



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

INFLUENCIA DE LA GESTACION TEMPRANA Y PSEUDOGESTACION INDUCIDA CON h CG SOBRE LA MIGRACION DE LOS LINFOCITOS EN EL UTERO DE LA CONEJA

TESIS PRESENTADA ANTE LA DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES DE LA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

PARA LA OBTENCION DEL TITULO DE MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA POR: VERONICA XOCHITL ZAMORA HUERTA

ASESORES: DR. EN C. MARIO PEREZ MARTINEZ MVZ HECTOR VILLASEÑOR GAONA



MEXICO, D.F.

2002



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## **CONTENIDO**

<b>Lista de cuadros y figuras</b>	
<b>Resumen</b>	<b>1</b>
<b>Introducción</b>	<b>3</b>
<b>Hipótesis</b>	<b>18</b>
<b>Objetivos</b>	<b>19</b>
<b>Material y Métodos</b>	<b>20</b>
<b>Resultados</b>	<b>24</b>
<b>Discusión</b>	<b>28</b>
<b>Conclusiones</b>	<b>30</b>
<b>Agradecimientos</b>	<b>31</b>
<b>Literatura citada</b>	<b>32-37</b>

## CUADROS Y FIGURAS

**Figura 1.** La ovulación en la coneja ocurre a consecuencia de un estímulo neuro-endócrino postcoital que activa al eje hipotálamo-hipofisis (alvariño,1993).

**Figura 2.** Resumen de los estímulos que pueden inducir la ovulación en la coneja y su regulación e el eje hipotálamo-hipofisiario.

**Figura 3.** Curvas comparativas de la concentración sérica de progesterona en conejas gestantes y pseudogestantes (Alvariño, 1993).

**Cuadro 1.** Ejemplos de citocinas que participan en la regulación de la migración linfocitaria, (Cassatella,1996).

**Figura 4.** Diferenciación de linfocitos y funciones efectoras específicas que incluyen la síntesis de anticuerpos o de citocinas. Principales eventos que tienen lugar en la inducción y amplificación de la respuesta inmune con la participación de las células presentadoras de antígeno (Reviews of Reproduction. 5, 164-174. 2000).

**Figura 5.** Esquema del aparato reproductor de la coneja.

**Figura 6.** Linfocitos totales en el endometrio de conejas gestantes (D-1 a D-8) y no gestantes (NG). Los valores son expresados como promedios  $\pm$  error estandar. \*  $P < 0.05$  vs todos los otros grupos, \*\*  $p < 0.05$  vs D-3, D-4, D-5, D-8.

**Figura 7.** Linfocitos totales en el endometrio de conejas pseudogestantes (PS-1 a PS-8) y no gestantes (NG). Los valores son expresados como promedio  $\pm$  error estándar. \*  $p < 0.05$  vs, todos los demás grupos.

## RESUMEN

**ZAMORA HUERTA XOCHITL VERONICA.** Influencia de la gestación temprana y pseudogestación inducida con hCG sobre la migración de los linfocitos en el útero de la coneja. (Bajo la asesoría de: Dr.en C. Mario Pérez Martínez y M.V.Z. Héctor Villaseñor Gaona).

La gestación es un periodo transicional en el que se registran cambios muy importantes en los niveles de hormonas sexuales. Durante los primeros días de la gestación la mucosa uterina experimenta múltiples cambios morfofisiológicos necesarios para que se lleve a cabo la implantación. El linfocito es la célula central del sistema inmunocompetente y existen evidencias experimentales que indican que la secreción de inmunoglobulinas en el tracto reproductor femenino es regulada por las hormonas sexuales. El presente estudio tuvo como propósito evaluar la actividad migratoria de los linfocitos totales en el endometrio de la coneja durante la gestación temprana y pseudogestación inducida con hCG. Se utilizaron conejas Nueva Zelanda gestantes y en otro grupo se indujo el estado de pseudogestación mediante la aplicación de hCG, en ambos grupos se evaluaron los días 1, 2, 3, 4, 5 y 8 postcoito. De cada animal se obtuvieron fragmentos de ambos cuernos uterinos y se procesaron por inclusión en parafina. Para el conteo celular se consideraron los linfocitos existentes en el epitelio y tejido conjuntivo del endometrio. El número de linfocitos totales presentes en el endometrio de conejas durante los días 1 al 5 y 8 de la gestación fue menor ( $P < 0.05$ ) con respecto a los valores encontrados en las hembras no gestantes (NG). En los animales pseudogestantes también se observó una disminución en el número de linfocitos con respecto a las conejas NG, sin embargo la disminución de linfocitos encontrada en los días 1 y 2 fue más evidente que la observada para estos días en las conejas gestantes. El día 8 de la gestación se caracterizó por presentar menor cantidad de células que el resto de los demás días evaluados.

Se concluye que durante los 8 primeros días de la gestación el número de linfocitos presentes en la mucosa uterina disminuye y que en el estado de pseudogestación de la coneja se presenta un patrón de afluencia de linfocitos similar al observado en los animales gestantes.

**Descriptor:** gestación temprana, pseudogestación inducida, linfocitos, útero, coneja.

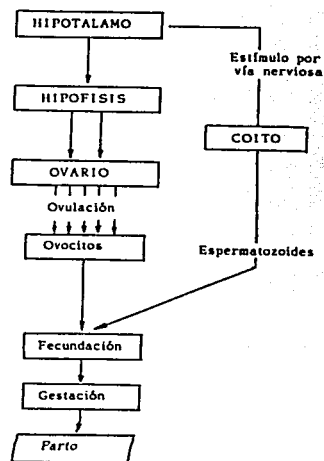
## INTRODUCCIÓN

La coneja presenta características reproductivas diferentes a las de otras especies domésticas, derivadas de la ausencia de un ciclo estral definido y regular. Mientras que en otras especies la actividad ovárica sigue un ritmo cíclico acentuado, en la coneja se discute actualmente sobre el carácter cíclico de la actividad ovárica. El crecimiento folicular se ve afectado especialmente por la liberación preovulatoria de gonadotropinas, tras la cual los folículos terciarios crecen rápidamente para reemplazar a la población de folículos que se rompen durante la ovulación. En caso de no ocurrir la monta y en ausencia de ovulación, los folículos maduros inician un estado de degeneración (atresia), y son reabsorbidos en el ovario (1).

