



W P Q O U U O O O A P O O W P O S A O E W 3 P U T O Z O O A T " Y O U

O O W S V O O A O O A T O O O O O A K O N O U O O E U O E Y A Z U U V O O P O E

X a e ã e ã } ^ • Á } Á a Á ä | a e ã } Á ^ Á ã { & a [ • Á } Á | Á } a [ { ^ d a Á ^ Á O [ } ^ b e  
V i a e a e Á [ } Á ã ^ ! • [ • Ô [ { ] ^ • d • Ü ^ \* ^ | a a [ ! ^ • Á ^ Á e O ! d ã a a È

V ^ • ã

Û ^ ^ Á a e a [ à c } ^ ! Á | Á ã [ [ Á ^ Á T . . a ã [ Á ^ c ! ã a e ã Á Z [ [ c & } ã c e

Ú ! ^ • ^ } c e

P ^ ã : ã @ ã | Á O F b e } a i [ Á T a p a [ } a a [ Á Ú . . ! ^ :

O E ^ • [ ! ^ • K

T X Z Á Ú a e c a e [ Á Ü ^ } . Á O E : a p a g a e O E &

T X Z Á P . . & d | Á X ã | a e ^ f i [ ! Á O a e } a e

Ö ! É Á T a e & [ Á O E d } ã Á Ô ^ ! à 5 } Á Ô ^ ! ç a e c •

Ô ã a a a Á M } ã ^ ! • ã a e ã Z Ö Ö T Y

G J B X } ã B C F I



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.

## DEDICATORIA

OF{ ā Á] æ!^•Á^Á@!{ æ æ~ a}^•Á @ Á•æ[ Á^|Á] !ā &ā æÁ&ā ā} d Á] ææ|æ  
& }•d~ && } Á^Á æææ! [ ^•ā } æ^ } æ[ } Á} Á æææ^Á^Á^•] [ }•ææææÁ  
å^•^[ •Á^Á~ ] ^!ææ } Á Á~^Á ^Á @ Á ^&æ[ Á~ Áæ [ !Á Áææ^: Á^Áææ æææææ  
& ææ [ È

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi familia, especialmente a mi madre, por su apoyo y comprensión durante todo el proceso. También quiero agradecer a mis amigos por su compañía y motivación. Finalmente, quiero agradecer a mi profesor por su guía y paciencia.



## RESUMEN

MALDONADO PÉREZ HUITZILIHUITL ALEJANDRO. Variaciones en la Migración de Linfocitos en el Endometrio de Conejas Tratadas con Diversos Compuestos Reguladores de la Fertilidad. (Bajo la dirección de: M.V.Z. Santiago René Anzaldúa Arce, M.V.Z. Héctor Villaseñor Gaona y Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes)

La noretisterona (NET) y sus metabolitos, se han empleado como un método anticonceptivo en las hembras. El objetivo del presente trabajo fue determinar si existen diferencias en la cantidad de linfocitos intraepiteliales, glandulares y del tejido conjuntivo del endometrio de conejas con 8 días de gestación, pseudogestantes y conejas no gestantes, además de conejas tratadas con NET y sus metabolitos como son la 5 -dihidronoretisterona (5 -NET) y la 3 -5 tetrahidronoretisterona (3 -5 -NET), un antiprogestágeno de referencia (RU-486), el 17 estradiol (17 -E) y además del grupo testigo tratado con Propelinglicol (PPG) utilizando 36 conejas nulíparas de la raza Nueva Zelanda adultas que se dividieron en estos nueve grupos (n=4). Las conejas se sacrificaron de acuerdo con el protocolo experimental por medio de una inyección intracardiaca letal de pentobarbital sódico, previa anestesia de los animales. Posteriormente a su sacrificio se obtuvieron fragmentos del útero que se fijaron y procesaron por inclusión en parafina para efectuar cortes histológicos que se tiñeron con H. y E. y con Giemsa para efectuar el conteo de linfocitos totales presentes en el epitelio de revestimiento (E.R.), en el glandular (E.G.) y en el tejido conjuntivo (T.C.). Se observó en el E.R., que el número de linfocitos fue menor al encontrado en el T.C. pero fue similar al del E.G. Y en el T.C. se observó que la cantidad de linfocitos es mayor que E.R. y E.G. (P 0.0001). Las conejas gestantes mostraron una menor afluencia de linfocitos tanto en el T.C. como en el E.R. y E.G. en relación con el grupo de conejas no gestantes y el resto de los grupos tratados con progestinas excepto en el caso de la NET en el que se observó un número similar al de las gestantes. En el caso de los animales tratados con 17

estradiol y  $3 \times 10^{-5}$  -NET se observó un incremento significativo en la cantidad de linfocitos en el T.C. y en el E.R. y en el caso del E.G. solo los animales tratados con  $3 \times 10^{-5}$  -NET mostraron un incremento significativo. En el T.C el número de linfocitos fue significativamente mayor en las hembras tratadas con  $17 \times 10^{-5}$  estradiol y  $3 \times 10^{-5}$  -NET en relación con los demás tratamiento y las hembras no gestantes. Los resultados demuestran que los diferentes tratamientos hormonales modifican la distribución y cantidad de la migración de linfocitos en el epitelio, glándulas y lámina propia del endometrio de la coneja.

## INTRODUCCIÓN

El problema de la sobrepoblación no es exclusivo de nuestra especie, ya que en algunos animales domésticos (como los perros y gatos) la regulación de la fertilidad se ha convertido en un problema de salud, precisamente por su sobrepoblación, por lo que en diversas circunstancias representan un importante riesgo de salud pública, de tal forma que todos los esfuerzos encaminados al estudio de métodos de regulación de la fertilidad o anticonceptivos son de primordial importancia para poder afrontar los retos que el futuro inmediato nos plantea en esta área. Por otro lado, el complejo proceso reproductivo en la especie humana y otras especies de mamíferos domésticos presenta diversas oportunidades y niveles de intervención, ya sea para la reproducción o para su regulación, que van desde la obtención de los gametos hasta la implantación del óvulo fecundado en la pared uterina y su normal desarrollo en este sitio (Anzaldúa A.S.R, 1996).

Una de las estrategias más eficaces y mayormente empleadas como anticonceptivas consisten en la regulación del ciclo estral mediante su intervención hormonal y modificando la fertilidad en las hembras, para lo cual se recurre al empleo de múltiples compuestos sintéticos o naturales de naturaleza esteroide con gran actividad biológica, como son los estrogénicos y los progestacionales, con la finalidad de modificar la velocidad en el transporte de los gametos y

evitando la ovulación. Estos compuestos han permitido implementar diversas estrategias de terapia hormonal anticonceptiva en las mujeres que se emplean cada día con mejores resultados y con un gran margen de seguridad, abatiendo riesgos y efectos indeseables. En la actualidad el estudio de progestágenos y estrógenos sintéticos constituyen un pilar preponderante en la investigación biomédica, que permite diseñar nuevos métodos de planificación reproductiva, así como optimizar los ya existentes. Igualmente, el estudio de procedimientos contragestacionales postcoito ocupa un sitio relevante en la investigación biomédica en este campo (Díaz y et al., 1982).

Dentro de los esteroides sintéticos con los que se cuenta en la actualidad destacan los progestágenos, que se clasifican en tres grupos de acuerdo a su composición química, los derivados de: 1) la 17 alfa-hidroxi-progesterona como son: los acetatos de clormadinona y de medroxiprogesterona, 2) la 19-nortestosterona entre los que encontramos a la noretisterona, noretinodrel, 3) el levonorgestrel entre los cuales encontramos al desogestrel, gestodeno y norgestimato (Sociedad Iberoamericana de Información Científica [SIIC], 2002). Dentro del segundo grupo se encuentran los compuestos más frecuentemente empleados y de ellos un lugar relevante lo ocupa la noretisterona (NET) que se emplea en diversas presentaciones anticonceptivas [inyecciones, comprimidos, dispositivos intrauterinos, implantes subdérmicos (como son el Implanon ® y el Jadelle ®, estos están hechos a base del etonogestrel y levonorgestrel), anillos vaginales, entre otros]. A pesar de haber sido el primer progestágeno sintético utilizado con éxito en la clínica su mecanismo de acción a nivel molecular y celular no se comprende aún del todo, por lo que muchas investigaciones están encaminadas a este objetivo (Rudel et al., 1969).

