



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
FACULTAD DE BIOQUÍMICA Y CIENCIAS BIOLÓGICAS
LABORATORIO DE ENDOCRINOLOGÍA Y TUMORES
HORMONODEPENDIENTES(LETH)**

**Modificaciones histofisiológicas del
cérvix, útero y sínfisis púbica del
cobayo relacionadas con la gestación,
el parto y el posparto**

AUTOR: BIOQ. HORACIO A. RODRÍGUEZ

DIRECTOR: PROF. DR. ENRIQUE H. LUQUE

CO-DIRECTOR: PROF. DRA. MÓNICA MUÑOZ DE TORO

**Santa Fe
2004**

A Celina y Santiago, por las esperas y los desencuentros, porque cambiaron mi vida para siempre.

A mamá, por los años de su vida invertidos en que yo estudiara.

A Patricia, por estar conmigo en los momentos difíciles.

Agradecimientos

A mis directores, el Dr. Enrique H. Luque y la Dra. Mónica Muñoz de Toro, por brindarme la oportunidad de volver al LETH, y especialmente a Enrique por su empeño en enseñarme a concretar logros.

Al Dr. Guillermo Ramos, por ser un entrañable compañero de andanzas en la ciencia y por su enorme generosidad en todos los aspectos de la amistad.

Al Dr. Hugo Ortega, por el placer de haber obtenido juntos una parte de los resultados de esta tesis.

A mis compañeros del LETH: Milena Durando, Laura Kass, Jorgelina Varayoud, Florencia Rey, Verónica Bosquiazzo, Guillermo Ramos, Lucas Monje, Pablo Beldoménico, Juan Carlos Villarreal, Ma de los Milagros Bassani, Luciana Costabel y Cora Stoker, porque no podría haberlo hecho sin su ayuda; especialmente a Milena, Guillermo y Jorgelina, por el tiempo que me regalaron en distintos momentos de la realización de esta tesis. Estoy en deuda con todos y cada uno de ellos.

A las Dras. Laura Kass, Maricel Maffini y Jorgelina Varayoud, porque ocupan un lugar especial en mis afectos.

Al Prof. Dr. Gregorio S. Montes, por haberme impulsado a retomar este camino.

A Alejandro, Lucía y Germán Graff, porque siempre están cuando los necesito.

A papá, mi hermano César y mi tío Beto, porque me hubiera gustado que estén conmigo para festejar.

Al Prof. Dr. Juan Claus, por su voto de confianza.

A los Dres. Alfredo Castro-Vásquez, Miguel Nanni y Silvia Sandoz, por recibirme en sus laboratorios y brindarme su conocimiento y experiencia en todo el trabajo referido a las mediciones de los niveles hormonales.

A la Dra. Raquel Chan, al Dr. Daniel González y a todos los integrantes de su laboratorio, por recibirme y brindarme su ayuda.

A las autoridades de la Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas y a la Universidad Nacional del Litoral, que por medio de becas permitieron que me dedicara a este trabajo.

A las autoridades del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, que por medio de subsidios hicieron posible la concreción de este proyecto.

A la vida, que está llena de problemas, pero también de oportunidades.

Publicaciones de los resultados de esta tesis

Rodríguez, H.A.; Kass, L.; Varayoud, J.; Ramos, J.G.; Ortega, H.; Durando, M.; Muñoz-de-Toro, M.; Luque, E.H. Collagen remodelling in the guinea-pig uterine cervix at term is associated with a decrease in PR expression. *Molecular Human Reproduction* 9 (12): 807-813, 2003.

Muñoz-de-Toro, M.; Varayoud, J.; Ramos, J.G.; **Rodríguez, H.A.**; Luque, E.H. Collagen remodeling is a key event in cervical ripening for a successful vaginal delivery. *Brazilian Journal of Morphological Sciences* 20 (2): 75-84, 2003.

Rodríguez, H.A.; Ortega, H.H.; Ramos, J.G.; Muñoz-de-Toro, M.M.; Luque, E.H. Guinea-pig interpubic joint (*symphysis pubica*) relaxation at parturition: Underlying cellular processes that resemble an inflammatory response. *Reproductive Biology and Endocrinology* 1:113-121, 2003.

Otras publicaciones del autor

Luque, E.H.; Ramos, J.G.; **Rodríguez, H.A.**; Muñoz-de-Toro, M. Dissociation in the Control of Cervical Eosinophilic Infiltration and Collagenolysis at the End of Pregnancy or After Pseudopregnancy in Ovariectomized Steroid-Treated Rats. *Biology of Reproduction* 55: 1206-1212, 1996.

Luque, E.H.; Muñoz-de-Toro, M.; Ramos, J.G.; **Rodríguez, H.A.**; Sherwood, O.D. Role of relaxin and estrogen in the control of eosinophilic invasion and collagen remodeling in rat cervical tissue at term. *Biology of Reproduction* 59: 795-800, 1998.

Ramos, J.G.; Varayoud, J.; Kass, L.; **Rodríguez, H.A.**; Muñoz-de-Toro, M.; Luque, E.H. Estrogen and progesterone modulation of eosinophilic infiltration of the rat uterine cervix. *Steroids* 65: 409-414, 2000

Ramos, J.G.; Varayoud, J.; Kass, L.; **Rodríguez, H.A.**; Costabel, L.; Muñoz- de-Toro, M.; Luque, E.H. Bisphenol A Induces Both Transient and Permanent Histofunctional Alterations of the Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Axis in Prenatally Exposed Male Rats. *Endocrinology* 144: 3206-3215, 2003.

Stoker, C.; Rey, F.; **Rodríguez, H.A.**; Ramos, J.G.; Siroski, P.; Larriera, A.; Luque, E.H.; Muñoz-de-Toro, M. Sex reversal effects on *Caiman latirostris* exposed to environmentally relevant doses of the xenoestrogen bisphenol A. *General and Comparative Endocrinology* 133: 287-296, 2003.

Bosquiazso, V.; Durando, M.; Varayoud, J.; Ramos, J.G.; Rodríguez, H.A.; Muñoz-de-Toro, M.; Luque, E.H. Macrophage density in the pregnant rat uterine cervix is modulated by mast cells degranulation. (en prensa)

ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS UTILIZADAS	i
LISTADO DE TABLAS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
RESUMEN	ix
ABSTRACT	xvi
INTRODUCCIÓN	
1. Introducción	
1.1. Factores maternos y fetales del parto	1
2. Anatomía e histología	2
2.1.1. <i>Canal blando de parto</i>	2
2.1.2. <i>Canal duro de parto</i>	10
2.2. Adaptaciones fisiológicas	10
2.2.1. <i>Canal blando</i>	10
2.2.1.1. <i>Útero</i>	11
2.2.1.1.1. <i>Patrón de actividad contráctil durante la gestación y el parto</i>	11
2.2.1.1.2. <i>Bases de la contracción</i>	13
2.2.1.1.3. <i>Acoplamiento eléctrico y excitabilidad</i>	14
2.2.1.1.4. <i>Oxitocina (OT) y receptores para OT (OTR)</i>	16
2.2.1.1.5. <i>Óxido nítrico (ON)</i>	18
2.2.1.2. <i>Cérvix</i>	19
2.2.1.2.1. <i>Cambios bioquímicos e histológicos del cérvix durante la gestación y el parto</i>	19
2.2.1.2.2. <i>Remodelación del colágeno cervical</i>	20
2.2.1.2.3. <i>La maduración cervical como un proceso inflamatorio</i>	23
2.2.2. <i>Canal duro</i>	27
3. Inicio del parto	29
3.1. <i>Generalidades</i>	29
3.2. <i>Receptores de hormonas esteroideas</i>	31
3.3. <i>Biología de RE y de RP</i>	32
3.4. <i>El control hormonal de los receptores</i>	34
3.5. <i>Modelos de inicio del parto</i>	35
3.5.a. <i>Luteólisis</i>	36
3.5.b. <i>ACTH-cortisol fetal</i>	36
3.5.c. <i>Mecanismos funcionales</i>	36
3.6. <i>Consideraciones adicionales para especies que cursan el parto sin variaciones de Pg y Eg</i>	37
3.7. <i>Modelo animal propuesto: Similitudes en la biología del parto entre la mujer y el cobayo</i>	40

