utilizando aceite de cedro como liquido intermedio e inclusión en paraplast y

se utilizó la técnica de tinción con eritrosina (I.C. 41348 Sigma Chem.) específica para proteína básica mayor de eosinófilos modificada de Benitez-Bribriesca y col. (Apéndice 3).

Para ambas técnicas se hicieron cortes al microtomo de 4 μm y se contratiñeron con hematoxilina de Harris por 5' (Kiernan 1990). (Apéndice 4).

Cuantificación de células en compartimientos uterinos.

El conteo de células se hizo dividiendo el útero en cuatro regiones: antimesometrial, mesometrial y dos laterales, asimismo se dividió por capa de tejido: epitelio, estroma superficial, que se consideró como la capa de tejido adyacente al epitelio y antes de las glándulas estromales; estroma profundo considerado como la capa de tejido que incluye a las glándulas estromales hasta el límite de capa muscular o miometrio; miometrio circular que sólo abarcó la zona de tejido de músculo liso circular y miometrio longitudinal que constituye la última capa de tejido del útero que además de músculo tiene una gran cantidad de vasos sanguíneos. Por cada rata se contaron 5 cortes, dejando sin contar 4 cortes consecutivos entre ellos. En el día 6 se contaron sitio y no sitio de implantación para ambas tinciones. Para el caso de peroxidasa se contaron las células de tipo migratorio en los tejidos, esto es, no se contaron eritrocitos aunque sí células epiteliales positivas a la enzima.

El conteo y la toma de fotografías se realizó en un fotomicroscopio Zeiss, Fomit III.

Análisis Estadístico.

Los datos se normalizaron sacando logaritmos y se utilizó la prueba de análisis de varianza (ANOVA) multifactorial y prueba de Tukey para sacar los grupos que dan las diferencias en el programa Statistica 3.1 para Windows 95.

RESULTADOS

DESCRIPCION HISTOLÓGICA DEL ÚTERO DE RATA A TRAVÉS DE LOS PRIMEROS SEIS DÍAS DE PREÑEZ.

Estructura general del útero.

El útero de la rata es un órgano bicornue hueco, cada cuerno consiste de una luz y la pared uterina. Esta última esta formada por tres capas: el endometrio, el miometrio y el perimetrio.

El endometrio esta constituido por un epitelio y estroma. El epitelio recubre la luz y también forma glándulas tubulares simples inmersas en el estroma.

El estroma esta formado por tejido conjuntivo con células típicas de dicho tejido.

El miometrio presenta dos capas de músculo liso, una capa interna de fibras circulares y una externa con fibras en disposición longitudinal muy vascularizada.

El perimetrio es una delgada capa adventicia o serosa que conecta al útero con otros órganos y lo delimita.

Descripción histológica en los primeros días de preñez

Día 1.

La luz del útero se encuentra en forma irregular muy contorneada, el epitelio luminal en los ápices de las contorsiones es cilíndrico y en las zonas laterales y bajas es cúbico. El citoplasma del epitelio es positivo a peroxidasa, exceptuando la zona del antimesometrio.

En el estroma superficial se observa gran cantidad de fibroblastos, células positivas a peroxidasa y a eritrosina, gran cantidad de venulas y arteriolas.

En la zona del endometrio profundo la vascularización es mayor y las glándulas de epitelio cúbico se encuentran muy desarrolladas, la celularidad es grande, es en esta zona donde se observan mayor cantidad de células positivas a peroxidasa y a eritrosina (Figura 1).

La capa muscular circular abarca alrededor de 25 filas de células musculares lisas, en ellas se observan pocos vasos sanguíneos inmersos en ella.

La capa muscular longitudinal se encuentra muy vascularizada con una notable presencia de células positivas a peroxidasa y a eritrosina, estos tipos celulares se encuentran inmersos entre los paquetes musculares y alrededor de los vasos sanguíneos, en algunas zonas se puede observar

una ligera reacción positiva a peroxidasa en el contenido de algunos vasos y en la matriz del tejido muscular. En este día se observa edema generalizado de todas las capas del órgano.

Día 2.

La luz uterina se vuelve mas regular, presenta menos contorsiones, el epitelio se hace cúbico en las zonas donde no lo era y desde la zona lateral media hacia el mesometrio la reacción a peroxidasa en el epitelio es muy intensa, se logran observar células no epiteliales positivas a peroxidasa inmersas entre el epitelio (figura 2). Esto no sucede con la tinción con eritrosina donde no se encontraron células teñidas con ella inmersas en el epitelio.

El estroma uterino se engrosa, se observa edema, las glándulas involucionan lo mismo que los vasos sanguíneos.

La capa muscular circular denota gran cantidad de núcleos contraídos y se aprecia un menor volumen con respecto al día 1.

Día 3.

El epitelio luminal cúbico es muy ligeramente positivo a peroxidasa y la luz uterina esta alargada sin pliegues, el estroma uterino es más grueso del lado antimesometrial, se observa mayor densidad celular en el estroma cerca de la luz uterina, la zona más profunda del endometrio presenta muchas células con núcleos de "cara abierta".

Las glándulas del tejido endometrial aparecen sin cambios, los vasos sanguíneos son abundantes y tortuosos.

En el miometrio circular se observan pocas células positivas a peroxidasa o a eritrosina y ésta capa es más delgada que los días anteriores. Los paquetes musculares de la capa longitudinal muscular no son muy evidentes, tampoco están muy irrigados y se ve más delgada que los otros días.

Día 4.

Se observa proliferación epitelial, el citoplasma de las células luminales tiene apariencia de tener secreción mucoide incolora a H-E. En el estroma superficial se alcanzan a observar mitosis activas cercanas a la luz de la zona antimesometrial y lateral principalmente.

Las glándulas endometriales presentan proliferación así como secreción acidófila en la luz.

En el estroma se observa mayor densidad celular, el edema que se observaba durante los primeros días ha desaparecido completamente.

Los tejidos musculares circular y longitudinal no presentan cambios con respecto al día anterior.

Día 5.

El epitelio luminal es cilíndrico, el estroma superficial se observa con mayor celularidad que en el estroma profundo, los vasos sanguíneos se ven más grandes y tortuosos y en mayor cantidad, lo mismo en el tejido muscular.

Se observa edema en el tejido estromal.

Día 6.

Sitio de implantación

La luz es amplia y recta, el epitelio es cilíndrico ligeramente positivo a peroxidasa en su citoplasma, se observan figuras mitóticas abundantes en el estroma superficial. Asimismo, hay edema en todo el estroma endometrial, el que es mayor del lado antimesometrial. Las glándulas son mayores con secreciones muy ligeramente positivas a peroxidasa (figura 3).

Las capas de músculo circular y longitudinal, también están edematizadas, en este último se observan los vasos sanguíneos de mayor calibre, con respecto a los demás días.

Las fibras de tejido conectivo y el citoplasma del útero en este día de preñez se vuelven más reactivas a eritrosina, aunque esta tinción sigue siendo preferencial para los gránulos de la proteína básica mayor (PBM) de los eosinófilos, que al parecer no son tan abundantes en esta zona. Se pueden observar macrófagos ligeramente positivos a peroxidasa en el estroma superficial y en el estroma profundo (figura 4).

Intersitio de implantación.

La luz es más estrecha y contorsionada, es más amplia y proporcional hacia los lados mesometrial y antimesometrial. La reactividad del epitelio a peroxidasa es leve y se observan pocas células positivas a peroxidasa en el estroma.

En el citoplasma de las células estromales la reactividad a eritrosina es menor que en el sitio y se alcanzan a distinguir muy bien los eosinófilos.

Los vasos sanguíneos presentan una luz prominente.

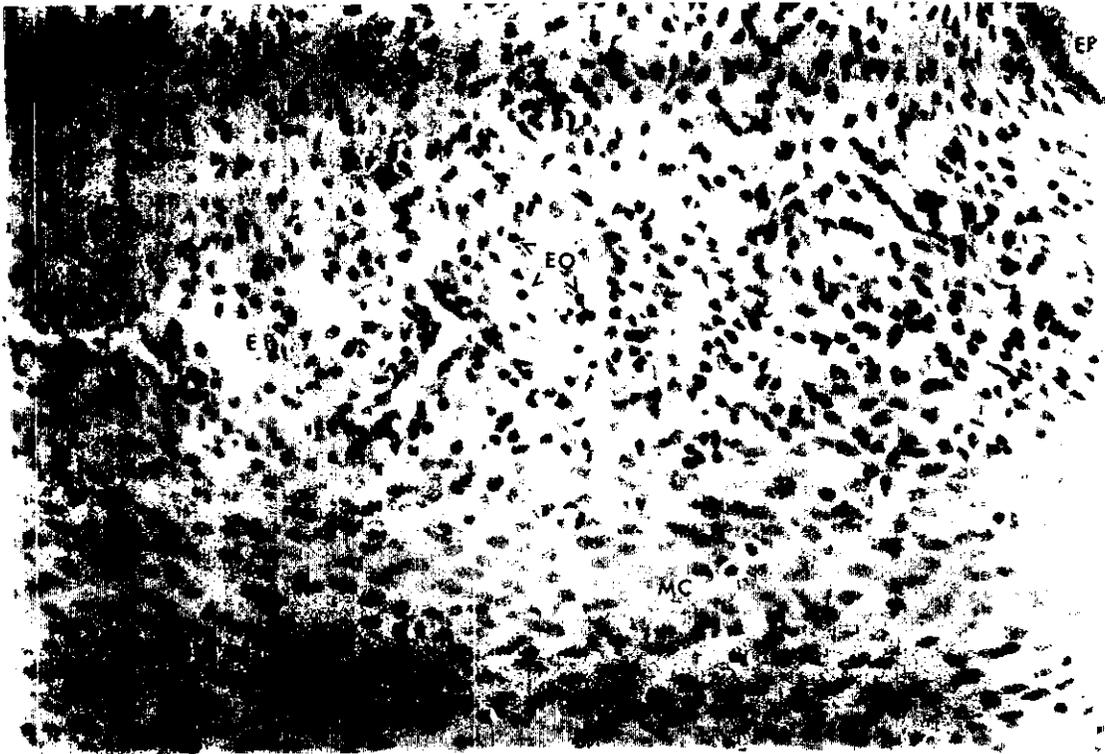


Figura 1. Corte transversal de útero de rata del día 1 de preñez. Notese la gran cantidad de eosinófilos(eo) , principalmente en el estroma profundo (ep), escasos en el miometrio circular (mc) y ninguno en la pequeña porción de ep) que se alcanza ver. Tinción con eritrosina específica para proteína básica mayor de eosinófilos, contratinción con hematoxilina 4µm, 200X.