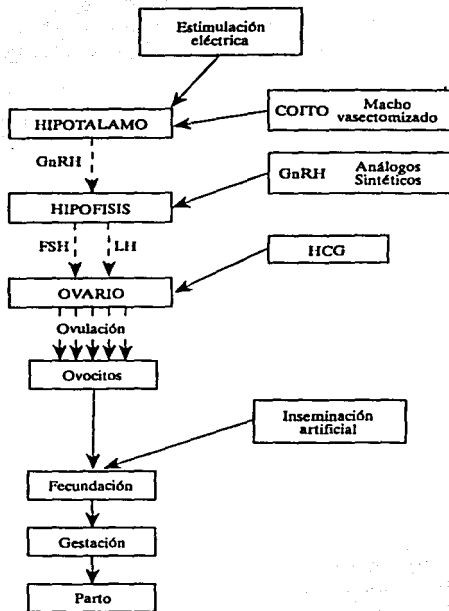
En la coneja el estímulo coital condiciona la ovulación (Figura 1). Además del coito se ha comprobado que pueden provocar la ovulación los estímulos vaginales, los intentos de monta de conejas alojadas juntas y estímulos eléctricos lumbosacros o aplicados directamente en el eje hipotálamo-hipofisiario (1) (Figura 2).

El estímulo coital provoca por vía neural la descarga del factor hipotalámico LHRH que da lugar a un pico preovulatorio de LH y, en menor cantidad de FSH. El máximo nivel se alcanza a los 90 minutos postcoito, para caer a valores basales hacia las 4 a 5 horas postcoito. Se ha detectado un pico postovulatorio de FSH a las 18-30 horas postcoito, siendo el mayor valor detectado para esta gonadotropina. La ovulación en la coneja tiene lugar de 10





**Figura 1.** La ovulación en la coneja ocurre a consecuencia de un estímulo neuro-endócrino postcoital que activa al eje hipotálamo-hipofisiario. (Alvariño, 1993).



**Figura 2.** Resumen de los estímulos que pueden inducir la ovulación en la coneja y su regulación en el eje hipotálamo-hipofisario.

a 12 horas postcoito y posteriormente a esta se forma un coágulo que ocupa el centro del folículo. Las células de la granulosa se hipertrofian y proliferan hasta ocupar el espacio correspondiente al antro folicular. Paralelamente a estos eventos ocurre una proliferación de las células de la teca interna y una invasión de vasos sanguíneos, conformando de esta manera el cuerpo lúteo productor de progesterona.

En ausencia de embriones se puede presentar el estado de pseudogestación en el que los cuerpos lúteos son equivalentes a los de gestación hasta el día 10 y experimentan una reducción en su tamaño en el día 12 y una destrucción funcional y estructural en el día 14 de la gestación. En la gestación normal el reconocimiento materno de la presencia de embriones tiene lugar aparentemente el día 12 de la gestación. Debido a que la implantación no se realiza en todos los embriones, sobre todo cuando existen altas tasas de ovulación, se puede presentar reabsorción embrionaria. Los resultados de diferentes autores indican que se presenta entre un 5 a un 15% de pérdidas totales embrionarias en etapa de preimplantación, que es atribuible a mortalidad embrionaria y no a fallas de fertilización (1). Se ha propuesto que las pérdidas embrionarias en el periodo de preimplantación están relacionadas con un desarrollo incompleto de las estructuras uterinas, mientras que las pérdidas que ocurren entre los días 7 y 12 postcoito están relacionadas a alteraciones inherentes a los embriones (1).

Desde los inicios del siglo pasado, quedó bien establecido que en esta especie, después de la ovulación, los ovarios y particularmente el cuerpo lúteo, son indispensables para el establecimiento y mantenimiento de la gestación (2).

Los cuerpos lúteos (CL) son esencialmente la única fuente de progesterona ( $P_4$ ) en la coneja gestante o pseudogestante. La concentración sérica de  $P_4$  esta estrechamente correlacionada con el peso del tejido luteal durante el séptimo y décimo día postcoito (3), por lo que los cambios en la producción de progesterona ovárica constituyen el factor principal responsable de las variaciones en los niveles periféricos de progesterona durante la gestación y la pseudogestación de la coneja.

En la coneja pseudogestante, la progesterona se incrementa gradualmente del día 1 posterior a la ovulación hasta aproximadamente el día 12 cuando se inicia la luteólisis funcional del cuerpo lúteo (Figura 3).

Se sabe que la histerectomía retrasa la luteolisis de 6 a 8 días, sugiriendo que en la coneja existe una "luteolisina" de origen uterino la cual causa la regresión del cuerpo lúteo como ocurre en otras especies de mamíferos (4 y 5).

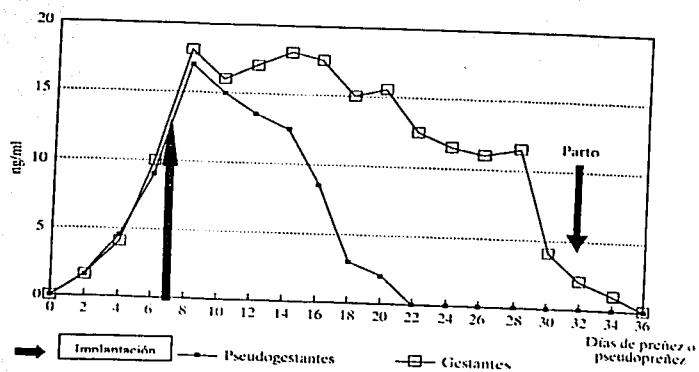
La pared del útero esta compuesta de tres capas histológicas: El endometrio o mucosa, el miometrio y el perimetrio (6). El endometrio consiste de una lámina epitelial superficial y de tejido conjuntivo, el que junto con las glándulas endometriales se encuentra por debajo del epitelio. El tejido

endometrial responde de manera específica a cambios endocrinos que acompañan al ciclo estral y a la gestación.