OBJETIVOS	
Objetivo General	42
Objetivos Específicos	42
MATERIALES Y MÉTODOS	
4. Materiales y Métodos	
4.1. Animales	44
4.2. Obtención y procesamiento de las muestras	46
4.2.1. <i>Cirugías</i>	46
4.2.2. <i>Procesamiento histológico</i>	46
4.2.3. <i>Extracción de ARN</i>	47
4.2.3.1. <i>Lectura espectrofotométrica de ácidos nucleicos</i>	48
4.2.3.2. <i>Geles de agarosa con formaldehído</i>	48
4.2.4. <i>Extracción de proteínas</i>	48
4.3. Determinación de las concentraciones séricas hormonales	49
4.4. Determinación de leucocitos polimorfonucleares que infiltran el cuello y el cuerpo del útero	52
4.5. Estudio de la distribución del colágeno	53
4.6. Determinación de RE α y RP	54
4.6.1. <i>Western blot</i>	54
4.6.2. <i>Inmunohistoquímica</i>	55
4.7. Estudio de la expresión del ARNm del RE α y RE β	57
4.7.1. <i>Generación de los competidores</i>	58
4.7.1.1. <i>Cepa bacteriana y vector utilizado</i>	59
4.7.1.2. <i>Minipreparación de ADN plasmídico</i>	60
4.7.1.3. <i>Digestión del ADN con endonucleasas de restricción</i>	60
4.7.1.4. <i>Ligación de moléculas de ADN</i>	60
4.7.1.5. <i>Transformación de E. coli por el método del Cl₂Ca</i>	61
4.7.1.6. <i>Generación de stocks de bacterias transformadas</i>	61
4.7.1.7. <i>Cálculo del número de moléculas de competidor</i>	62
4.7.2. <i>Determinación del ARNm de REα y REβ</i>	62
4.7.2.1. <i>Transcripción reversa</i>	62
4.7.2.2. <i>Selección de oligonucleótidos específicos</i>	63
4.7.2.3. <i>Digestión con endonucleasas de restricción</i>	63
4.7.2.4. <i>Determinación del rango de diluciones</i>	64
4.7.2.5. <i>Evaluación de la variabilidad en la carga inicial de ADNc</i>	64
4.7.2.6. <i>Medición de la expresión del ARNm del REα y REβ</i>	64
5. Análisis estadístico	66
6. Normas éticas y de bioseguridad	66
RESULTADOS	
7. Resultados	
7.1. Niveles hormonales	67
7.1.1. <i>Validación del método</i>	67
7.1.2. <i>Niveles séricos de E₂ y Pg</i>	69
7.2. Infiltración de neutrófilos y remodelación del colágeno	70
7.2.1. <i>Cérvix</i>	70
7.2.2. <i>Cuernos uterinos</i>	73

7.3. Expresión de RE y RP	75
7.3.1. <i>Especificidad de los anticuerpos usados para el estudio de REα y RP.</i>	75
7.3.2. <i>Expresión de REα y RP en los cuernos uterinos</i>	77
7.3.3. <i>Expresión de receptores en el cérvix</i>	84
7.3.3.1. <i>REα y RP en el ligamento interpúbico</i>	89
DISCUSIÓN	
8. Discusión	98
BIBLIOGRAFÍA	112

ABREVIATURAS UTILIZADAS

μg	Microgramo/s
μl	Microlitro/s
μm	Micrómetro/s
(m)/(n)M	(mili)/(nano)Molar
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AF	Función de activación/transactivación
ARNm	Ácido ribonucleico (mensajero)
CAPs	Proteínas activadoras de la contracción
cm	Centímetro/s
Cx	Conexina/s
D	Día
D.O.	Densidad óptica
dNTP	Desoxinucleótido trifosfato
DPP	Día/s posparto
E₂	Estradiol
EDTA	Ácido etilendiamino tetracético
Eg	Estrógeno/s
ERH	Elementos de respuesta hormonal
Es	Estro
g	Gramo/s
GAG	Glicosaminoglicanos
h/hs	Hora/s
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
hrRlx	Relaxina recombinante humana
IL	Interleuquina/s
IOD	Intensidad de densidad óptica

kDa	Kilo Daltons
kg	Kilogramo/s
LB	Medio Luria Bertani
ME	Microscopía electrónica
mg	Miligramo/s
min	Minuto/s
ml	Mililitro/s
mm	Milímetro/s
MMLV-RT	Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase
MMP	Metaloproteinasas
MO	Microscopio óptico
nm	Nanometro/s
NOS	Sintetasa de óxido nítrico
ON	Óxido nítrico
ONA	Onapristona
OT	Oxitocina
OTR	Receptores para Oxitocina
pb	Pares de bases
PBS	Buffer fosfato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Pg	Progesterona
PG	Prostaglandinas
pg	Picogramo/s
PKC	Proteína kinasa C
PM	Peso molecular
pmol	Picomol

PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PPI	Posparto inmediato
r	Coeficiente de correlación
RE	Receptor de estrógeno
RER	Retículo endoplásmico rugoso
REα	Receptor de estrógeno α
REβ	Receptor de estrógeno β
Rlx	Relaxina
RP	Receptor de progesterona
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Transcripción reversa
SDS	Duodecil sulfato de sodio
SEM	Error standard de la media
SUA	Segmento uterino alto
SUB	Segmento uterino bajo
TA	Temperatura ambiente
U	Unidades internacionales
VDCC	Canales iónicos voltaje-dependientes
vs	Versus
Vv	Densidad de volumen

LISTADO DE TABLAS

TABLA 1	Grupos experimentales y número de animales estudiados.	45
TABLA 2	Regiones tisulares evaluadas para la cuantificación de RE α y RP por inmunohistoquímica.	57
TABLA 3	Programa de ciclado de PCR	58
TABLA 4	Secuencia de los <i>primers</i> utilizados	63
TABLA 5	Protocolo de ciclado de PCR para r18S.	64
TABLA 6	Programa de ciclado de PCR para RE α	65
TABLA 7	Programa de ciclado de PCR para RE β	65
TABLA 8	Valores de Pg sérica en muestras puras (P), puras con extracción (P + E) y puras con extracción y desnaturalización (P + E + D) provenientes de hembras adultas no preñadas en estro (Es), D42 y D56 de la gestación.	67
TABLA 9	Valores de E ₂ sérico en muestras puras (P) y puras con extracción (P + E) provenientes de hembras adultas no preñadas en estro (Es), D42 y D56 de la gestación.	67

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1	Representación esquemática de los cuernos y cérvix uterinos en el cobayo (A) y fotomicrografía a bajo aumento del útero de cobayo (B).	3
FIGURA 2	Fotomicrografía de un corte transversal del útero de cobayo adulto no preñado.	4
FIGURA 3	Fotomicrografía del cérvix uterino de un cobayo adulto no preñado.	5
FIGURA 4	Fotomicrografías del endocérnix y exocérnix de cobayo adulto no preñado.	6
FIGURA 5	Fotomicrografía de la región subepitelial del cérvix (A) y del útero (B) de cobayo adulto no preñado.	7
FIGURA 6	Fotomicrografías del compartimiento glandular del cérvix uterino de cobayo adulto no preñado.	8
FIGURA 7	Fotomicrografía de las capas musculares interna y externa del útero del cobayo.	9
FIGURA 8	Registro de la actividad electromiográfica de la superficie abdominal humana durante la gestación y el trabajo de parto.	12
FIGURA 9	Esquema de un grupo de células miométricas interconectadas por canales de baja resistencia.	13
FIGURA 10	Esquema de los dominios presentes en la estructura proteica de los receptores para estrógeno descriptos: α y β .	32
FIGURA 11	Modelo propuesto para el parto en el humano, indicando la existencia de una fase condicionante para útero (miometrio), cérvix y membranas fetales.	39
FIGURA 12	Esquema de funcionamiento del analizador IMMULITE 2000.	50
FIGURA 13	Fotomicrografía a bajo aumento del útero de un cobayo.	57
FIGURA 14	Plásmido pBluescript SK-, Stratagene®.	60

FIGURA 15	Correlaciones entre la cantidad conocida de Pg (A) o E ₂ (B) agregada a sueros de machos preabsorbidos con carbón dextrán y los valores obtenidos experimentalmente.	68
FIGURA 16	Niveles séricos de Pg y E ₂ en hembras adultas no preñadas en estro, en hembras preñadas a lo largo de la gestación, en el posparto inmediato, y 1 día posparto.	70
FIGURA 17	Densidad de volumen (Vv) de neutrófilos (A) e intensidad de birrefringencia (B) en el subepitelio de cérvix uterino de hembras adultas no preñadas en estro, hembras preñadas, en el posparto inmediato, y durante el posparto.	72
FIGURA 18	Fotomicrografías de secciones de cérvices uterinos obtenidos inmediatamente después del parto (A,B) y en D21 de la gestación (C,D).	73
FIGURA 19	Densidad de volumen de neutrófilos (A) e intensidad de birrefringencia (B) en el subepitelio de los cuernos uterinos de hembras no preñadas en estro, en hembras preñadas a lo largo de la gestación, en el posparto inmediato, y durante el posparto.	74
FIGURA 20	Inmunomarcación de RE α (A) y RP (B) en útero de ratón y cobayo.	76
FIGURA 21	Expresión de RP (A) y RE α (B) en células del epitelio glandular de los cuernos uterinos durante la gestación, en el posparto inmediato y 24 hs posparto.	78
FIGURA 22	Expresión de RP y RE α en células del epitelio luminal, estroma subepitelial y estroma muscular de los cuernos uterinos durante la gestación, en el posparto inmediato y 24 hs posparto.	79
FIGURA 23	Fotomicrografías de secciones de cuernos uterinos de cobayos en D63 de la gestación inmunomarcadas para RP (A) y RE α (B).	80
FIGURA 24	Expresión de ARNm de RE α (A) y RE β (B) en el	81

segmento bajo de los cuernos uterinos en la gestación y en el posparto inmediato.

