

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA



- 1.- **“Cambios histológicos inducidos por el Acetato de Medroxiprogesterona en el útero de conejas ovariectomizadas.”**
- 2.- EFECTO DEL ACETATO DE MEDROXIPROGESTERONA SOBRE EL NUMERO DE LINFOCITOS B B-2 Y MACROFAGOS EN EL UTERO DE CONEJAS OVARIECTOMIZADAS.

T E S I S

Que para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

PRESENTA:

CESAR ROSAS VELASCO

COMITÉ TUTORIAL

MVZ DR. HECTOR CASTILLO JUAREZ
MVZ DR. MARIO PEREZ MARTINEZ
MVZ DR. F. IVAN FLORES PEREZ

CONTENIDO

INDICE.....	1
RESUMEN.....	2
ABSTRACT.....	3
PREFACIO.....	4
INTRODUCCION.....	12
MATERIAL Y METODOS.....	14
RESULTADOS.....	17
DISCUSION.....	18
REFERENCIAS.....	22
COROLARIO.....	27

INDICE

Fig.1. Fotomicrografía de Inmunodetección de linfocitos BB-2 en el endometrio de conejas, mediante la técnica de inmunoperoxidasa (40X).

Fig. 2. Fotomicrografía de inmunodetección de macrófagos CD 14+ en el endometrio de una coneja, las células positivas se detectaron con la técnica de inmunoperoxidasa (40X).

Fig. 3. Número de Células positivas a BB-2 en el endometrio de las conejas. Ovariectomizadas y tratadas con 5mg (OVX+AMP).

Fig.4. Número de macrófagos CD14+ en el endometrio de conejas. Ovariectomizadas y tratadas con 5mg (OVX+AMP).

Fig.5. Altura del epitelio secretor del útero de conejas. Ovariectomizadas y tratadas con 5mg (OVX+AMP).

Fig. 6. Grosor de la lámina propia. Ovariectomizadas y tratadas con 5mg (OVX+AMP).

Resumen

El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto del acetato de medroxiprogesterona (AMP) en el número y la distribución tisular de los macrófagos CD14+ y linfocitos BB-2. Se emplearon un total de 15 conejas Nueva Zelanda fueron ovariectomizadas, 3 semanas después de la cirugía se formaron 5 grupos y todos los animales recibieron 5mg de AMP, excepto el grupo control. Los animales fueron sacrificados en los días 1(fase temprana), 3 (fase media) y 6y7 (Fase tardía) post tratamiento. Los fragmentos obtenidos del útero se fueron obtenidos y procesados mediante el método de inclusión en parafina. Con la técnica de inmunocitoquímica se detectaron los macrófagos CD14+ y los linfocitos BB-2. La altura del epitelio secretor y el grosor de la lámina propia fue cuantificada. Los resultados indican que el AMP provoca una disminución en el número de células positivas a BB-2 en los días 1, 3, 6 y 7 post-tratamiento. Se observó un efecto bifásico en los días 1,3 y 6 en los cuales, el número de macrófagos CD14 se incrementó y a los 7 días postratamiento el número de células positivas a CD14 fue similar al testigo. En la altura del epitelio glandular se obtuvo un incremento a los días, 6 y 7 post tratamiento en relación al grupo testigo. En el caso de la lamina propia únicamente se encontraron diferencias en el grosor en los días 1 y 7 en comparación con el grupo testigo. Los resultados obtenidos indican que el AMP puede afectar de manera negativa la respuesta inmunitaria local del útero en conejas ovariectomizadas.

Palabras clave: ACETATO DE MEDROXIPROGESTERONA, CONEJOS, LINFOCITOS BB-2, MACROFAGOS CD14.

Abstract

The objective of this study was to evaluate the effect of Medroxyprogesterone acetate (MPA) on the number and tissular distribution of CD14+ macrophages and BB-2 lymphocytes. A total of 15 white New Zealand rabbits were ovariectomized and 3 weeks after the surgery 5 groups were formed and to all animals 5 mg of medroxyprogesterone acetate (MPA) were administered. The animals were sacrificed at days 1(early phase), 3 (medium phase) 6 and 7(delay phase) post-treatment. Fragments of uterine tissue were obtained and processed by the inclusion in paraffin method. Through immunohistochemistry CD14+ macrophages and BB-2 lymphocytes were detected. The height of the secreting epithelium and the thickness of lamina propria were measured. The results indicate that MPA induce a decrease in the number of BB2 positive cells at days 1, 3, 6 and 7 post-treatment. A biphasic effect was observed at days 1, 3, and 6 in which, the number of CD 14 macrophages increased and finally at 7 day post-treatment the number of CD14 positive cells was similar to control group. In the height of glandular epithelium at days 3, 6 and 7 an increment on this parameter was obtained. Moreover in the lamina propria differences were found in the thickness only in the days 1 and 7 vs. control group. The obtained results suggest that the MPA could affect in a negative way the immune response in the uterus of ovariectomized rabbits.

Keywords: MEDROXYPROGESTERONE ACETATE, RABBIT, BB-2 LYMPHOCYTES, CD14 MACROPHAGES.

PREFACIO

El sistema inmune de los mamíferos es altamente complejo y se ha desarrollado para proteger al organismo de muchas formas en contra de enfermedades (**Entrican et al 2002, Bainbridge et al 2000**). El eje inmune uterino es una de las llaves para solucionar problemas importantes en la reproducción de la hembra, problemas como la infertilidad, patologías del embarazo, y enfermedades de transmisión sexual (**Hunt et al 2000, Robertson et al 2003, Entrican et al 2002**).

El útero se compone de diferentes tipos celulares heterogéneos que experimentan cambios dinámicos durante el ciclo ovárico, el desarrollo e implantación del embrión. Estos cambios son sobre todo dependientes por el estrógeno ovárico y la progesterona (P 4) (**Tan et al 1999**).

El útero es parte del sistema inmune mucosal común, compartiendo semejanzas estructurales y funcionales, en la migración de los linfocitos y de macrófagos en los tejidos finos asociados, oculares intestinales, bronquiales, nasales, en glándulas salivales y mamarias. El útero se provee del sistema linfático y contiene una gama completa de células linfopoyéticas y de reguladores moleculares para generar inmunidad. La diferencia más llamativa entre el útero y otras superficies mucosales es la carencia de los nódulos linfoides secundarios como las placas de Peyer. Aunque ha habido pocos esfuerzos sistemáticos por definir las variables que determinan la magnitud o la calidad de la respuesta inmune uterina. El útero es excepcional entre tejidos finos mucosales en donde las hormonas esteroideas ováricas tienen efectos considerables en acontecimientos inmunes aferentes y eferentes. Así, el resultado de una respuesta inmune en contra de los patógenos que puede ser influenciado por la etapa del ciclo estral. (**Robertson et al 2000, Cavagna et al 2003**).

