



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

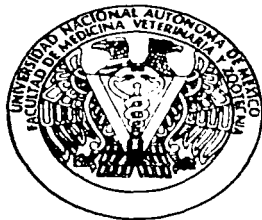
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

MIGRACION LINFOCITARIA EN OVARIOS DE CONEJAS (Oryctolagus cuniculus) DURANTE LA GESTACION TEMPRANA Y PSEUDOGESTACION INDUCIDA CON hCG

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA PRESENTA JOEL VILLA GONZALEZ

ASESORES: DR. MARIO PEREZ MARTINEZ M, en C, SANTIAGO RENE ANZALDUA ARCE



MEXICO, D.F.

2002



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.

PAGINACIÓN

DISCONTINUA

**MIGRACION LINFOCITARIA EN OVARIOS DE CONEJAS
(*Oryctolagus cuniculus*) DURANTE LA GESTACION TEMPRANA Y
PSEUDOGESTACION INDUCIDA CON hCG**

**Tesis presentada ante la
División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia**

de la

**Universidad Nacional Autónoma de México
para la obtención del título de
Médico Veterinario Zootecnista**

por

Joel Villa González

Asesores:

DR. Mario Pérez Martínez

M. en C. Santiago René Anzaldúa Arce

La Dirección General de Bibliotecas de la
UNAM difundir en formato electrónico e impreso el
contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Joel Villa

González

FECHA: 2. SEP. 2002

ESMA: [Firma]

**México, D.F.,
2002**

DEDICATORIA

A mis padres que, a base de amor, comprensión y cariño han logrado inculcarme valores como la honradez, la responsabilidad y la honestidad, que han sido fundamentales en mi formación como persona y con ello poder luchar para merecer el trabajo, esfuerzo y sacrificio que han hecho por mí y gracias a los cuales he podido lograr, hasta el momento, una de las metas más importantes en mi vida.

A mis hermanos quienes, sin la costumbre de expresarse abiertamente, siempre han estado a mi lado apoyandome y extendiendome su mano en los momentos en que lo he necesitado.

A mi esposa y a mi bebé, quienes llegaron a mi vida como una bendición, impulsándome con su amor a lograr mis metas y dejándome en claro que ahora me toca a mí esforzarme para llegar a ser un buen ejemplo.

AGRADECIMIENTOS

A mis asesores, que representan gran parte de este trabajo, por haberme brindado su confianza y apoyo para realizarlo siempre teniéndolos como respaldo.

A los miembros de mi jurado:

MVZ. Rosa Emilia Lavielle
MVZ. Martha Beatriz Trejo Salas
MVZ. Carlos Alberto Tena Betancourt
MVZ. Mario Pérez Martínez
MVZ. Héctor Villaseñor Gaona

Por su paciencia al hacer la revisión de mi trabajo y realizarle las correcciones pertinentes para poder concluirlo.

A Héctor V. G, por darme la oportunidad , desde muy temprano en mi carrera, de adquirir los conocimientos básicos necesarios en la práctica de la clínica veterinaria; por apoyar en la realización de mi trabajo de tesis y por brindarme su amistad incondicional. ¡Gracias pela'o, m d!.

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)

CONTENIDO

Página

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
3. OBJETIVOS	14
4. MATERIAL Y MÉTODOS	15
4.1 Animales y manejo	15
4.2 Procesamiento histológico	16
4.3 Conteo celular	17
4.4 Análisis estadístico	17
5. RESULTADOS	18
6. DISCUSIÓN	19
7. CONCLUSIONES	23
8. LITERATURA CITADA	24
9. FIGURAS	27
10. CUADROS	36

RESUMEN

VILLA GONZALEZ JOEL. Migración linfocitaria en ovarios de conejas (*Oryctolagus cuniculus*) durante la gestación temprana y pseudogestación inducida con hCG (bajo la dirección de: Dr. Mario Pérez Martínez y M. en C. Santiago René Anzaldúa Arce).

Con el propósito de conocer la dinámica migratoria de los linfocitos totales (LT) al estroma ovárico de conejas Nueva Zelanda durante los días 1 al 5 y 8 en el estado de gestación y pseudogestación (inducida con 100 UI de gonadotropina coriónica humana), se obtuvieron los ovarios de 41 conejas: 18 gestantes (GS), 18 pseudogestantes (PG) y 5 no gestantes (NG), para obtener fragmentos de tejido que se procesaron mediante la técnica de inclusión en parafina y efectuar cortes de 6-8 μm de grosor que se tiñeron con Giemsa para evidenciar a los LT. En los cortes histológicos obtenidos se contaron los LT presentes en 25 campos microscópicos considerando para este fin el estroma ovárico de la zona cortical y medular. Al comparar los resultados obtenidos entre el grupo de conejas gestantes con las NG (testigo), se encontró mayor número de LT ($P \leq 0.05$) en el día 2 de la gestación en relación a las conejas NG. A partir del día 3 se observó una disminución de LT que se mantuvo en el día 4 y 8. Al comparar los datos de los animales gestantes y pseudogestantes se encontró un menor número de LT en los días 5 y 8 del estado de pseudogestación en relación con los días 1 (≤ 0.05) y 2 ($P \leq 0.01$) de la gestación. En el grupo de PG disminuyeron los LT a partir del día 2 que se hizo más evidente los días 5 y 8, resultados que sugieren un papel activo de los LT en la remodelación tisular que se presenta en los primeros días posteriores a la ovulación. Estos resultados sugieren un efecto inhibidor de la progesterona sobre el número de LT del estroma ovárico de la coneja a partir del día 2 y 3 de la gestación y pseudogestación, respectivamente.

Descriptor: Linfocitos, migración, ovario, gestación, pseudogestación, coneja.

Trabajo financiado por el PAPIIT-UNAM (Proyecto IN 212101).

**MIGRACION LINFOCITARIA EN OVARIOS DE CONEJAS
(*Oryctolagus cuniculus*) DURANTE LA GESTACION TEMPRANA Y
PSEUDOGESTACION INDUCIDA CON hCG**

DESCRIPTORES: linfocitos, migración, ovarios, gestación, pseudogestación.