FIGURA 25	Análisis por RT-PCR competitiva de la expresión de ARNm de RE α en el segmento bajo de los cuernos uterinos.	82
FIGURA 26	Análisis por RT-PCR competitiva de la expresión de ARNm de RE β en el segmento bajo de los cuernos uterinos.	83
FIGURA 27	Expresión inmunohistoquímica de RP y RE α en el epitelio luminal, estroma subepitelial y estroma muscular del cérvix durante la gestación, el posparto inmediato y 24 hs posparto.	85
FIGURA 28	Fotomicrografías de secciones de cérvices uterinos de hembras de D63 de la gestación, inmunomarcadas para RP (A) y para RE α (B).	86
FIGURA 29	Expresión de ARNm de RE α en el cérvix durante la gestación y en el posparto inmediato.	86
FIGURA 30	Análisis por RT-PCR competitiva de la expresión de ARNm de RE α en el cuello uterino en la gestación y el posparto inmediato.	87
FIGURA 31	Análisis por RT-PCR competitiva de la expresión de ARNm de RE β en el cuello uterino de la gestación y del posparto inmediato.	88
FIGURA 32	Expresión inmunohistoquímica de RE α (A) y RP (B) en el estroma del ligamento interpúbico durante la gestación, en el posparto inmediato y 1 día posparto.	89
FIGURA 33	Fotomicrografías de secciones del ligamento interpúbico de cobayos en D56 (A) y D63 (B) de la gestación inmunomarcadas para el RP.	90
FIGURA 34	Expresión de RE α (A) y RE β (B) en el ligamento interpúbico durante la gestación y en el posparto inmediato.	91
FIGURA 35	Análisis por RT-PCR competitiva de la	92

expresión de ARNm de RE α en el ligamento interpúbico de la gestación y del posparto inmediato.

FIGURA 36	Análisis por RT-PCR competitiva de la expresión de ARNm de RE β en el ligamento interpúbico de la gestación y del posparto inmediato.	93
FIGURA 37	Análisis de correlación entre la intensidad de birrefringencia y expresión de RP (A) o RE α (B) en el subepitelio del cérvix uterino durante la gestación y el posparto inmediato.	95
FIGURA 38	Análisis de correlación entre la expresión de RP y RE α en el subepitelio del cérvix uterino durante la gestación y el posparto inmediato.	95
FIGURA 39	Análisis de correlación entre la intensidad de birrefringencia y la expresión de RP (A) o RE α (B) en el subepitelio de los cuernos uterinos durante la gestación y el posparto inmediato.	96
FIGURA 40	Análisis de correlación entre la expresión de RP y RE α en el subepitelio de los cuernos uterinos durante la gestación y el posparto inmediato.	97

Resumen

El parto está dividido en dos etapas o fases: una primera relativamente larga, fase preparatoria o condicionante, y una segunda corta y rápida, la fase activa. Para el momento en que comienza la fase activa, los órganos del canal de parto deben estar preparados: es necesario que el útero sea capaz de producir contracciones intensas y coordinadas y que el cérvix se dilate fácilmente ante la presión del feto. También es necesaria una extensa separación de los huesos pélvicos para permitir el pasaje de los fetos durante el parto. Por lo tanto, un parto exitoso requiere que la fase activa del mismo se inicie recién cuando los tejidos del útero, el cérvix y la sínfisis púbica ya estén preparados. Esta preparación tendría lugar durante la última etapa de la gestación.

Todas las hipótesis propuestas para explicar el inicio del parto se basan en el cambio de un medio ambiente endocrino dominado por la Pg a otro dominado por los Eg. En la mayoría de los mamíferos este cambio se realiza a través de modificaciones en los niveles circulantes de Pg y Eg maternos (disminución de Pg e incremento de Eg), causados por un cambio en la actividad metabólica placentaria (ovejas) o por la regresión del cuerpo lúteo (ratas, ratones, conejos, cabras y cerdos). Por el contrario, en cobayos, primates no humanos y mujeres, el cambio de medio ambiente hormonal del parto no está asociado con cambios significativos en los niveles séricos hormonales. Sin embargo, los niveles séricos no reflejan necesariamente la actividad local de las hormonas en los tejidos: la acción ejercida por las mismas a nivel tisular depende de varios factores (concentración de hormona libre, metabolismo local, etc). Actualmente, se considera que la acción de una hormona depende en gran parte de la existencia de receptores celulares y la maquinaria post-receptor a la cual el receptor está acoplado. Teniendo en cuenta estos aspectos del mecanismo de acción hormonal, para las especies que cursan el parto sin variaciones significativas en los niveles circulantes de Eg y Pg, se ha propuesto que la acción biológica que estas hormonas ejercen sobre el útero no estaría determinada por variaciones en sus niveles circulantes sino por cambios en la susceptibilidad del tejido. Los mecanismos que modifican la susceptibilidad de los tejidos a las hormonas circulantes provocando una variación en la acción biológica de la hormona por una vía diferente a los cambios en la concentración sérica hormonal, se han

denominado mecanismos funcionales. Uno de los principales mecanismos funcionales propuestos para explicar el inicio del trabajo de parto, sin que existan variaciones en la concentración sérica de Pg y Eg, es la modificación en la expresión tisular de sus receptores. Además, algunos autores postulan que la Pg promovería una regionalización funcional en el útero. En la zona alta del útero habría una caída en la acción biológica de la Pg (*functional progesterone withdrawal*) mientras que en la zona baja ocurriría un aumento de la misma o se mantendría sin variaciones. La caída funcional de Pg en el segmento uterino alto (SUA) permitiría el estímulo de los Eg sobre la expresión de los genes de proteínas asociadas a la contracción (*functional estrogen activation*), aumentando la actividad contráctil en esta zona, mientras que el segmento bajo seguiría bajo el bloqueo de la Pg manteniéndose en estado de relajación.

La hipótesis que orientó el presente trabajo supone que los órganos de todo el canal de parto se preparan sincronizadamente durante la última parte de la gestación a través de mecanismos funcionales que modifican la susceptibilidad de sus tejidos a los niveles circulantes de Pg y Eg. El uso del cobayo, que es un modelo animal con una endocrinología de la preñez y del parto similares a la de la mujer, nos permitió investigar si en los tejidos de los órganos del parto se producen modificaciones en la expresión tisular de los receptores durante la última etapa de la gestación presentando un patrón de regionalización determinado. Además, investigamos una posible asociación entre la remodelación del colágeno, como principal proceso fisiológico de adaptación del cuello uterino durante la etapa preparatoria del parto, y la expresión de RE y RP, como mecanismo funcional responsable de modificar la susceptibilidad del tejido a los niveles circulantes de Pg y Eg.

Para este trabajo se sacrificaron cobayos machos y hembras no preñadas y cobayos hembras en distintos estadios de la gestación y posparto. Las hembras no preñadas fueron sacrificadas en el estro. De cada animal se obtuvo suero y se disecó el cérvix, los cuernos uterinos, y el ligamento interpúbico. Las muestras, destinadas para histología, fueron procesadas hasta su inclusión en tacos de parafina siguiendo técnicas histológicas de rutina (Junqueira y col., 1979). Una

porción del cérvix, de los cuernos uterinos y del ligamento interpúbico fue obtenida en condiciones de esterilidad, pesada, congelada inmediatamente en nitrógeno líquido y conservada a -80°C para su posterior procesamiento para extracción de ARN o de proteínas. Las determinaciones de E_2 y Pg se realizaron en sueros de hembras en estro (Es), preñadas (D42, D56 y D63 de gestación), posparto inmediato (PPI) y posparto temprano (1DPP). Las determinaciones se realizaron mediante un análisis enzimoinmunométrico quimioluminiscente secuencial en fase sólida, utilizando un analizador IMMULITE 2000. Como esta es la primera vez que este sistema diagnóstico es usado en muestras de cobayos, previamente se realizó la validación del método. Los perfiles séricos obtenidos nos permitieron confirmar que, en el cobayo, el parto se lleva a cabo sin cambios significativos en la circulación periférica de los niveles de E_2 y Pg.