Las células del sistema inmune se originan de células mesenquimatosas en la médula. El linaje linfóide produce linfocitos, y el linaje del mielóide produce los fagocitos (monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos y basófilos) (**Dalin et al 2004, Dey et al 2004**)

Los macrófagos son las células que desempeñan papeles centrales en diversas respuestas inmunológicas, la función exacta de estos es desconocida. Sin embargo, las funciones inmunológicas de estas células es la fagocitosis, la presentación del antígeno, actividades bactericidas, la producción de las citocinas que promueven el crecimiento y la implantación del embrión **(Mor et al 2003, Hunt et al 2000)**.

Para reconocer la presencia de patógeno, las células inmunes naturales expresan receptores que identifican las estructuras moleculares patógeno-asociadas altamente conservadas como los lipopolisacáridos (LPS) que son el componente principal de la pared externa de las bacterias Gram negativas y es el mediador principal de las respuestas inflamatorias con este tipo de patógenos **(Knapp et al 2003)**.

El antígeno CD14 es una glicoproteína de 55 kDa presente en la membrana de los monocitos periféricos, de los macrófagos y de los granulocitos periféricos de la sangre. La molécula está ligada a la membrana por el fosfatidil inositol (Pi), y se ha encontrado en forma soluble en el plasma y en la orina humana **(Lund et al 1990, Bergamini et al 2000, Guha et al 2001)**.

La molécula antígeno de CD14 es reconocida por una variedad de anticuerpos monoclonales y permite la diferenciación de los monocitos y los macrófagos maduros del tejido fino **(Bernardo et al 1997)**.

Los linfocitos B y T son células que juegan un papel importante en la respuesta inmune. La activación de los linfocitos B a través de su antígeno de superficie y el antígeno permite que de forma natural proliferen y se distingan en el plasma y/o como células de memoria duraderas, y permite que durante la diferenciación los linfocitos B manifiesten las estrategias únicas para diversificar el repertorio de los receptores antígeno específicos de cada linfocito B (BCR) **(Lander et al 1990, Fagarasa et al 2000)**.

Los linfocitos B y las células del plasma están presentes en los tejidos finos uterinos, demostrando inmunidad humoral activa. La abundancia y la distribución de los

linfocitos en tejidos finos uterinos es influenciada por la especie, la madurez sexual y particularmente por la etapa del ciclo o de la gestación **(Croy et al., 1993, Ramsay et al 1997)**.

Las hormonas esteroides sexuales implicadas en la regulación del sistema inmune y en las enfermedades autoinmunes afectan a un mayor grado a hembras que a machos. Las hembras tienen una mayor susceptibilidad a la enfermedad autoinmunes reflejándose en las respuestas inmunes más fuertes y de concentraciones más altas de anticuerpos y de linfocitos, la regulación de la inmunidad es compleja en hembras porque los linfocitos responden a las concentraciones de las hormonas sexuales. Hay una reducción dramática en el número de los precursores activados y de los linfocitos B en la médula ósea de ratones gestantes, debido a esteroides sexuales producidos durante la gestación. En ratones, la exposición a largo plazo a las altas dosis de estradiol exógeno realiza la activación policlonal de los linfocitos B. Los niveles ováricos de los esteroides del sexo tienen una influencia particular en inmunidad genital femenina de la zona. En la rata, el ciclo estral influencia en la acumulación de IgA y de IgG en las secreciones uterinas **(Lu et al 2002)**.

Las subpoblaciones de los linfocitos expresan muchas moléculas en su superficie, que se pueden utilizar para distinguir los subconjuntos celulares. Las moléculas superficiales de la célula se pueden identificar con anticuerpos monoclonales específicos. Una nomenclatura sistemática que se ha desarrollado en la cual el CD del término (cluster de diferenciación) refiere a los grupos por los anticuerpos monoclonales, cada CD diferencia específicamente a una molécula en particular **(Dalin et al 2004)**.

Existen dos subpoblaciones de los linfocitos B, B-1 y B-2, estos subconjuntos muestran antígenos de superficie que los distinguen uno del otro, reflejando probablemente diversas funciones en el sistema inmune. Las células B-2 parecen ser

responsables de respuestas dependientes de la célula de T a los antígenos exógenos y de generar las células de la memoria B **(Clarke 1998)**.

Las células B en los tejidos periféricos pueden subdividirse en diversas subpoblaciones con base en las diferencias en el fenotipo de superficie. Uno puede diferenciar ampliamente las células B CD5- maduras (B2) recirculantes, de células B CD5+ (B1). Una de las diferencias de las células B B2, es que en su superficie tiene marcadores para IgM en menor cantidad que las células B B1. **(Hasler 2001)**

Los linfocitos B, B1 y B2 son subpoblaciones celulares que aumentan su número durante el desarrollo fetal. En el ratón, el hígado fetal produce células B1, en individuos adultos la médula ósea genera predominantemente células B2. **(Clarke et al 1998, Hasler et al 2001)**. Las subpoblaciones de linfocitos B, las células B-1 y B-2 producen la IgM después del estímulo de el antígeno, esta inmunoglobulina es necesaria para la protección inmune óptima en contra de las infecciones **(Baumgarth et al 2000)**.

Los cuerpos lúteos después de la ovulación son esenciales para el establecimiento y mantenimiento de la gestación, debido a que constituyen la única fuente de progesterona (P4). Se ha informado que la migración de las células inmunológicas en el útero experimenta cambios importantes durante los primeros días de la gestación. En la oveja se ha considerado que la elevada 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 **(Graham et al 1997, Dharmarajan et al 1992, Groshong et al 1997)**.

En el conejo como en otras especies, el cuerpo lúteo es la fuente principal de la progesterona durante la gestación, el retiro de uno de los ovarios se observara declinación rápida en los niveles de progesterona y acelerará así la terminación de la gestación. **(Chiboka et al 1978, Browning et al 1982, Miller et al 1987, Browning et al 1981)**

En el conejo y el cerdo, los esteroides ováricos se han propuesto para constituir un mecanismo que regula la función endometrial **(Spencer et al 2004)**.