La noretisterona (NET) y sus metabolitos, se han empleado como un método anticonceptivo, ya que además de tener actividad progestacional demostrada mediante la disminución de la expresión de los receptores a progesterona, son capaces de inhibir la ovulación al evitar la liberación cíclica de gonadotropinas

hipofisiarias. Por otro lado, posee un efecto directo sobre el endometrio, debido a que durante la terapia con estos compuestos se origina un desequilibrio en los niveles hormonales de estrógenos-progesterona, en consecuencia, se afecta el crecimiento y maduración idónea del endometrio (Goodman y Gilman, 2007).

Los metabolitos de la NET son: la 5 $\alpha$  dihidronoretisterona (5 $\alpha$ -NET), la 3 $\alpha$ -5 $\alpha$  tetrahidronoretisterona (3 $\alpha$ -5 $\alpha$ -NET). Se conoce que la 5 $\alpha$  NET presenta una afinidad relativamente alta ( $K_i = 2.6 \times 10^{-7}$  M) por el receptor a progesterona (RP); sin embargo, no es tan grande como el de la NET; estos estudios comparativos se lograron utilizando ratas ovariectomizadas tratadas con 17 $\beta$ -estradiol (E2), en las que se realizó pruebas de desplazamiento con ORG-2058 una progestina de alta afinidad (Pérez-Palacios y col. 1991). La 5 $\alpha$  NET interactúa también con el receptor para andrógenos, de hecho, es un competidor potente del sitio activo del receptor; estudios de análisis de desplazamiento para andrógenos en ratas machos castrados han demostrado que la NET también interacciona con estos receptores, pero con una afinidad inferior (Loza et al., 1988; Pérez-Palacios et al., 1991).

El útero de los mamíferos domésticos es un órgano tubular que se divide en tres capas histológicas que se describen de adentro hacia afuera, la primera capa se denomina el endometrio y corresponde a la mucosa, consta de una lámina de tejido epitelial de revestimiento cilíndrico simple (Banks 1996, Geneser 2003, Gartner y Hiatt, 2002), como en la yegua y en los carnívoros, mientras que en la cerda y los rumiantes puede ser cilíndrico simple o pseudoestratificado, además de una lámina propia-submucosa de tejido conjuntivo ordinario laxo areolar; la segunda capa es el miometrio formado por músculo liso muy grueso dividido en tres direcciones cada una de las cuales forma tres capas histológicas (estrato submucoso con dirección circular, estrato vascular con fibras en varias direcciones y estrato subseroso con dirección longitudinal), y la tercera capa es el perimetrio que es una serosa formada por una capa de tejido conjuntivo laxo areolar y un mesotelio.

El útero es un órgano en el cual el epitelio varía de manera predecible a lo largo del ciclo estral debido a la influencia de hormonas esteroides de origen ovárico, predominando glándulas rectas y no ramificadas en las etapas estrogénicas y glándulas ramificadas y con imágenes arboriformes en las etapas luteínicas del ciclo estral (Patek, 1974; Brenner and West, 1975, Fawcett, 1995). En el caso de la coneja el útero presenta variaciones en los procesos de proliferación celular y apoptosis en el epitelio de revestimiento y glandular durante los días previos a la implantación (Anzaldúa et al., 2001). También se ha señalado que la altura de las células epiteliales está relacionada con el estado hormonal de la hembra a lo largo del ciclo estral; debajo del epitelio de revestimiento aparece un tejido conectivo altamente vascularizado con macrófagos y mastocitos, con un número variable de neutrófilos y linfocitos según la fase del ciclo estral, en la oveja también pueden observarse melanocitos (Banks 1996); en el endometrio de los rumiantes y especialmente en el estro, hay un aumento del fluido intercelular constituyendo un edema.

En general, la secreción de estrógenos se caracteriza por producir un aumento del grosor en el endometrio debido a la hipertrofia e hiperplasia de las glándulas y además en el caso de los primates un alargamiento de las arterias helicinas; en el miometrio sus 3 capas aumentan de grosor durante la gestación (Paniagua et al, 2007).

En el endometrio de la coneja se han identificado células T, algunas células plasmáticas productoras de IgA (Otsuki et al., 1990) y macrófagos. En conejas tratadas con hCG se ha observado que a las 11 hrs postratamiento existe un máximo número de linfocitos intraepiteliales mientras que en la lamina propia los linfocitos fueron ocasionales la mayoría de estos linfocitos fueron identificados como linfocitos T (Otsuki et al., 1990), sin embargo, no se tiene información sobre las variaciones en el número de estas células en este órgano bajo la influencia de diferentes condiciones hormonales.

Los linfocitos junto con los monocitos se clasifican como agranulocitos, por no presentar gránulos específicos (o secundarios) en su citoplasma; después de los

neutrófilos estas células ocupan la segunda población más grande de glóbulos blancos y aunque todos tienen un diámetro mayor que los eritrocitos, se describen como pequeños, medianos y grandes, y tienen un núcleo indentado que ocupa la mayor parte de la célula. Los linfocitos se dividen, con base a su función, en 3 tipos: 1) los linfocitos T que se encargan del sistema inmunitario de mediación celular, se originan en el timo, se diferencian en células T citotóxicas (células T asesinas) que establecen contacto y destruyen a las células extrañas o alteradas viralmente; y células T colaboradoras que tienen función en el inicio y desarrollo, al igual que las células T supresoras, de la mayor parte de las reacciones inmunitarias de mediación humoral y celular; 2) los linfocitos B, que se encargan del sistema inmunitario de mediación humoral, se originan en la mayor parte de los mamíferos en la médula ósea, estas se diferencian en células plasmáticas que producen los anticuerpos contra antígenos; 3) los linfocitos NK (Células Nulas) que pueden destruir algunas células extrañas y viralmente alteradas sin la influencia del timo o de células T (Gartner y Hiatt, 2002).

En el útero de conejas, durante los primeros 8 días de la gestación se presenta una disminución en el número de linfocitos totales; la disminución en la afluencia de linfocitos también ocurre en el útero de conejas en estado de pseudogestación (Zamora et al., 2005), inducida mediante la administración de hCG, ya que al tener efecto predominante de LH simula el pico preovulatorio de esta hormona e induce la ovulación.

También se sabe que el útero está provisto de poblaciones y subpoblaciones linfocitarias y se ha informado que la distribución de estas células en el endometrio está influenciada por la etapa del ciclo estral (Pérez et al., 2002; Bischof et al., 1994). Otro factor que puede modificar el número de linfocitos en el endometrio es la presencia de espermatozoides. En un estudio realizado en conejas se observó que la destrucción de espermatozoides en el endometrio está dada por la acción de los leucocitos (Howe, 1967).

Se han realizado tratamientos de conejas gestantes con dosis crecientes de antiprogestágenos de la 5 NET, en las cuales se buscaba la dosis más adecuada para producir un efecto antiprogestacional similar al del antiprogestágeno de referencia RU-486 y sin provocar efectos nocivos en el útero, las dosis idóneas fueron de 1 y 1.5 mg/kg, mientras que con dosis de 2.5 y 5 mg/kg se provocaban efectos nocivos como la necrosis coagulativa, un caso similar se observó para la 3 -5 NET, sin embargo, se desconocen los efectos de estos metabolitos en cuanto a la migración de linfocitos en el endometrio de la coneja (Anzaldúa A.S.R., 1996). En este estudio se utilizó como vehículo el propilenglicol, por lo que los animales testigo fueron tratados únicamente con este compuesto.