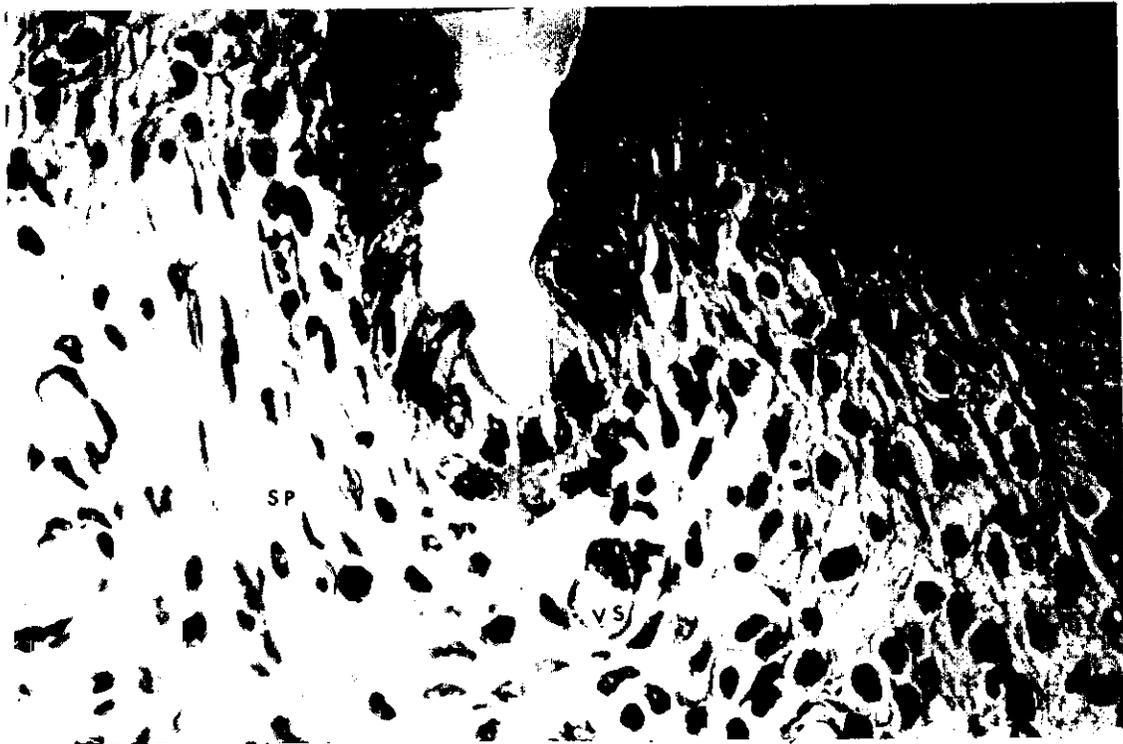


Figura 2. Corte transversal de útero de rata de día 2 de preñez donde se observa la presencia de células positivas a peroxidasa en el epitelio (ep), pequeños vasos sanguíneos (vs) con células positivas a peroxidasa dentro de su luz, también se puede observar la reactividad de las células del epitelio uterino y la presencia de células positivas a peroxidasa en el estroma superficial (sp). Técnica de detección de peroxidasa con DAB contratinción con hematoxilina, 4µm, 400X

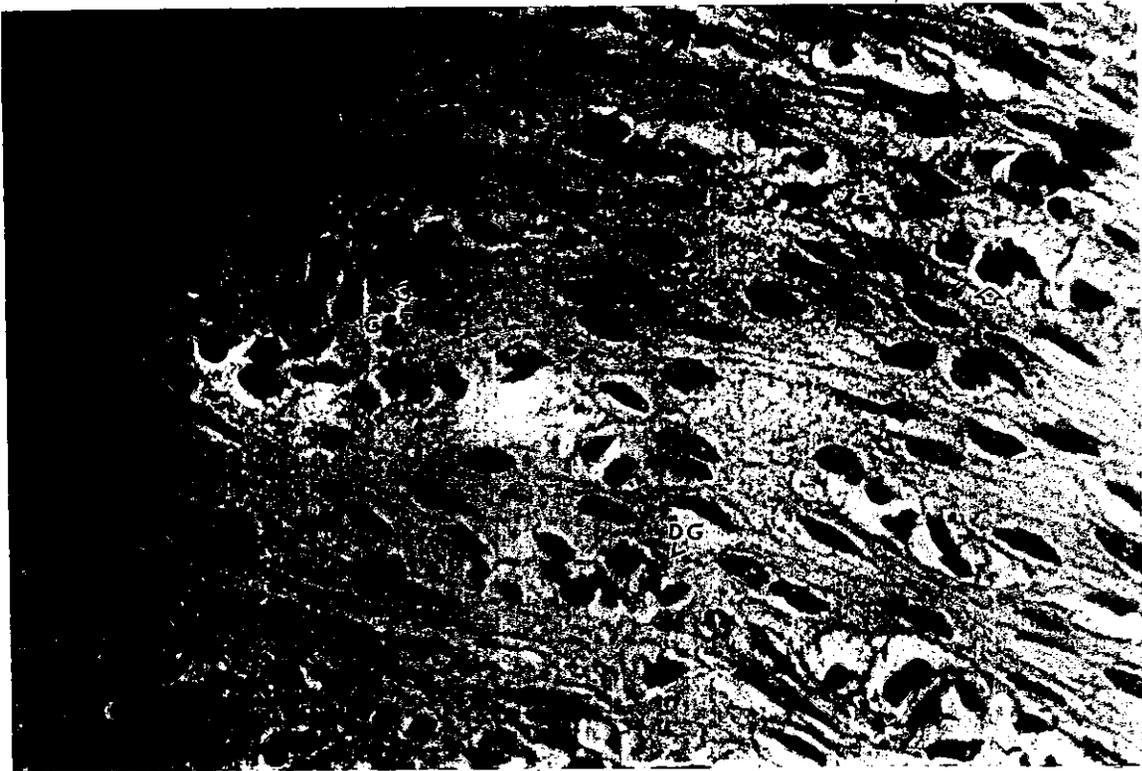


Figura 3. Tejido estromal profundo del sitio de implantación del día 6. Donde se puede observar la presencia de células positivas a peroxidasa (cpp), algunas con ligera degranulación (dg) y una ligera reacción en el citoplasma de las células estromales. Reacción con DAB para peroxidasa, contratinción de hematoxilina, 4µm, 400X

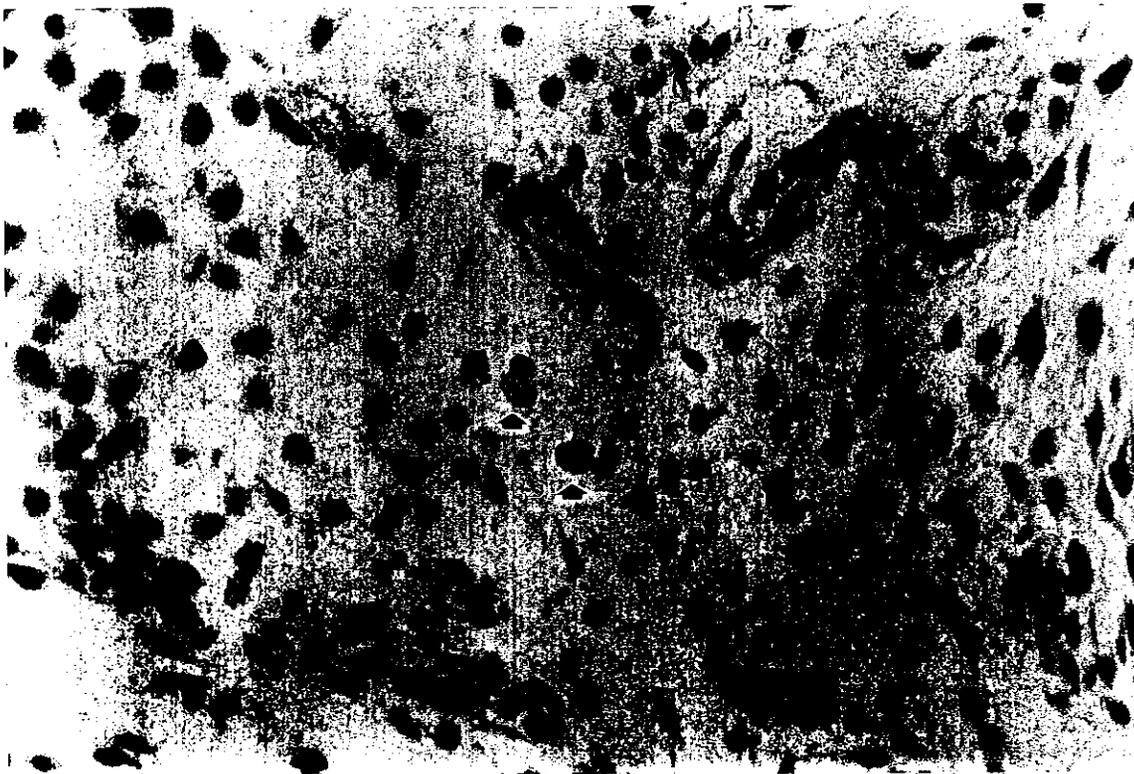


Figura 4. Sitio de implantación del día 6. En la zona del estroma profundo se puede observar reactividad ligera a peroxidasa en los macrófagos (flechas). Reacción con DAB, contratinción hematoxilina 4µm, 400X

Variaciones en la población de eosinófilos en la preñez temprana

La población de eosinófilos detectada con la reacción de peroxidasa y con eritrosina presentó algunas variaciones durante la preñez temprana. La mayor cantidad de células evaluadas con ambas tinciones se encontró durante los dos primeros días, siendo mayor el día 1 disminuyendo para los demás días, aunque para ambas tinciones se mantiene constante los días 3, 4 y 5. También se presenta un aumento estadísticamente significativo ($p < 0.05$) en la población de células positivas para peroxidasa el día 6 y no para las positivas a eritrosina, no hubo diferencias entre la zona y la inter-zona de implantación con ninguno de los métodos empleados. (Tabla 2, figura 5).