En los receptores a progesterona en linfocitos de mujeres gestantes se observó una sensibilidad de cien veces a la progesterona que los linfocitos de hembras no gestantes. Por lo que es posible que los linfocitos de mujeres gestantes expresen receptores para la progesterona. **(Szekeres et al 2001)**

Evidencias experimentales obtenidas en diferentes especies indican que el patrón de migración de células inmunológicas al útero se modifica dependiendo del ambiente hormonal sistémico y local que existe durante el ciclo estral. Existen estudios que indican que las hormonas esteroides sexuales inducen variaciones en el número de plasmocitos presentes en el endometrio de la vaca, cerda, cabra, rata y yegua **(Lavielle ET AL)**

Los macrófagos y los linfocitos constituyen las principales subpoblaciones de leucocitos en el estroma endometrial de hembras no gestante. Solamente una pequeña cantidad de leucocitos polimorfonucleares (PMN) están presentes a través del ciclo endometrial normal. No se sabe, sin embargo, la proliferación in situ o la migración de la circulación periférica. **(Critchley et al 1999, Slukvina et al 2004)**

El acetato de medroxiprogesterona (AMP) es una progestina sintética usada extensamente en el tratamiento de los adenocarcinomas mamarios, endometrial, como terapia de apoyo en el síndrome de anorexia / caquexia y como anticonceptivo. A pesar de su amplio empleo en terapia humana, hay pocos informes que analizan los efectos de MPA en el sistema inmune en especies animales. Debido a su actividad inhibitoria en funciones transmitidas por células, el AMP se ha propuesto como una sustancia prometedora para el tratamiento de enfermedades autoinmunes **(Vermeulen et al 2001, Lignieres et al 2000)** Las progestinas disminuyen la proliferación endometrial de la célula en el útero de la mujer, pero su efecto sobre la glándula

mamaria y células inmunes es menos claro (**Hofseth et al 1999, Tibbetts et al 1999, Gray et al 2000**).

Las drogas anticáncerigenas interfieren en diversos pasos de la división celular que afectan a las células cancerosas. Dentro de los efectos de la progestinas ahora se sabe que puede influir a la célula a una apoptosis. Además, se ha observado que existe una influencia en la respuesta inmune del cuerpo en contra de las células cancerigenas. Estas actividades biológicas incluyen la capacidad de estimular la proliferación y la diferenciación de las células multipotenciales progenitoras de la médula en granulocitos y macrófagos. Hay evidencia de que CSFs estimulan la actividad fagocitaria y citotóxica de macrófagos (**Calatayud et al 2002**). Las progestinas tienen un efecto bifásico sobre el ciclo de la célula (**Sutherland et al 1998**) Los glucocorticoides endógenos son hormonas esenciales, sus efectos principales incluyen el mantenimiento de los niveles de azúcar en sangre y de la presión arterial así como la prevención de una inmunorespuesta excesiva. Utilizándose en enfermedades inflamatorias y alérgicas. Se ha observado que la progestina acetato del medroxiprogesterona de la (AMP), también se liga al receptor de los glucocorticoides. (**Bamberger et al 2000**).

En estos estudios en células y linfocitos del linfoma predicen que los mecanismos que controlan la proliferación y el apoptosis de la célula son afectados por mGRs, y, por lo tanto, afectarán una variedad de funciones del sistema inmune y de resultados clínicos. Las proteínas superficiales de la célula implicadas en interacciones de la célula afectan la migración inmune de la célula dentro y fuera de los varios tejidos finos donde modulan inmunorespuestas, y tienen así consecuencias funcionales importantes para las enfermedades del sistema inmune (**Watson et al 2001, Lingham et al., 1988, Brenner et al 1990, Leo et al 2004**).

Las semejanzas moleculares entre los miembros de la superfamilia de receptores sugieren no solamente una ascendencia común, pero la posibilidad de interacciones importantes entre los receptores o de productos genómicos inmediatos. Un ejemplo dramático de tal interacción es el recíproco entre el estrógeno (E) y los receptores de la progestina (P) (R) en los cuales los estrógenos realzan y las progestinas suprimen generalmente la síntesis de ambos ER y de la banda. Muchos de estos péptidos y/o de sus receptores están presentes dentro de los órganos de blanco del sistema reproductivo, y hay evidencia considerable que los esteroides del sexo pueden influenciar su producción (**Lingham et al., 1988**)

El presente artículo fue enviado para su publicación a la *Revista Veterinaria México*, se evaluaron los “Cambios histológicos inducidos por el Acetato de Medroxiprogesterona en el útero de conejas ovariectomizadas.” Con la finalidad de evaluar el efecto a la respuesta de los linfocitos B B2, macrófagos CD14+ y el grosor de la lamina propia del útero de conejas ovariectomizadas con la administración del AMP a una dosis de 5 mg/kg.

**Cambios histológicos inducidos por el Acetato de Medroxiprogesterona
en el útero de conejas ovariectomizadas.**

**Histological changes induced with medroxyprogesterone acetate on the
uterus of ovariectomized rabbits.**

Cesar Rosas-Velasco^{**}

Mario Pérez-Martínez^{**}

Héctor Castillo Juárez^{***}

Fernando Ivan Flores-Pérez §

Introducción

El acetato de medroxiprogesterona (AMP) es un derivado de la 17 α -hydroxyprogesterona con un efecto progestageno, antigonadotropico, antiestrogenico y que también puede actuar como glucocorticoide¹. El AMP es una progestina sintética usada para el control reproductivo y en la producción animal es empleada para la sincronización de ciclo estral y la función ovárica

*Esta investigación forma parte de la tesis de maestría del primer autor.

** Departamento de Morfología, Laboratorio de Biología Tisular de la Reproducción, "Rosa Emilia Lavielle", Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México D. F.

***Departamento de Producción Agrícola y Animal. Universidad Autónoma Metropolitana ,04960, Unidad Xochimilco, Calzada del Hueso110.México D.F

§Facultad de Ciencias Agropecuarias. Campo Experimental de Desarrollo e Investigación Agropecuaria (CEDIA). Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Av. Universidad 101, Col. Chamilpa, 62210, Cuernavaca, Mor, México (cuerpo académico en Producción Animal).

Para correspondencia y sobretiros: Fernando Ivan Flores Pérez, Facultad de ciencias Agropecuarias –CEDIA, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Av. Universidad 101, Col. Chamilpa, CP.62210, Cuernavaca, Mor, México Tel: (73)297046. e-mail: ivanfloreseperez@yahoo.com.mx

en bovinos y pequeños rumiantes ^{2,3}. Asimismo, su administración en el tratamiento de padecimientos como son el cáncer de mama y endometrio ha sido documentada tanto en humanos como en perras ⁴, por su capacidad protectora en contra de drogas citotóxicas para células de estirpe mieloide, se le han atribuido propiedades mieloprotectoras ^{5,6}. Por otro lado, se ha referido que esta progestina puede inducir muerte celular por apoptosis o prevenirla, así como inhibir la proliferación *in vitro* de ciertas líneas celulares tumorales. ^{7,8}

Los leucocitos en especial los macrófagos y linfocitos constituyen una población variable en el útero de diversas especies. La población de macrófagos y linfocitos se incrementa cuando el estro se aproxima y en la etapa del diestro disminuyen, lo cual indica que los niveles de estrógenos y progesterona existentes en el ciclo estral modulan el reclutamiento de leucocitos a nivel uterino. ^{9,10,11}

Los linfocitos BB-2 participan en la respuesta inmunitaria y son precisamente los linfocitos B los más abundantes en la edad adulta, las células B poseen un fenotipo CD5- y se caracterizan por una baja expresión de IgM y una elevada expresión de IgD. ¹²