La lámina epitelial de la mucosa uterina presenta un epitelio de tipo cilíndrico simple, pero se pueden encontrar también porciones de epitelio de tipo cilíndrico pseudoestratificado o cúbico, dependiendo de la región anatómica del órgano. Debajo de la lámina epitelial se encuentra la lámina propia-submucosa (LPS) de tejido conjuntivo laxo muy vascularizado. Dentro de la LPS existen glándulas de tipo tubular que pueden ser simples o ramificadas; dichas glándulas están revestidas por un epitelio de tipo cilíndrico simple y proliferan durante la fase prostestacional del ciclo estral. Estas glándulas secretan proteínas que alimentan al producto antes de que ocurra su implantación (6,7).

La gestación es un periodo transicional en el que se registran cambios muy importantes en los niveles de hormonas sexuales (8). Durante el periodo previo a la implantación en la coneja se presentan cambios en los procesos de proliferación celular y apoptosis del epitelio uterino y se ha propuesto que ambos procesos actúan de manera interaccionada, de modo que cuando uno predomina el otro se inhibe. Este comportamiento se ha observado tanto en el epitelio de revestimiento como en el glandular (9).

Al inicio de la gestación debe establecerse un "diálogo" molecular entre la madre y el embrión, este diálogo consiste en la secreción de diversas señales químicas que contribuyen al transporte sincrónico del producto hacia el útero de tal forma que se encuentre en condiciones secretoras adecuadas para



**Figura3.** Curvas comparativas de la concentración sérica de progesterona en conejas gestantes y pseudogestantes. (Alvariño, 1993).

permitir la implantación; además existen diversas sustancias que favorecen el desarrollo embrionario inicial. Entre las señales embrionarias tempranas se han citado al factor activador derivado del embrión (EPAF), el cual es necesario para inducir la formación de la gestación temprana (EPF) el cual constituye la primera respuesta específica materna propia de la gestación en especies como la oveja y la coneja (9).

Los múltiples eventos de cooperación celular que ocurren en las etapas iniciales de la gestación son de tipo paracrino y endocrino (10). En el contexto de la comunicación inmunoendocrina que ocurre durante dicho periodo crítico, la progesterona ( $P_4$ ) destaca por su participación reguladora de muchos de estos procesos tisulares. Se ha propuesto que una de las funciones de la  $P_4$  durante la gestación es la de inhibir la respuesta inmunológica dirigida contra el feto. El incremento en los niveles circulantes de progesterona ( $P_4$ ) que ocurre durante la gestación, modifica en forma notoria la respuesta inmunológica (11,12). Es bien conocido que la progesterona puede inhibir el rechazo de injertos de tejido en el útero. Se ha planteado que la progesterona regula la función inmunológica en el útero mediante la inhibición de la función inmune periférica y se piensa que esto podría ser mediante dos mecanismos: primeramente la progesterona por sí misma es inhibitoria de la activación linfocitaria; sin embargo la concentración requerida para inhibir la proliferación linfocitaria debe ser suficientemente alta para inducir dicho efecto a nivel uterino. En segundo lugar, muchas acciones de la progesterona sobre la función inmunológica del útero son mediadas, al menos en parte, por la

inducción de otras moléculas producidas localmente. Por ejemplo, en el útero de la oveja la molécula que media algunos de los efectos inhibitorios de la progesterona es una glucoproteína endometrial llamada proteína de leche uterina (UTMP) que es un miembro de la superfamilia de las serpinas (11). En el útero de la coneja se sintetiza en los primeros días de la gestación una proteína llamada uteroglobina (UTG) o blastocinina, que constituye entre el 40 y 60% de las proteínas totales del fluido uterino.

En la coneja la implantación ocurre aproximadamente en el día siete de la gestación, momento en el que existe alta concentración de UTG (9). La secreción de UTG es detectable desde el tercer día de la gestación y registra un pico alrededor del cuarto y quinto día, disminuyendo notoriamente al décimo día, manteniendo una concentración baja durante el resto de la gestación. Se ha propuesto que la UTG ejerce diversos efectos sobre el blastocisto y estos cambios que induce tienen como propósito facilitar la implantación.

El endometrio es parte del sistema inmune mucosal común, y presenta similitudes estructurales y funcionales con otras mucosas, como la conjuntival, nasal, intestinal y bronquial. En todos estos sistemas inmunes locales existe una red de tráfico de linfocitos.

El útero está provisto de un sistema de drenaje linfático y contiene una amplia variedad de células linfohematopoyéticas y reguladores moleculares necesarios para generar e incrementar la inmunidad adaptativa. Histológicamente la diferencia más notoria entre el útero y otras superficies mucosales es la carencia de nódulos linfoides secundarios bien organizados,



semejantes a las placas de Peyer y al tejido linfoide asociado a los bronquios. Esta diferencia puede deberse a la poca carga antigénica existente en el útero.

En la ausencia de enfermedades infecciosas la exposición antigénica esta confinada a la introducción de semen, a la presencia de tejido embrionario y a los microorganismos provenientes de la vagina que son introducidos durante la inseminación artificial que se lleva acabo en diferentes especies (cabra, oveja, etc.).

La inmunidad mediada por células y la mediada por anticuerpos puede ser inducida en el útero después de la infección o la inmunización por antígenos liberados en el tracto reproductor o en otras superficies mucosales. Es de llamar la atención que el útero es un sitio de excepción entre los tejidos mucosales en el que las hormonas esteroides ováricas también tienen efectos considerables sobre las vías inmunológicas aferentes y eferentes (13). De esta manera la respuesta inmunológica a patógenos puede ser fuertemente influenciada por la etapa del ciclo estral en que ocurre la infección (14,15).

La preparación morfofuncional del útero durante la fase lútea ovárica y las características bioquímicas de las secreciones embrionarias y endometriales proporcionan las condiciones microambientales requeridas para que ocurra exitosamente la implantación del producto (16).