Los niveles de colágeno organizado fueron evaluados cuantitativamente mediante la medición de la intensidad de birrefringencia, por el método de Picrosirius-polarización. Para ello, los cortes histológicos fueron teñidos con Picrosirius (solución saturada de Sirius rojo al 0,1% en ácido pícrico). También se caracterizó la infiltración de polimorfonucleares neutrófilos mediante la tinción de Giemsa prolongado, adaptada para cortes en parafina. Analizando los resultados de la cinética de la infiltración de neutrófilos en asociación con la remodelación del colágeno, observamos que ambos procesos biológicos están relacionados temporalmente en el cérvix pero no en el útero. Los resultados de esta tesis demuestran que los momentos de máxima remodelación del colágeno en el cuello uterino coinciden con la mayor infiltración de polimorfonucleares neutrófilos al tejido, mientras que en el útero ambos procesos están temporalmente disociados: en el momento en que los neutrófilos invaden el útero las fibras de colágeno ya han completado los mayores cambios en sus niveles de organización. La infiltración de neutrófilos y la remodelación del colágeno en el útero del cobayo en el momento del parto serían fenómenos independientes.

La expresión de receptores para hormonas esteroideas fue evaluada por inmunohistoquímica ($\text{RE}\alpha$ y RP) y por RT-PCR competitiva ($\text{RE}\alpha$ y $\text{RE}\beta$), en el segmento uterino bajo (SUB), el cérvix y la sínfisis púbica. En el útero y el cérvix,

el estudio de la expresión de RP y RE α por inmunohistoquímica se realizó en las células del epitelio luminal, el subepitelio y la región muscular, desde el D42 de la gestación hasta 1 día posparto (D42, D56, D63, PPI y 1DPP). En el útero también fue evaluada la expresión de RE α y RP en las células del epitelio glandular. La expresión de RE α y RP se hizo por inmunohistoquímica, usando anticuerpos primarios generados para su uso en biopsias de otras especies. Previamente, se confirmó su especificidad contra RP y RE α de cobayos por medio de la técnica de *Western-blot*. Luego, se realizaron las inmunomarcaciones en cortes de 5 μ m de espesor con el método avidina-biotina peroxidasa, siguiendo protocolos previamente descritos por nuestro grupo. La expresión del ARNm de RE α y RE β fue evaluada por transcripción reversa (RT) seguida de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) competitiva (RT-PCR competitiva). En este trabajo de tesis se usaron competidores del tipo heterólogo, para lo que se utilizó una técnica desarrollada en nuestro laboratorio (Ramos y col., manuscrito en preparación). Para ello, se realiza una PCR con oligonucleótidos específicos para RE α o RE β del cobayo, utilizando como molde el ADN genómico del fago lambda (λ) que no posee la secuencia de genes que queremos estudiar. Para lograr productos de amplificación usamos un protocolo de ciclado con muy baja temperatura de *annealing* en los ciclos iniciales, forzando de esta manera la obtención de fragmentos de ADN cuyos extremos 5' y 3' poseen las secuencias de los oligonucleótidos utilizados como cebadores (*primers*). Posteriormente, se procedió a la inserción del fragmento de ADN seleccionado como competidor en un plásmido pBluescript (pSK-) (Stratagene, USA). La cepa bacteriana utilizada fue *E.coli* DH5 α (Invitrogen™) y como vector de transformación se usó el plásmido pBluescript SK- (Stratagene®). Se estableció el rango de diluciones del fragmento de ADN competidor para cada RE. Para ajustar y corregir la variabilidad en la carga inicial de ADN entre muestras, se hicieron reacciones en cadena de la polimerasa para la ARN ribosomal de la subunidad 18S (r18S) como normalizador interno. La expresión de ARNm de RE α y RE β fue cuantificada en muestras de segmento uterino bajo, cérvix y ligamento interpúbico de cobayos hembras de D42 y D60 de la gestación y PPI.

Los resultados de la inmunohistoquímica demuestran que el parto transcurre con altos niveles de expresión de RP en la región muscular de la zona baja del útero. Este resultado sugiere que no habría una caída en la acción biológica de la Pg en el SUB mediada por un menor número de RP. Esto apoyaría el concepto de regionalización propuesto para el útero, según el cual el SUB se mantendría en estado de relajación por una persistente acción de la Pg que inhibiría el estímulo de los Eg sobre la expresión de los genes de las proteínas activadoras de la contracción en esta zona del útero. Otra posible explicación para la alta expresión de RP en el SUB durante el parto es que ocurra una caída en la acción biológica de la Pg sobre el miometrio uterino de esta zona por un mecanismo diferente. Los resultados obtenidos en esta tesis en los *Western blot* del RP de úteros de cobayo, demuestran que hay cuatro isoformas de RP, similares a las descritas en mujeres. Este hallazgo nos permite sugerir que en el cobayo, al igual que en la mujer, el mecanismo funcional que provocaría una disminución en la acción de la Pg sobre las células musculares uterinas podría consistir en un cambio en la relación RP-A/RP-B. Teniendo en cuenta esta última posibilidad, y con los resultados obtenidos en la expresión de RP en la zona baja del útero (SUB), no podemos concluir si existe o no una disminución funcional de la acción de la Pg en esta región del útero. Por otro lado, ha sido descrito que el RE β presenta una potente acción inhibidora sobre el estímulo de la actividad transcripcional promovida a través del RE α en células que coexpresan ambos receptores. Esta propiedad fundamenta el hecho de que los cambios en la expresión de RE α y de RE β puedan ser tomados como un mecanismo funcional que modifique la acción biológica de los Eg circulantes sobre las células del SUB (activación funcional a Eg). El uso de la metodología de RT-PCR competitiva nos permitió cuantificar con precisión la expresión de los ARNm del RE α y RE β . Observamos que, a medida que progresa la gestación y se acerca el parto, los ARNm de RE α y RE β aumentan de forma paralela en el SUB. Este incremento simultáneo y paralelo estaría indicando que el estímulo promovido por los Eg a través de RE α podría estar bloqueado por la alta expresión de RE β en esta zona baja del útero (SUB). La confirmación de esta hipótesis requiere, entre otros, estudios que evalúen la co-localización celular de ambos RE. La alta expresión de RP y del ARNm de RE β en la porción baja del útero durante el parto sugeriría que esta región no se

transformaría en un tejido con capacidad para generar contracciones intensas y coordinadas ante los altos niveles circulantes de agentes estimulantes como la OT y las PGs.

En cuanto al cérvix observamos que, a medida que nos acercamos al parto, las células del estroma subepitelial disminuyen su expresión de RP mientras que mantienen una alta expresión de RE α . A los resultados obtenidos por inmunohistoquímica, se suman los de la expresión del ARNm de RE α y RE β cuantificado por RT-PCR competitiva. En el período evaluado, el ARNm del RE β no se expresó en el tejido cervical mientras que sí lo hizo el ARNm de RE α . Estos resultados en su conjunto, significan que, durante la etapa preparatoria del parto, y de manera localizada en el estroma subepitelial del cuello uterino, se produce un cambio del estímulo endocrino con predominio de acción de la Pg a otro donde prevalecen las distintas acciones biológicas promovidas por los Eg. También analizamos si la remodelación del colágeno descrita tenía una asociación temporal con las variaciones halladas para la expresión de RE y RP en esta región tisular. El resultado de los análisis de correlación demostró que la remodelación del colágeno del cérvix durante la última etapa de la gestación está asociada temporalmente tanto con la caída en la expresión de RP como con la alta expresión del RE α . En conjunto, los resultados descriptos para el cérvix sugieren que el proceso de ablandamiento que este órgano realiza como preparación para el momento del trabajo de parto, es desencadenado por cambios regionales en la expresión de RE y RP que sensibilizan al estroma cervical para responder a los altos niveles de Eg en circulación. Trabajos en realización en nuestro laboratorio aportarán más evidencias para confirmar esta hipótesis.

Por último, pudimos observar que la progresiva relajación de la sínfisis púbica está relacionada con una disminución en la expresión de RP en el estroma del ligamento interpúbico. Junto con esta caída de RP en el estroma del ligamento, hay un aumento del ARNm de RE α y una disminución en el de RE β . De manera similar a lo demostrado en el cérvix, la relajación del ligamento interpúbico durante la etapa preparatoria del parto también estaría asociada a un cambio

funcional del microambiente endocrino que inhibiría el efecto biológico de la Pg mientras que se favorecería una mayor acción biológica de los Eg.