Los macrófagos son células con actividad fagocítica que poseen un receptor de membrana que se denomina CD14, que es específico para los lipopolisacáridos de bacterias Gram negativas; cuando este receptor es activado, se promueve la destrucción de estos microorganismos. Se ha propuesto que este receptor participa en la activación de células T. ^{13,14}

La progesterona puede incrementar la susceptibilidad a diferentes enfermedades de transmisión sexual, lo cual ha sido estudiado en modelos animales ^{15,16}. El estudio de las células que se localizan en la mucosa del tracto

reproductor es de interés ya que constituye un área de estudio esencial para comprender la patogénesis de las enfermedades de transmisión sexual en humanos y especies domesticas. ^{16,17}

La progesterona y a algunos de sus análogos se les han atribuido propiedades antiinflamatorias característica que convierte al AMP en candidato terapéutico para enfermedades que involucran procesos de autoinmunidad e inflamación crónica.¹⁸ Sin embargo, hasta la fecha los efectos del AMP *in vivo* no han sido entendidos completamente. Asimismo, los efectos que en modelos animales pueden ser inducidos con la administración de AMP en los linfocitos B y los macrófagos en el útero no han sido valorados aun, por lo que el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de una dosis única de MPA en el numero y la distribución tisular de los linfocitos BB-2 y los macrófagos CD14+ en el útero de conejas ovariectomizadas

Materiales y métodos

La ovariectomía se llevo a cabo en 15 conejas Nueva Zelanda obtenidas de la de la FMVZ-UNAM con un pesos entre 2.5-3.5 Kg que fueron mantenidos en condiciones convencionales en jaulas separadas con agua y alimento administrado ad limitum .Los animales fueron anestesiados por vía intramuscular con Xilazina (Lab. La Pisa®, Hgo. Mexico) (5 mg/kg IM) y Ketamina (Lab. Revetmex ®, D.F, México) (35 mg/kg IM). La ovariectomía fue llevada acabo mediante uan insicion por linea media , los ovarios fueron localizados y se practico una ligadura del paquete vascular posteriormente se procedió a llevara acabo la resección de los ovarios y la insición se suturó con dexon 3-0 . Todos los animales

fueron medicados con analgesicos y antibioticos de amplio especto durante 72hrs.

A los 21 días después de la ovariectomia los animales fueron divididos en 5 grupos de 3 conejos cada uno. Doce Conejos fueron tratados con unas dosis única IM de 5mg de MPA (Vetoquinol© Lab), los tres restantes se utilizaron como grupo testigo, y solamente se les aplico 1ml de Solución Salina por vía intramuscular al inicio del experimento. Las conejas fueron sacrificadas humanitariamente a los 1,3,6 y 7 días post inyección con MPA, utilizando una sobredosis de pentobarbital sodico aplicada por vía intracardiaca de 100 mg/Kg .

Se obtuvieron fragmentos de tejido del tercio medio de los cuernos uterinos de cada uno de los grupos y fueron inmediatamente fijados durante 72hrs en paraformaldehido al 4%, pH 7.4. Después del periodo de fijación , los tejidos fueron procesados con un histoquinette, y se obtuvieron cortes histológicos semiseriados de un grosor de 6 a 7 μm con un micrótomo y fueron teñidos con verde metil pironina para observar la estructura histológica general y cuantificar la altura del epitelio secretos y el grosor de la lamina propia.

Las secciones de tejido fueron obtenidas y adheridas a portaobjetos tratados previamente con poli-l-lisina, se desparafinaron con xilol y se hidrataron con alcoholes de diversas concentraciones. Se permeabilizaron con triton X-100 al 0.1% en una solución de citrato de sodio durante 20 minutos, posteriormente, se inhibió la actividad de peroxidasas endogenas incubando los tejidos por 25 minutos con una solución de 0.3% H_2O_2 a temperatura ambiente. todas las preparaciones fueron lavadas con Solución amortiguadora

de fosfatos(PBS1x) y marcadas con un lápiz hidrofóbico al rededor de los tejidos.

Todos los tejidos fueron incubados con suero durante 30 minutos. La inmunodetección de los antígenos BB-2 y CD 14, se llevo a acabo con anticuerpos monoclonales comerciales que son específicos tanto para los antígenos como para la especie (BAQ44A y CAM36A, laboratorios VMRD). La dilución para ambos fue de 1:20. se incubó con los anticuerpos primario durante 12 hrs. a 4°C, posteriormente , se incubo con el anticuerpo secundario durante 45 minutos y con el anticuerpo conjugado se incubo por un periodo similar, finalmente , se añadió el cromogeno para revelar la señal. Se contratiñó con hematoxilina y la reacción se observo al microscopio. La especificidad del inmunomarcaje fue demostrada al incluir un grupo testigo negativo al que no se le incubo con el anticuerpo primario.

Las células positivas a BB-2 y CD14+ , se contaron empleando un analizador de imágenes (Motic© images 2000), el cual se encuentra acoplado a una computadora. Las células localizadas en la capa epitelial luminal, lamina propia y el endometrio fueron consideradas. Se evaluaron 10 campos microscópicos con el objetivo de 40X en los cortes semiseriados obtenidos de cada útero.

El numero de células obtenidas de los conteos positivas a BB-2 como a CD14+ fueron comparadas con el grupo testigo mediante la prueba de Kruskal-Wallis, posteriormente se llevo a cabo un análisis en el que se uso la prueba de Dunn. Con el propósito de analizar los valores obtenidos de la altura del epitelio glandular y el grosor de la lámina propia se empleó una prueba de análisis de variancia de una sola cola y posteriormente una prueba de Tukey. En todos los

análisis y para la elaboración de las graficas se uso el programa GraphPad Prism versión 4.02*.

Resultados

Los linfocitos B y los macrófagos presentaron una localización similar en el endometrio. También se observaron en la lámina propia adyacente al epitelio de los pliegues endometriales y entre las células del epitelio luminal. Estas células también estuvieron presentes cerca de los vasos sanguíneos de la lamina propia y entre las células epiteliales del las glándulas endometriales (Figura 1 y 2).

En el conteo de los linfocitos BB-2 en el endometrio un numero reducido de células se observo en los días 3 y 6 ($P < 0.001$) post-tratamiento en relación al grupo testigo (Figura 3). Sin embargo, en el día 1 el MPA, mostró tener una menor capacidad para reducir el numero de linfocitos BB-2 ($P < 0.05$).

Los macrófagos CD14+ localizados en el endometrio presentaron un incremento significativo en los días 1, 3 y 6 postratamiento ($P < 0.001$), en comparación con el grupo control. En el día 7 la cantidad de macrófagos CD 14 fue similar a la del grupo control ($P < 0.05$) (Figura 4).