Tabla 2. Población de eosinófilos durante la preñez temprana en la rata.

Tinción/ Día	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6S	Día 6NS
Peroxidasa	901.3± 187.7 a	629.65± 270 b	271.6± 58.02 c	373.55± 133.0 c	151.25± 40 c	612.15± 271.1 b	455.2± 71.9 b
Eritrosina	1446.5± 59.5 a *	460.25± 249.7 b	356.1± 180.9 b	179.5± 106.55 c	167.1± 89.99 c	149.67± 37.33 c	279.32± 81.2 c

Población de células por corte. Media (8), ± error estándar (ee) de 4 experimentos.

*presentó diferencias estadísticamente significativas con respecto a la población de células positivas a peroxidasa ($p < 0.05$). a diferente de los demás; b iguales entre sí, diferentes de a y c; c iguales entre sí, diferentes de a y b
S=sitio de implantación, NS=no sitio de implantación

La población de eosinófilos evaluada por ambas técnicas por lo general es similar excepto los días 1 y 6, donde para el primero la población de células positivas a eritrosina es de 1446, siendo para peroxidasa 901.

Para el día 6, la mayor población se presentó para las células positivas a peroxidasa, en el sitio de implantación (612.1 ± 271 vs 149.67 ± 37.33) y en el no sitio (455.2 ± 71.92 vs 279.32 ± 81.2).

(Figura 6).

El comportamiento de la población de células transitorias positivas a peroxidasa durante los primeros seis días de la preñez temprana en rata es muy similar al de células positivas a eritrosina. Difiere en el número de células del día 1 aunque es alto en ambas técnicas, y disminuye progresivamente para los demás días. El día 6 con peroxidasa vuelve a presentarse un aumento parecido al del día 2, lo que no ocurre para la tinción con eritrosina donde la población de eosinófilos no vuelve a incrementarse durante este período de tiempo.

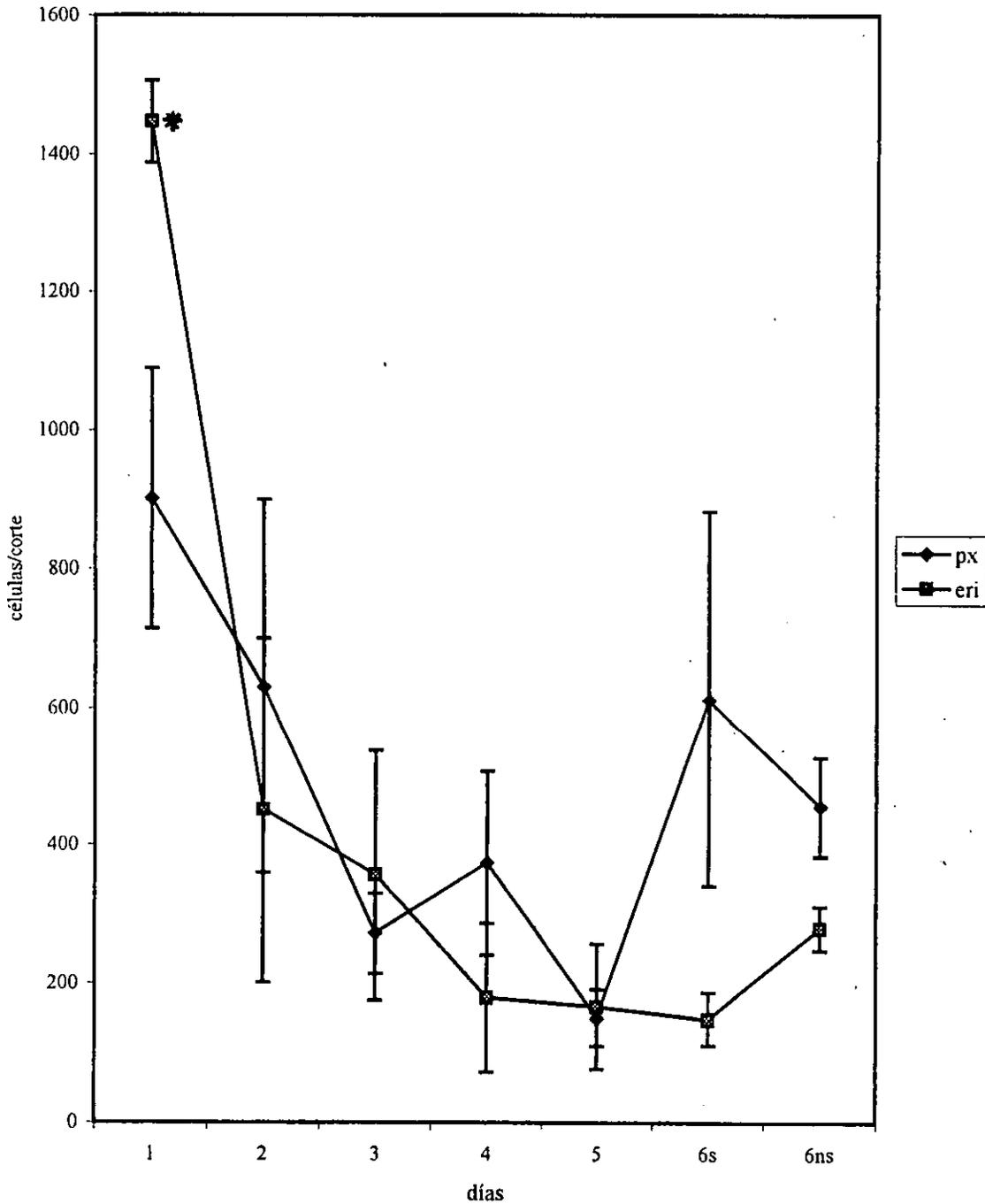


Figura 5. Población de las células positivas a peroxidasa y a eritrosina (cosinófilos) en el útero durante la preñez temprana en rata. El día 1 la población evaluada con eritrosina (*) es significativamente diferente con la población de células positivas a peroxidasa el mismo día y de los demás $p < 0.05$. Entre los días previos al día 6 no existen diferencias significativas entre ellos para ambas técnicas. El día 6 si presenta diferencias significativas entre ambas tinciones ($p < 0.05$) no así entre sitio y no sitio de implantación. ($8 \pm EE$, $n=4$)

Distribución de eosinófilos en las regiones uterinas

La proporción de eosinófilos detectados por eritrosina fue similar en las regiones uterinas antimesometrial, laterales y mesometrial ($p > 0.05$) Excepto el día 4 en que estas células son abundantes en la región lateral (tabla 3, figura 6).

Tabla 3. Distribución de células positivas a eritrosina por regiones uterinas durante la preñez temprana en la rata.

Zona uterina	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6 S	Día 6 NS
Antimeso	447.3± 54.4 (30.9)	140.35± 63.4 (32.58)	102.6± 48.66 (26.05)	45.4± 21.65 (16)	66± 30.05 (31.64)	49.55± 4.9 (33.6)	75.85± 49 (25.9)
Lateral	661± 87.7 (45.7)	210.35± 52.6 (46.43.8)	139.87± 51.4 (37.6)	181.3± 47.47 (69.7)	77.7± 30.08 (41)	59.4± 10.5 (39.34)	108.37± 71.1 (37.7)
Meso	338.1± 47.2 (23.38)	99.55± 34.95 (20.98)	113.65± 24.2 (36.2)	36.7± 9.67 (14.2)	49.15± 14.9 (27.2)	40.67± 6.87 (26.9)	95.1± 62.64 (36.3)

Número de células por corte ($8 \pm EE$), $n = 4$ ratas

Antimeso=antimesometrial, meso=mesometrial S=sitio, NS= No sitio

Las cifras en paréntesis significan los porcentajes por regiones.

La distribución de las células positivas a peroxidasa en las tres regiones uterinas designadas sólo varió significativamente ($p < 0.05$) los días 1 y en el intersitio del día 6, donde para estos días se puede observar una mayor proporción de las mismas en la región lateral. Para los demás días la distribución es similar entre las tres zonas. Sin embargo, hay que considerar que la región lateral le corresponde un área doble respecto a las otras zonas, lo que significa que estas regiones presentan menor densidad de células positivas a peroxidasa que las otras dos regiones. (Tabla 4, figura 7).

Tabla 4. Distribución de células positivas a peroxidasa en las regiones uterinas durante la preñez temprana en la rata.