A modo de resumen, los resultados presentados en esta tesis aportan evidencias originales que apoyan aspectos importantes del modelo de parto propuesto para mujeres y cobayos. Fundamentalmente, nuestros resultados demuestran que la acción biológica ejercida por la Pg y los Eg varía entre los tejidos de los distintos órganos involucrados en el parto (útero, cérvix y sínfisis), mediante una expresión diferencial de sus receptores. Esta expresión diferencial de RE y RP ocurre en la última etapa de la gestación, en función de las adaptaciones que cada órgano del canal de parto realiza durante la etapa preparatoria del mismo. Por último, pensamos que los resultados aportados en el desarrollo de esta tesis realzan la validez del cobayo como modelo animal para el desarrollo de estudios de endocrinología de la gestación y regulación del inicio del parto, y como modelo para la experimentación de drogas diseñadas para evitar un parto prematuro.

Abstract

Parturition is composed of two major steps: a relatively long conditioning (preparatory) phase, followed by a short secondary phase (active labour). At the beginning of the active phase, the uterus needs to become an active contracting organ while the cervix should be capable of dilatation. Comparatively little attention has been paid to modifications of the pelvic girdle that occurs in many species to enable safe delivery. In addition, there is an adaptation of the pelvic joint cartilage, transforming itself into an elastic interpubic ligament, allowing considerable separation of the pubic bones. The timely birth of a developmentally mature fetus appropriate for the species requires that some mechanisms synchronize both conditioning and active phase.

Parturition is induced by any intervention that prevents progesterone (Pg) synthesis or action. In contrast, estrogens (Eg) stimulate parturition by increasing the expression of genes that encode factors that augment myometrial contractility and excitability. In most species parturition is associated with increased Eg levels. Thus, the process of parturition and particularly the transformation of the myometrium from a quiescent to a contractile state require Pg withdrawal and Eg activation. In different species, one of three distinct mechanisms of Pg withdrawal and Eg activation occurs. In one of the cases, many species including rats, mice, rabbits, goats and pigs, the corpus luteum is the main source of Pg until term, when its regression, luteolysis, directly causes Pg withdrawal and labour onset follows. In other case, in sheep, an increase in fetal cortisol induces the activity of the enzyme 17α -hydroxylase which turns Pg into Eg. Therefore, there is an increase in Eg and a decrease in Pg. The third mechanism is observed in guinea-pigs, non-human primates and humans. In these species the strategy for Pg withdrawal and Eg activation is not readily apparent, because maternal Pg and Eg levels are high for most of pregnancy and remain elevated during labour and delivery. In these species, “functional Pg withdrawal” and “functional Eg activation” could be facilitated through changes in the responsiveness of the tissues to Pg and Eg via different mechanisms such as changes in receptor expression profiles or receptor accessory proteins (e.g., heat shock proteins and/or receptor co-regulators), or a local production of an antiprogestin or an estrogen agonist. Moreover, it has been hypothesized for women that sustained circulating

concentrations of Pg are indeed required in order to reach a functional regionalization of myometrium at term. A functional withdrawal of Pg in the upper uterine segment (UUS) might induce activation, whereas enhanced Pg signalling in the lower uterine segment (LUS) promotes relaxation. This regional distribution would facilitate descent of the fetus by propagation of contractions from fundus to cervix.

Based on previous studies, it appeared expedient to investigate whether high levels of Pg and Eg at term are associated with regional changes in progesterone receptor (PR) and estrogen receptor (ER) levels in uterus, cervix and pubic symphysis, potentially capable of mediating changes in the responsiveness of the cervical or symphyseal stroma and myometrium. However, time-course studies of spatial changes cannot be performed in humans. Thus, this task was undertaken by choosing an animal model which resembles human conditions (guinea-pig), to establish the profile of ER and PR in uterus, cervix and pubic symphysis. In addition, collagen remodelling and leukocyte infiltration were studied (as a measurement of physiological changes) in uterus and cervix during pregnancy, parturition and postpartum.

Samples of blood, uterine horns, cervical and interpubic tissues were obtained from: a) nonpregnant females at estrus (Es), b) along pregnancy at day (D) 21, D28, D34, D42, D49, D56, D63; c) immediately after parturition (iAP); and d) at D1, D3, D5, D7, D10, D15, D30 of postpartum. Nonpregnant animals served as controls. Samples were dehydrated in a series of ethanol solutions and embedded in paraffin. A portion of the cervix, uterine horns and interpubic ligament was obtained in sterile conditions, weighted, flash frozen in liquid nitrogen and kept at -80 °C until its further processing for RNA or protein extraction. Pg and estradiol (E₂) were measured in serum samples from Es, D42, D56, iAP and D1PP. Pg and E₂ were measured directly in guinea-pig serum by a sequential immunometric assay using kits (IMMULITE Progesterone and IMMULITE Estradiol) for in vitro diagnostics. Accuracy, recovery, intra-assay variance and inter-assay variance of the method were calculated. Patterns of Pg and E₂ serum levels showed that no significant changes in E₂ and Pg were observed during parturition.

Collagen remodelling was evaluated by measuring the intensity of birefringence with the picrosirius-polarization method. In order to identify the infiltrating neutrophils, sections were stained in Giemsa stain. According to our results, neutrophil infiltration is associated with collagen remodelling in cervix, but not in uterus. These results mean that highest collagen remodelling coincides with the maximum value of neutrophil infiltration into the cervix, whereas in the uterus both processes are not related. Thus, neutrophil infiltration and collagen remodelling on guinea-pig uterus at birth might be independent events.

The expression of steroid receptors was evaluated by immunohistochemistry (ER α and PR) and by competitive RT-PCR (ER α and ER β), in the LUS, cervix and pubic symphysis. The immunohistochemical detection of ER α and PR was performed in samples obtained from animals from mid-pregnancy to early pospartum. In uterus and cervix, the quantification was carried out in three different tissue compartments: luminal epithelium, subepithelium and muscular region. Furthermore, the expression of ER α and PR in uterus was also evaluated in the glandular epithelium. The antibodies used in immunohistochemistry were generated in other species. Previously, specificity was confirmed by Western blot. Then, assays were made by avidin-biotin peroxidase method, following protocols previously described by our laboratory. The ER α and ER β - RNAm expression was assessed by competitive RT-PCR. In this thesis, competitors of the heterologous type were used. A PCR is performed with specific primers for ER α or ER β , using the genomic DNA of lambda phage as template, which does not have the sequence of interest. We use inicial cycles with low annealing temperature, allowing this way the obtention of DNA fragments which 5' and 3' ends show same sequences as the primers (competitors). For obtention of the clones, we used *E.coli* DH5 α (Invitrogen™) and pBluescript SK⁻ plasmid (Stratagene®). Dilution rank was established for each ER competitor. As housekeeping, RT-PCR for 18S subunit of the ribosomal RNA was used. ER α and ER β -RNAm expression was quantified in samples of LUS, cervix and interpubic ligament of pregnant female guinea pigs at D42 and D60 of gestation and iAP.

Immunohistochemistry shows that birth is carry out with high PR expression in the muscular region of LUS. This result suggests that there would not be a functional Pg withdrawal in LUS through a lower number of PR. This would support the regionalization concept proposed for uterus, according to which the LUS would be kept relaxed by a persistent Pg action that might inhibited Eg stimulus on gene expresión of contraction activating proteins (CAPs). An alternative explanation for high myometrial PR expression at parturition would be the existence of a different mechanism of functional Pg withdrawal in the LUS. In this study, we have found that guinea-pig uterus has similar PR isoforms as described for women. Thus, the possibility that myometrial Pg responsiveness is related to changes in expression of PR-A relative to PR-B might also be considered as a probable mechanism of myometrial functional Pg withdrawal in guinea pigs. Overall, we can not conclude whether a functional Pg withdrawal in the LUS occurs or not. On the other hand, it has been described that ER β inhibits the transcriptional activity of ER α in cells expressing both receptors. Based on these results, changes in the expression of ER α and ER β have been considered as a mechanism of estrogen activation. Competitive RT-PCR methodology allowed us a precise quantification of RNAm expression of ER α and ER β . In late gestation and birth, both ER α and ER β -RNAm expression show an increase in the LUS. This suggests that Eg action through ER α could be blocked by high expression of ER β in LUS. To confirm this hypothesis, studies evaluating co-localization of both ER are needed. The high expression of PR and ER β RNAm in LUS at parturition is suggesting that this region is not capable of generating strong and sincronized contractions.

Regarding cervix, we found a decrease while a high expression of ER α is observed in subepithelium in late gestation. In addition, in the mentioned period only the RNAm of the RE α express in cervix. We also analyzed if there exists a temporal association between collagen remodelling and changes in the ER and PR expression in cervical tissue. Correlation analysis showed that in late gestation, collagen remodelling is temporally associated with PR expression withdrawal as well as with RE α high expression. Altogether, our results suggest that cervical softening is originated by regional changes in ER and PR expression.

This changes increase the cervical responsiveness to high levels of circulating Eg. This hypothesis will be further supported by ongoing experiments.