En las glándulas endometriales se observaron diferencias significativas en la altura de el epitelio secretor de los animales en los días 3 ($33.3 \pm 6.4 \mu\text{m}$) ($P < 0.001$), 6 ($19.8 \pm 3.1 \mu\text{m}$) ($P < 0.001$) y 7 ($15.2 \pm 4.7 \mu\text{m}$) ($P < 0.01$) post-tratamiento en comparación al grupo testigo ($10.0 \pm 2.8 \mu\text{m}$) (Figura 5).

En la lamina propia se encontraron diferencias en el grosor únicamente en los días 1($324.4 \pm 98.5 \mu\text{m}$) ($P < 0.001$) y 7 ($316.8 \pm 45.6 \mu\text{m}$) ($P < 0.001$) post-tratamiento vs. Grupo control ($203.2 \pm 70.2 \mu\text{m}$) (Figura 6).

Discusión

Las disminuciones significativas observadas en el número de células BB-2 positivas entre el grupo testigo y los días 1, 3, 6 y 7 postratamiento, puede ser explicado con la propiedad que posee el AMP de poder disminuir la proliferación celular en linfocitos de manera *in vitro*.^{8,19} Es interesante mencionar que el efecto inducido por el AMP puede ser evidenciado desde las 24 hrs post tratamiento.

El efecto negativo del AMP en la proliferación celular ha sido también evidenciado de manera *in vitro* e *in vivo*, en estudios en líneas celulares tumorales y en el tracto reproductor del macaco respectivamente^{7,20}. En la medula ósea, el AMP inhibe la mitosis y la diferenciación celular de las células tronco, lo que provoca, que estas células entren en un estadio de senescencia que se conoce como G0, el cual reduce el daño producido por agentes citotóxicos, efectos similares se han documentado en estudios *in vitro* lleva dos a cabo en líneas tumorales de cáncer de glándula mamaria en humanos.^{7,21} Además, el AMP posee la capacidad de afectar de manera negativa la proliferación en la porción glandular de endometrio, en mujeres que se encuentran en premenopausia, en este estudio clínico, se determinaron índices mitóticos, y la inmunodetección del antígeno de proliferación nuclear (PCNA) y la ciclina (MIB1).²²

En el caso de las subpoblaciones de linfocitos BB-2, se ha referido que el AMP puede inducir proliferación²². Sin embargo, el AMP fue empleado como parte de una terapia hormonal en combinación con estrógenos, y la dosis empleada fue distinta a la utilizada en el presente estudio, por lo que los autores en realidad describen un efecto sinérgico de ambos hormonales.²³

Con la dosis de AMP, utilizada en el presente trabajo el número de macrófagos CD14 en los días 1, 3 y 6 postratamiento se incrementó y en el día 7 la cantidad de macrófagos fue similar al grupo testigo, estas observaciones pueden deberse a el efecto bifásico que ha sido descrito para el AMP de manera *in vitro*, que consiste en promover inicialmente la proliferación en líneas tumorales de cáncer mamario (T47d) , después de 24 horas de la administración, y a las 48hrs se observa una inhibición en la proliferación.²⁴

Las progestinas sintéticas afectan la capacidad inmunológica del tracto reproductor femenino en contra de infecciones virales. En el ratón la susceptibilidad a la infección con el herpes genital tipo 2 se incrementa aproximadamente 100 veces cuando son tratados con medroxiprogesterona¹⁶. Estos resultados experimentales apoyan la propuesta de que las progestinas sintéticas poseen un efecto mas prolongado en relación a las hormonas existentes en concentraciones fisiológicas, por lo que se deben tomar en cuenta factores tales como la dosis y tiempos de aplicación. En borregas ovariectomizadas tratadas con progesterona durante los días 10, 30 y 60, se observo una disminución de linfocitos cd45r+ presentes en el epitelio luminal del endometrio²⁵. En el presente trabajo se observo que los linfocitos BB-2 y los macrófagos CD 14, disminuyeron a los 7 días postratamiento, por lo que el

MPA podría tener un efecto de inmunosupresión local en el útero de las conejas

Las progestinas son ampliamente utilizadas para sincronizar la función ovárica en algunas especies domésticas; no obstante, se carece de estudios *in vivo* que evalúen de manera integral los posibles efectos colaterales de estas hormonas en la respuesta inmunitaria local del tracto reproductor femenino.

Es indispensable considerar que aun a pesar de que los estudios *in vitro* se han llevado a cabo en líneas celulares han aportado información relevante de los efectos biológicos del AMP, es difícil extrapolar esta información a modelos *in vivo*¹, ya que las condiciones experimentales como por ejemplo dosis, sistemas biológicos y tiempo de evaluación son variables.

En las glándulas endometriales provenientes de conejas que fueron tratadas con AMP, se observó un incremento en la altura del epitelio en los días 3, 6 y 8 posttratamiento al ser comparadas con el grupo testigo. Con la dosis empleada en el presente estudio de AMP la altura del epitelio se vio incrementada y en algunos casos se mantuvo, esto podría ser un mecanismo compensatorio. Al respecto se ha referido que la deficiencia de esteroides ováricos que se asocia con la ovariectomía, en un lapso de tres semanas post cirugía, provoca importantes cambios histológicos en la mucosa uterina del conejo.²⁶

Se sabe que el AMP requiere de un receptor a progesterona con la finalidad de inducir sus efectos, sin embargo, en un estudio de expresión llevado a cabo en linfocitos humanos se encontró que estos carecen del receptor a progesterona, pero si presentan un receptor a glucocorticoides por medio del cual el MPA puede inducir sus efectos¹⁸. Es importante destacar que

esta característica indica que el AMP podría ser un sustituto terapéutico para los glucocorticoides que son empleados en terapias anti inflamatorias , con las ventajas de que el AMP no presenta efectos adversos como lo es la inducción de osteoporosis en el paciente .¹⁸

Los resultados obtenidos en el presente estudio indican que el AMP administrado a una dosis de 5 mg, en una fase temprana de 24 hrs., disminuye el numero de células BB-2 positivas e incrementa el numero de macrófagos CD14 ; en una fase media de 3 días postratamiento inhibe la proliferación de los linfocitos BB-2 y promueve la proliferación de los macrófagos CD14, por ultimo, en la etapa final , es decir los días 6 y 7 post tratamiento el numero de ambos tipos celulares disminuye en el endometrio de conejas ovariectomizadas. Sin embargo, se requieren de estudios futuros a nivel molecular que permitan conocer a detalle los mecanismos que utiliza el AMP para inducir sus efectos de manera *in vivo*. Es importante destacar que este trabajo es el primer estudio en el que se describen los efectos del AMP en el número de linfocitos BB-2 y macrófagos CD- 14 utilizando como modelo al conejo doméstico. Asimismo, los cambios en parámetros morfológicos como lo son la altura del epitelio secretor y la lamina propia, inducidos por el MPA no han sido referidos previamente.

Agradecimientos.

El presente trabajo fue financiado por la DGAPA-UNAM (proyecto PAPIIT: IN212101) y el PROMEP/103.5/04/2862. Los autores agradecen el apoyo técnico brindado por Maribel Nieto, en la ejecución de los cortes histológicos.