El tracto reproductor femenino esta provisto de células inmunocompetentes (17). Por ello los leucocitos incluidos en los agregados linfoides y dispersos en el tejido conjuntivo de lámina propia, son una

constante en el endometrio normal de diferentes especies, tales como la oveja (18,19), caballo (20), cabra (21,22,23) y cerdo (24,25,26).

Engel Hard and King (27) revisaron las subpoblaciones de linfocitos en oveja y vaca así como el impacto de la gestación sobre estas células, observando que la subpoblación de linfocitos T y B, constituye el 75% de las células monoclonales circulantes en estos rumiantes.

Existen evidencias experimentales que indican que la secreción de inmunoglobulinas en el tracto reproductor femenino es regulada por las hormonas sexuales. Se ha demostrado que la síntesis de inmunoglobulinas en el tracto reproductivo de diferentes especies registra variaciones durante el ciclo estral (15,28). Asimismo diversos estudios indican que las hormonas esteroides sexuales, durante el ciclo estral, inducen variaciones en el número de plasmocitos presentes en el endometrio de la vaca, cerda, cabra, rata y yegua (20,25,29,30,31,32).

La administración de estrógenos a ratas induce la presencia de células productoras de IgA y también acumulaciones de IgA e IgG en el endometrio de la rata (27), esto coincide con la producción de inmunoglobulinas que registra un pico durante el proestro (28,33).

Se ha informado que la migración de inmunocitos en el útero experimenta cambios importantes durante la gestación temprana. Debido a que el blastocisto expresa antígenos paternos que resultan extraños al organismo materno, algunos investigadores han propuesto que el proceso de implantación guarda cierta similitud con el proceso inflamatorio. Entre los

eventos tisulares que tienen lugar durante la implantación, se citan la infiltración de macrófagos y leucocitos, la neovascularización y la producción de prostaglandinas, entre otros (34, 35).

Por medio de los vasos linfáticos aferentes, los linfonodos reciben a los linfocitos provenientes del tejido linfoide no capsulado que esta asociado a las mucosas (TLAM). A partir del TLAM se inicia una red de vasos linfáticos que converge en el ducto torácico y de ahí los linfocitos provenientes de las mucosas y las submucosas, se reincorporan a la circulación sanguínea para posteriormente volverse a distribuir por todo el organismo e infiltrarse una vez más en tejidos diferentes. Los linfocitos abandonan los vasos sanguíneos después de interactuar con las moléculas de adhesión que presenta el endotelio de las venas poscapilares (36).

El linfocito es la célula central del sistema inmunocompetente. Desde el punto de vista funcional existen los linfocitos responsables de la respuesta inmune humoral o "B" y los responsables de la respuesta inmune celular o "T". Cuando un linfocito es activado, responde dividiéndose y diferenciándose en células efectoras. Los antígenos de superficie de la membrana de los linfocitos CD4+ y CD8+ son glucoproteínas que intervienen en el reconocimiento de los antígenos del complejo principal de histocompatibilidad (MHC). Las células "T" cooperadoras tienen en su superficie el antígeno CD4+ que reconoce a moléculas MHC de la clase II y los linfocitos T citotóxicos tienen el antígeno CD8+ que reconoce a las moléculas MHC de la clase I (37,38).

En la migración leucocitaria ocurren múltiples interacciones entre estas células y las del tejido conjuntivo. En el proceso de comunicación intercelular cumplen una función fundamental los mediadores solubles denominados citocinas (Cuadro 1). Las citocinas son proteínas que transmiten señales de una célula emisora a otra célula receptora. Las citocinas son sintetizadas por diversas células del organismo y hoy en día se sabe que son muy importantes en la regulación de la respuesta inmunológica sistémica y local. (36)(Figura 4).

En la oveja se ha considerado que la alta concentración de progesterona que predomina desde la formación del cuerpo lúteo, es la condición endógena que regula la secreción de moléculas que inhiben la proliferación linfocitaria a nivel local (11, 39, 40).

## CUADRO 1

### EJEMPLO DE CITOCINAS QUE PARTICIPAN EN LA REGULACIÓN DE LA MIGRACIÓN LINFOCITARIA (Cassatella, 1996).

#### CITOCINAS

##### Interleucinas

Interleucina-1 $\alpha$   
**Colonias**  
Interleucina-1 $\beta$   
Interleucina-1 receptor antagonista  
Interleucina-2  
Interleucina-3  
Interleucina-4  
Interleucina-5  
Interleucina-6  
Interleucina-7  
Interleucina-9  
Interleucina-10  
Interleucina-11

Semejante a la Insulina  
**Quimiocinas**

Quimiocina (Linfocina)

##### Transformante

##### Interferones

Interferon- $\alpha$   
Interferon- $\beta$   
Interferon- $\gamma$   
Nerviosos

##### Varios

Eritropoyetina  
Factor Inhibidor de la Leucemia  
Angiogenina

#### Factores de Necrosis Tumoral

Linfotoxinas  $\beta$

#### Factores Estimulantes de

Macrofagos-Granulocitos  
Macrofagos  
Granulocitos

#### Factores de crecimiento

Queratinocitos  
Epidermal  
Fibroblastos  
Hepatocitos  
Factores de Crecimiento