INTRODUCCIÓN

La coneja doméstica (*Oryctolagus cuniculus*) es una especie que presenta características reproductivas diferentes a las de otras especies, debido a que presenta una conducta estral caracterizada por el ciclo estral y ovulación inducida por el coito(1). La ovulación inducida ocurre entre 10 a 12 horas posteriores al coito, la cual puede ser ocasionada por monta de un macho infértil o por medio de un estímulo físico vulvar; en ambos casos se desencadena un reflejo neuroendocrino y en consecuencia se desarrolla un estado de pseudogestación (2).

Los eventos neuroendocrinos desencadenados por el apareamiento se relacionan a través del sistema de control ovárico hipotálamo-hipofisiario que funciona bajo 2 condiciones: a) Una actividad estacionaria o básica de tipo tónico, posiblemente responsable del desarrollo folicular continuo, y b) Una fase transitoria activada por diversos impulsos sensoriales que conducen a la activación preóptica-

hipofisaria-hipotalámica, seguida por la ovulación después de 10 a 12 horas (Cuadro 1).

Por otra parte, el estímulo mecánico de vagina o cérvix puede disparar la elevación de gonadotropinas, lo que desencadena la ovulación. Asimismo, cuando un animal ha sido tratado con estrógenos o cuando éstos se elevan de manera natural durante la etapa de estro, el estímulo del área genital puede desencadenar la ovulación (3).

Pincus y Enzmann establecieron los procesos de desarrollo, maduración y atresia de los folículos ováricos en la coneja (4).

El hipotálamo es el sitio en el que se traducen diferentes señales químicas neuroendocrinas, entre las que se encuentra la Hormona Liberadora de Hormona Luteinizante (LH-RH). La hipófisis funciona como un amplificador biológico que asegura una concentración eficaz de la Hormona Luteinizante (LH) en sangre para inducir la ovulación (Figura 1 y 2).

En la rata se ha observado que las múltiples intromisiones durante la cópula elevan los niveles de LH y prolongan la duración del pico de LH, sin embargo la activación nerviosa responsable del pico de LH-RH y del inicio de la descarga hipofisaria de LH y de la Hormona Folículo estimulante (FSH) culmina poco después del apareamiento.

Se ha estudiado el crecimiento de los folículos en el ovario de la coneja durante los periodos de elevación de los niveles de progesterona

en la sangre. La concentración de progesterona aumenta en la sangre por la gestación o por la administración de implantes de progesterona.

Existen estudios en conejas donde ha sido medida la concentración de estradiol en el contenido de folículos ováricos con 1 mm de diámetro ó más, entre la 1ª y 4ª semana de gestación o posterior a la administración de un tratamiento con implantes (parches) de progesterona. Mientras que las conejas no gestantes presentan folículos con diámetro superior a los 2.5 mm, en el caso de las hembras gestantes y las que fueron tratadas con implantes de progesterona presentan un diámetro máximo de 1.8 mm. Por otra parte, tanto en las gestantes como en las implantadas, la concentración de estradiol disminuye significativamente en comparación a los niveles presentes en folículos de conejas no tratadas. Asimismo, se ha informado que los implantes de progesterona no tienen mayor efecto sobre los niveles de LH y FSH en la sangre (Figura 3).

Una vez ocurrida la ovulación los niveles plasmáticos de 20 alfa hidroxiprogesterona y progesterona aumentan dentro de los 15 minutos posteriores al coito y alcanzan valores máximos en el lapso de 1 a 3 horas. En contraste, los niveles de progesterona alcanzan valores altos postcoito únicamente durante 5 horas, representando sólo una quinta parte de los niveles alcanzados de 20 alfa hidroxiprogesterona (3).

La progesterona ejerce una acción inhibitoria sobre el desarrollo folicular y en la función esteroidogénica del ovario de la coneja, ya que la acción de la progesterona al parecer es ejercida directamente sobre el ovario y no indirectamente, a través de la inhibición de la secreción gonadotrópica (5) (Figura 4).

En diferentes especies de mamíferos, la mayoría de los folículos presentes en el ovario son pequeños o atrésicos durante los períodos de concentración elevada de progesterona (fase lútea, gestación ó pseudogestación). Existen datos de que en la rata sólo los folículos menores de 600 μm de diámetro están presentes durante la gestación, excepto al final de este periodo cuando reaparecen los folículos de mayor diámetro. Asimismo, se ha informado de la reaparición de folículos grandes aparentemente asociados a un aumento brusco de LH en la sangre que se presenta cuando los niveles de progesterona disminuyen en la gestación tardía. En el caso de algunos primates, durante la gestación hay pocos folículos en desarrollo, probablemente debido a que la progesterona suprime la secreción de gonadotropinas; los ovarios, sin embargo, permanecen respondiendo a la estimulación de LH. En la mujer, la acción inhibitoria de progesterona sobre los folículos en crecimiento también parece ser mediada por la supresión de secreción gonadotrópica.

Con base en los estudios realizados en ratas y primates donde se indica una acción inhibitoria de la progesterona sobre el desarrollo folicular, en el caso de las ovejas se presenta una situación contraria.

En la oveja se han encontrado un mayor número de folículos en desarrollo en los ovarios que presentan cuerpo lúteo, que en aquellos en los que no se presenta. También se ha informado de una correlación positiva entre los niveles de progesterona en el suero y el número de folículos presentes en los ovarios (5).

Diversos estudios han evaluado el tamaño y contenido esteroidal de los folículos ováricos en conejas durante la pseudogestación temprana, registrando a los folículos viables y con un diámetro superior a 0.8mm presentes los días 0, 2 y 6 después de la inyección de una dosis ovulatoria de gonadotropina coriónica humana (hCG), con el fin de determinar su contenido de estradiol, testosterona y progesterona como indicadores de la función esteroideogénica. Los resultados demostraron un "agotamiento" de los folículos de mayor diámetro (>1.6mm), 2 días después de la inyección de hCG, observándose una subsecuente repoblación de los ovarios con folículos grandes en el día 6; asimismo la concentración de los tres esteroides determinados incrementó de manera general con el aumento del tamaño del folículo ya que dentro del proceso del desarrollo folicular los estrógenos y la progesterona

ováricos, regulan múltiples mecanismos autocrinos que participan en la formación y selección de los folículos (6) (Figura 5).

Los estrógenos regulan varias hormonas hipotalámicas e hipofisarias que, alternadamente, controlan funciones ováricas; asimismo sus metabolitos tales como catecoloestrógenos, también tienen efectos directos dentro del ovario.