Región	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6 S	Día 6 NS
Antimeso	262.57± 48.42 (28.8)	117.95± 34.21 (19.4)	91.95± 9.7 (34.1)	99.4± 30.68 (27.3)	56.05± 15.87 (35.7)	179.75± 29.66 (33.1)	141.35± 12.5 (31)
Lateral	400± 86.65* (44.2)*	268.65± 86.5 (42.63)	96.4± 14.34 (35)	143.1± 11.27 (42.7)	50.3± 6.9 (33.8)	275.4± 84.77 (43)	203.8± 26.23 (44.)
Meso	238.75± 47.64 (26.8)	243.44± 75.39 (37.95)	83.25± 9.8 (30.7)	104.6± 19.14 (29.9)	45.05± 6.6 (30.4)	157± 48.91 (23.7)	110.05± 4.17 (24.46)

Células por corte. ($8 \pm EE$, $n = 4$ ratas)

Los números en paréntesis son los porcentajes equivalentes

Antimeso= antimesometrial, meso=mesometrial, S= sitio de implantación, NS= no sitio de implantación

* diferente a las otras áreas

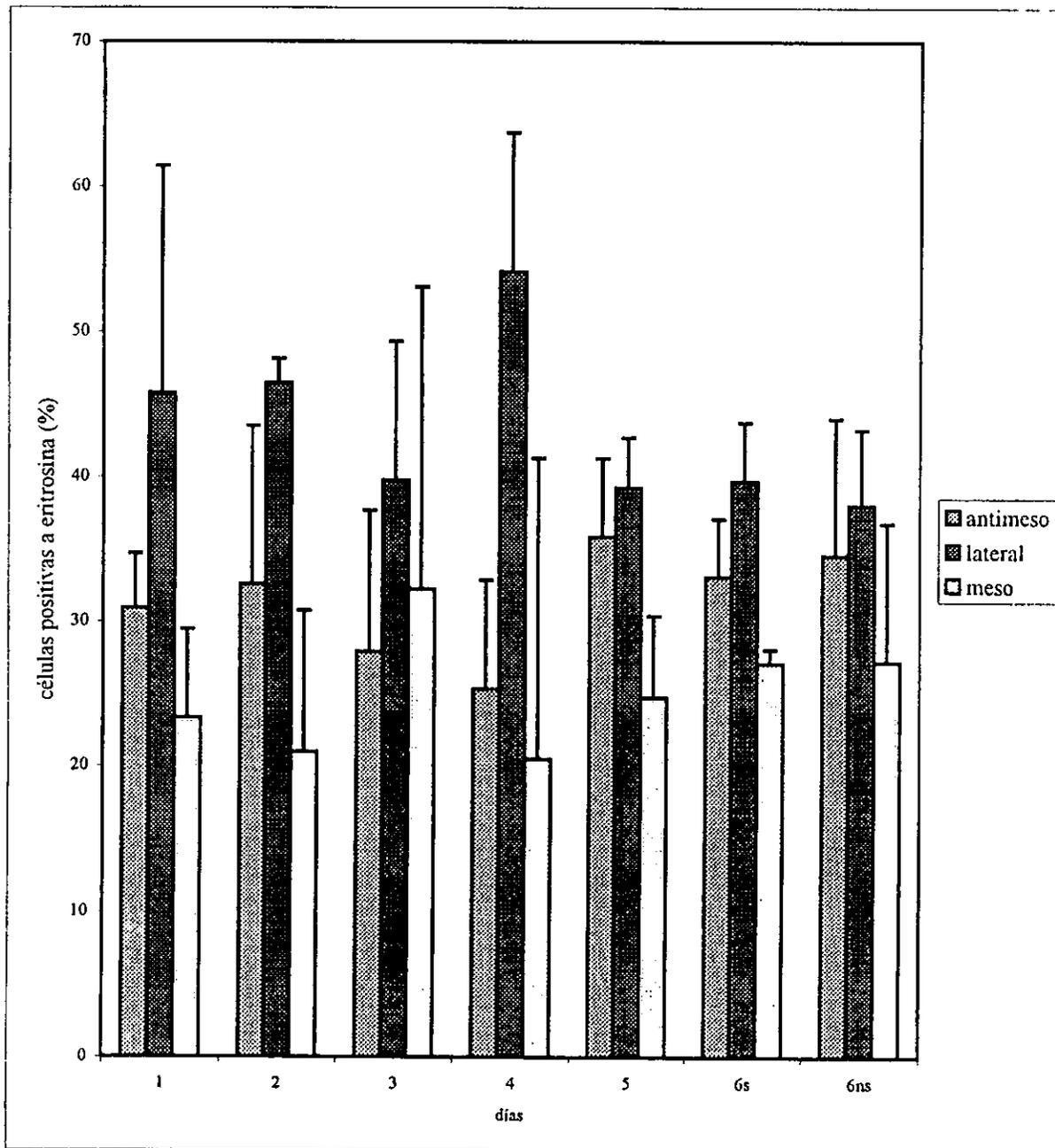


Figura 6. Distribución de células positivas a eritrosina (eosinófilos) en las regiones uterinas durante la preñez temprana en rata. El único día que presenta diferencia significativa ($p < 0.05$) es el día 4, donde el mayor porcentaje de células se presenta en las zonas laterales del útero para los demás días la distribución es casi uniforme. ($8 \pm EE$, $n=4$)

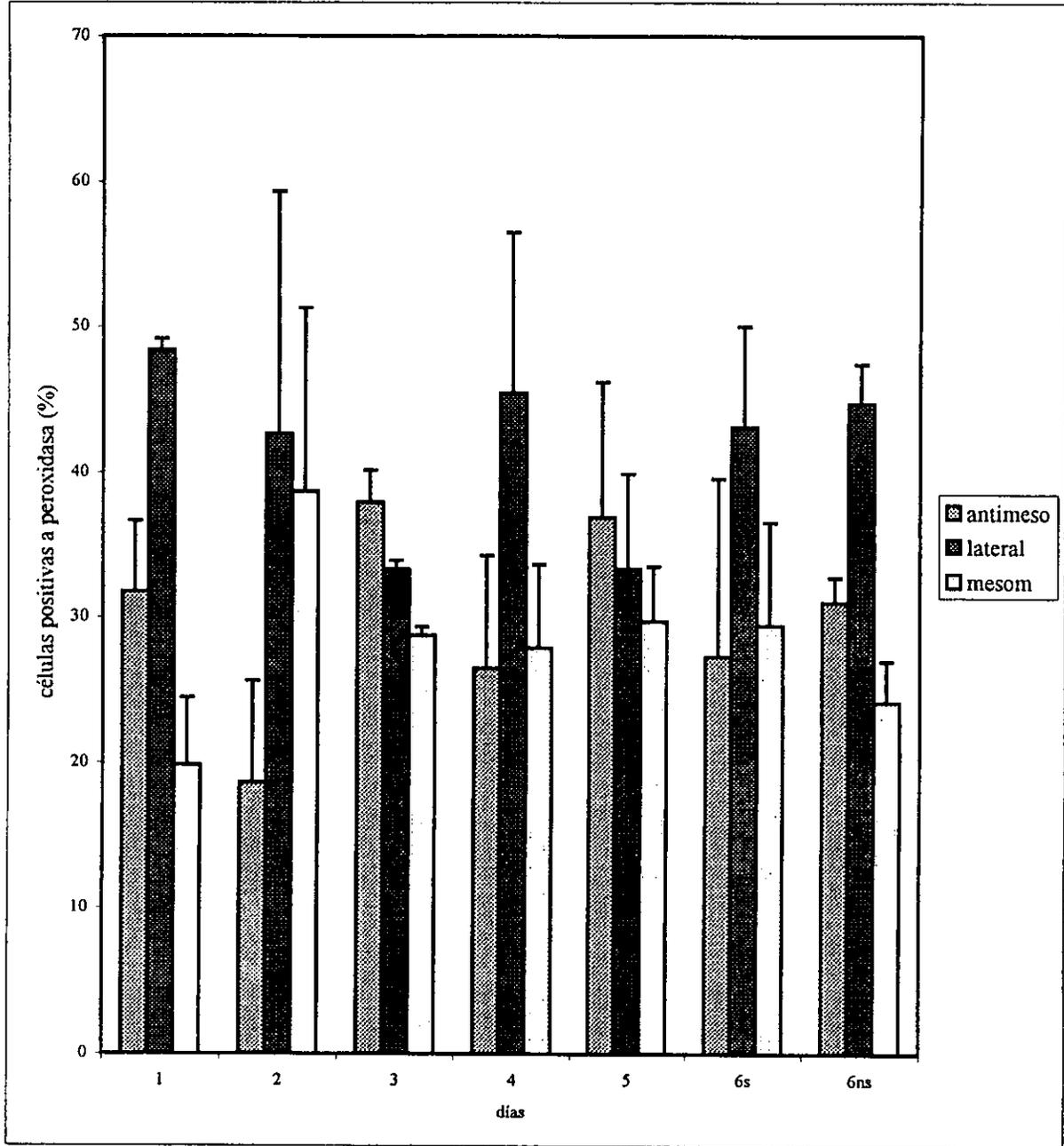


Figura 7. Distribución de las células positivas a peroxidasa en las regiones uterinas durante la preñez temprana en rata. ($8 \pm EE$, $n=4$ ratas)

Distribución de eosinófilos en las distintas capas uterinas.

La variación en la distribución de las poblaciones celulares detectadas con ambas técnicas es mas alta entre las capas de tejidos, la mayor cantidad de células se detectó en el estroma profundo y el miometrio longitudinal, siendo mayor en la primera capa ($p < 0.05$) (Tablas 5 y 6).

En el epitelio es donde se encuentra el menor número de células, para peroxidasa se presentan pocas células durante los primeros cuatro días siendo mayor el día 2, (5 para el día 1, 26 para el día 2, 2 para el día 3, 0.2 para el día 4), sin que se vuelvan a presentar en este tejido (figura 2). Con eritrosina el epitelio solo presentó eosinófilos los días 1,2 y 5 aunque en muy baja proporción. Las demás capas mantuvieron su población casi constante además de baja y aunque el miometrio circular presenta variaciones entre los días no son importantes, y el estroma superficial presenta un comportamiento similar a través de todos los días no habiendo variación notable en esta capa uterina.