Referencias

1. Schindler AE, Campagnoli C, Druckmann R, Huber J, Pasqualini JR, Schweppe KW, Thijssen JH. Classification and pharmacology of progestins. *Maturitas*.2003: 46S1; 7-16.
2. Aba MA, Quiroga MA, Auza N, Forsberg M, Kindahl H. Control of ovarian activity in Llamas (*Lama glama*) with medroxyprogesterone acetate. *Reprod Dom Anim*. 1999: 34; 471-476.
3. Dogan I, Nur Z, Gunay U, Soylu MK, Sonmez C. Comparison of fluorgestone and medroxyprogesterone intravaginal sponges for oestrus synchronization in Saanen does during the transition period. *South Af J of Anim Science*.2004:34; 18-22.
4. Montovani G, Maccio A, Esu S, Lai P, Santona MC, Massa E, Dessi D, Melis GB, Del Giacco GS. Medroxyprogesterone acetate reduces the *in vitro* production of cytokines and serotonin involved in anorexia /cachexia and emesis by peripheral blood Mononuclear cells of cancer patients. *Europ J Cancer*. 1997:33; 602-607.

5. Pedrazzoli P, Bacciocchi G, Dapradda GA, Preti P, Pavesi L, Poggi G, Locatelli F, Rosti V, Della Cuna RG. Evaluation of the effect of medroxyprogesterone acetate on bone marrow progenitor cells. *Tumori*, 1991;77;399-402.
6. Celebioglu BS, Kurtman C, Ozbilgin MK. The myeloprotective effect of medroxyprogesterone acetate in an irradiated animal model. *Jpn J Clin Oncol*.2003: 33; 642-644.
7. Ory K, Lebeau J, Levalois C, Bishay K, Fouchet P, Allemand I, Terwath A, Chevevillard S. Apoptosis inhibition mediated by medroxyprogesterone acetate treatment of breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res. Treat*.2001: 68;187-198.
8. Seeger H D, Wallwiener A, Mueck A. Comparison of the effect of progesterone, medroxyprogesterone acetate and norgestrel acetate and norethisterone on the proliferation of human breast cancer cells. *J. British Menopause Soc*.2003;3; 36-38. 2003.
9. Hunt J. Immunologically relevant cells in the uterus. *Biol. Reprod*. 1994;50;461-466.
10. Kaushic C, Frauendorf E, Rossol R, Richardson J, Wira C. Influence of the oestrous cycle on the presence and distribution of immune cells in the rat reproductive tract. *Am. J. Reprod. Immunol*. 1998: 39; 209-216,1998.

11. Pérez-Martínez M, Luna J, Mena R, Romano MC. 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.* 2002;72; 115-121.
12. Sagaert X, De Wolf-Peeters C. Classification of B-Cells according to their differentiation status, their micro-anatomical localization and their development lineage. *Immunol Lett.* 2003;90; 179-186.
13. Haziot A, Chen S, Ferrero E, Low MG, Silber R, Goyert SM. The monocyte differentiation antigen, CD14, is anchored to the cell membrane by a phosphatidylinositol linkage. *J. Immunol.* 1998;141; 547-552.
14. Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science.* 1990; 249; 1431-1433.
15. Beagley WK, Gockel CM. Regulation of innate and adaptive immunity by the female sex hormones oestradiol and progesterone. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2003; 38; 13-22.
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. Prakash M, Patterson S, Kapembwa MS. Macrophages are increased in cervical epithelium of women with cervicitis. *Sex Transm Inf.*2001: 77; 366-369.
18. Bamberger CM, Elase T, Bamberger A.M, Ulrich F, Schulte H. Dissociative glucocorticoid activity of medroxyprogesterone acetate in normal human lymphocytes . *J Clin Endocrin Metabo.* 1999: 84;4055-4061.
19. Kontula K, Paavonen T, Luukkainen T, Andersson LC. Binding of progestins to the glucocorticoid receptor. Correlation to their glucocorticoid-like effects on *in vitro* functions of human mononuclear leukocytes. *Biochem Pharmacol.*1983: 9;1511-1518.
20. Clinee JM, Soderqvist G., Register, T.C., Williams, J.K., Adams, M.R. and Von Schoultz, B.: Assessment of hormonally active agents in the reproductive tract of female nonhuman primates. *Toxicol Pathol.*2001: 29; 84-90.
21. Quesada, A.R, Jimeno, J.M. , Marquez, G. and Aracil, M.: Cell cycle arrest of human hematopoietic progenitors induced by medroxyprogesterone acetate. *Exp Hematol.*1993: 11; 1413-1418.
22. Moyer DL, Felix JC. The effects of progesterone and progestins on endometrial proliferation. *Contraception.* 1998;6; 399-403.

23. Kamada M, Irahara M, Maegawa M, Yasui T, Yamano S, Yamada M, Tezuka M, Kasai Y, Deguchi K, Ohmoto Y, Aono T. B cell subsets in postmenopausal women and the effect of hormone replacement therapy. *Maturitas*.2001: 3;173-179.
24. Thuneke I, Schulte HM, Bamberger AM. Biphasic effect of medroxyprogesterone-acetate (MPA) treatment on proliferation and cyclin D1 gene transcription in T47D breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*.2000: 3; 243-800.
25. Gottshall SL , Hansen PJ. Regulation of leukocyte subpopulations in the sheep endometrium by progesterone. *Immunology*. 1992:76; 636-641.
26. Starczewski A, Glabowski W W , laszczynska M, Sluczanowska-glbowska S. The effect of ovarian steroid deficiency on regeneration of oviductal mucosa following reconstructive surgery. *Rep Biol*.2003: 3; 197-214.

COROLARIO

Los resultados obtenidos en el presente estudio indican que el AMP administrado a una dosis de 5 mg, se observa un efecto bifásico del AMP sobre la proliferación celular, evidenciado de *in vitro* e *in vivo* en otras investigaciones, además de inhibir la mitosis en la medula ósea y la diferenciación celular de las células tronco, provocando un estadio de senescencia celular, el AMP afecta de manera negativa la proliferación glandular del endometrio, de las subpoblaciones de linfocitos BB-2, se ha referido que el AMP puede inducir proliferación. El número de macrófagos CD14 se incrementó y en el día 7 disminuyó siendo similar al grupo testigo.