Sin embargo hasta el momento, no se ha estudiado la influencia de diversos progestágenos derivados del metabolismo de la NET al inicio de la gestación en cuanto a la distribución de linfocitos en el endometrio de la coneja, por lo que el objetivo de este estudio es determinar las características de distribución de los linfocitos en el epitelio de revestimiento (intraepiteliales) (E.R.), en el epitelio de las glándulas (E.G.) y en el tejido conjuntivo (T.C.) en la mucosa uterina, entre los días 7 y 8 de la gestación, en este tipo de hembras previamente tratadas con diversos compuestos reguladores de la fertilidad como los metabolitos de la NET. Este trabajo describe las modificaciones en el número de linfocitos como resultado del efecto de diversos compuestos reguladores de la fertilidad y es el primero que se tiene hasta donde nuestra búsqueda nos permitió. Este trabajo permite sentar algunas bases para que junto con futuros experimentos se pueda conocer como participan estos compuestos en los procesos de regulación en la migración linfocitaria.

## **HIPÓTESIS**

La aplicación de compuestos derivados de la noretisterona y sus metabolitos (5 dihidronoretisterona y 3 5 tetrahidronoretisterona) en conejas gestantes modificará la cantidad de los linfocitos presentes en la mucosa uterina de estos animales.

## **OBJETIVO**

Determinar las características de distribución de los linfocitos en el epitelio de revestimiento (E.R.), en el epitelio glandular (E.G.) y en el tejido conjuntivo (T.C.) en la mucosa uterina, entre los días 7 y 8 de la gestación de las conejas, tratadas con diversos compuestos reguladores de la fertilidad como los metabolitos de la NET.

# MATERIAL Y MÉTODOS

## 1. Animales

Se utilizaron 36 conejas nulíparas de la raza Nueva Zelanda, jóvenes entre 3 y 5 meses de edad y un peso promedio de 4 kg (3.5-4.5 Kg aproximadamente); los animales se mantuvieron en condiciones convencionales de bioterio y alimentación *ad libitum* con alimento comercial (Purina Chow) y se alojaron en jaulas individuales.

### 1.1 Criterios de Inclusión

- A) Para todos los grupos, excepto el de los animales no gestantes, se eligieron las conejas que presentaban conducta de aceptación al macho y vulva hiperemica (Pérez M.M. et al., 1996). Los animales se cruzaron dos veces al día mediante monta natural con dos sementales probados, de 1 año de edad y con un peso de 4.5 kg, el día de la crusa se designó como día 0, los animales cruzados que presentaron espermatozoides vaginales en el día 1 (24 hrs después del segundo coito) fueron incluidas en el estudio; se tuvieron aproximadamente un 20 % de hembras vacías mismas que se desecharon al no cumplir los criterios de inclusión; al día siguiente de la crusa (día 1) se inició el tratamiento mediante la inyección subcutánea del esteroide o bien del vehículo (propilenglicol) según el caso. El propilenglicol se utilizó como vehículo, por lo que en los animales testigo fueron tratados únicamente con este compuesto.
- B) Se utilizaron como criterio de inclusión aquellas conejas que, en el momento de la toma de muestras, mostraron en sus cuernos uterinos las prominencias propias de los sitios de implantación. Los animales que no cumplan con este requisito (hembras vacías) fueron eliminados del estudio. Del mismo modo se realizaron lavados de los cuernos uterinos con SSF, y

el líquido se colocó en cajas de Petri para la identificación de embriones al microscopio estereoscópico.

## 2. Esteroides

La 5 NET se sintetizó por reducción de la NET (Shering Mexicana S.A.) por litio en amoníaco como fue descrito por Bowers (Bowers, 1958). La pureza química de la NET y sus derivados se corrobora por su punto de fusión y su comportamiento en el análisis de cromatografía líquida de alta presión, así como por su análisis espectrométrico de resonancia magnética nuclear (Still, W.C., 1978), lo cual fue realizado por el Dr. García de la Mora en la Facultad de Química de la UNAM.

## 3. Experimento y Tratamientos

Conejas jóvenes gestantes fueron divididas en 9 grupos, 4 animales por grupo (n=4, sin considerar aquellos animales que no cumplieron con alguno de los criterios de inclusión) y fueron inyectados diariamente a partir del primer día de la gestación por vía subcutánea por 8 días, de acuerdo con el siguiente protocolo:

Grupo:	Tratamientos:
I	5 NET 1 mg/Kg/día /8 días
II	3 5 NET 1.5mg/Kg
III	17 estradiol (1.5mg/Kg)
IV	RU-486 1 mg/kg/día/8 días
V	NET: Noretisterona (1mg/Kg)
VI	Gestante del día 7 (UT OVX+D7)

VII	Pseudogestante del día 8 (PUB 8)
VIII	Propilenglicol (PPG)
IX	No Gestante

Los animales fueron sacrificados por sobredosis de pentobarbital a una dosis de 90 mg/Kg después de anestesiarlos con Ketamina (Rhône, Mérieux, Qro. México) en el día 8 de la gestación. Los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con la Ley de Protección a los animales de México, y la Norma NOM-062-200-1999 (de Aluja, 2002). Se tomaron muestras del útero de los diversos animales para su estudio histológico. Este experimento tuvo como finalidad comparar el efecto antiprogestacional sobre la migración de linfocitos en el endometrio de conejas tratadas con la 5 NET (1 mg/kg) y la 3 5 NET (1.5 mg/kg) con el antiprogestágeno de referencia RU-486 (1 mg/kg), un grupo control de conejas gestantes (tratado con propilenglicol) y un grupo de conejas pseudogestantes (tratadas con 100 UI de hCG).

#### **4. Recolección de Tejidos**

Los úteros se destinaron a estudios histológicos por lo cual se fijaron en una solución de ácido pícrico saturada (150 ml) con paraformaldehído (20 g) amortiguada con solución de fosfatos (PBS) a pH de 7.4 (solución de PAF) (Stefanine, 1967).

#### **5. Estudios Histológicos de los cuernos uterinos**

El útero fue fijado mediante la fijación en PAF y se procesaron rutinariamente mediante un histoquinette automático (American Optical p 800) para su inclusión en parafina, las muestras se cortaron mediante un micrótopo (Spenser 820) a 5-7

$\mu\text{m}$  de grosor y se utilizaron tinciones de H-E para observar la arquitectura histológica normal y tinción de Giemsa, esta última permitió determinar la cantidad de linfocitos intraepiteliales y del tejido conjuntivo del endometrio, dividido para su estudio en tres tercios a lo largo de su longitud total.

Las muestras teñidas con Giemsa fueron observadas en un microscopio de campo claro "Carl Zeiss" para cuantificar la proporción de linfocitos, en un ocular, retícula micrométrica "Carl Zeiss 19" y el objetivo 40x (400X de aumento total). Cada retícula tiene una longitud de 200  $\mu\text{m}$  por lado por lo que el área cuantificada fue de 40000  $\mu\text{m}^2$  de área real, se tomaron 12 campos microscópicos (0.48mm<sup>2</sup>) por animal y segmento anatómico (tercio medio de cada cuerno uterino).

Las laminillas fueron cubiertas por una identificación numérica y al azar, de tal forma que no se conoció su procedencia durante el conteo, se obtuvo la media y desviación estándar de las dos poblaciones celulares (intraepiteliales y del tejido conjuntivo) para el tercio medio de cada uno de los cuernos uterinos muestreados. Para determinar la existencia de diferencias estadísticas se empleó el Análisis de Varianza (ANOVA) de una sola vía seguida del procedimiento de Tukey (Diferencia Mínima Significativa Honesta: DMSH) (Grill, 1981).