Derivados de las Plaquetas  
Endotelio Vascular

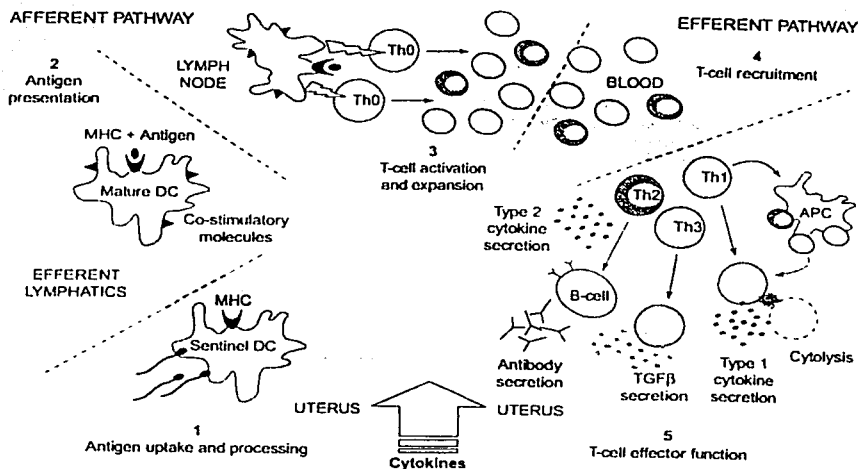
#### Factores de crecimiento

Activinas

#### Factores Neurotróficos

Factores Neurotróficos

Neurotrofinas



**Figura 4.** Diferenciación de linfocitos y funciones efectoras específicas que incluye la síntesis de anticuerpos o de citocinas. Principales eventos que tienen lugar en la inducción y amplificación de la respuesta inmune con la participación de las células presentadoras de antígeno. (Reviews of Reproduction. 5, 164-174. 2000).

## **HIPOTESIS**

El ambiente progestacional predominante en las conejas gestantes y en las que se ha inducido el estado de pseudogestación, modifica el patrón de migración de los linfocitos en el endometrio, durante los 8 días posteriores a la ovulación. En relación con las conejas no gestantes.

## **OBJETIVOS**

Se plantearon como objetivos específicos del presente estudio, los siguientes:

1. Establecer el patrón de migración de los linfocitos totales en el endometrio de la coneja, bajo un ambiente progestacional predominante, durante los 8 días posteriores a la ovulación. En comparación con los animales testigos (NG).
2. Evaluar el efecto de un ambiente progestacional inducido, sobre el patrón de migración de linfocitos totales en el endometrio de conejas tratadas con hCG, durante los 8 días posteriores a la ovulación. En comparación con los animales testigos (NG).
3. Establecer las posibles diferencias entre ambos grupos, sobre la migración de linfocitos totales en el endometrio de la coneja, durante los días 1-2-3-4-5 y 8 posteriores a la ovulación.



## **MATERIAL Y METODOS**

El presente estudio se realizó en el laboratorio de Biomorfología Animal Integrativa del Departamento de Morfología, sección de Histología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

## **ANIMALES Y TRATAMIENTOS**

Para la realización del presente estudio se utilizaron 41 conejas Nueva Zelanda blancas sexualmente maduras (3.5-4.5 Kg de peso) que se mantuvieron en condiciones de bioterio en jaulas individuales (90x60x40 cm) con alimento concentrado comercial (Purina) y agua *ad libitum*. Con estos animales se formaron 12 grupos, 6 de ellos (n=3, para cada grupo) correspondientes a los días 1,2,3,4,5 y 8 postcoito y en los 6 grupos restantes (n=3) se indujo la ovulación en las conejas mediante la administración de 100 UI de gonadotropina coriónica humana (hCG) por vía intramuscular (41), en los mismos días que el grupo anterior.

En el grupo de animales gestantes, a cada coneja se le dieron 2 montas en un mismo servicio, utilizando para ello dos sementales experimentados de la misma raza. El día de la cruce se considerará como el día "0" del experimento.

Paralelamente se contó con un grupo de animales que sirvieron como testigo para las hembras gestantes y pseudogestantes. Este grupo estuvo constituido por 5 conejas adultas nulíparas no gestantes (NG).

## **OBTENCIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO**

A los animales de cada grupo se les dió muerte mediante una sobredosis de pentobarbital sódico consistente en 90 mg/kg (42).

Con el fin de verificar la existencia de gestación se efectuó un lavado del oviducto y cuernos uterinos con solución salina fisiológica isotónica, todas estas hembras resultaron gestantes. Posteriormente con un microscopio estereoscópico se buscó la presencia de embriones. A continuación se obtuvieron fragmentos del tercio medio de ambos cuernos uterinos (Figura 5), de cada uno de los animales y se fijaron en una solución de ácido pícrico (15%) y paraformaldehído (4%) en un amortiguador de fosfatos (PBS), pH 7.4, durante 8 horas.

## **PROCESAMIENTO HISTOLÓGICO**

Transcurrido el período de fijación, los fragmentos de tejido se mantuvieron durante 24 horas en una solución de PBS y se procesaron conforme a la técnica de inclusión en parafina en un histoquinette automático (American Optical p 800). A continuación se efectuaron cortes semiseriados de 6  $\mu$ m de grosor en un microtomo (Spencer 820), algunos de estos cortes se tiñeron con la tinción de Hematoxilina y Eosina para la observación de la estructura histológica general del útero y otros con la tinción de Giemsa para evidenciar a los linfocitos.

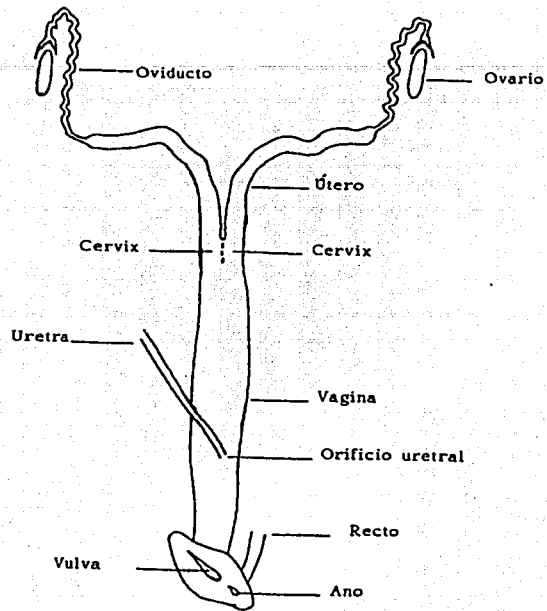


Figura.5 Esquema del aparato reproductor de la coneja

### **CONTEO DE CÉLULAS**

Para efectuar el conteo de linfocitos se utilizó un ocular con retícula micrométrica (Zeiss) y un microscopio fotónico (Zeiss) y se contaron las células presentes en 25 campos microscópicos con el objetivo 40X. Para este fin se consideró la lámina epitelial y la lámina propia de tejido conjuntivo laxo.