Con la tinción de eritrosina se puede observar que los primeros cinco días la mayor cantidad de eosinófilos se detectó en el estroma profundo, mientras que en el día 6 el mayor número de eosinófilos se encuentra en el miometrio longitudinal. También se pueden observar variaciones en la distribución entre la zona y la interzona de implantación del día 6, donde la proporción de eosinófilos o células positivas a eritrosina es mayor en el miometrio longitudinal para la zona de implantación, manteniéndose casi igual para la interzona (figura 8).

Con la técnica de peroxidasa también se presentan diferencias entre los tejidos, la mayor cantidad de células positivas a peroxidasa se encuentra en el estroma profundo y el miometrio longitudinal, por lo general la proporción de estas células en ambas capas es similar a excepción del día 5, en que es mayor en el miometrio longitudinal (figura 9). Con la reacción de peroxidasa en términos generales se detectó una mayor proporción de eosinófilos en el miometrio longitudinal que la detectada con eritrosina.

Con eritrosina es curioso observar que en el sitio de implantación del día 6 la proporción de células es ligeramente mayor en el miometrio longitudinal que en el estroma profundo, en el no sitio la proporción se mantiene casi igual entre ambas capas. Con peroxidasa no se observan estas variaciones. Lo más relevante es que no hay diferencia entre el sitio y no sitio de implantación del día 6 en cuanto a cantidad y distribución por regiones ni por capas.

Tabla 5. Distribución de células positivas a eritrosina en las capas uterinas durante la preñez temprana en rata.

Tejido	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6 S	Día 6 NS
Epitelio	0.8±0.7 (0.8)	0.13±0.13 (0.02)	0	0	0.06±0.06 (0.12)	0	0
Estroma Superficial	231.66±62.9 (11.24)	20.4.8±3.5 (4.3)	16.22±6.73 (3.2)	10.73±8 (2.6)	4.2±1.6 (2)	5.53±2.6 (2.8)	12.06±4.39 (3.5)
Estroma Profundo	1135.4±225 (57.77)	342±80.89 (56.56)	253.46±63.4 (52.12)	191.4±110.7 (50.4)	139.13±22.2 (56.23)	71.66±15.84 (36.5)	149.73±38.2 (43)
Miometrio Circular	233.4±49.3 (11.27)	64.13±14.1 (9.86)	17.06±1.84 (2.96)	10.53±0.7 (3.4)	14.4±3.4 (6.1)	8.03±1.9 (3.6)	29.03±8.5 (3.9)
Miometrio longitudinal	327.4±54.9 (19.57)	169.2±37.5 (29.21)	188.1±30.05 (41.5)	138.5±66 (43.22)	99.26±15 (35.4)	114.3±5 (56.9)	181.6±8.9 (48.9)

Células por corte $8 \pm EE$, n=4 ratas S=sitio de implantación, NS=no sitio de implantación
Las cifras en paréntesis son los porcentajes equivalentes

Tabla 6. Distribución de células positivas a peroxidasa en las capas uterinas durante la preñez temprana en la rata.

Tejido	Día 1	Día 2	Día3	Día4	Día5	Día6 S	Día6 NS
Epitelio	5.86± 1.6 (0.5)	26.86± 20.7 (2.77)	2.4± 1.83 (0.6)	0.2± 0.03 (0.01)	0	0	0
Estroma Superficial	101.96± 45.2 (8.02)	29.66± 11.9 (4.07)	23± 4.02 (6.55)	15.46± 4.5 (3.34)	2.8± 1.2 (0.97)	38.93± 17.06 (3.97)	31.46± 11.13 (5.12)
Estroma Profundo	477.06± 145.2 (40.72)	308.8± 84.26 (38.55)	182.46± 17.9 (47.25)	214.06± 59.3 (44.67)	60.53± 8.6 (30.25)	346.13± 130.2 (38.47)	226.3± 72.3 (36.8)
Miometrio Circular	187.6±77.5 (15.66)	174.8± 28.98 (14.46)	13.6± 3.84 (3.7)	17.6± 3.4 (3.66)	6.93± 2.05 (2.7)	102.4± 10.69 (12.19)	54.73± 5.6 (8.9)
Miometrio Long.	429.26± 108.6 (35.07)	299.4± 80.8 (36.05)	140.12± 7.5 (41.6)	215.6± 12.12 (47.37)	131.33± 13.9 (65.04)	328.9± 16.7 (45.35)	292.4± 32.5 (49.09)

Células por corte $8 \pm EE$. n=4 S=sitio de implantación, NS= no sitio de implantación
Las cifras en paréntesis corresponden a los porcentajes equivalentes

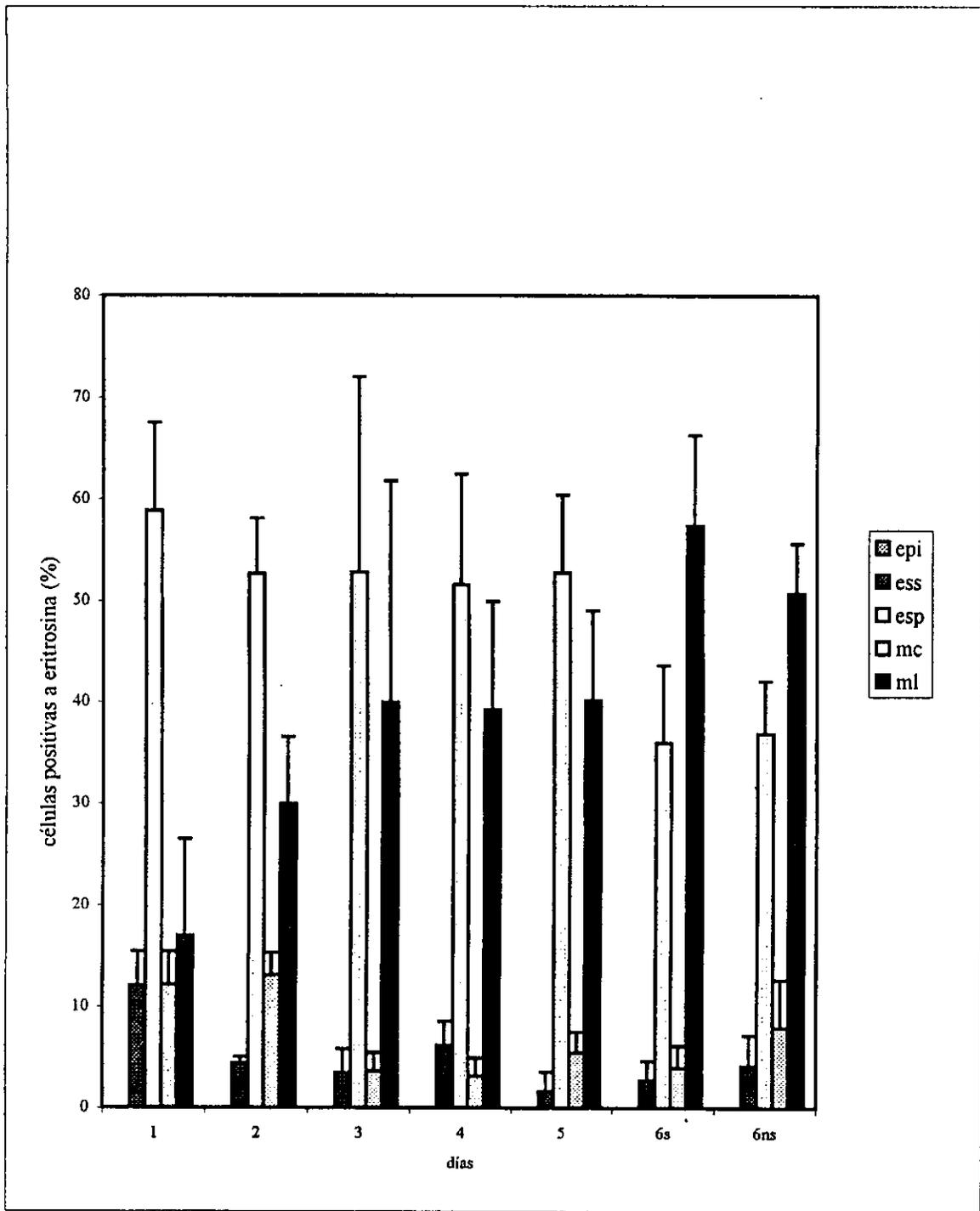


Figura 8. Distribución de células positivas a eritrosina (eosinófilos) en las capas uterinas. La mayor proporción de eosinófilos se encuentra en el estroma profundo y el miometrio longitudinal ($p < 0.05$). En los días 1 y 2 se presentan la mayor proporción de eosinófilos en el estroma profundo siguiendo el miometrio transverso, al paso del tiempo la relación se va invirtiendo, encontrándose los eosinófilos en igual proporción en el miometrio longitudinal con respecto al estroma profundo a partir del día 3, sólo en el sitio de implantación del día 6 la mayor proporción de eosinófilos se encuentra en el miometrio longitudinal. ($8 \pm ee$, $n=4$ ratas)