## RESULTADOS

En la cuantificación de linfocitos en el epitelio de revestimiento (E.R.) se observó que los grupos con el menor número fueron: los animales tratados con NET ( $0.5000 \pm 0.1946$ ), animales gestantes ( $0.4333 \pm 0.1143$ ) y pseudogestantes ( $0.2917 \pm 0.09478$ ), de manera contraria se encontró que los grupos con mayor cantidad de linfocitos fueron los animales que se trataron con PPG ( $2.000 \pm 0.2462$ ), RU-486 ( $2.083 \pm 0.1926$ ), 5 -NET (1 mg/kg) ( $2.569 \pm 0.2174$ ), 3 -5 NET ( $2.774 \pm 0.1730$ ) y 17 estradiol ( $3.472 \pm 0.5669$ ); una cantidad intermedia de linfocitos intraepiteliales se observaron en las conejas no gestantes ( $1.667 \pm 0.1667$ ) (Figura 1 y 2).

En el epitelio glandular (E.G.) el menor número de linfocitos correspondió al de las hembras no gestantes ( $0.8333 \pm 0.1770$ ), gestantes ( $0.5333 \pm 0.1417$ ), pseudogestantes ( $0.3750 \pm 0.1320$ ) y las tratadas con NET ( $0.8333 \pm 0.2706$ ) y 17 - estradiol ( $0.8611 \pm 0.2428$ ), por otro lado, el mayor número se determinó para los demás grupos PPG ( $2.750 \pm 0.3917$ ), RU-486 ( $2.250 \pm 0.2030$ ), 5 -NET 1mg/kg/día ( $2.472 \pm 0.2348$ ) y 3 -5 NET ( $2.321 \pm 0.1998$ ).

En cuanto a la cuantificación de linfocitos en el tejido conjuntivo (lámina propia) del útero de las conejas no gestantes ( $5.438 \pm 0.4928$ ) es similar al de las conejas tratadas con PPG ( $6.083 \pm 0.7926$ ), las tratadas con RU-486 ( $8.438 \pm 0.6982$ ) y las que fueron tratadas con 5 -NET 1 mg/kg ( $6.792 \pm 0.4820$ ), mientras que el número de linfocitos se incrementó en los animales tratados con 3 -5 NET ( $9.250 \pm 0.7931$ ) y 17 estradiol ( $15.17 \pm 3.090$ ), observándose el mayor número de linfocitos en este último grupo (Figura 5 y 6).

El número de linfocitos encontrados en el E.R. ( $0.5000 \pm 0.1946$ ) y E.G. ( $0.8333 \pm 0.2706$ ) de los animales tratados con NET fue menor al presentado en los mismos tejidos de las conejas tratadas con el antiprogestágeno de referencia RU-486, E.R. ( $2.083 \pm 0.1926$ ) y E.G ( $2.250 \pm 0.2030$ ) (Figuras 2, 4 y 6), sin embargo,

desde el punto de vista estadístico esta disminución en la cantidad de linfocitos no fue significativo (Figura 4).

En el T.C. los animales tratados con 17 E ( $15.17 \pm 3.090$ ) y 3 -5 NET ( $9.250 \pm 0.7931$ ) mostraron un incremento significativo ( $P < 0.0001$ ) en relación con la NET ( $1.417 \pm 0.3580$ ), mientras que las hembras tratadas con 5 -NET ( $6.792 \pm 0.4820$ ) mostraron una menor cantidad de linfocitos en relación con el primer grupo (Figura 6).

Se observó un incremento significativo ( $P < 0.05$ ) en la cantidad de linfocitos en el E.G. de los animales tratados con RU-486 ( $2.250 \pm 0.2030$ ), 3 -5 NET ( $2.321 \pm 0.1998$ ), 5 -NET ( $2.472 \pm 0.2348$ ) y PPG ( $2.750 \pm 0.3917$ ) en relación con los demás grupos.

## DISCUSIÓN

El principal sitio donde se observó el mayor número de linfocitos (de los tres estudiados) fue la lámina propia (tejido conjuntivo), esto se debe a que en la mayor parte de los órganos los leucocitos cumplen sus funciones específicas en el tejido conjuntivo (Gartner y Hiatt, 2002). Sin embargo, tratándose del endometrio uterino la afluencia de linfocitos hacia el tejido conjuntivo y de ahí al tejido epitelial (tanto de revestimiento como del glandular) está influido por las hormonas esteroides de origen ovárico (estrógenos y progesterona) (Banks 1996; Patek, 1974; Brenner and West, 1975, Fawcett, 1995).

Las conejas gestantes mostraron una menor afluencia de linfocitos tanto en el tejido conjuntivo como en el tejido epitelial de revestimiento y glandular en relación con el grupo de conejas no gestantes y el resto de los grupos tratados con progestinas excepto en el caso de la NET y la PUB8 en el que se observó un número similar al de las gestantes (Figuras 2, 4 y 6). Estos datos son similares a los informados previamente por Zamora, et al. (2005); en los que se observó una disminución en la cantidad de linfocitos totales durante los primeros días de la gestación, lo que indicaría que el ambiente progestacional que se establece durante esta condición fisiológica, inhibe la migración de linfocitos, quizás como parte de los mecanismos de inmunomodulación que evitan una respuesta inmunológica en contra del embrión (Galina H.C y Valencia M.J. 2004 y Stevens C.D. 2009).

Una disminución en la cantidad total de linfocitos se determinó en el útero de conejas pseudogestantes (tratadas con hCG) (Zamora et al., 2005), estos resultados concuerdan con las observaciones de este trabajo (Figuras 2, 4 y 6). Estos datos sugieren que probablemente la presencia de un cuerpo lúteo presente en animales gestantes y pseudogestantes induzcan un ambiente progestacional que sea la responsable de la disminución observada en el estroma y epitelio tanto glandular como de revestimiento de estos animales (Zamora et al., 2005).

Contrariamente al efecto progestacional endógeno, en el caso de los animales tratados con  $17\beta$  estradiol se observó un incremento significativo en la cantidad de linfocitos en el T.C. y el E.R., lo cual sugiere que en estos tejidos los estrógenos incrementan tanto la presencia de linfocitos en la lámina propia como su migración a través del tejido epitelial de revestimiento por igual. A este respecto se sabe que los estrógenos tienen la propiedad de modificar la permeabilidad vascular en el útero, ya que en algunas especies como la perra o la vaca es capaz de producir la salida por diapédesis de eritrocitos en etapas estrogénicas del ciclo estral, proestro en la perra y metaestro en la vaca (Galina H.C y Valencia M.J. 2004). En el caso de la cerda se desconoce el mecanismo por el cual los linfocitos puedan pasar de manera selectiva el endotelio y favorecer su migración a través del tejido epitelial.

Se observó una menor cantidad de linfocitos en el E.R. y E.G. en los animales tratados con NET en relación con los animales tratados con RU-486 (Figuras 2, 4 y 6). Aunque la disminución de los linfocitos es muy notable no fue estadísticamente significativa, sin embargo pudiera tener una relevancia fisiológica. Estos resultados sugieren que el efecto antiprogestacional en la migración y cantidad de linfocitos a nivel glandular del RU-486 no es el mismo que el observado para la NET, no se conoce la causa de esta discrepancia, sin embargo, debe tomarse en cuenta que la NET una vez dentro del organismo se biotransforma en los dos metabolitos ( $5\beta$ -NET y  $3\beta$ - $5\alpha$ -NET) sin embargo el número de linfocitos identificados para estos metabolitos fue mayor que para la NET (figuras 2,4 y 6).

En el T.C. los animales tratados con  $17\beta$  E ( $15.17\pm 3.090$ ) y  $3\beta$ - $5\alpha$  NET ( $9.250\pm 0.7931$ ) mostraron un incremento significativo en relación con la NET ( $1.417\pm 0.3580$ ), lo cual indicaría un posible efecto estrogénico sobre el incremento de permeabilidad del endotelio vascular del  $17\beta$  estradiol y  $3\beta$ - $5\alpha$  NET, mientras que las hembras tratadas con  $5\beta$ -NET ( $6.792\pm 0.4820$ ) y NET ( $1.417\pm 0.3580$ )

mostraron una menor cantidad que los dos primeros grupos (Figura 6). Estos resultados sugieren que los tratamientos con NET disminuyen la afluencia de linfocitos a la lámina propia lo cual podría corresponder a un efecto progestacional; en el caso de la 5 -NET la afluencia de linfocitos fue similar al del antiprogestageno de referencia RU-486 ( $8.438 \pm 0.6982$ ) lo cual sería compatible para un compuesto con actividad antiprogestacional como 5 -NET. Desde el punto de vista estadístico no se observaron diferencias en la cantidad de linfocitos del tejido conjuntivo entre todos los grupos excepto 17 estradiol (Figura 6).