Los estrógenos promueven el desarrollo folicular que culmina en la ovulación, inducen el desarrollo folicular, la expresión de receptores a gonadotropinas en las células de la granulosa, la esteroidogénesis y la formación de las uniones tipo nexo en las células de la granulosa, así como también participan en la formación y el mantenimiento del cuerpo lúteo (7).

Después de que ocurre la ovulación, en el ovario se inicia una serie de procesos de remodelación tisular, la cual incluye la formación y maduración funcional de un CL. Los cuerpos lúteos bajo el estímulo de la prolactina (8) experimentan un desarrollo continuo hasta alcanzar su máximo tamaño alrededor del día 16 de la gestación, este aumento en el volumen se debe a la hipertrofia de las células lúteas; a los dos días de haber ocurrido la ovulación, el diámetro de los CL en ovarios de la coneja doméstica es de aproximadamente 2 mm y se incrementa a 5 mm al final de la segunda semana postovulatoria (9).

En el estroma ovárico es posible distinguir diferentes células con funciones inmunitarias presentes en el tejido ovárico entre las cuales se encuentran linfocitos, neutrófilos, macrófagos, células plasmáticas y mastocitos, estas células provienen del torrente sanguíneo y son residentes temporales del tejido conjuntivo. (10).

Una parte de los macrófagos presentes en ambas áreas expresaron antígenos clase II del complejo principal de histocompatibilidad (MHC); éstas células se encontraban presentes sobre todo en la región medular, sin cambios en la densidad aparentes durante el periodo preovulatorio. Los neutrófilos representan una porción más pequeña de la población total de leucocitos en la región medular pero fueron abundantes en la capa tecal. La densidad de neutrófilos se incrementó 3 veces en la región medular y 8 veces en la región tecal durante la ovulación comparado a los folículos preovulatorios.

Respecto a los linfocitos T, éstos se encontraron uniformemente con una densidad relativamente baja en la médula y en el estroma de la corteza. La mayoría de los linfocitos T expresaron el antígeno CD8. Con base en estos estudios, actualmente se sabe que los macrófagos, los neutrófilos y los linfocitos T están presentes en el ovario durante la ovulación.

Es de llamar la atención que ocurre un incremento selectivo en el número de macrófagos y neutrófilos en la región medular y en la capa teical conforme progresa el periodo ovulatorio, indicando que estas células participan activamente en la remodelación del ovario durante la ovulación (11).

Los ovarios a diferencia de los testículos, no presentan una barrera distinta entre el sistema inmune y los gametos en desarrollo, sin embargo los factores inmunes tienen implicaciones frecuentes en la disfunción ovárica.

Gran parte del conocimiento actual sobre el sistema inmune de los ovarios proviene de estudios sobre la expresión de proteínas en la zona pelúcida (ZP) durante el desarrollo ovárico (12).

La evidencia reciente indica que las células del sistema inmune y que productos de secreción como las citocinas, desempeñan un papel activo en el ovario durante todo el ciclo estral.

Se ha informado que en la etapa de gestación temprana de la yegua, el número de células CD4, CD8 y macrófagos disminuye, así como la expresión del MHC II, comparado con las muestras del diestro medio.

De manera similar la distribución de los eosinófilos en equinos es escasa y su población disminuye notoriamente en la gestación. Estos resultados indican que las poblaciones de células inmunitarias en el CL de esta especie varían en las diferentes etapas fisiológicas. El aumento selectivo en células CD8 antes de la luteólisis funcional sugiere que tienen un papel fisiológico en la regresión del CL (13).

En ratas gestantes y pseudogestantes se detectaron, con anticuerpos monoclonales, diferentes células inmunológicas incluyendo monocitos/macrófagos, granulocitos y linfocitos T en el cuerpo lúteo (CL). Los datos obtenidos coinciden con la hipótesis de que la involución del CL se promueve a través de la interacción de las células inflamatorias y la acción del Factor de Necrosis Tumoral (TNF), aunque la acción del TNF no se ha determinado en el tejido luteal (14).

En la migración leucocitaria ocurren múltiples interacciones entre dichas células y las células del tejido conjuntivo, cumpliendo una función fundamental en este proceso los mediadores solubles conocidos como citocinas. Estas moléculas son sintetizadas por diversas células del organismo y actualmente se sabe que son muy importantes en la regulación de la respuesta inmunológica sistémica y local (15).

Recientemente se ha propuesto que diversas citocinas secretadas por los leucocitos residentes en el estroma ovárico, influyen sobre la función esteroideogénica de esta glándula y en los procesos de remodelación tisular locales (14,16).

En los ovarios en estado preovulatorio la secreción del Factor Estimulador de Colonias de Macrófagos Granulocitos (GM-CSF) no es influenciada por la LH pero se observa un aumento cuando la Interleucina 1β (IL- 1β) recombinante humana (4ng/ml) es agregada al medio de perfusión. Diversas evidencias indican que las citocinas proinflamatorias semejantes como IL1, IL6 y TNF alfa modulan los cambios esteroideogénicos, los cuales tienen lugar durante la luteinización (17).

En el CL de la coneja se han identificado linfocitos T y macrófagos tanto en la gestación como durante la pseudogestación; en esta especie existe una correlación funcional entre el incremento en el número de macrófagos y la involución del CL, lo que sugiere la actividad de este tipo de células en el proceso de luteolisis (18); por otro lado, los leucocitos residentes en el estroma ovárico aparentemente participan en la ruptura del folículo y en la transformación a un CL funcional.

La importancia potencial de las citocinas proinflamatorias en los mecanismos de control de la luteolisis es sugerida por la capacidad de IL1 y TNF alfa de disminuir ambos la producción de progesterona y la supervivencia de las células luteales en bovino (19) (Cuadro 2).

Los CL que se forman después de la ovulación son esenciales para el establecimiento y mantenimiento de la gestación debido a que constituyen la única fuente de progesterona (P_4) (20). La literatura refiere que existe una correlación estrecha entre el peso del tejido luteal y las concentraciones séricas de P_4 durante la gestación y pseudogestación (21).

La síntesis de P_4 registra variaciones durante la gestación y pseudogestación en la coneja. La concentración plasmática de P_4 durante la pseudogestación, determinada a partir de una muestra de sangre tomada directamente de la vena ovárica o indirectamente de la circulación periférica, aumenta significativamente entre el día 9 y 13 después de inducir la ovulación por la aplicación intramuscular (IM) de gonadotropina coriónica humana (hCG), disminuyendo significativamente a niveles muy bajos a partir de los días 16 al 18 (22,23).