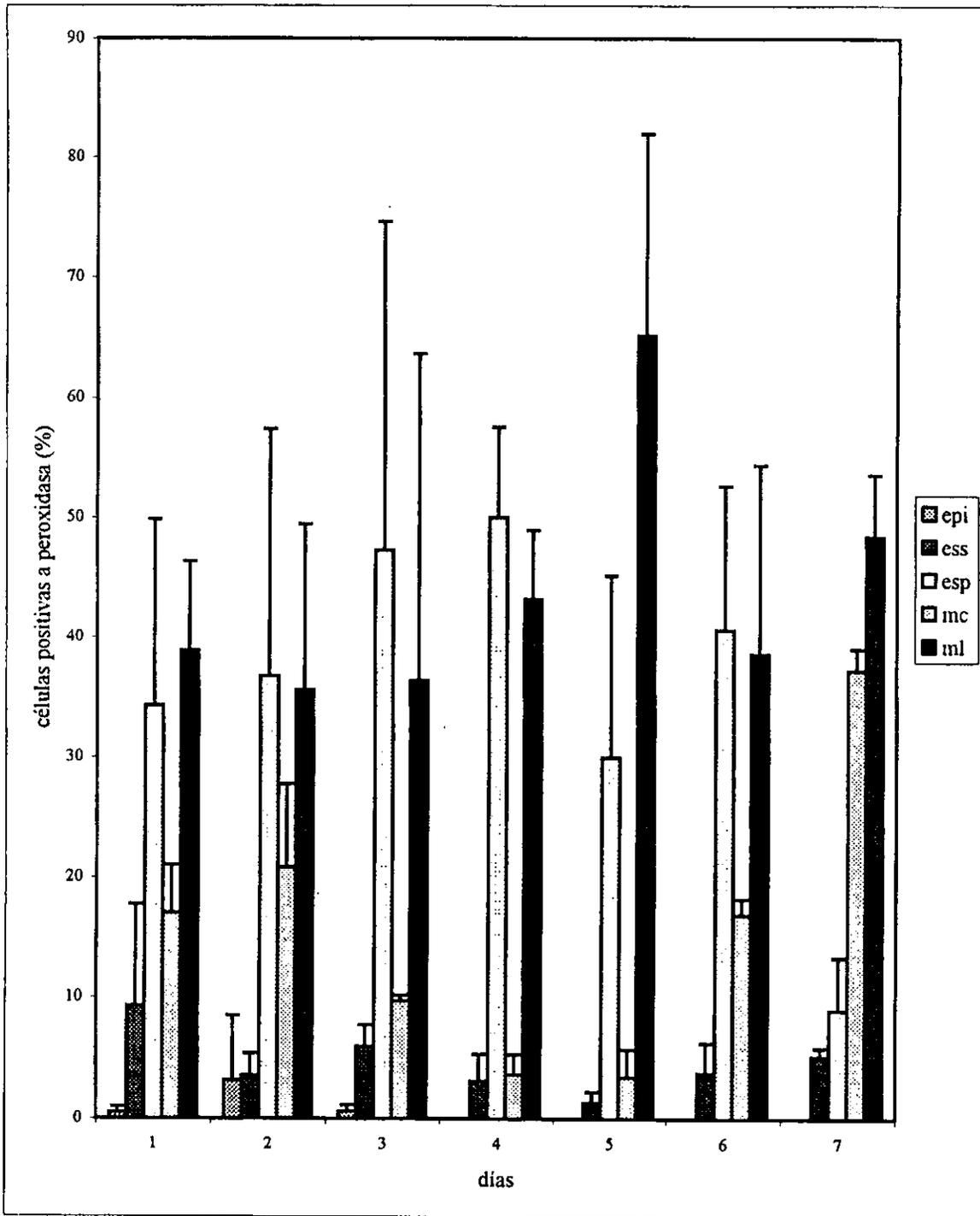


Figura 9. Distribución de células positivas a peroxidasa en las capas uterinas de rata durante la preñez temprana. La mayor prevalencia celular ($p < 0.05$) se encontró en el estroma profundo (esp) y en el miometrio longitudinal (ml), nótese que para esta técnica se detectan pequeñas cantidades de células positivas a peroxidasa durante los tres primeros días en el epitelio (ep). Las poblaciones en estroma superficial (ess) y en el miometrio circular (mc) son muy pobres aunque varían a través del tiempo.

DISCUSION

En este trabajo se determinó la población de eosinófilos en el tejido uterino y la distribución de la peroxidasa que se supone proviene principalmente de esta población de células durante la preñez temprana en la rata, la presencia de eosinófilos durante este periodo ha sido parcialmente detectada en otros trabajos. En este reporte se encontró que existe variación a través de los días que al parecer no es dependiente de los estrógenos y que la peroxidasa uterina en este estado no solo proviene de la eosinofilia uterina.

Aunque la mayor proporción de la población de eosinófilos se encuentra en la circulación periférica y migran a los tejidos en donde realizan diversas funciones, también se les puede localizar abundantemente en condiciones fisiológicas especiales como en el útero durante la fase de estro, así como en patológicas (infestación helmíntica, enfermedad de Hodking, síndrome de Sezary y reacciones de hipersensibilidad (Weller, 1984).

La respuesta inflamatoria que ocurre en los sitios con infiltración eosinófilica es favorecida por la liberación extracelular de los constituyentes de los gránulos preformados de los eosinófilos. Siendo uno de los componentes principales de ellos es la peroxidasa. Por lo que se ha sugerido que la mayor parte de la peroxidasa de los tejidos con eosinófilos es debida a estas células. Organos como el intestino, el estómago, el bazo y el pulmón también presentan una alta actividad a esta enzima, lo que sugiere que esta mayor actividad puede ser reflejo de tejidos con alta renovación celular.

En el útero, el número de eosinofilos varía con el ciclo estral. El mayor número se presenta en la fase de estro y el menor en el diestro, observándose un aumento después de la administración de estrógenos. Se ha calculado la cantidad de eosinófilos en el útero completo, la cifra determinada en la fase de diestro fue de 150,000 y de 8,000,000 en el estro, también se ha reportado que en el útero de la preñez tardía y en el de ratas inmaduras los eosinófilos están ausentes. (Ryotoma y Teir 1961, Ross 1966, Henderson 1991).

No obstante estar bien determinada la cinética de la eosinofilia y la actividad de la peroxidasa dependientes de estrógenos, aún existen controversias acerca del origen del mayor aporte de la enzima como una respuesta del útero a ellos. Se concluye que la cantidad principal de peroxidasa es proveniente de los eosinófilos y también se sugiere que durante la preñez la existencia de eosinófilos es casi nula. (Lyttle 1991). Otros autores proponen la existencia de dos

fuentes de la peroxidasa dependiente de estrógenos: la de los eosinófilos y la producida por el epitelio uterino (Lee 1982, Anderson y col. 1986, Gabriel y col. 1986).

En estudios relacionados con células inmunes como linfocitos, monocitos, macrófagos y granulocitos durante el período preimplantacional se le da mayor importancia a la presencia de neutrófilos básicamente por su conocida capacidad de secretar interleucinas sin considerarle mayor importancia a los eosinófilos (Mamata De y col. 1991, Mc Master y col. 1992, 1993; Brandon 1993, Hunt 1994, Mathur y Kennedy 1994, Robertson y col. 1996). De acuerdo a estos trabajos los monocitos y neutrófilos están asociados al sitio de implantación y los neutrófilos asociados al epitelio luminal (McMaster y col. 1993). También se ha demostrado la variación de las células plasmáticas en el embarazo desde el día 1 hasta el día 5, siendo casi el doble éste último día (Parr y Parr 1985).

Nuestros resultados demuestran la presencia de eosinófilos durante la preñez temprana, y su predominio durante los primeros dos días, lo cual coincide con algunos autores, aunque ellos lo asocian a la respuesta inflamatoria que se presenta como una reacción al semen y/o al espermatozoide o a la presencia de bacterias en el útero después del coito (McMaster y col. 1992, Upadhyay 1995, Parr y Parr 1985).

Asimismo, se ha demostrado que existe variación en la distribución de células de tipo inflamatorio, principalmente macrófagos, que durante la preñez temprana cambia de la región subepitelial del estroma hacia la periferia en la unión endometrio-miometrio, que en este trabajo se denominó estroma profundo. Sin embargo sólo se detectaron los primeros cuatro días de embarazo y con respecto a los eosinófilos solo se menciona una distribución “similar a las células productoras de citocinas” o que los eosinófilos se localizan en la periferia de los nódulos deciduales. (Tachi y Tachi 1992, Mc Master y col. 1992, Kachkache y col. 1991, Brandon 1993).

En este trabajo se observa el mayor número de eosinófilos en el estroma o unión estroma-miometrio durante los primeros 6 días de la preñez en la rata, etapa en que los “nódulos deciduales” aún no se han establecido.

Se ha reportado un aumento en la actividad de la peroxidasa los días 4 y 5 de preñez en la rata, lo cual puede estar correlacionado con el incremento en la concentración de estrógenos necesario para preparar el útero preimplantacional. (Sinhg y col, 1996; Baiza y col, en prensa). Como se mencionó anteriormente, se atribuye que el mayor aporte de la peroxidasa uterina es por los eosinófilos, en este trabajo se estudiaron los cambios en su población en la preñez temprana y

se encontró que no cambia en forma paralela a la actividad de peroxidasa. Al contrario, el día 5 cuando hay máxima actividad de la enzima la población de eosinófilos es menor; lo que indica la existencia de una peroxidasa endógena que podría provenir principalmente de las células epiteliales glandulares y lumbinales. Se logró observar la presencia de eosinófilos degranulándose durante el día 5, esto podría ayudar a explicar la disminución de células positivas a peroxidasa para este día, pues quizá muchas de éstas ya no contaban con la enzima y no pudieron ser detectadas con diaminobencidina, sin embargo esto pudiera ser factible si se observara un gran número de células positivas a eritrosina que es prácticamente específica para eosinófilos, pues se pega a la proteína básica mayor que es producida solo en los eosinófilos. Esto no fue así, pues no hubo diferencias estadísticas de los días 4 y 5 con respecto a los demás a excepción del día uno. Esto es, no ocurre eosinofilia uterina durante estos días y por lo tanto el aumento de esta enzima proviene de otras fuentes. Asimismo se logró observar que con el uso de las dos tinciones simultáneamente se detectaron células positivas a ambas tinciones y también células positivas a eritrosina pero no a peroxidasa lo que nos asegura que la célula es un eosinófilo sin peroxidasa que probablemente ya degranulo o que carece de peroxidasa activada por los estrógenos. (Datos no publicados, Verdín y Baiza, 1996).