Es de llamar la atención que ambos metabolitos de la NET (5 -NET y 3 -5 NET) permitan un incremento en la migración de linfocitos y la aplicación directa de la NET no; por otro lado RU-486, compuesto con acción antiprogestacional, también provocan un incremento significativo en la cantidad de linfocitos, esto pudiera ser parte del efecto antiprogestacional ya que en los animales con un ambiente progestacional endógeno la cantidad de linfocitos fue menor. En el caso de E.G. la 3 -5 NET ( $2.321 \pm 0.1998$ ) y PPG ( $2.750 \pm 0.3917$ ) se observó un incremento significativo ( $P < 0.05$ ) de linfocitos glandulares que no corresponden a la cantidad significativamente menor que se observó en los animales tratados con 17 estradiol ( $0.8611 \pm 0.2428$ ) o no gestantes ( $0.8333 \pm 0.1770$ ) respectivamente, por lo que se desconoce la causa de estos incrementos (Figura 4).

Las progestinas afectan la capacidad inmunológica del tracto reproductor femenino frente a infecciones virales como se observó en el ratón ya que su susceptibilidad a la infección con el herpes genital tipo 2 se incrementa casi 100 veces cuando es tratado con medroxiprogesterona (Kaushic C. Ashkar A., et al. 2003); estos resultados experimentales apoyan la propuesta de que las progestinas sintéticas poseen un efecto más prolongado que las hormonas existentes en concentraciones fisiológicas por lo que se debe tomar en cuenta la dosis y el tiempo de aplicación; por otro lado en las borregas ovariectomizadas que fueron tratadas con progesterona en los días 10, 30 y 60 postratamiento se

observó una disminución de linfocitos específicos (como el CD45r+) en el epitelio luminal del endometrio. (Gottshall S.L y Hansen P.J., 1992).

La presencia de receptores a progesterona (PR) parece tener un papel relevante en el influjo de leucocitos en el útero, ya que en ratones knock-out para PR se ha observado un incremento muy importante en la cantidad de leucocitos, dicho incremento no puede ser prevenido mediante la administración de progesterona exógena, ya que estos animales no expresan los PR. Debido a esto resulta de mucho interés el conocer la participación de los PR en los diferentes tratamientos estudiados y de manera particular en los animales gestantes y pseudogestantes; sin embargo se sabe que de manera general cuando se incrementan las concentraciones plasmáticas de progesterona los receptores llevan a cabo lo que se conoce como regulación a la baja (down regulation) (Lange CA, et al 2000; y Lydon JP, et al 1995).

En las trompas de Falopio de la mujer se han identificado linfocitos T CD8 positivos que expresan además el receptor a estrógenos , y que se clasificaron como linfocitos intraepiteliales; los cuales incrementan en la fase proliferativa tardía y en la fase secretora tardía y media, del mismo modo se observó que estas células inmunopositivas fueron consistentemente abundantes en gestaciones tubáricas por lo que se concluye que estos linfocitos intraepiteliales puedan estar involucrados en la regulación de la inmunotolerancia en gestaciones tubáricas de humanos (Ulziibat, et al. 2006). En este estudio los receptores a estrógenos estuvieron ausentes en la totalidad de las gestaciones tubáricas (Ulziibat, et al. 2006).

En todos los mamíferos domésticos y en particular en las especies no primates las gestaciones tubáricas son prácticamente inexistentes (McDonald LE, 1991), sin embargo la afluencia de los linfocitos intraepiteliales están estrechamente relacionados con las fluctuaciones en los niveles plasmáticos de estrógenos y progesterona, por lo tanto las variaciones observadas en la cantidad de linfocitos

con las diferentes progestinas y compuestos con actividad estrogénica pueden explicarse por posibles variaciones no solo en las concentraciones plasmáticas de estrógenos y progesterona sino también por la presencia de linfocitos intraepiteliales con posibles características a las descritas en el humano.

## Conclusiones

- 1.- El principal sitio donde se observó el mayor número de linfocitos (de los tres estudiados) fue la lámina propia del endometrio.
- 2.- En los animales tratados con 17 E inducen un incremento significativo en la cantidad de linfocitos presentes en el tejido conjuntivo no así con los demás tratamientos o condiciones hormonales.
- 3.- Los animales con influencia progestacional mostraron una inhibición en la afluencia de linfocitos del tejido conjuntivo, epitelio glandular y epitelio de revestimiento.
- 4.- La cantidad de linfocitos intraepiteliales se incrementa por la influencia estrogenica pero también por compuestos con actividad antiprogestacional y PPG.
- 5.- La NET inhibe la afluencia de linfocitos en las tres regiones estudiadas mientras que sus metabolitos la incrementan en el epitelio de revestimiento y glandular.
- 6.- Los metabolitos de la NET, el RU-486 y el PPG incrementan la afluencia de linfocitos intraepiteliales y en el epitelio glandular del endometrio.