El CL formado durante la pseudopreñez o gestación temprana, permanece secretor hasta el día 16 postcoito y después de este día se inicia su involución, proceso que abarca aproximadamente 5 días (24).

En conejas pseudogestantes tratadas con metilprednisolona (antiinflamatorio esteroidal) los linfocitos T virtualmente fueron eliminados del tejido luteal, no existiendo cambios en los niveles séricos de P_4 , estos hallazgos sugieren que los linfocitos T y sus productos de secreción (diversas citocinas) no influyen sobre la función del CL en esta especie (25).

En estudios recientes se ha informado de la participación de diferentes subpoblaciones linfocitarias en la actividad funcional del cuerpo lúteo en el ciclo estral, así como durante la gestación en la yegua (26). De igual forma se ha observado la distribución temporal de diferentes subpoblaciones leucocitarias en el cuerpo lúteo de la rata gestante y con pseudogestación (14), sin embargo debido a las particularidades de tipo endócrino e histológico que presentan ambas especies no es posible inferir esta información a la coneja.

Actualmente se desconoce la migración de células inmunitarias, particularmente linfocitos en el estroma ovárico de conejas en el inicio de la gestación y pseudogestación, dadas las modificaciones tisulares que tienen lugar en el desarrollo morfológico y funcional del cuerpo lúteo y el microambiente hormonal predominante en estas etapas.

OBJETIVOS

1. Estudiar la actividad migratoria de linfocitos totales en el estroma ovárico de conejas no gestantes.
2. Estudiar la actividad migratoria de linfocitos totales en el estroma ovárico de la coneja gestante durante los días 1,2,3,4,5 y 8 posteriores a la ovulación.
3. Estudiar la actividad migratoria de los linfocitos totales en el estroma ovárico de conejas pseudogestantes tratadas con hCG, durante los días 1,2,3,4,5 y 8 posteriores a la ovulación.
4. Determinar las posibles diferencias entre animales gestantes y pseudogestantes, durante los ocho días posteriores a la ovulación, así como entre éstos y el grupo testigo.

MATERIAL Y METODOS

El presente estudio se realizó en el laboratorio de Fisiología Tisular de la Reproducción Animal del Departamento de Morfología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

Animales y manejo

Para la realización del presente estudio se utilizaron 41 conejas Nueva Zelanda blancas sexualmente maduras (3.5 kg \bar{x}) nulíparas que se mantuvieron en condiciones ambientales de bioterio, alojadas en jaulas individuales con alimento concentrado comercial y agua de bebida *ad libitum*. Se formaron 12 grupos de 3 animales cada uno. 6 de estos 12 grupos fueron utilizados para lograr en las conejas un estado de gestación (Grupo Gx) y los 6 grupos restantes para inducir un estado de pseudogestación (Grupo Ps). Cada uno de los 6 grupos representan los días 1,2,3,4,5 y 8 de avance tanto de la gestación como de la pseudogestación, correspondiendo el grupo (g) 1 al día (d) 1, el g2 al d2, el g3 al d3, el g4 al d4, el g5 al d5 y el g6 al d8. Paralelamente se contó con un grupo de animales testigo, consistente en 5 conejas adultas nulíparas.

El estado de gestación en las conejas se logró al darles monta, dos veces al día, una en la mañana y una en la tarde, con sementales experimentados de la misma raza.

Asimismo, el estado de pseudogestación se logró al inducir la ovulación en las conejas mediante la administración de 100 UI de gonadotropina coriónica humana (hCG) (Chorulon, Intervet®) por vía intramuscular.

El día de la cruce ó de la aplicación de hCG se consideró como día "0" del experimento.

Para poder confirmar el estado de gestación en las conejas, éstas fueron sometidas a eutanasia mediante una sobredosis de pentobarbital sódico (90 mg/kg) (27) a fin de verificar la presencia de embriones en lavados efectuados en el oviducto y en cuernos uterinos con solución salina fisiológica, asimismo se corroboró la existencia de cuerpos hemorrágicos y/o lúteos en la superficie ovárica. Posteriormente el aparato reproductor y se fijó en una solución de ácido pícrico (15%) y paraformaldehído (4%) en un amortiguador de fosfatos (PBS), pH 7.4, durante 8 horas para su procesamiento histológico.

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). Posteriormente se efectuaron cortes semiseriados de 6 μ m de grosor en un microtomo (Spencer 820),

algunos de estos cortes se tiñeron con la técnica Tricrómica de Gomori para la observación de la estructura histológica general de los ovarios y otros con la tinción de Giemsa para evidenciar a los linfocitos (10).

Conteo celular

Para el conteo de linfocitos se utilizó un ocular con retícula micrométrica y un microscopio fotónico (Ziess). Se contaron las células presentes en 25 campos microscópicos con el objetivo 40X. y se consideró el estroma ovárico de la zona cortical y medular

Análisis estadístico

Los datos obtenidos del conteo celular se analizaron mediante la prueba estadística no paramétrica de Tukey. Se utilizó el sistema Prism 2.0 (C.A) para efectuar la comparación entre los diferentes grupos (28).

RESULTADOS

Al comparar el número de linfocitos totales del grupo testigo (NG) con los del grupo gestante, se observó un mayor número ($P < 0.05$) en el día 2 de gestación en relación con el NG; por otra parte, también se observó un incremento en el día 1 de la gestación con respecto a los NG, aunque éste último no resultó ser estadísticamente significativo (Figura 6 y 7).

Al comparar entre sí el número de linfocitos totales de los diferentes días de gestación y pseudogestación se pudo observar, de manera notable, un menor número en los animales pseudogestantes del día 5 y 8 en relación con los gestantes del día 2 ($P < 0.01$) y del día 1 ($P < 0.05$).

Asimismo, se observó un número menor de linfocitos totales en los animales pseudogestantes del día 5 y 8 con respecto a los del día 1 (Figura 8 y 9).

DISCUSIÓN

En el grupo de animales gestantes se encontró un incremento en el número de linfocitos totales en los días 1 y 2, siendo estadísticamente significativo el día 2, con relación al valor promedio obtenido en los animales no gestantes. Posteriormente a partir del día 3 de la gestación se observó una disminución de linfocitos que se mantuvo en el día 4 y 8.