### **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los datos obtenidos del conteo celular se analizaron mediante la prueba estadística no paramétrica para la cual se utilizó el programa Prisma 2.0. (C.A.) para efectuar la comparación entre los diferentes grupos (43).

## RESULTADOS

El número de linfocitos totales presentes en el endometrio de conejas durante los días 1 al 5 y 8 de la gestación fue menor ( $P < 0.05$ ) con respecto a los valores encontrados en las hembras no gestantes (NG). Es interesante destacar que los días 1 y 2 de la gestación si bien hubo menor número de linfocitos con relación al grupo testigo (NG), en ambos días el número de células presentes fue mayor que el observado en los días 3, 4, 5 y 8. La disminución de linfocitos que se presentó durante los días 1 y 2 de la gestación fue alrededor del 30% en relación con el grupo de conejas NG, mientras que para los días restantes la disminución fue aproximadamente del 60% (Figura 6).

En los animales pseudogestantes también se observó una disminución en el número de linfocitos con respecto a las conejas NG. Sin embargo la disminución de linfocitos encontrada en los días 1 y 2 fué más evidente que la observada para estos días en las conejas gestantes. El día 8 se caracterizó por presentar menor cantidad de células que el resto de los demás días evaluados (Figura 7, 8 y 9).

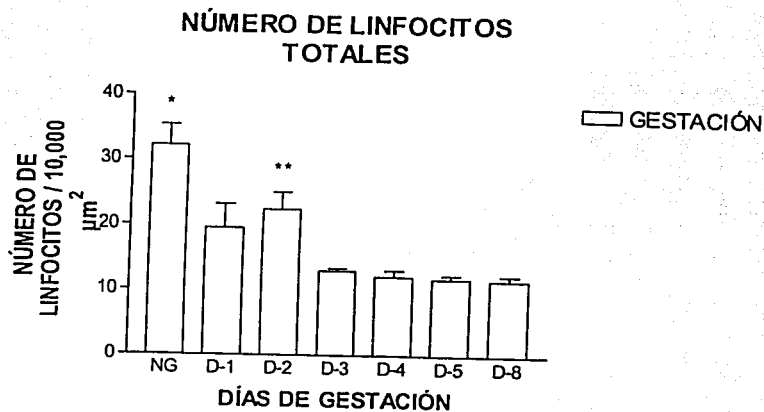


Figura 6. Linfocitos totales en el endometrio de conejas gestantes (D-1 a D-8) y no gestantes (NG) . Los valores son expresados como promedios  $\pm$  error estandard. \*  $p < 0.05$  vs todos los otros grupos, \*\* $p < 0.05$  vs D-3, D-4, D-5, D-8.

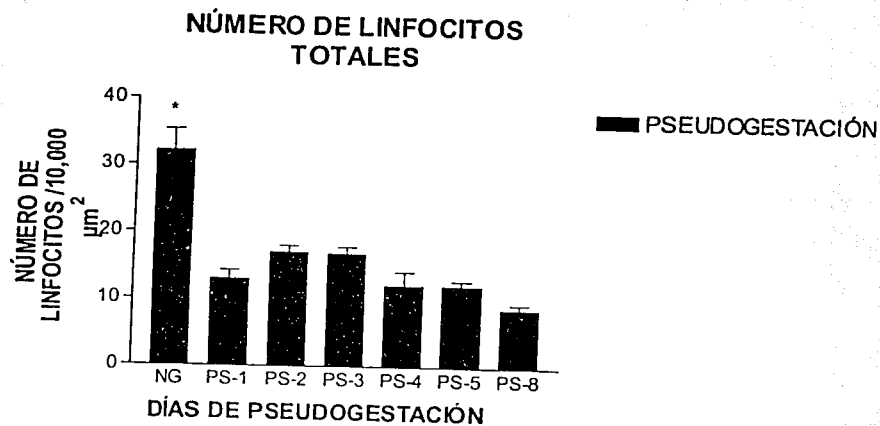


Figura 7. Linfocitos totales en el endometrio de conejas pseudogestantes (PS-1 a PS-8) y no gestantes (NG). Los valores son expresados como promedios  $\pm$  error estandar.  
\*  $p < 0.05$  vs. todos los demás grupos.



Figura 8. Micrografía de linfocitos totales en el endometrio de coneja no gestante. Tinción Giemsa. Aumento total 400X.





Figura 9. Micrografía de linfocitos totales en el endometrio de coneja gestante del día 3. Tinción Giemsa. Aumento total 400X.

## DISCUSIÓN

La disminución de linfocitos totales que se presentó en el endometrio de las conejas gestantes se apreció más notoriamente a partir del día 3 postcoito. Este hallazgo puede estar relacionado con el hecho de que el embrión proveniente del oviducto ingresa al útero durante dicho día, lo que sugiere que la presencia del producto y los tejidos que lo rodean inducen un estado de inmunosupresión local, probablemente mediante la síntesis de citocinas endometriales que inhiben la afluencia de linfocitos a la mucosa uterina.

El evento de la implantación en la coneja ocurre en el día 7 postcoito (21,22), y debido a que la interacción trofoblasto-endometrio es más intensa durante dicha etapa, ello puede explicar en parte el porque se mantiene un número disminuido de linfocitos durante los días 3 al 8 posteriores a la fertilización.

Entre los cambios morfofisiológicos necesarios para que la implantación se lleve a cabo se mencionan variaciones en la actividad mitótica de las células del epitelio de revestimiento y glandular, que se ve incrementada notablemente en el día 2 de la gestación (9); este dato coincide con la presencia del mayor número de linfocitos totales presente en el endometrio, lo que apoya la existencia una interacción funcional entre las células epiteliales y los linfocitos (25).

La disminución de linfocitos totales que se presentó en el día 1 de la gestación probablemente esta asociada con la presencia del plasma seminal en el útero de la coneja, debido a que a partir de las 6 horas posteriores al coito

ocurre un incremento notable de linfocitos, condición que se mantiene constante después de las 18 horas (24,25,26).