## FIGURAS

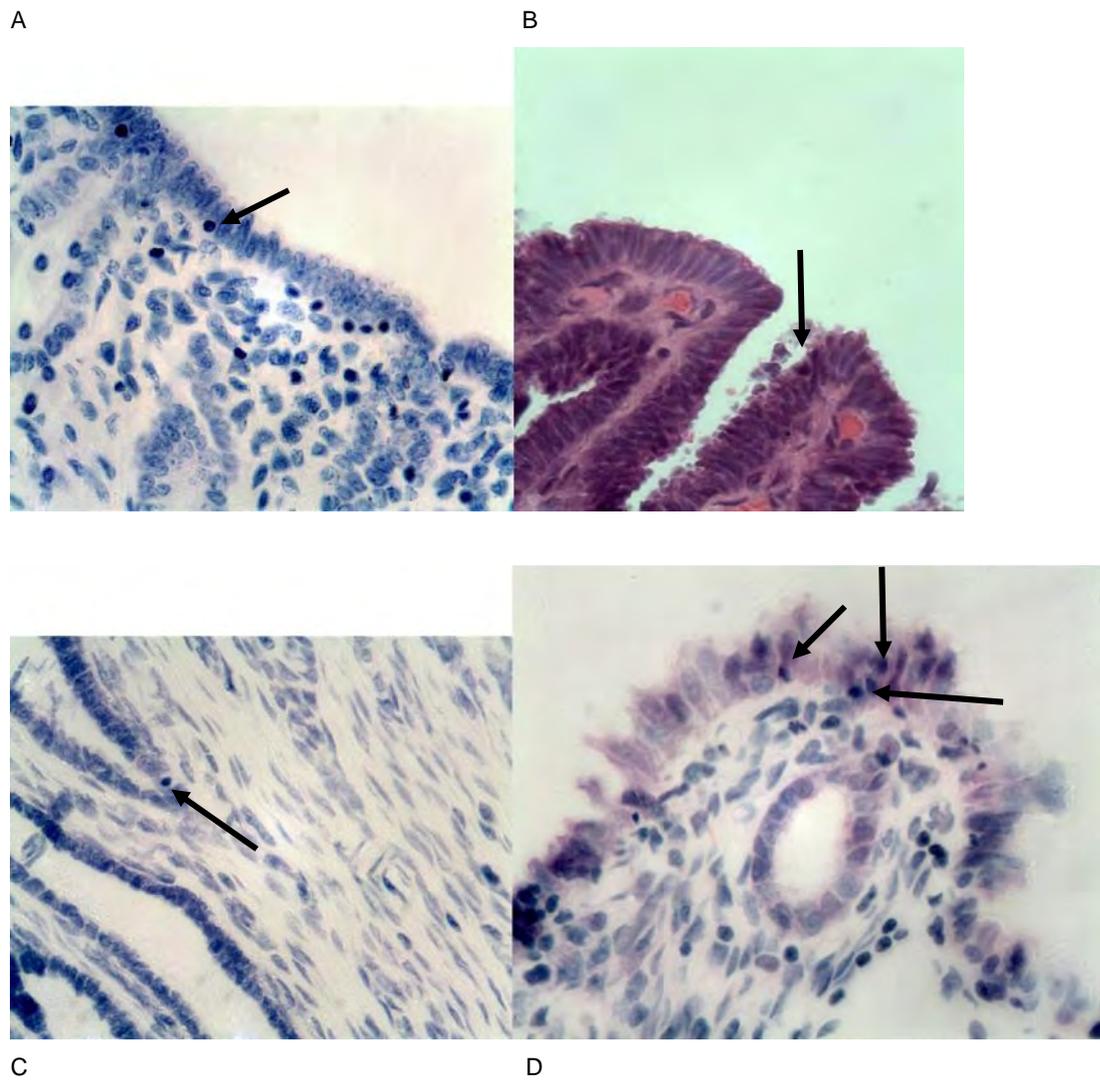


Figura 1 Micrografía microscópica de Linfocitos intraepiteliales (flechas) en coneja no gestantes (A), gestantes (B), tratadas con NET (C) y 5 NET 1mg/kg (D). Tinciones: A, C y D Giemsa y B H. y E. Aumento total 400x.

## EPITELIO DE REVESTIMIENTO

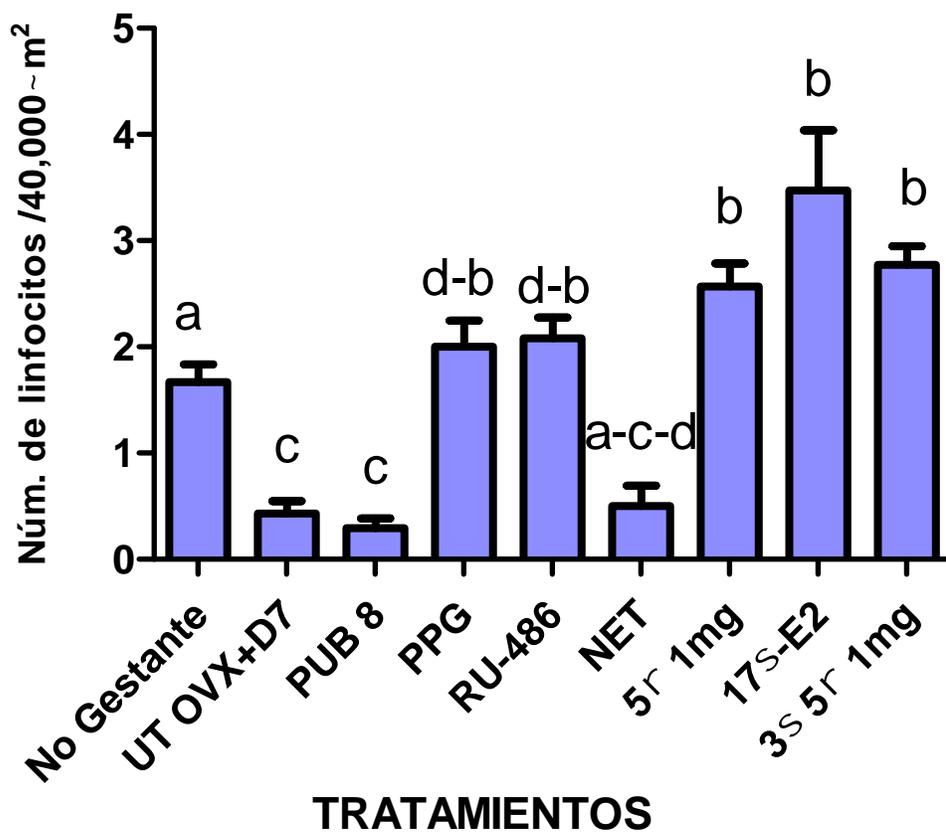
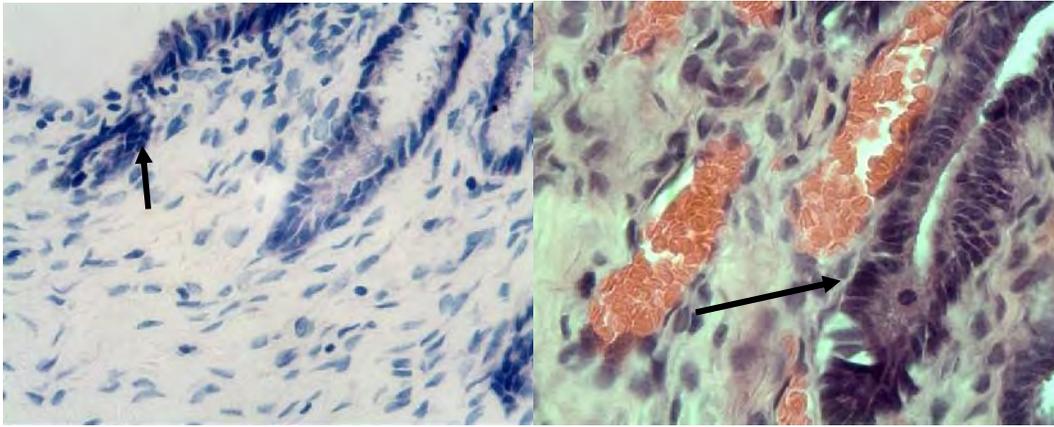
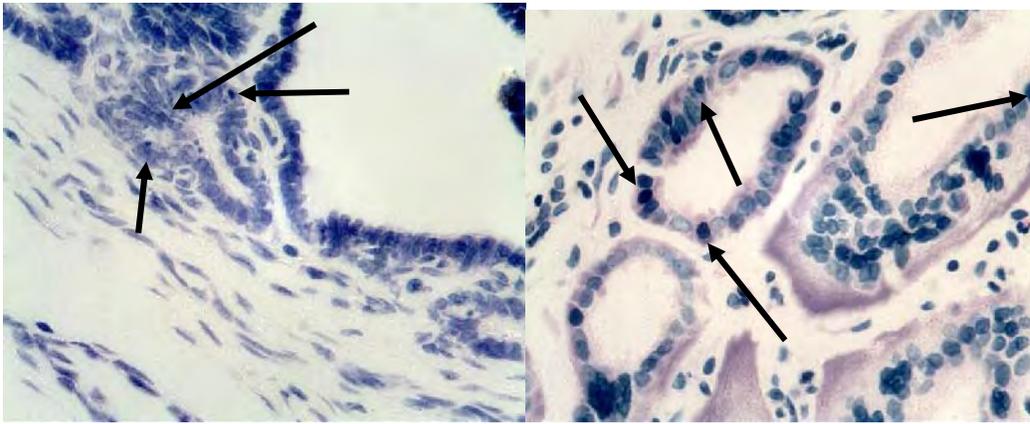


Figura 2: Cuantificación de linfocitos intraepiteliales en animales no gestante, gestantes y con diversas dosis de progestinas sintéticas. UT OVX+D7: Útero gestante del día 7; PUB 8: Pseudogestante; PPG: Propilenglicol; RU-486: Mifepristona; NET: Noretisterona; 5 NET: 5 dihidronoretisterona; 17 -E2: 17 Estradiol; 3 5 NET: 3 -5 tetrahidronorestisterona.



A

B



C

D

Figura 3 Micrografía de linfocitos presentes en el epitelio glandular de conejas: No gestante (A), gestante (B), NET 1mg/kg (C) y propilenglicol (PPG) (D). Tinciones: A, C y D Giemsa y B H. y E. Aumento total 400x.