In addition, we demonstrate that gradual relaxation of the pubic symphysis is associated with a diminishing PR expression in stroma. Along with the fall in PR protein levels in symphyseal stroma, there is an increase in ER α -RNAm and a diminution in ER β -RNAm expression. Alike the cervix, relaxation of interpubic ligament at conditioning phase would also be associated to a functional change of endocrine environment: the biological action of Pg is inhibited whereas a higher Eg action is favoured.

Finally, results presented in this work provide evidence supporting important features for parturition model proposed for women and guinea-pigs. Mainly, our results show that the biological action of Pg and Eg varies among tissues of the different organs involved in parturition (uterus, cervix and symphysis), through differential expression of their receptors. This differential expression of ER and PR occurs in late gestation, related to adaptative changes performed by each organ of the birth canal. We are persuaded that results achieved through this thesis outstand the validity of the guinea pig as an animal model for studies about gestation and parturition onset, in an attempt to avoid premature parturition.

Introducción

1. Introducción

1.1 Factores maternos y fetales del parto

El parto representa el término de la vida intrauterina del feto. Es un proceso activo por el que el feto es expulsado del interior de la cavidad uterina al medio ambiente extrauterino, siendo el resultado de una compleja interrelación entre factores maternos y fetales. El mismo requiere que el útero, que ha permanecido en un relativo estado de inactividad (quiescencia uterina) durante toda la gestación, produzca contracciones intensas y coordinadas, al mismo tiempo que el cérvix se debe dilatar de tal manera de permitir el paso del feto por el canal de parto con el menor traumatismo posible (Challis y Lye, 1994; Hafez y Hafez, 2000; Muñoz-de-Toro y col., 2003). Por otra parte, además de una adecuada contracción uterina y dilatación del cérvix, es necesaria la adaptación de la cavidad pelviana para que el parto sea normal. En la articulación interpúbica ocurre una extensa separación de los huesos pélvicos para permitir el pasaje de los fetos durante el parto (Sherwood, 1994). Por último, los órganos del feto deben estar lo suficientemente maduros para adaptarse a la vida extrauterina. Por todo lo mencionado, un parto exitoso es el resultado de una compleja interrelación entre factores maternos y fetales, siendo necesaria una precisa sincronización entre los procesos que controlan el desarrollo del feto y los estímulos que desencadenan el trabajo de parto (Challis y Lye, 1994).

Uno de los principales problemas de la perinatología son los partos prematuros o pre-término, aquellos que ocurren antes de la semana 37 de la gestación, los que implican una desincronización entre los eventos mencionados en el párrafo anterior (Challis y col., 2000). Los partos pre-término ocurren en el 7-10 % de todos los embarazos y representan el 85% de las causas de complicaciones y muerte perinatales. El principal inconveniente asociado a los partos prematuros es la falta de un tratamiento efectivo que permita un adecuado manejo clínico del inicio del parto (Norwitz y col., 1999).

Una de las razones de esta falencia es que, a pesar de ser un área de intensa investigación, aún hoy no se conocen en su totalidad los eventos y las señales que controlan el inicio del parto. Este nivel de incertidumbre no es sorprendente si

se tienen en cuenta las restricciones existentes para la realización de estudios invasivos en mujeres embarazadas (Nathanielsz y Smith, 1999). Es a la luz de estas limitaciones que los modelos animales adquieren una gran importancia, ya que han representado una considerable fuente de información sobre los mecanismos potenciales que regulan el parto en la mujer. Uno de estos modelos, el cobayo, es considerado desde hace mucho tiempo un modelo animal similar al humano en lo referente a la fisiología del parto (Trewin y Hutz, 1999).

Los órganos involucrados en el desarrollo de la gestación y el parto, pueden clasificarse como pertenecientes a un “canal duro” de parto, constituido por los componentes óseos de la cavidad pelviana y sus articulaciones, o a un “canal blando”, formado por el útero, el cérvix y la vagina. Para comprender en detalle las adaptaciones fisiológicas que se producen durante la gestación, el parto y posparto en los órganos y tejidos involucrados, consideramos necesario revisar previamente la anatomía e histología de cada uno de ellos.

2. Anatomía e histología

2.1.1. Canal blando de parto

El aparato reproductor de la hembra está formado por los ovarios y el sistema conductor o tubular (Nalbandov, 1969). El útero forma parte de éste último, siendo un órgano de origen completamente mesodérmico. En los individuos adultos algunos autores lo dividen en una parte gestacional o **útero**, y el cuello uterino o **cérvix** (Bartol, 1999).

El útero se sujeta a las paredes pélvica y abdominal por el mesometrio, a través del cual recibe irrigación sanguínea, linfática e inervación nerviosa (Nalbandov, 1969; Bartol, 1999). El cobayo presenta un útero doble, dividido en dos cuernos uterinos largos (40-45 mm de longitud) y separados por un *septum* cervical; no posee cuerpo uterino. Dicho *septum* divide al cérvix en dos compartimientos que se comunican en sentido craneal con el cuerno uterino correspondiente, mientras que en sentido caudal ambos canales cervicales desembocan en la vagina fusionados en un único orificio (Figura 1A) (Nalbandov, 1969; Bartol, 1999). De esta manera, el cérvix del cobayo presenta dos orificios craneales y un único

orificio caudal. La porción caudal del cérvix, que penetra en el espacio vaginal, se denomina ectocérvis o exocérvis mientras que la porción craneal recibe el nombre de endocérvis (Hafez, 1970) (Figura 1B).

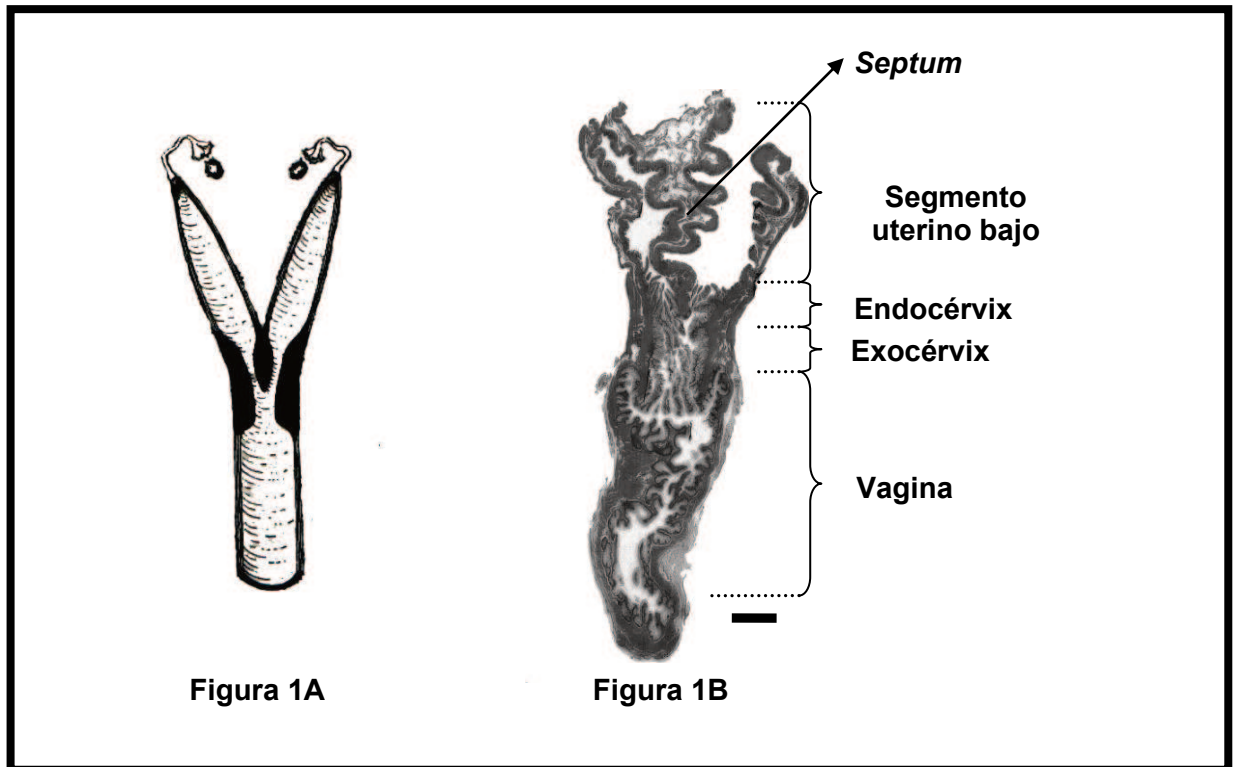


Figura 1A: Representación esquemática de los cuernos y cérvix uterinos en el cobayo. Nótese el cérvix dividido por un *septum*, donde cada canal cervical se comunica en forma independiente con su correspondiente cuerno uterino. *Modificado de: Nalbandov, A.V. (1969) La estructura de los sistemas reproductores. En: Fisiología de la Reproducción. Ed. Nalbandov, A.V., Acribia-Zaragoza, España.*

Figura 1B: Fotomicrografía a bajo aumento del útero de cobayo. Se observa claramente el *septum* (dividiendo al cérvix en dos canales independientes), el endocérvis, el exocérvis y la vagina. Barra = 5 mm. *Tomado de Rodríguez y col, sin publicar.*

En todo el órgano, tanto en el útero como en el cérvix, se distinguen dos zonas: el epitelio de revestimiento o epitelio luminal y la pared del órgano (Figura 2) (Nalbandov, 1969; Ross, 1992; Geneser, 2000).