En el grupo de animales pseudogestantes se presentó un patrón de afluencia de linfocitos similar al observado en los animales gestantes. Es de llamar la atención que durante los días 2 y 3 el número de linfocitos se mantuvo igual y en el día 8 se registró el menor número de linfocitos en comparación con los días 1 al 5.

Después de la inducción de pseudogestación con gonadotropina coriónica humana (**hCG**) la concentración plasmática de  $P_4$  se incrementa durante los primeros 9 a 13 días y disminuye significativamente en los días 16 al 18. (2,3). El patrón de secreción de la  $P_4$  durante los primeros días de la pseudogestación se caracteriza por concentraciones crecientes de dicha hormona, condición endócrina que de acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio esta asociada con una disminución en la cantidad de linfocitos presentes en la mucosa uterina. Esto se observó mas claramente en el día 8 del estudio y es precisamente en este día cuando existen niveles mayores de  $P_4$  con respecto a los días previos y también se ha llevado a cabo la implantación recientemente en el día 7

## **CONCLUSIONES**

Se concluye que durante los 8 primeros días de la gestación el número de linfocitos presentes en la mucosa uterina disminuye, sin embargo la disminución más marcada se observa a partir del día 3, que es cuando el producto ingresa al útero. Es probable que estos cambios tengan relación con la migración de espermatozoides los primeros días y con el proceso de implantación en los días posteriores. En el grupo de animales pseudogestantes se presentó un patrón de afluencia de linfocitos similar al observado en los animales gestantes. En los esquemas actuales de manipulación de la función ovárica de las especies domésticas productivas ha aumentado el uso de diferentes progestinas sintéticas para sincronizar el ciclo estral. Sin embargo hasta el momento no se ha evaluado sus posibles repercusiones sobre el sistema inmune de la mucosa uterina, por lo que es necesario continuar estudiando la interacción funcional entre las hormonas ováricas y el comportamiento migratorio a nivel tisular de las células inmunitarias. Estos conocimientos pueden también contribuir a explicar la fisiopatología de enfermedades uterinas de los animales, como la endometritis o la piometra en las que la hembra se encuentra más susceptible en ciertos momentos del ciclo estral.

## **AGRADECIMIENTOS**

\* A mis asesores El Dr. Mario Pérez Martínez y El MVZ. Héctor Villaseñor Gaona por todo su tiempo dedicado y apoyo en todos los aspectos referentes a este proyecto.

\* Al Departamento de Morfología por proporcionarme todas las facilidades y recursos necesarios para que se llevara acabo este proyecto. Al Técnico en Histología Francisco López López por su ayuda en el procesamiento histológico.

- 
- Se agradece a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM el financiamiento recibido para la realización de esta tesis, por medio del programa PAPIIT (proyecto IN212101).

### **A mi jurado**

MVZ. Carlos Villagran Velez.  
MVZ. Santiago R. Anzaldúa Arce.  
MVZ. Manuel Espinosa Pedroza.  
MVZ. Verónica Graullera Rivera.  
MVZ. Mario Pérez Martínez.

Por su disposición, tiempo, aportaciones y sugerencias realizadas para que este proyecto se llevara acabo y lograrse llegar a termino.

## **DEDICATORIA**

A mis padres porque gracias a su esfuerzo, apoyo y amor he logrado la meta más importante en esta etapa de mi vida.

A mis hermanos Victor y Rodolfo por estar conmigo.

A mis Tíos por todo su apoyo, confianza y cariño.

Al mejor de los amigos Héctor, por brindarme su amistad incondicional, sus consejos, y el estar conmigo en los momentos más difíciles ya que gracias a ese apoyo he logrado muchas cosas, una de las cuales y más importantes es en este momento haber logrado mi titulación.

Al Dr. Mario por brindarme su amistad, confianza y llenarme de consejos para que cada día logre ser una mejor persona.

**“GRACIAS”**

### **LITERATURA CITADA**

1. Alvariño MR.(1993) Control de la Reproducción en el conejo Madrid: Mundi-Prensa, 1993.
2. Holt JA. Regulation of progesterone production in the rabbit corpus luteum. Biol. Reprod 1989; 40: 201-208.
3. Miller JB, Keyes PL. A mechanism for regression of the rabbit corpus luteum: uterine induced loss of luteal responsiveness to 17B-estradiol. Biol Reprod 1976;15: 511-518.
4. Scott RS, Reninie PIC. Factors controlling the life span of the corpora lutea in the pseudopregnant rabbit. J. Reprod Fert 1970;23:415-422.
5. Hilliard J. Corpus luteum function in guinea, pigs, hamsther, rats, mice and rabbits. Biol.Reprod 1973;8: 202-221.
6. Banks WJ. Applied Veterinary Histology. 3 rd ed. Saint Louis Missouri: Mosby Year Book, 1993.
7. Simón C, Moreno C, Remohi J, Pellicer A. Cytokines and embryo implantation. J. Reprod. Immunol 1998;39:117-131.
8. Browning J, Keyes FL, Wolfe R. Comparison of serum progesterone, 20  $\alpha$ -dihydroprogesterone and estradiol-17B in pregnant and pseudopregnant rabbit: evidence for post implantation recognition of pregnancy. Biol Reprod 1980; 23: 1014-1019.