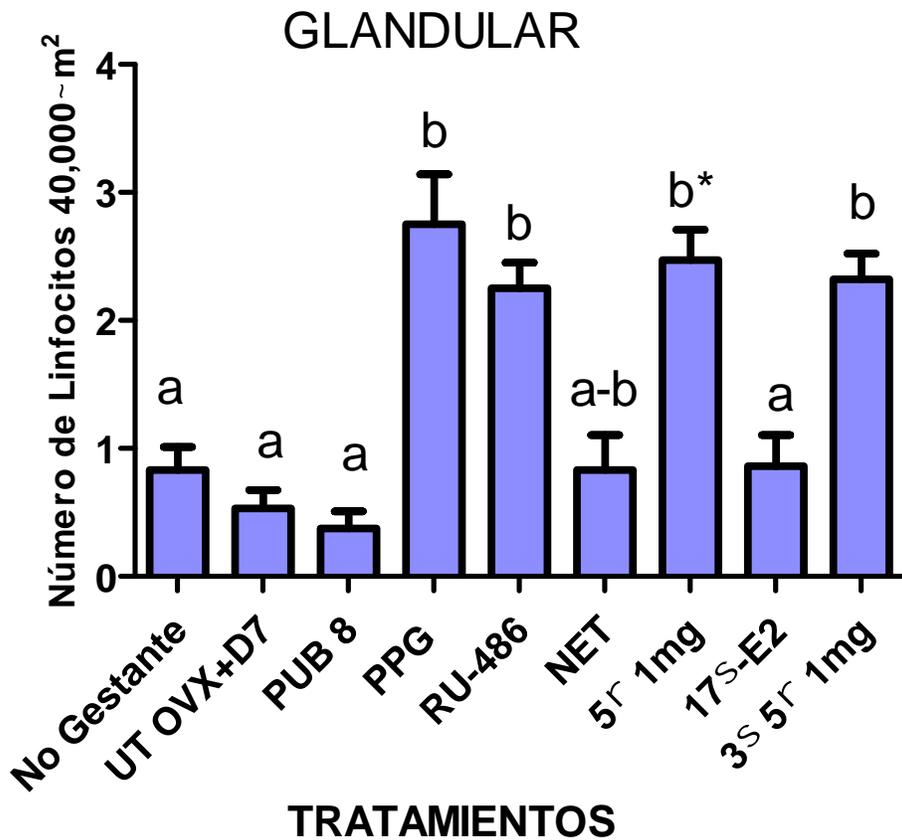
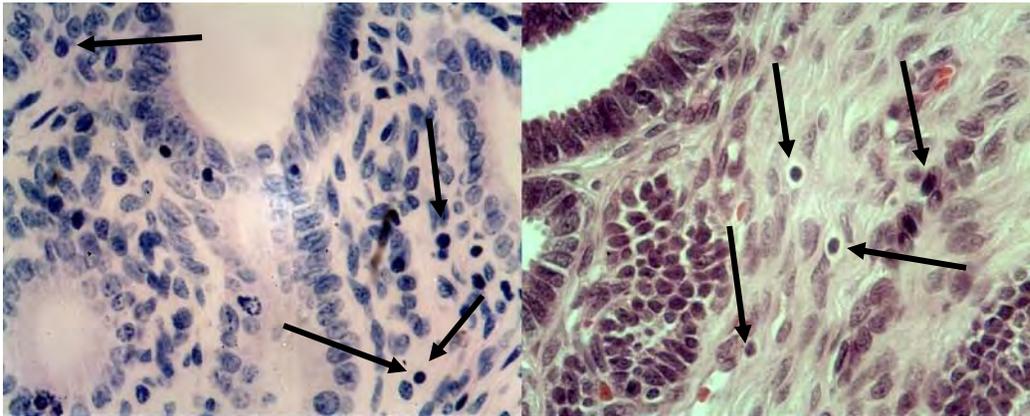
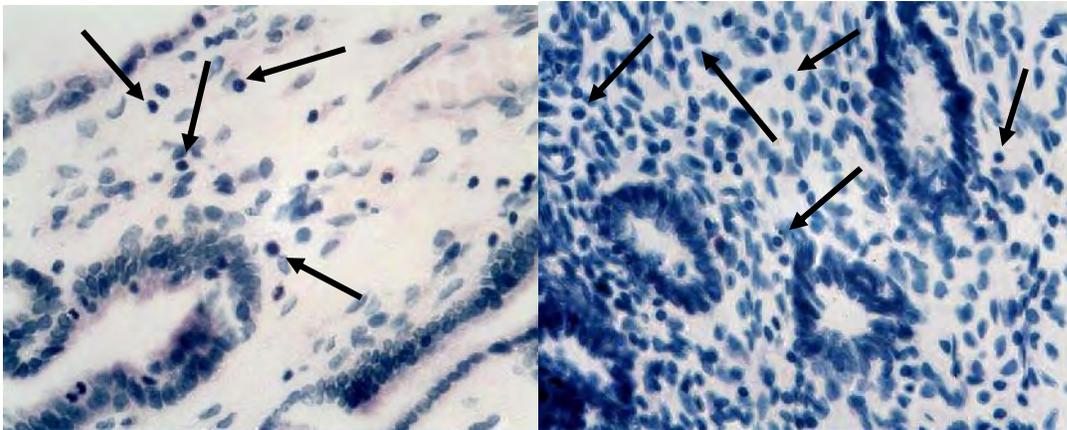


Figura 4: Cuantificación de linfocitos en las glándulas endometriales en animales no gestante, gestantes y con diversas dosis de progestinas sintéticas. UT OVX+D7: Útero gestante del día 7; PUB 8: Pseudogestante; PPG: Propilenglicol; RU-486: Mifepristona; NET: Noretisterona; 5 NET: 5 dihidronoretisterona; 17 - E2: 17 Estradiol; 3 5 NET: 3 -5 tetrahidronorestisterona. \*5 NET diferente a NET  $p < 0.05$



A

B



C

D

Figura 5 Micrografía de linfocitos en el tejido conjuntivo de úteros de conejas: no gestante (A), pseudogestante (B), propilenglicol (PPG) (C) y 3 5 NET 1 mg/kg (D). Tinciones: A, C y D Giemsa y B H. y E. Aumento total 400x.