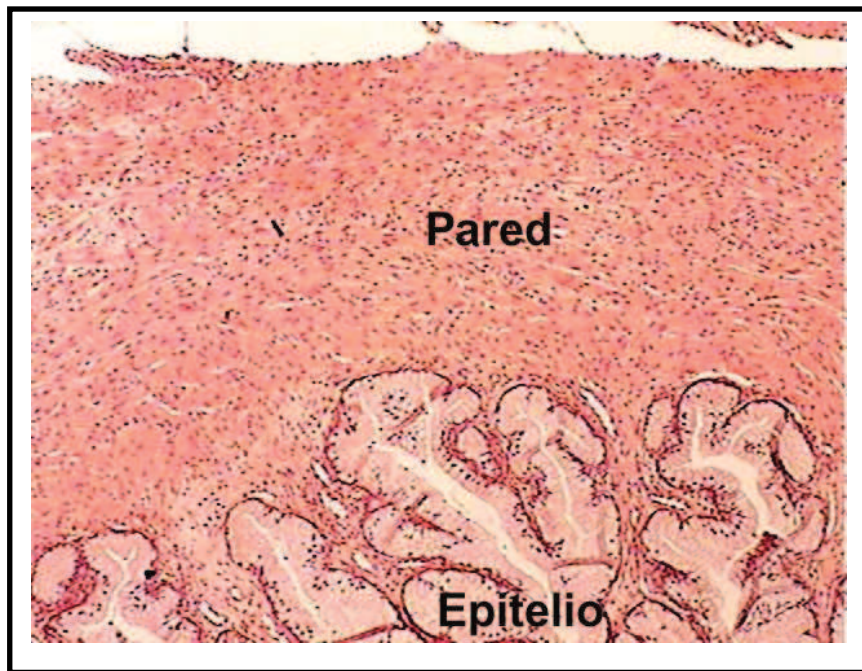


Figura 2: Fotomicrografía de un corte transversal del útero de cobayo adulto no preñado. Se observan las dos zonas que componen el órgano: el epitelio de revestimiento y la pared del órgano. Coloración: picrosirius - hematoxilina. Magnificación X40. *Tomado de Rodríguez y col, sin publicar.*

Epitelio de revestimiento o epitelio luminal. Es un tejido compuesto por células adyacentes, sin sustancia intercelular, que delimita la luz del órgano de la pared del mismo. El epitelio luminal crece sobre un tejido conectivo subyacente rico en vasos, del que lo separa una capa extracelular de sostén: la membrana basal (Geneser, 2000). En el cobayo, el epitelio de revestimiento del útero está formado por una sola capa de células que varían de cúbicas a cilíndricas según el estadio del ciclo estral. La mucosa del cuello uterino forma pliegues, los *plicae palmatae* (lat. *palma palmera*), que se abren en distintas direcciones y están separados por surcos que se extienden hacia la parte profunda de la mucosa (Figura 3) (Geneser, 2000). Tanto la mucosa del cérvix de la mujer como la del cobayo presentan estas estructuras, dando una imagen característica al microscopio óptico (MO) en la que se observan numerosos pliegues longitudinales que ocupan la totalidad de la luz del canal cervical que semejan un sistema de túbulos y hendiduras como el de las glándulas tubulares (Hegele-Hartung y col., 1989).

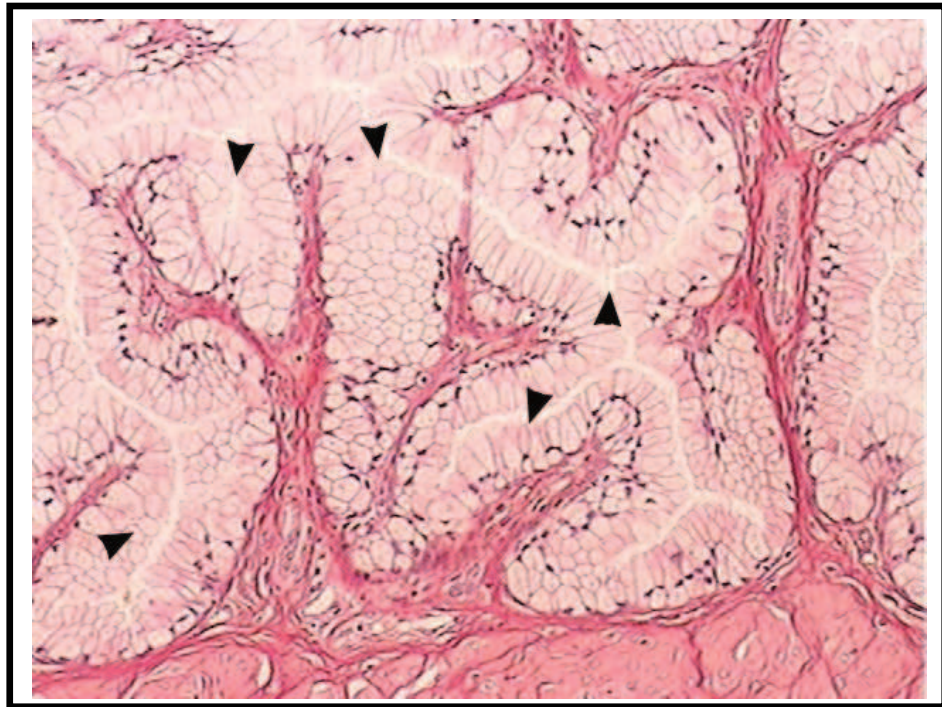


Figura 3: Fotomicrografía del cérvix uterino de un cobayo adulto no preñado. Se observan los *plicae palmatae* (puntas de flecha). Coloración: picosirius - hematoxilina. Magnificación X100 (B). *Tomado de Rodríguez y col, sin publicar.*

Este compartimiento tisular presenta cambios graduales a medida que se asciende por el cérvix en sentido caudal-craneal; de tal manera que se transforma en un epitelio cilíndrico simple en la transición hacia los cuernos uterinos (Figura 4A) mientras que se confunde con el epitelio estratificado de la vagina en el exocervix (Figura 4B). Estas diferencias son más o menos marcadas de acuerdo al estadio del ciclo estral, acentuándose durante el estro y tornándose menos notorias durante el diestro (El-Banna y Hafez, 1972; Jurow y Arbor, 1943).

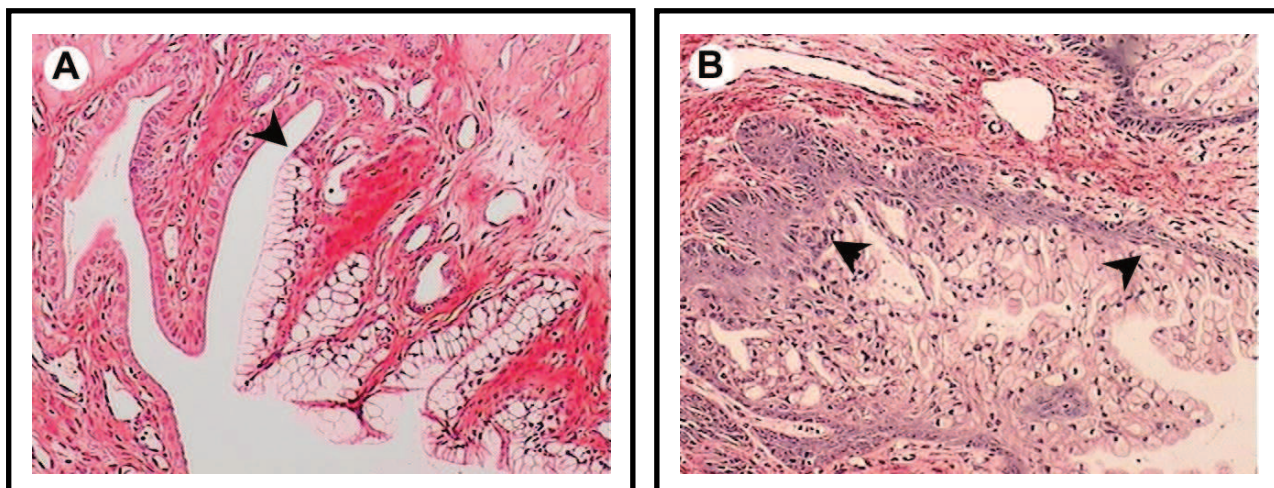


Figura 4: Fotomicrografías del endocérnix y exocérnix de cobayo adulto no preñado. Se observa la zona de transición entre los epitelios del endocérnix y del segmento uterino bajo (A), y entre el exocérnix y la vagina (B). Coloración: picosirius – hematoxilina. Magnificación X100. *Tomado de Rodríguez y col, sin publicar.*