- 9 Anzaldúa ASR, Pérez MM, Castro RJI. Variación en los índices de mitosis y apoptosis del epitelio uterino de la coneja durante los días previos a la implantación. *Téc Pecu Méx* 2001;39:59-68.
- 10 Lessey BA, Arnold JT. Paracrine signaling in the endometrium integrins and the establishment of uterine receptivity. *J. Reprod. Immunol* 1998;39:105-116.
- 11 Hansen PJ, Skopets B. Temporal relationship between progesterone and uterine lymphocyte-inhibitory activity in ewes. *Vet. Rec* 1992;131:371-372.
12. Stephenson DJ, Hensen PJ. Induction by progesterone of immunosuppressive activity in utero secretions of ovariectomized ewes. *Endocrinology* 1999;129:3168-3178.
- 13 Wira CR, Kaushic C, Richardson J. Role of sex hormones and cytokines in regulating the mucosal immune system in the female reproductive tract. In *Mucosal Immunology*. 2<sup>nd</sup>. Ed. San Diego: Academic, 1999.
14. Kaushic C, Murdin AD, Underdown BJ and Wira CR. Chlamydia trachomatis infection in the female reproductive tract of the rat: influence of progesterone on infectivity and immune response *Infection and Immunity*. 1998;66 :893-895.
15. Parr MB and Parr EL. Female genital tract immunity in animal models. In *Mucosal Immunology*. 2<sup>nd</sup> Ed. San Diego: Academic- Press, 1999.
16. Perez MM. Estudio del estadio reproductivo de la cabra doméstica (*Capra hircus*) y su relación con la distribución de células inmunológicas de la mucosa



del tracto genital femenino. Tesis doctoral. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. México, D.F. 1999.

17. Hunt J. Immunologically relevant cells in the uterus. *Biology of Reproduction* 1994; 50:461-466.

18. Lee CS, Gogolin-Ewens, Brandon MR. Identification of a unique Lymphocyte subpopulation in the sheep uterus. *Immunology* 1998;63:157-164.

19. Segerson E, Matterson P, Gunsett F. Endometrial Lymphocyte subset infiltration during the ovine estrous cycle and early pregnancy. *J. Reprod Immunol* 1991;20:221-236.

20. Watson ED, Tomson RM. Lymphocyte subsets in the endometrium of genitally normal mares and mares susceptible to endometritis. *Equine Vet-J* 1996;28:106-110

21. Vander-wielen AL, King GJ. Intraepithelial lymphocytes in the bovine uterus during the oestrous cycle and early pregnancy. *J. Reprod. Fert* 1984;70:457-462.

22. Hussain AM. Bovine uterine defense mechanisms: A Review. *J. Vet Med. B* 1989; 36:641-651.

23. Cobb SP, Watson ED. Immunohistochemical study of immune cell in the bovine endometrium at different stages of o estrous cycle, *Res. Vet. Sci* 1995;59:238-241.

24. Hussein AM, Newby TJ and Bourne FJ. Immunohistochemical studies of the local immune system in the reproductive tract of the sow. *J. Reprod. Immunol* 1983;5:1-15

25. Lavielle RE, Pérez MM, Hernández GR, Martínez MJJ. Cuantificación de células plasmáticas en cuello uterino de cerda, en fase folicular y lútea del ciclo estral. *Vet. Méx* 1994;25:29-31.
26. Bisohof R, Brandon MR, Lee CS. Studies on the distribution of immune cell in the uteri of prepubertal and cycling gilts. *J. Reprod. Immunol* 1994;26:1111-1129.
27. Engelhardt H, King GJ. Uterine natural Killer cells in species with epitheliochorial placentation. *Natural Immunity* 1996;15:53-69.
28. Wira CR, Richardson J, Prabhala R. Endocrine regulation of mucosal immunity. Effect of sex-hormones and cytokines on the afferent and efferent arms of the immune system in the female reproductive Tract. In: *Handbook of Mucosal Immunology*. New York: Academic Press ,1994.
29. Lander Chacin MF, Jansen PJ and Drost M. Effects of stage of the oestrus cycle and steroid treatment of uterine immunoglobulin content and polymorphonuclear leukocytes in cattle. *Theriogenology* 1990;34:1169-1184.
30. Pérez MM, Mendoza GM, Mena LR y Romano PM. Lymphocytes of the uterus in adult goat. Histological and Immuno histochemical study with confocal microscopy. *Memorias de la XI Reunión Nacional de la Asociación Mexicana de la Reproducción Caprina, A.C;* 1996 octubre 16-18; Chapingo Edo de México.
31. Vander Wielen AL and King GJ. Intraepithelial lymphocytes in the bovine uterus during the oestrus cycle and early gestation. *J. Reprod Fert* 1998;70: 457-462.

32. Wira CR and Sandoe CP. Sex steroid hormone regulation of IgA and IgG in rat uterine secretions *Nature* 1977;268:534-536.
33. Wira CR, Sullivan DA. Estradiol and progesterone regulation of IgA, IgG and secretory component in cervico-vaginal secretions of the rat. *Biology of reproduction* 1985;32:90-95.
35. Hansen PJ. Regulation of uterine immune function by progesterone. *J. Reprod. immunol* 1998;40:63-79.
36. Vadillo OF, Hernández GC, Guerra IF, Butos LH. Bases moleculares de la implantación del conceptus humano *1992*;6:157-165.
37. García TF. *Fundamentos de Inmunobiología*. . México, D.F: Dirección General de Publicaciones. 1997.
38. Abbas, A.K., Lichtman. A. H., Pober, J.S. *Inmunología celular y molecular: Anatomía funcional de las respuestas inmunitarias y sistémicas*. 2 da. ed. Madrid España: Interamericana Mc. Graw- Hill, 1995.
39. Santos AL. Principios básicos de la respuesta inmunológica *Perinatol. Reprod. Hum* 1994;8:3-19.
40. Gottshall SL, Hansen PJ. Regulation of leucocyte subpopulations in the sheep endometrium by progesterone. *Immunology* 1992;76:636-641.
41. Fleming MW, Gamble HR. Consequences of dose-dependent immunosuppression by progesterone on parasitic worms burdens in lambs. *Am. J. Vet. Res* 1993; 54: 1299-1302.
42. Dharmarajan AM, Yoshimura Y, Sueoka K, Atlas SJ, Dubin NH, Ewing, Zirkin BR, Wallach EE. Progesterone secretion by corpora lutea of the isolated

perfused rabbit ovary during pseudopregnancy. Biol Reprod 1998;381:137-1143.

43.AVMA. Report of the AVMA panel on euthanasia. JAVMA 1993; 202-230.

44.Steel S R y Torrie H J. Bioestadística, Principios y procedimientos. Estadísticas no Paramétrica. 2ª ed. México, D.F: Mc Graw-Hill, 1988.