En el día 5 de gestación se presentó un incremento notorio de linfocitos en relación a los días 3, 4 y 8 donde se presenta un decremento constante de éstas células, lo cual resulta un hallazgo interesante para su posterior análisis mediante un estudio específico. Durante el desarrollo y etapa funcional del cuerpo lúteo, el ovario secreta moléculas que llevan mensajes, capaces de atraer ciertas poblaciones y subpoblaciones de leucocitos que efectúan funciones especiales como; el rompimiento del tejido extracelular y la regulación de la función esteroideogénica de las células del ovario; es probable que el incremento temporal en la afluencia de linfocitos tenga relación con los procesos de remodelación del estroma ovárico que ocurre posteriormente a la ovulación, sin embargo, la comprensión de los eventos de interacción celular que se desarrollan en el tejido ovárico se

torna compleja debido a que el cuerpo lúteo es una estructura heterogénea, compuesta por diferentes poblaciones celulares.

Por otra parte, en los animales pseudogestantes también se observó este incremento de linfocitos en el día 1 post-ovulación y a partir del día 2 se presentó una disminución que se hizo más evidente los días 5 y 8. Estos resultados son similares a lo observado en las conejas gestantes donde, a excepción del día 5 en el que se presenta un repunte, el número de linfocitos disminuye de manera constante a partir del día 3 sugiriendo un papel activo de éstas células inmunitarias en la remodelación tisular que ocurre en los primeros días posteriores a la ovulación.

Diversos estudios en diferentes especies animales indican que las células inmunológicas juegan un papel importante en la actividad ovárica cíclica.

Los resultados obtenidos sugieren un posible efecto inhibitorio de la progesterona sobre el número de linfocitos del estroma ovárico a partir del día 2 y 3 de pseudogestación y gestación, respectivamente; además del efecto que la progesterona ejerce sobre el desarrollo folicular y la función esteroideogénica en el ovario de la coneja citado anteriormente.

Diversos estudios han demostrado que los estrógenos, particularmente el 17 beta estradiol producido por los folículos, tienen un efecto luteotrópico en la coneja (21).

Estos datos sugieren la existencia de efectos locales de los estrógenos, por lo que es difícil aseverar que la migración linfocitaria observada en el estroma ovárico sea exclusivamente por efecto progestacional; sin embargo, durante la gestación o pseudogestación existe un predominio en los niveles de progesterona sobre el de los estrógenos. Para poder conocer la influencia de los estrógenos o la progesterona a nivel local y en particular sobre la migración de linfocitos, se requiere el empleo de compuestos antiestrogénicos como el Tamoxifen o antiprogestacionales como el RU-486.

El proceso ovulatorio se ha comparado con la inflamación porque varios mediadores inflamatorios clásicos parecen participar en este proceso. Un componente de la reacción inflamatoria es la migración de leucocitos al sitio de la inflamación y de la activación subsecuente de éstas células. Se ha informado recientemente que la perfusión *in vitro* de leucocitos en el ovario de la rata aumenta el número de ovulaciones inducidas por LH, lo que sugiere una participación activa de los leucocitos en la ovulación (11).

Lo anterior podría explicar el incremento en el número de linfocitos totales que se observan durante los dos primeros días de la gestación o en el primer día de la pseudogestación.

A este respecto se ha efectuado la caracterización inmunohistoquímica de los macrófagos, linfocitos T y granulocitos en los ovarios de rata tratadas con Gonadotropina Coriónica Equina (eCG) - Gonadotropina Coriónica Humana (hCG).

Los macrófagos, identificados con anticuerpos monoclonales fueron la principal población de leucocitos y se localizaron principalmente en la región medular alrededor de los vasos sanguíneos. También se observaron macrófagos en la capa tecal de los folículos preovulatorios, y el número de éstas células fue aproximadamente 5 veces mayor en esta área en los folículos ovulatorios (12 h después de hCG), comparado con los folículos preovulatorios (antes de hCG) (11).

CONCLUSIONES

1. Existen diferencias en el número de linfocitos totales presentes en el estroma ovárico de conejas no gestantes con relación a las gestantes del día 2.
2. Se encontró una disminución en el número de linfocitos totales presentes en el estroma ovárico en los días 3 a 5 y 8 de gestación con relación al día 2 de la misma.
3. Se encontró un incremento en el número de linfocitos totales del estroma ovárico en el día 2 de la gestación con relación a las pseudogestantes del mismo día y al \bar{x} de NG.
4. Se encontró una disminución en el número de linfocitos totales los días 5 y 8 de la pseudogestación con relación a los 2 primeros días de la gestación.
5. Se encontró una disminución en el número de linfocitos totales los días 5 y 8 de pseudogestación con relación al día 1 de la misma.
6. Las variaciones en el número de linfocitos totales en el estroma ovárico fueron similares entre el grupo de animales gestantes y pseudogestantes.