Ya se ha reportado la activación de la peroxidasa en el epitelio vaginal en un útero inmaduro sensibilizado con estrógenos exógenos y la presencia de peroxidasa en el epitelio luminal durante el estro. (Brokelmann y Fawcett 1969, King y col. 1981, Andersson y Fosberg 1988), pero no se había reportado la reactividad del epitelio glandular a la peroxidasa durante la preñez temprana e inclusive se menciona que las células epiteliales son negativas a esta enzima durante el embarazo (Lyttle 1991). Sin embargo, en este trabajo se encuentra al epitelio positivo a peroxidasa los días 1,2,3 y 4, lo que nos sugiere un aporte de la enzima por este tejido y que esta enzima tiene diversas fuentes durante la preñez temprana, no siendo la eosinofílica la de mayor prevalencia.

Además, debería esperarse como se ha reportado, un aumento de la eosinofilia uterina después del pico preimplantacional de estrógenos durante la preñez. Sin embargo, en este trabajo no se detecta un aumento en la población de eosinófilos en el día 5, sino uno muy discreto en el día 6 cuando ocurre la implantación, no existe hasta el presente ningún trabajo donde se evalúe la relación entre la cantidad de eosinófilos durante la preñez temprana y el aumento de estrógenos necesarios para la implantación en la rata. De acuerdo a nuestros resultados la acción de los

estrógenos durante la preñez temprana induce un aumento en la peroxidasa que no es acompañada por un cambio paralelo o simultáneo con el número de eosinófilos, a diferencia de lo que ocurre cuando esta hormona actúa sobre el útero no preñado.

La diferencia de la población de células migratorias positivas a peroxidasa con respecto a las positivas a eritrosina, durante el día 6 de preñez, nos indica que existen células positivas a peroxidasa que pueden ser diferentes a los eosinófilos. La detección de macrófagos con una ligera reacción positiva a la peroxidasa durante este día podría ser indicativa que estas células además de los eosinófilos también participan en el aporte de la enzima. Si bien es cierto que se ha reportado cierta reactividad a la peroxidasa por parte de los eritrocitos y que en este trabajo también se registró, las células dentro de los vasos sanguíneos no fueron contadas, además de que los animales fueron perfundidos, la mayor diferencia entre el número de células fue dada por el estroma profundo. Lo mismo sucede con las células positivas a peroxidasa registradas en el epitelio durante el día 2 si bien su porcentaje es bajo con esta técnica, la cantidad de eosinófilos detectados con eritrosina fue nula en esta capa tisular, presentando una evidencia más de que existen otras células migratorias diferentes de los eosinófilos que durante el embarazo producen esta enzima. Se ha reportado un aumento de macrófagos durante el embarazo que se presenta a partir del día 3 y se mantiene alto hasta el 8, esto nos podría ayudar a explicar el aumento de células positivas a peroxidasa diferentes de los eosinófilos (Mamata y col., 1997).

Ahora bien, el papel biológico de la peroxidasa dependiente de estrógenos aún está en estudio, existen diversas hipótesis: Tchertnitchin (1973) especula que los estrógenos se unen a la peroxidasa de los eosinófilos para participar como un intermediario en el acarreamiento de electrones e hidrógeno en los procesos oxidativos esenciales uterinos. Lyttle (1991) propone que la peroxidasa puede participar como agente antimicrobiano, o como un metabolizador de los estrógenos, María Pérez y col. (1996) sugieren que los gránulos de los eosinófilos pueden proveer las enzimas necesarias para una remodelación del estroma, Farley y col. (1992) proponen que puede mediar la conversión del estradiol a catecol-estradiol y facilitar la hiperemia uterina dependiente de estrógenos.

El verdadero papel aún está por determinarse, sin embargo, si se observa que las células positivas a peroxidasa se ven aumentadas durante el día de la implantación podría pensarse que su acción es más local y que podría estar íntimamente relacionada a la remodelación de los tejidos y aún más probablemente a un simple papel protector de la peroxidasa como agente bacteriostático

del útero, pues no se encontraron diferencias entre sitios y no sitios de implantación, ni en el número de eosinófilos ni en el número de células positivas a peroxidasa. Esto indica que los cambios uterinos propios de la receptividad endometrial o de la respuesta del útero a la presencia del blastocisto como el aumento de la vascularidad no es tan dependiente de la peroxidasa de los eosinófilos.

Es importante entonces considerar el papel que puede tener la peroxidasa, no tanto la eosinofilia, durante el período previo a la implantación embrionaria, ya que esta enzima si aumenta durante la fase de receptividad uterina a pesar de que probablemente no provenga de los eosinófilos.

CONCLUSIONES

No se observó aumento de la población de células positivas a peroxidasa o a eritrosina durante el período de preñez temprana asociada al aumento preimplantacional de estrógenos en la rata.

Se sugiere que durante la preñez no existe una inducción por estrógenos a la eosinofilia uterina al menos para la cepa utilizada.

La población de eosinófilos detectada por eritrosina o por la reacción a la peroxidasa es mayor los días 1 y 2 de preñez, posiblemente como una respuesta de tipo inflamatorio poscoito.

El aumento reportado en la actividad de peroxidasa en el útero el día de receptividad endometrial (5 de preñez) no es acompañado por un cambio simultáneo en la población de eosinófilos por lo que deben estar implicadas otras células en él.

La población de eosinófilos es mayor en el estroma profundo y en el miometrio longitudinal del útero durante los primeros días de preñez estudiadas.

Existe una diferencia entre las poblaciones de células positivas a eritrosina y células positivas a peroxidasa el día 6 de preñez, siendo mayor esta última, indicando otra probable fuente de a peroxidasa diferente de los eosinófilos.

En los cambios metabólicos y morfológicos uterinos en el sitio de implantación pueden no intervenir los eosinófilos ya que no se encontraron diferencias en las poblaciones de eosinófilos o de células positivas a peroxidasa en los sitios de implantación con respecto a los intersitios.

BIBLIOGRAFIA.

- Affleck A., Keeping H.S., Newcombe A.M., Jellinck P.H.** Distribution of oestrogen-induced peroxidase in the rat uterus. *Acta Endocrinol. (Copenh)* 1981 98(4): 609-613.
- Anderson W.A., Gabriel B.W., Nerurkar S.G., Wyche J.H., Yates P.E., Hanker J.S.** Peroxidases induced in rat uterus by estrogen administration II. Cytochemical and Biochemical heterogeneity. *J.Submicrosc. Cytol.* 1986 18(4): 683-690.
- Anderson C., Fosberg J.G.** Induction of estrogen receptor, peroxidase activity, and epithelial abnormalities in the mouse uterovaginal epithelium after neonatal treatment with diethylstilbestrol. *Teratog. Carc. Mut.* 1988 8:347-361
- Aplin J.S.** The Cell Biology of Human Implantation. *Placenta* 1996 17:269-275
- Baiza-Gutman, L.A., Flores-Sánchez M.M., Díaz-Flores M, Hicks-Gómez J.J.** (en revisión). Presence of uterine peroxidase activity in the rat during early pregnancy. *Inf. J. Biochem.& Cell Biol.*
- Ball P., Knuppen R.** Formation, metabolism, and physiologic importance of catecholestrogens. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1990 163(6-2): 2163-2170.
- Brandon J.M.** Leucocyte distribution in the uterus during the preimplantation period of pregnancy and phagocyte recruitment to sites of blastocyst attachment in mice. *J. Reprod. Fert.* 1993 98:567-576
- Benitez-Bribiesca L., Perez-Astudillo, Freyre-Horta R.** Tinción histoquímica para la proteína básica mayor mediante eritrocina B alcalina, en granulocitos eosinófilos y espermatozoides. *Arch Invest. Méd.* 1987 18:213-218
- Bibhash C.P., Chakraborty C., Dey S.K.** Catechol estrogen formation in the mouse uterus and its role in implantation. *Mol. Cell Endocrinol* 1990 69:25-32
- Brökelmann J., Fawcett D.W.** The localization of endogenous peroxidase in the rat. Uterus and its induction by estradiol. *Biol. Reprod.* 1969 1:59-71
- De M, Sanford T.R., Wood G.W.** 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.
- Denker H.W.** (1990). Trophoblast-endometrial interactions at embryo implantation: a cell biological paradox. In: *Trophoblast Research*. Ed. Hans Denker y Aplin J.D. Plenum Pub. Vol.4 PP 3-29.

- Enders A.C.** Anatomical aspects of implantation. *J. Reprod. Fert.* 1976 25:1-15.
- Farley D.B., Ford S.P., Rosazza P.N.** Increase in uterine peroxidase activity in the rat uterus during oestrogen hyperemia. *J. Reprod. Fert.* 1992 95:551-558.
- Gabriel, BW, Eckberg W.R, Wyche J.H., Meones H., Hanker J.S., Anderson W.A.** Peroxidases induced in rat uterus by estrogen administration. I. Synthesis, secretion and immunofluorescent demonstration of fluid enzymes. *J. Submicrosc. Cytol* 1986 18(4): 673-682.
- Guzman-Grenfell M, Baiza-Gutman L.A., Hicks-Gómez J.J.** Sistemas moleculares en las interacciones celulares II. Implantación embrionaria en mamíferos. *Ginecol. Obstet. Mex.* 1993 61:22-25.
- Hosoya T., Saito T.** Comparative studies on estrogen-dependent peroxidase contained in uterine microsomes and fluid of rat and pigs. *J. Biochem.* 1981 89:203-215.
- Ionov I. D.** The mast cell system in reproductive toxicology. *Reproductive Toxicology* 1990 4:251-255.
- Hunt J. S.** Immunologically Revelant Cells in the uterus. *Biology of Reprod.* 1994 50:461-466.
- Jellinck P. H., Newcombe A. M.** Induction of uterine peroxidase: correlation with estrogenic activity. *J. Steroid Biochem* 1977. 8:1193-1195.
- Jellinck P.H., Newcombe A.M.** Effect of catechol estrogens and estriol on the induction of uterine peroxidase. *J. Steroid Biochem* 1980. 13:681-683.
- Jensen and DeSombre E.R.** Mechanism of action of the female sex hormones. *Ann. Rev. Biochem.* 1972 41:203-230
- Kachkache M, Acker G.M., Chatouat, Noun A., Garabedian M.** Hormonal and local factors control the immunohistochemical distribution of immunocytes in the rat uterus before conceptus implantation: Effects of ovariectomy, fallopian tube section, and injection. *Biol. Reprod.* 1991 45: 860-868
- Kiernan J.A.** (1990). *Histological & Histochemical methods. Theory and Practice.* Pergamon Press 2ª. Edi. New York USA.
- Kimura S., Elce J.S., Jellinck P.H.** Immunological relationship between peroxidases in eosinophils, uterus and other tissues of the rat. *Biochem J.* 1983 21(31): 165-169.
- King W.J., Allen T.C., DeSombre E.R.** Localization of uterine peroxidase activity in estrogen-treated rats. *Biol. Reprod.* 1981 25:859-870.