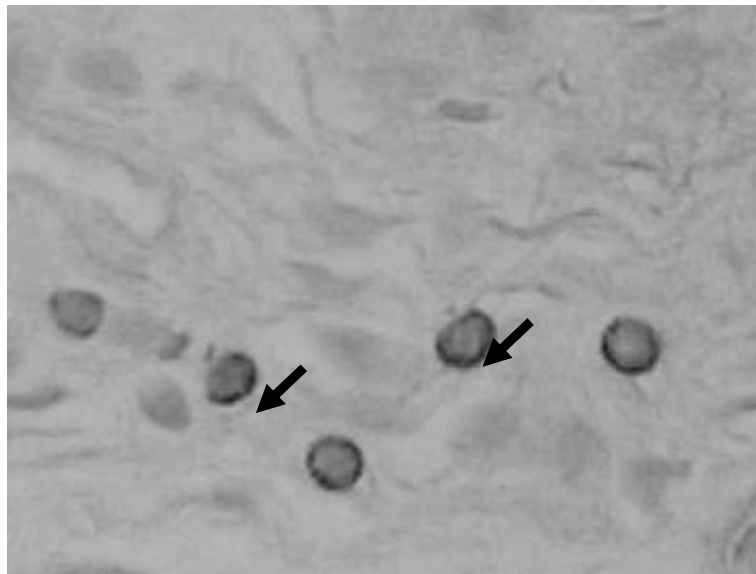


Figura 1. Inmunodetección de linfocitos BB-2 en el endometrio de conejas, mediante la técnica de inmunoperoxidasa(flechas). 40X. Barra: 10 μ m

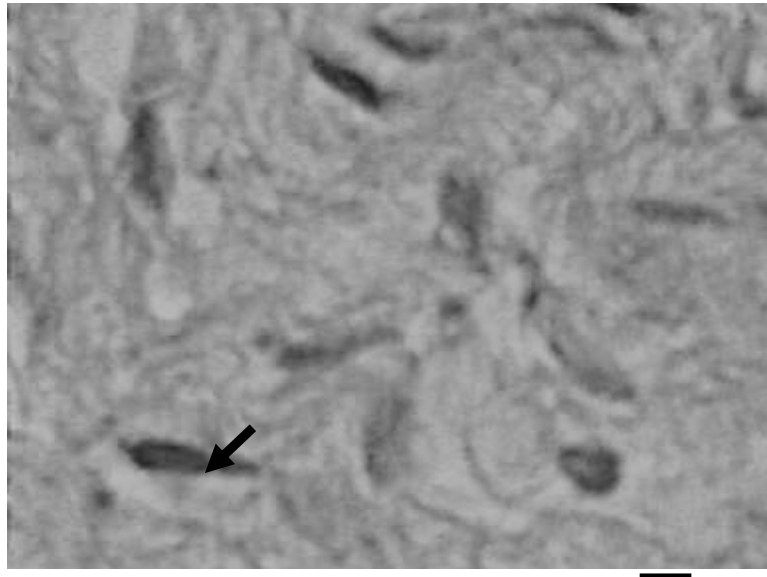


Figura 2 Fotomicrografía de inmunodetección de macrófagos CD 14+ en el endometrio de una coneja, las células positivas se detectaron con la técnica de inmunoperoxidasa(flecha) . 40X. Barra: 10 μ m

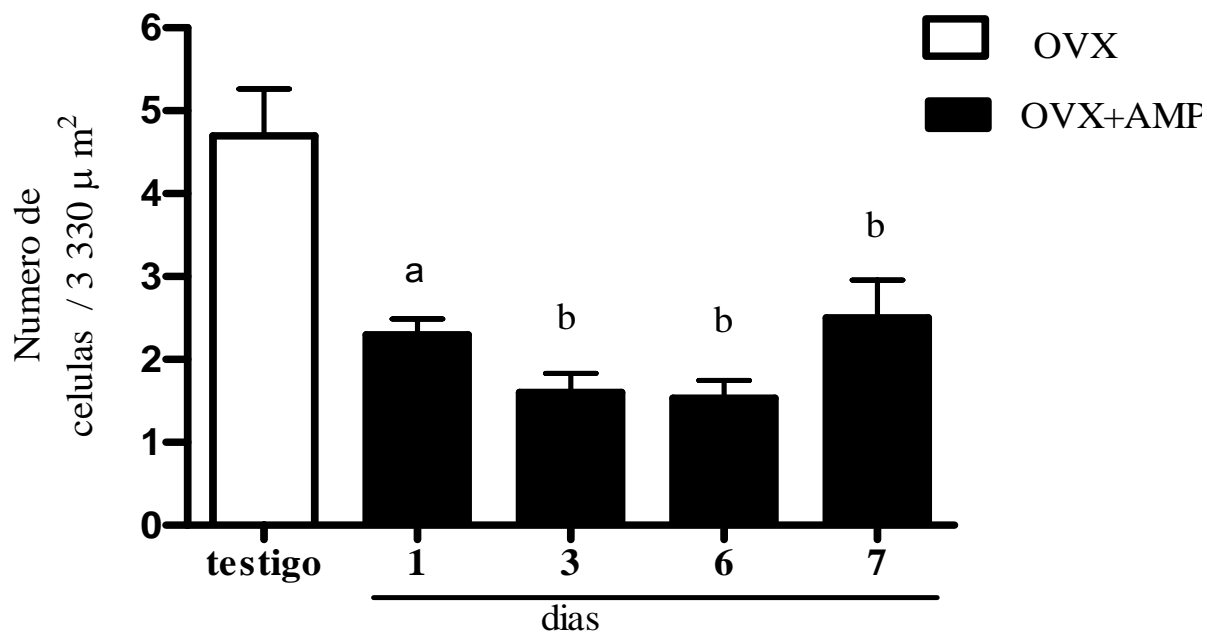


Figura 3 Número de Células positivas a BB-2 en el endometrio de las conejas. Los valores se expresan como media \pm ES (n=3). Día 1 ^a P<0.05, días 3, 6 y 7 ^b P<0.001. Todos los días vs. Testigo.. Ovariectomizadas (OVX), Ovariectomizadas y tratadas con 5mg(OVX+AMP).