LITERATURA CITADA

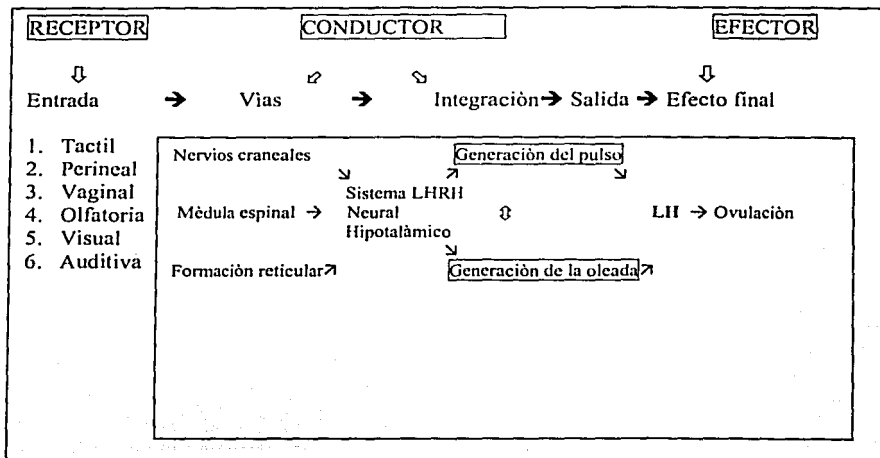
1. Alvaríño MR. Control de la reproducción en el conejo. Madrid, España: Mundi-Prensa, 1993.
2. Valencia MJ. Reproducción en el conejo (*Oryctolagus cuniculus*) In: Memorias del curso de actualización: El conejo como animal de granja y de laboratorio, México: Ed. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. 1985.
3. Knobil E, Nelly JD. The Physiology of Reproduction. New York: Raven Press, 1994.
4. Pincus G, Enzmann EV. The growth, maturation and atresia of ovarian eggs in the rabbit. J. Morphol. 1937; 61: 351-383.
5. Setty SL, Mills TM. The effects of progesterone on follicular growth in the rabbit ovary. Biol. Reprod 1987; 36: 1247-1252.
6. Osteen KG, Mills TM. Changes in the size, distribution and steroid content of rabbit ovarian follicles during early pseudopregnancy. Biol. Reprod 1980; 22: 1040-1046.
7. Rosenfield CS, Wagner JS, Robert RM, Lubahn DB. Intraovarian actions of oestrogen. Reproduction 2001; 122: 215-226.
8. Fuchs AR, Cubile L, Dawood WY. Effects of mating on levels of oxytocin and prolactin in the plasma of male and female rabbits. J Endocrinol 1981; 90:245-253.
9. Chapman JA, Hockman JG, Edwards WR. Cottontails. *Silvilagus floridanus* and Allies. En: Wild mammals of North America (Chapman JA y Feldhamen GA, eds.) Baltimore and London, The Johns Hopkins University Press, 1982:83-123.
10. Banks JW. Histología Veterinaria Aplicada. México: Manual Moderno, 1986.
11. Brannstrom M, Mayrhofer G, Robertson SA. Localization of leukocyte subsets in the rat ovary during the preovulatory period. Biol. Reprod 1993; 48: 277-286.

12. Dunbar BS, Prasad S, Carino C, Skinner SM. The ovary as an immune target. *J Soc Gynecol Investig* 2001; 8:43-48.
13. Lawler DF, Hopkins J, Watson ED. Immune cell populations in the equine corpus luteum throughout the oestrus cycle and early pregnancy: an immunohistochemical and flow cytometric study. *Journal. Reprod. Fertility* 1999; 117: 281-290.
14. Brannstrom M, Giesecke L, Moore IC, Van Den Heuvel CJ, Robertson SA. Leukocyte subpopulations in the rat corpus luteum during pregnancy and pseudopregnancy. *Biol. Reprod* 1994; 50: 1161-1167.
15. García TF. *Fundamentos de Inmunobiología*. Dirección General de Publicaciones, UNAM. México, D.F. 1997.
16. Adoshi EY: The potential relevance of cytokines to ovarian physiology: emerging role of resident ovarian cells of the white blood cell series. *Endocr. Rev.* 1990; 11: 454-464.
17. Brannstrom M, Norman RJ, Seamark RF, Robertson SA.: Rat ovary produces cytokines during ovulation. *Biol. Reprod* 1994; 50: 88-94.
18. Bagavandos P, Wiggins RC, Kunkel SL, Remick DG and Keyes PL. Tumor necrosis factor production and accumulation of inflammatory cells in the corpus luteum of pseudopregnancy and pregnancy in Rabbits. *Biology of reproduction* 1990;42:367-376.
19. Martal J, Chene N, Huynh L, Gharib-Hamrouche N, de la Llosa-Hermier MP. Cytokines and the corpus luteum. *Contracept Fertil Sex* 1994; 22: 635-647.
20. Holt, JA. Regulation of progesterone production in the rabbit corpus luteum. *Biol. Reprod.* 1989;40:201-208.
21. Miller JB, Keyes PL. A mechanism for regression of the rabbit corpus luteum: uterine induced loss of luteal responsiveness to 17 β -estradiol. *Biol Reprod* 1976;15: 511-18.
22. Carlson JC, Gole JD. CL regression in the pseudopregnant rabbit and the effects of treatment with prostaglandin F $_{2\alpha}$ and arachidonic acid. *J Reprod. Fert.* 1978;53:381-87.

23. Dharmarajan AM, Yoshimura Y, Sueoka K, Atlas SJ, Dubin NH, Ewing L, Zirkin BR, Wallach EE. Progesterone secretion by corpora lutea of the isolated perfused rabbit ovary during pseudopregnancy. *Biol Reprod.* 1988;38:1137-1143.
24. Rowlands IW, Weire BJ. Mammals: Non primate Eutherians. En: Marshall's physiology of reproduction, Cap. 7. Vol. 1, Reproductive cycles of vertebrates. Lomming GE, ed. New York. Churchill, Livingstone, 1984:495-500.
25. Seiner SJ, Schramm W, Keyes PL. Effect of treatment with methylprednisolone on duration of pseudopregnancy and on macrophages and T lymphocytes in rabbit corpora lutea. *J Reprod Fertil.* 1992;96:347-353.
26. Lawler D.F., Hopkins J and Watson ED. Immune cell population in the equine corpus luteum throughout the oestrus cycle and early pregnancy: an Immunohistochemical and flow cytometric study. *J Reprod and Fertil.* 1999;117:281-290.
27. AVMA. Report of the AVMA panel on euthanasia. *JAVMA* 1993; 202-230.
28. Steel SR y Torrie HJ. Bioestadística, Principios y procedimientos. Estadística no Paramétrica. 2a ed. México, D.F. Mc Graw-Hill, 1988.

ANEXO

FIG 1. DIAGRAMA DE LOS COMPONENTES PRINCIPALES DEL ARCO REFLEJO COPULOCEPTIVO EN EL CONEJO*



* Modificado de Knobil, The physiology of reproduction. 1994.

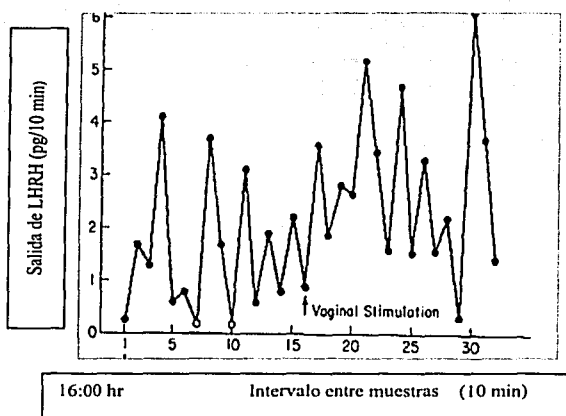


FIG 2. MODELO DE LIBERACIÓN ESPONTÁNEA DE LH-RH *IN VIVO* EN HIPOTÁLAMO DE UNA CONEJA JOVEN EN ANESTRO*. (* Modificado de Knobil, The physiology of reproduction. 1994.)