- Keeping H.S., Jellinck P.H.** Role of estrogen-induced peroxidase in metabolism of estradiol in vivo. *J. Steroid Biochem.* 1978 8:1049-1054.
- Keeping H.S., Lyttle C.R.** Monoclonal antibody to rat uterine peroxidase as being of eosinophil origin. *Biochem. Biophys. Ac.* 1984 802:309-406.
- Lee S.H.** Uterine epithelial and eosinophil estrogen receptors in rats during the estrous cycle. *Histochemistry* 1982 74(4): 443-452.
- Leiva M.C., Qin X, Galman M., Lyttle R.** Ontogeny of production of an estrogen-regulated eosinophil chemotactic factors in the rat uterus. *Biol. Reprod* 1991 45:818-893
- Lyttle C.R., Teuscher C. Medlock K.L., Sheehan D.M.** Estradiol-stimulated increases in uterine eosinophils and nuclear type II estrogen-binding sites are prevented by pertussi toxin. *Endocrinol.* 1989 125(5): 2773-2779
- Lucas F.V., Neufeld H.A., Utterback J.G., Martin A.P., Stotz E.** The effect of estrogen on the production of peroxidase in the rat uterus. *J. Biol. Chem.* 1955 214:755-780.
- Lyttle C.R., Teuscher C., Medlock K.L., Sheehan D.M.** Estradiol-stimulated increases in uterine eosinophils and nuclear type II estrogen-binding sites are prevented by Pertussis toxin. *Endocrinol.* 1989 125(5): 2773-2779.
- Mata Santibañez M.V.** (1997). Regulación hormonal de las citocinas derivadas de eosinófilos y células en el útero de rata adulta. Tesis Maestría. UNAM, Campus Iztacala.
- McMaster M.T., Newton R.C., Dey S.K., Andrews G.K.** Activation and distribution of inflammatory cells in the mouse uterus during the preimplantation period. *J. Immunol.* 1992 148(6): 1699-1705
- MacMaster M.T., Dey S.K. Andrews G.K.** Association of monocytes and neutrophils with events of blastocyst implantation in mice. *J. Reprod. Fert* 1993. 99:561-569
- MacNabb T., Jellinck P.H.** Origin of oestrogen-induced uterine peroxidase. *J. Endocr.* 1974. 62:415-416.
- Mamata De, Choudhuri R. Wood G.W.** Determination of the number and distribution of macrophages, lymphocytes, and granulocytes in the mouse uterus from mating through implantation. *J. Leuk. Biol* 1991. 50:252-262
- Moulton B.C., Koenig B.B.** Biochemical responses of the luminal epithelium and uterine sensitization. *Ann. New York Acad. Sci* 1986. 476:95-109.

- Newbold R.R., Jellinck P.H., Metzler M, McLachlan J.A.** Ontogeny of peroxidase activity in epithelium and eosinophils of the mouse uterus. *Ter. Carc. and Mut.* 1992 11:267-278.
- Orlando-Mathur C.E., Kennedy T.G.** An Investigation the role of neutrophils in decidualization and early pregnancy in the rat. *Biol. Reprod* 1993. 48:1258-1265
- Olsen R.L. Lyttle C.** Comparative studies on oestrogen-induced rat uterus peroxidase and rat eosinophil peroxidase. *Biochem* 1982. J. 207:613-616.
- Parr M.B., Parr L.** Immunochemical localization of immunoglobulins A,G, and M in the mouse female genital tract. *J. Reprod. Fert* 1985. 74: 361-370
- Psychoyos A.** Hormonal control of uterine receptivity for nidation. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 1976 25:12-28
- Psychoyos A.** What's its Receptivity? *Ann. New York Acad. Sci* 1986. 476:110-127.
- Robertson S.A., Maryhofer G., Seamarck R.F.** Ovarian steroid hormones regulate granulocyte-macrophage colony-stimulating factor synthesis by uterine epithelial cells in the mouse. *Biol. Reprod.* 1996 54:183-196.
- Ryotoma T.** Relationship between tissue eosinophils and peroxidase activity. *Nature* 1987 4799: 271-272
- Sauer M.J.** Hormone involvement in the establishment of pregnancy. *J. Reprod. Fert* 1979 56:725-743.
- Singh M.M., Trivedi R.N., Chauhan S.C., Srivasta M.L., Makker A., Chowdhury S.R., Kamboj P. J.** Uterine estradiol and progesterone receptor concentration, activities of certain antioxidant enzymes and dehydrogenases and histoarchitecture in relation to time of secretion of nidatory estrogen and high endometrial sensitivity in rat. *Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 1996 59(2): 215-224
- Tabibzadeh S., Babaknia A.** The signals and molecular pathways involved in implantation, a symbiotic interaction between blastocyst and endometrium involving adhesion and tissue invasion. *Mol. Hum. Rep.* 1995. 10(6): 1579-1602
- Tchertintchin A.** Fine structure of rat uterine eosinophils and the possible role of eosinophils in the mechanism of estrogen action. *J. Steroid Biochem* 1973. 4:277-282
- Tchernitchin A., Roorijck, Tchernitchin X., Vandehende J., Galand P.** Dramatic early increase in uterine eosinophils after oestrogen administration. *Nature* 1974 248: 142-143

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

Tchernitchin X. Tchernitchin A. Galand Dynamics of eosinophils in the uterus after oestrogen administration. *Differentiation* 1976 5:151-154.

Upadhyay S. Reproductive tract immunity for the control of fertility: New strategies for immunocontraception. *Muc Imm, Up.* 1995 4:176-177

Apéndice 1

Técnica Histoquímica para la detección de peroxidasa con diamonobencidina (DAB)

1. - Cortar transversalmente los cuernos uterinos en anillos de 1-2 mm de grosor.
2. - Fijar con paraformaldehído al 4% en amortiguador de fosfatos o PBS por 2 h
3. - Lavar en amortiguador de fosfatos o PBS por 24 h a 4 ° C.
4. - Incubar con DAB+ H₂O₂+NiCo 2 h en baño de agitación a 37°C
5. - Lavar con amortiguador de fosfatos
6. - Procesamiento histológico de rutina para inclusión en Paraplast
7. - Corte al microtomo a 5 µm
8. - Contratación con hematoxilina de Harris 5'

Reactivos para histoquímica con diaminobencidina para peroxidasa

Solución reveladora

Orto-diaminobencidina (Sigma Chem.) 25 mg

Amortiguador de fosfatos (PBS) 50 ml

Mezclar y agitar 40' en frasco oscuro

Filtrar

Solución de NiCo

Cloruro de níquel 20 mg

Cloruro de cobalto 20 mg

Agua destilada 2 ml

Mezclar antes de usar

Solución H₂O₂

Peróxido de hidrogeno 33 µl

Agua destilada 967 µl

Preparar solución fresca

Solución de sustrato (DAB+H₂O₂+NiCo)

20 ml DAB + 0.6 ml sol de NiCo + 100 µl H₂O₂

Agua c = agua corriente o de la llave OH= alcohol p.r. = paso rápido

Apéndice 2

Técnica de Inclusión en Parafina

Agua corriente 1hr

Alcohol 70% 1hr

Alcohol 80% 1hr

Alcohol 90% 1hr

Alcohol 100% 1hr

Aceite de cedro 24hr

Parafina I 2hr

Parafina II 2hr

Inclusión en paraplast

Apéndice 3

Técnica de tinción con eritrosina para proteína básica mayor de los eosinófilos

Desparafinar

Xilol I 5'

Xilol II 5'

Hidratar

OH 100 1'

OH 90 1'

OH 80 1'

OH 70 1'

Agua c 5'

Tinción

Hematoxilina de Harris 1'

Agua c p.r.

Carbonato de litio 0.5% paso rápido (p.r.) (a virar a azul)

Agua dest. 3 baños en p.r.

Eritrosina 30'

Deshidratación

OH 70 15'

OH 96 2'

OH 100 2'

OH 100 2'

Xilol I 5'

Xilol II 5'

Solución de eritrosina

Eritrosina I.C. 45438 0.30 mg

Amortiguador Tris 100 ml (0.5 M pH 10.5)

Guardar en frasco obscuro, dura aproximadamente 1 mes

Apéndice 4

Técnica de contratinción con hematoxilina de Harris

Desparafinar

Xilol I 5'

Xilol II 5'

Hidratar

OH 100 1'

OH 90 1'

OH 80' 1'

OH 70 1'

Agua corriente 5'

Contratinción

Hematoxilina de Harris 5'

Agua corriente p.r

OH ácido p.r

Agua corriente p.r

Agua amoniacal p.r

Agua corriente p.r

Deshidratar

OH 80 1'

OH 96 1'

OH 100 3'

OH 100 5'

Xilol I 5'

Xilol II 5'

Montaje con resina sintética

Agua c = agua corriente o de la llave OH= alcohol p.r. = paso rápido