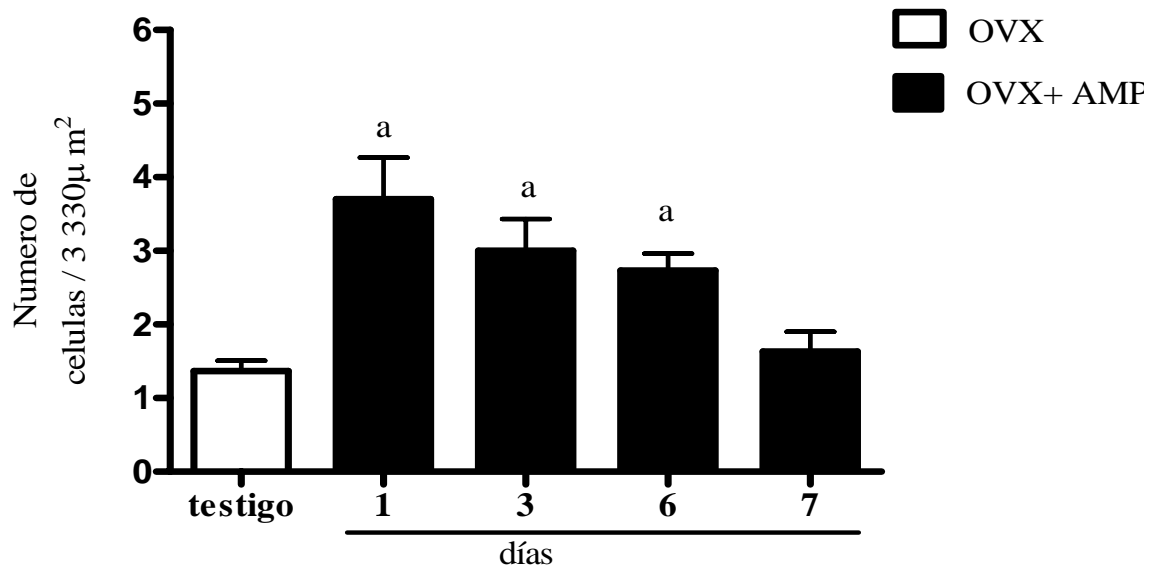


Figura 4 Número de macrófagos CD14+ en el endometrio de conejas. Los valores están expresados en media \pm ES (n=3). Días 1, 3 y 6 ^aP<0.001 vs. Testigo.. Ovariectomizadas (OVX), Ovariectomizadas y tratadas con 5mg(OVX+AMP).

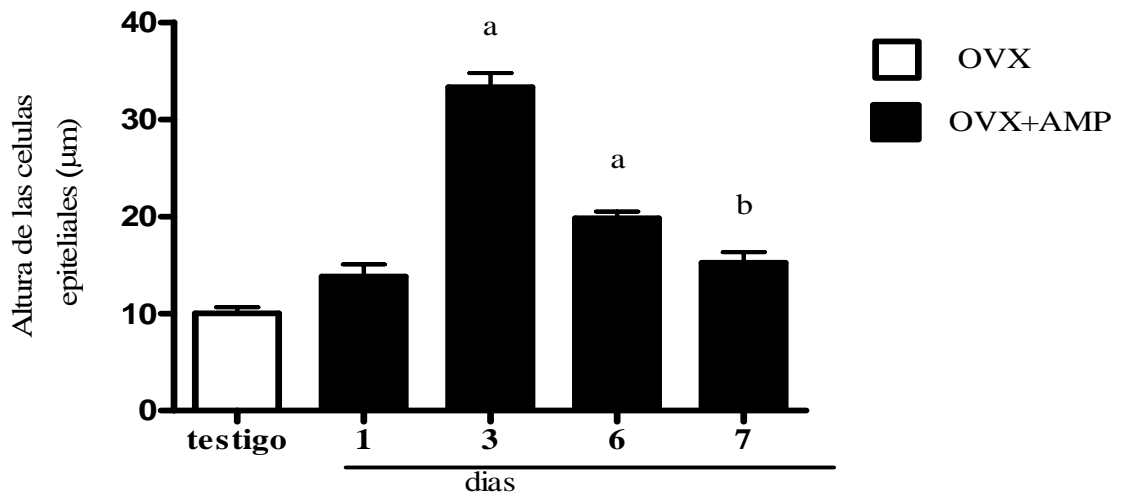


Figura 5 Altura del epitelio secretor del útero de conejas, expresados en medias \pm ES (n=3). Días 3 y 6 ^aP<0.001, día 7^b P<0.01 vs. control. Ovariectomizadas (OVX), Ovariectomizadas y tratadas con 5mg(OVX+AMP).

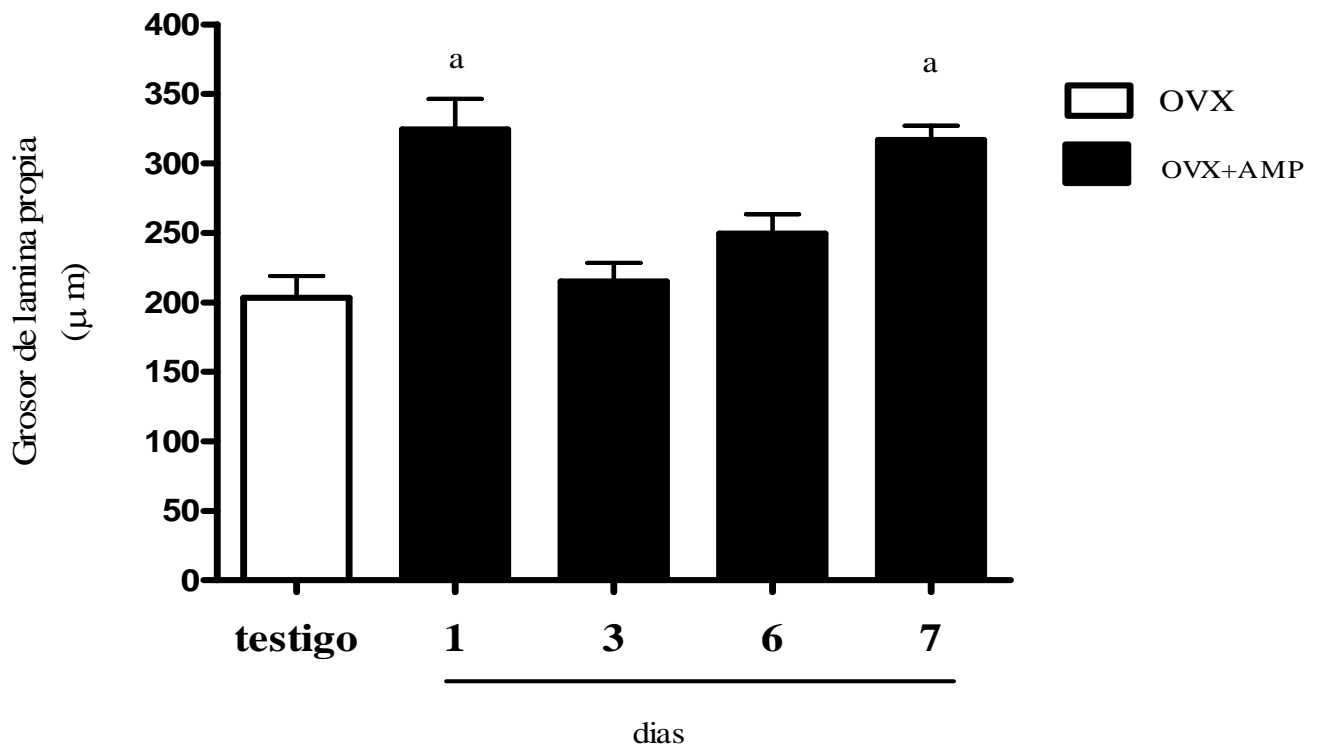


Figura 6 Grosor de la lamina propia, los valores presentados son media \pm ES (n=3). Días 1 y 7 ^aP<0.001 vs. testigo. Ovariectomizadas (OVX), Ovariectomizadas y tratadas con 5mg(OVX+AMP).