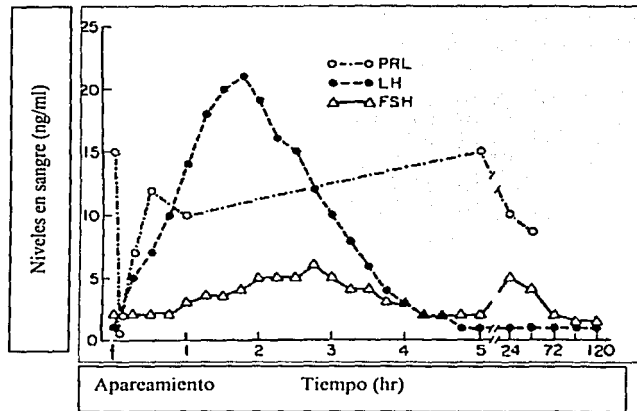


FIGURA 3. FIGURA COMPUESTA DEMOSTRANDO LA DINAMICA DE LH Y FSH EN SANGRE DE CONEJA EN RESPUESTA A LA COPULA*. (* Modificado de Knobil, The physiology of reproduction, 1994).

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

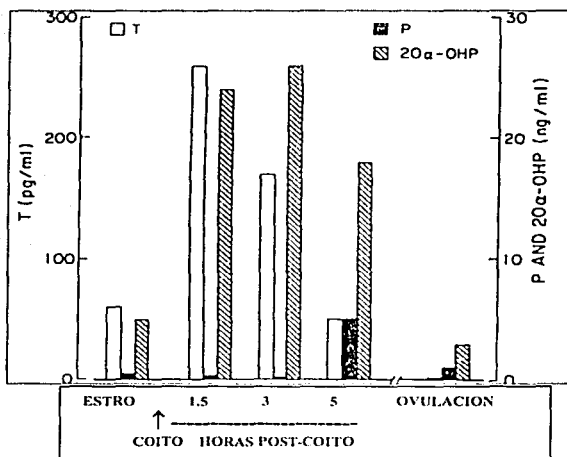


FIGURA 4. GRÁFICA QUE DESCRIBE LOS CAMBIOS EN LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE TESTOSTERONA (T), PROGESTERONA (P) Y 20 α -HIDROXYPROGESTERONA (20 α -OHP) DE CONEJAS EN ESTRO SUBSIGUIENTE AL COITO*. (* Modificado de Knobil, The physiology of reproduction, 1994).

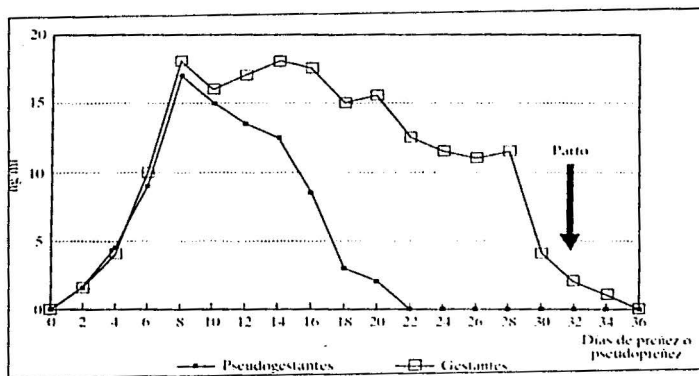


FIGURA 5. CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE PROGESTERONA EN CONEJAS GESTANTES O PSEUDOGESTANTES. (Tomado de Alvariño, Control de la Reproducción en el conejo. 1993).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

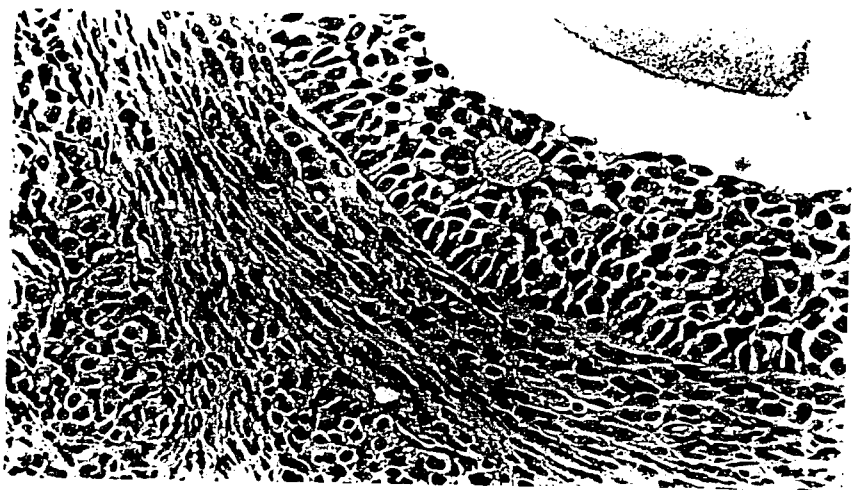


FIGURA 6. AUMENTO DE LINFOCITOS (flechas) EN EL ESTROMA OVÁRICO DE CONEJA DURANTE EL SEGUNDO DÍA DE GESTACIÓN, H-E, 32X.

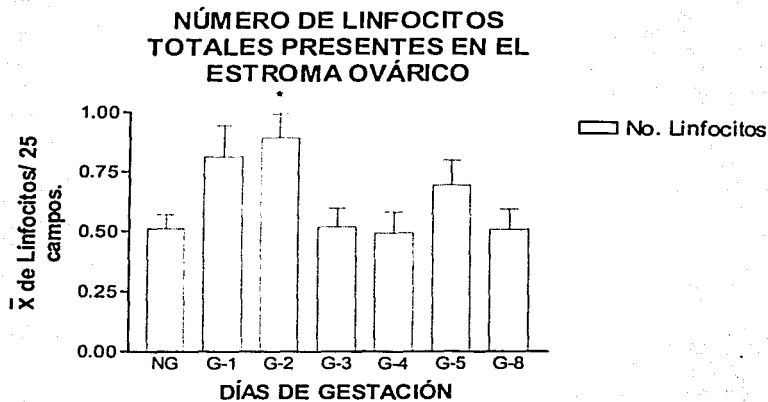


Figura 7. Linfocitos totales en el estroma ovárico de conejas gestantes (G-1 a 5 y G-8) y no gestantes (NG). Los valores son expresados como promedios +/- error estándar. * $P < 0.05$ vs NG.