## TEJIDO CONJUNTIVO

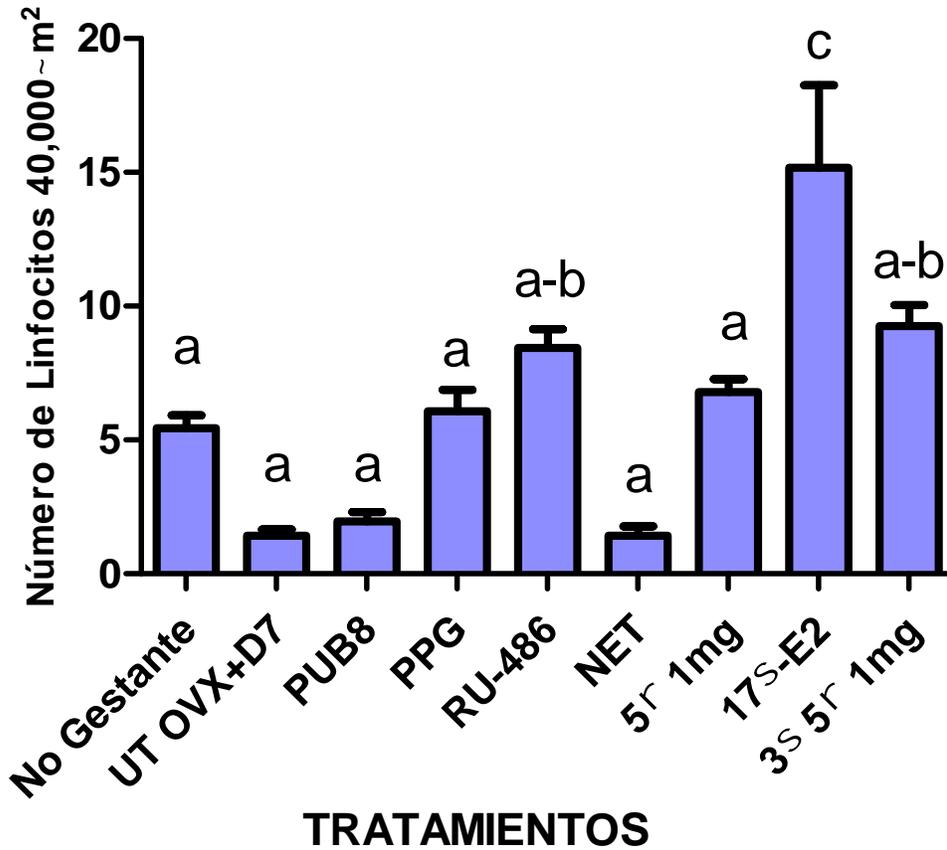


Figura 6: Cuantificación de linfocitos en la lámina propia (tejido conjuntivo) en animales no gestante, gestantes y con diversas dosis de progestinas sintéticas. UT OVX+D7: Útero gestante del día 7; PUB 8: Pseudogestante; PPG: Propilenglicol; RU-486: Mifepristona; NET: Noretisterona; 5 NET: 5 dihidronoretisterona; 17 -E2: 17 Estradiol; 3 5 NET: 3 -5 tetrahidronoretisterona.

## REFERENCIAS:

1. Anzaldúa A.S.R. (1996). Estudio histológico de órganos del aparato reproductor femenino de la coneja, durante el tratamiento con antiprogestágenos: análisis inmunohistoquímico de los receptores a progesterona. Tesis de Maestría. México D.F. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México.
2. Anzaldúa, A.S.R; Pérez, M.M y Castro, R.J.I. (2001). Variación en los índices de mitosis y apoptosis del epitelio uterino de la coneja durante los días previos a la implantación. *Téc Pecu. México*, 39, 59-68.
3. Banks, W.J. (1996). *Histología Veterinaria Aplicada*. 2ª edición: El Manual Moderno.
4. Bischof, R; Brandon, M.R y Lee, C.S. (1994). Studies on the distribution of immune cell in the uteri of prepubertal and cycling gilts. *J Reprod Immunol*, 26, 1111- 1129.
5. Brenner, R.M y West, N.B. (1975). Hormonal Regulation of the reproductive tract in female mammals. *Annual Review of Physiology*, 37, 273-303.
6. de Aluja, A.S., 2002. Animales de Laboratorio y la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999). *Gac. Méd. Méx.* 138, 295–298.
7. Díaz, S.V; Garza, F.J; Onega, M.C y Cuéllar, C. (1982). Las hormonas esteroides y su aplicación en el control de la fertilidad en el humano. *Mensaje Bioquímico*. Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
8. Fawcett, D.W. (1995). *Tratado de Histología Bloom-Fawcett*. 11ª ed. México: Interamericana McGraw-Hill.
9. Galina HC, Valencia MJ.: *Reproducción de Animales Domésticos* 2ª ed. México, D.F., 2004.
10. Gartner, P.L; Hiatt, L.J. (2002). *Texto Atlas de Histología*. 2ª edición: McGraw-Hill Interamericana.
11. Geneser, F. (2003). *Histología*. 3ª edición: Medica Panamericana.
12. Goodman y Gilman. (2007). *Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. México, D.F: Interamericana Mc-Graw Hill.
13. Gottshall SL, Hansen PJ. Regulation of leukocyte subpopulations in the sheep endometrium by progesterone. *Immunology* 1992; 76: 636-641.
14. Howe, G.R. (1967). Leukocytic response to spermatozoa in ligated segments of the rabbit vagina, uterus and oviduct. *J Reprod Fertil*, 13, 563-566.
15. I. Camacho-Arroyo, A. Ruiz, A. Gamboa-Dominguez, G. Pérez-Palacios, M.A. Cerbón Immunohistochemical localization of intracellular progesterone

and glucocorticoid receptors in the rabbit lung *J Endocrinol*, 142 (1994), pp. 311–316

16. Kaushic C, Ashkar A, Reid LA, Rosenthal KL. Progesterone Increases susceptibility and decreases immune responses to genital herpes infection. *J Virol* 2003; 77: 4558-4565.
17. Lange CA, Shen T, Horwitz KB 2000 Phosphorylation of human progesterone receptors at serine-294 by mitogen-activated protein kinase signals their degradation by the 26S proteasome. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:1032–1037
18. Loza, A.M; Lemus, A.E y Pérez-Palacios, G. (1988). Metabolismo de hormonas esteroides en *Bioquímica e Inmunología* Cap.5. Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
19. Lydon JP, DeMayo FJ, Funk CR, Mani SK, Hughes AR, Montgomery Jr CA, Shyamala G, Conneely OM, O'Malley BW 1995 Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes Dev* 9:2266–2278
20. McDonald LE.: *Endocrinología Veterinaria y Reproducción*. 4<sup>a</sup> ed. InteramericanaMcGraw Hill. México, D. F., 1991.
21. Otsuki, Y; Maeda, Y; Magari, S; Kubo, H y Sugimoto, O. (1990). Lymphatics, intraepithelial lymphocytes and endometrial lymphoid tissues in the rabbit uterus: an electron microscopic and immunohistological study. *Lymphology*, 23, 124-34.
22. Paniagua R.; Nistal M.; Sesma P.; Álvares-Uría M.; Fraile B.; Anadón R. y Sáez, F.J. (2007). *Citología e histología vegetal y animal*. 4<sup>a</sup> edición: McGraw-Hill Interamericana.
23. Patek, E. (1974). The epithelium of the human fallopian tube. *Acta. Obstr. Gyneco. Scand*, 53, Suppl. 31.
24. Pérez, M.M; Luna, J; Mena, R y Romano, M.C. (2002). Lymphocytes and T lymphocyte subsets are regionally distributed in the female goat reproductive tract: Influence of the stage of the oestrous cycle. *Res Vet Sci*, 72, 115-121.
25. Perez, M.M; Mendoza, G.M; Mena, L.R; Romano, P.M. (1996). Linfocitos del útero de la cabra: Un estudio histológico e inmunohistoquímico por microscopia confocal. *Memorias de la XI Reunión Nacional sobre Caprinocultura*. Chapingo, México; Universidad Autónoma de Chapingo, 71-76.
26. Pérez-Palacios, G; Vilchis, F; Chávez, B; Larrea, F; García, G.A; Arreola, G.A. y Pérez A.E. (1991). Cap. XIII. Tópicos selectos de *Biología de la Reproducción*. México: UNAM-Miguel Ángel Porrúa. Grupo Editorial.

27. Rudel, H; Martínez-Manatou, J y Maqueo-Topete, M. (1965). Role of progestagens in the hormonal control of fertility. *Fert. Steril*, 16, 158-169.
28. Stevens C. D. *Clinical Immunology and Serology: A Laboratory Perspective*. 3th ed. F. A. Davis Co, USA, 2009.
29. Vilchis F, Chavez B, Perez AE, Garcia GA, Angeles A, Perez-Palacios G. Evidence that a non-aromatizable metabolite of norethisterone induces estrogen-dependent pituitary progestin receptors. *J Steroid Biochem* 1986; 24:525-531.
30. X. Pang, M.M. Cotreau-Bibbo, G.R. Sant, T.C. Theoharides Bladder mast cells expression of high affinity oestrogen receptors in patients with interstitial cystitis *Br J Urol*, 75 (1995), pp. 154–161
31. Zamora H.V; Villaseñor, H; Anzaldúa A.S y Pérez-Martínez, M. (2005). Disminución de la migración de linfocitos totales al útero de la coneja (*Oryctolagus cuniculus*) en los primeros días de la gestación. *Veterinaria México*, (36), 63-73.