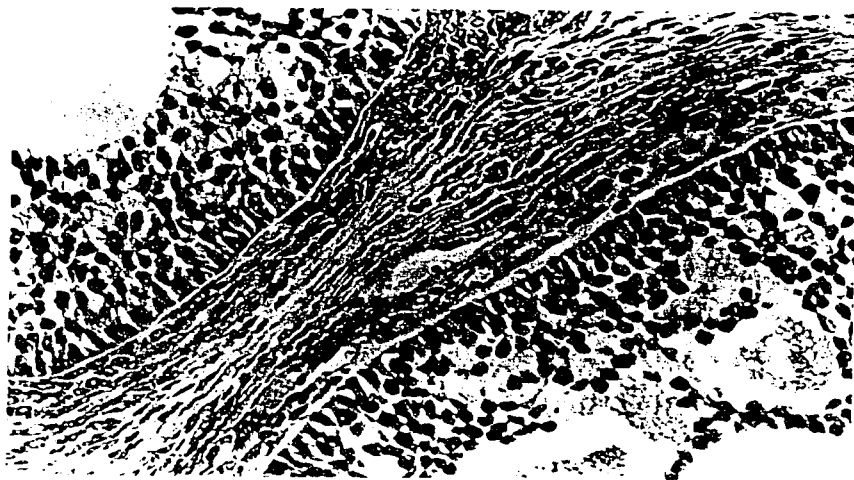


FIGURA 8. AUMENTO DE LINFOCITOS (flechas) EN EL ESTROMA OVÁRICO DE CONEJA EN EL DÍA 1 DE PSEUDOGESTACIÓN INDUCIDA CON hCG, GIEMSA, 32X.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

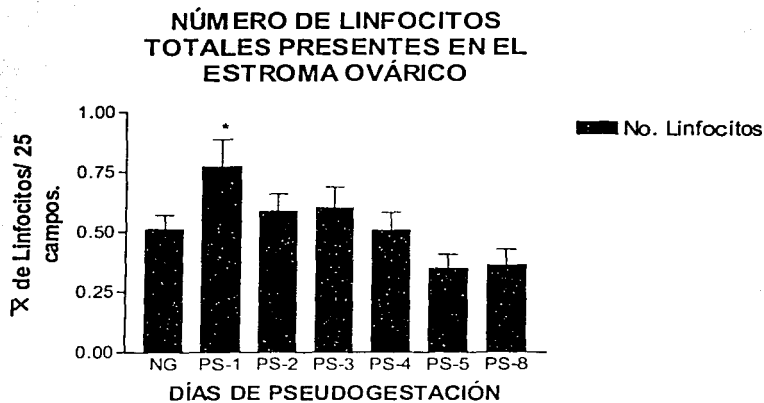


Figura 9. Linfoцитos totales en el estroma ovárico de conejas pseudogestantes (PS-1 a 5 y PS-8). Los valores son expresados como promedios +/- error estándar. *P < 0.05 vs PSS.

CUADRO 1. SECUENCIA DE EVENTOS NEUROENDÓCRINOS EN EL POSTCOITO DE LA CONEJA*

TIEMPO POSTCOITO	HIPOFISIS	OVARIO	SANGRE VENOSA OVÁRICA
<1 min			
<2 min			
10 min	↑ fosforilación		
10-30 min	↑ liberación de LH	↑ síntesis y liberación de progesterona	
30 min	↑ liberación de LH aproximadamente en un 20% completado.		↑ progesterona
	Hipofisectomía impide la ovulación.	↑ fosforilación	
60 min	↑ liberación de LH (ahora suficiente para la ovulación)	↑ síntesis y liberación de progesterona	↑ progesterona
1-2 hr	↑ liberación de LH		↑ progesterona ↑ progesterona en sangre periférica
3-5 hr		Ausencia del colesterol en glándula intersticial.	

* Modificado de Knobil, The physiology of reproduction. 1994.

↑ Aumento

CUADRO 2. EJEMPLO DE CITOCINAS QUE PARTICIPAN EN LA REGULACIÓN DE LA MIGRACIÓN LINFOCITARIA (Cassatella, 1996).

CITOCINAS

Interleucinas

Interleucina -1 α
 Interleucina -1 β
 Interleucina -1 receptor antagonista
 Interleucina -2
 Interleucina -3
 Interleucina -4
 Interleucina -5
 Interleucina -6
 Interleucina -7
 Interleucina -9
 Interleucina -10
 Interleucina -11
 Interleucina -12
 Interleucina -13
 Interleucina -14
 Interleucina -15
 Interleucina -16
 Interleucina -17

QUIMIOCINAS

Interleucina 8 (IL-8).
 (MCP-1)
 Linfotactina

Interferones

Interferon- α
 Interferon- β
 Interferon-gamma

Varios

Eritropoyetina
 Factor inhibidor de leucemia
 Oncostatina M
 Factor de células madre
 Angiogenin

Factor de Necrosis Tumoral (TNF)

Caquectina (TNF α)
 β Linfotoxinas (TNF131, TNF132)

Factor Estimulador de Colonias (CSF)

CSF de Granulocitos
 CSF de Macrófagos
 CSF de Macrófagos Granulocitos

Factor de Crecimiento

Factor de crecimiento de queratinocitos
 Factor de crecimiento Epidermal
 Factores de Crecimiento de fibroblastos
 Factor de crecimiento de hepatocitos
 Factores de Crecimiento semejante a la insulina
 Factores de Crecimiento derivados de plaquetas
 Factor de crecimiento del endotelio vascular
 Otros

Factor de Crecimiento Transformante(TGF)

TGF α
 TGF- β 1, - β 2, - β 3, - β 4, - β 5
 Activinas

Factores Neurotrópicos

Factor de Crecimiento Nervioso (NGF)
 Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (BONF)
 Factor Neurotrófico Ciliar (CNTF)
 Neurotropinas (NT)