La **pared del canal blando** está compuesta por varias regiones:

La región subepitelial. También definida como lámina propia del órgano, es la región de tejido conectivo laxo subyacente al epitelio luminal y la membrana basal (Figura 5). Esta zona consta de células y fibras extracelulares incluidas en una matriz de sustancia fundamental. En cuanto al componente celular, los tipos celulares que lo forman se clasifican en *células fijas* y *células migrantes*. Las células fijas (o componentes permanentes de la estructura del órgano) son principalmente de un único tipo, los fibroblastos. Las células migrantes más frecuentes son mastocitos, monocitos, linfocitos, granulocitos eosinófilos y neutrófilos (Ross, 1992; Luque y Montes, 1989; Luque y col., 1996; Luque y col., 1998; Muñoz-de-Toro y col., 2003). La cantidad de estas células migrantes es variable dado que, en su mayoría, invaden desde el torrente sanguíneo en diferentes cantidades para intervenir en ciertos tipos de reacciones (Leppert, 1998; Muñoz-de-Toro y col., 2003). En cuanto al componente extracelular, las fibras de colágeno son las principales y más abundantes, con un predominio del tipo I y III (Montes y Junqueira, 1988). También el sistema elástico forma parte de la estructura fibrilar del cérnix (Battlehner y col., 2003). La sustancia fundamental, que rodea a las células y al sistema de fibras, está compuesta por

glicosaminoglicanos (GAG) y proteoglicanos que forman geles muy hidratados donde quedan incluidos los demás componentes (Ross, 1992; Ludmir y Sehdev, 2000).

En el cobayo, la mayor cantidad de fibras de tejido conectivo se encuentran dentro de la lámina propia, mientras que una pequeña proporción de estas fibras se ubica entre las dos capas musculares que forman la región muscular. De forma característica, el tejido conectivo está compuesto principalmente por gruesos y compactos haces de fibras de colágeno, embebidos en una escasa cantidad de sustancia amorfa. Al MO se observan células mononucleares con gránulos de tamaño homogéneo y un núcleo dentado, localizadas en gran número en la cercanía de los vasos sanguíneos y de células de músculo liso. Por medio de microscopía electrónica (ME) se identificaron estas células como mastocitos, con gránulos citoplasmáticos electrodensos y de tamaño uniforme (Chwalisz y col., 1997). Los fibroblastos son el tipo celular más abundante, observándose escasos leucocitos. A la ME los fibroblastos muestran un núcleo alargado y escaso citoplasma, ocupado principalmente por retículo endoplasmático rugoso (RER) y estructuras del aparato de Golgi (Hegele-Hartung y col., 1989).

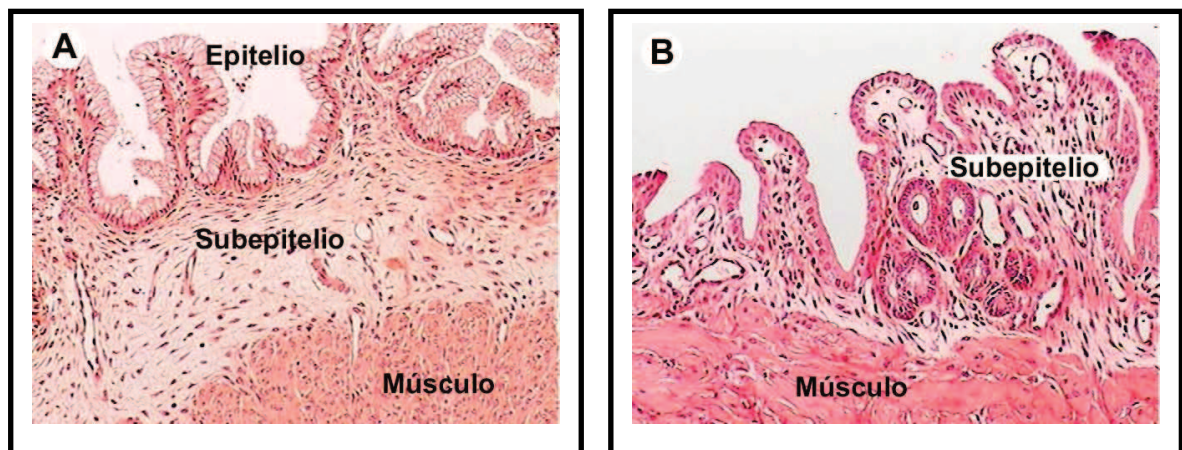


Figura 5: Fotomicrografía de la región subepitelial del cérvix (A) y del útero (B) de cobayo adulto no preñado. Coloración: picosirius – hematoxilina. Magnificación X100. *Tomado de Rodríguez y col, sin publicar.*

La región glandular: Dentro de la región subepitelial se encuentra un gran número de glándulas de tipo simple, revestidas por un epitelio que varía de cúbico

a cilíndrico de acuerdo al estímulo hormonal (Jurow y Arbor, 1943; El-Banna y Hafez, 1972). El cobayo, así como la mayoría de los roedores, presenta una marcada asimetría tanto en el grosor de la región subepitelial como en la distribución de las glándulas a lo largo de todo el órgano. Mientras que en el exocérvis prácticamente no se observan glándulas, en el endocérvis y en el útero, se observa una alta densidad glandular (Figura 6) (Jurow y Arbor, 1943; Bartol, 1999).

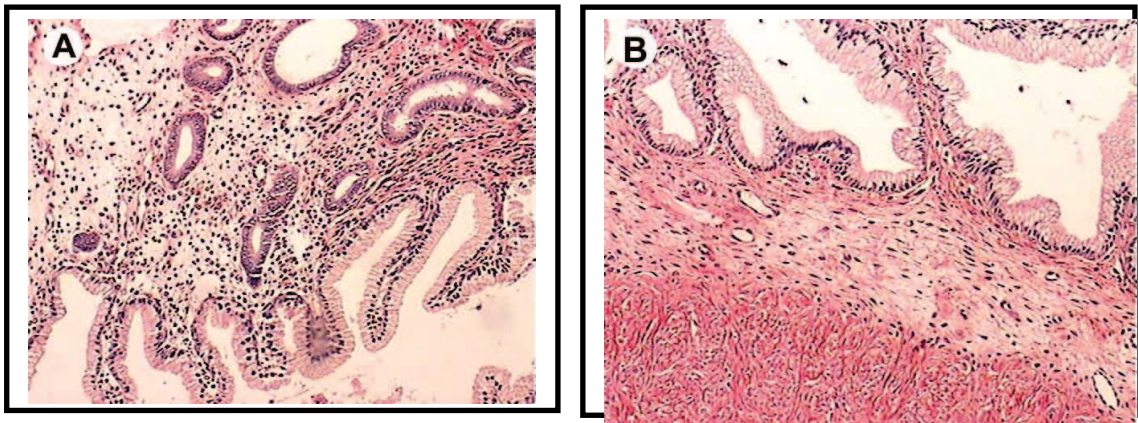


Figura 6: Fotomicrografías del compartimiento glandular del cérvix uterino de cobayo adulto no preñado. Nótese la mayor densidad glandular del endocérvis (A) en comparación con la del exocérvis (B). Coloración: picosirius – hematoxilina. Magnificación X100 (A) y X200 (B). *Tomado de Rodríguez y col., sin publicar.*

La región muscular: Las fibras musculares lisas son células de forma alargada y ahusadas, es decir con extremos afinados. En general aparecen agrupadas en capas donde es difícil determinar los límites de las células individuales con el MO. Las células están densamente empaquetadas por lo que la porción media más ancha de una célula limita con los extremos afinados de las células adyacentes (Geneser, 2000). Las capas o haces de fibras musculares lisas se mantienen unidas por medio de tejido conectivo y una delgada red de fibras de colágeno tipo III rodea cada célula muscular. En el útero y el cérvix del cobayo las células de músculo liso aparecen formando fibras musculares que se disponen en una capa circular interna y una capa longitudinal externa (Figura 7). A la ME las células

musculares lisas muestran abundantes microfilamentos intracitoplasmáticos y vesículas micropinocíticas características (Hegele-Hartung y col., 1989).

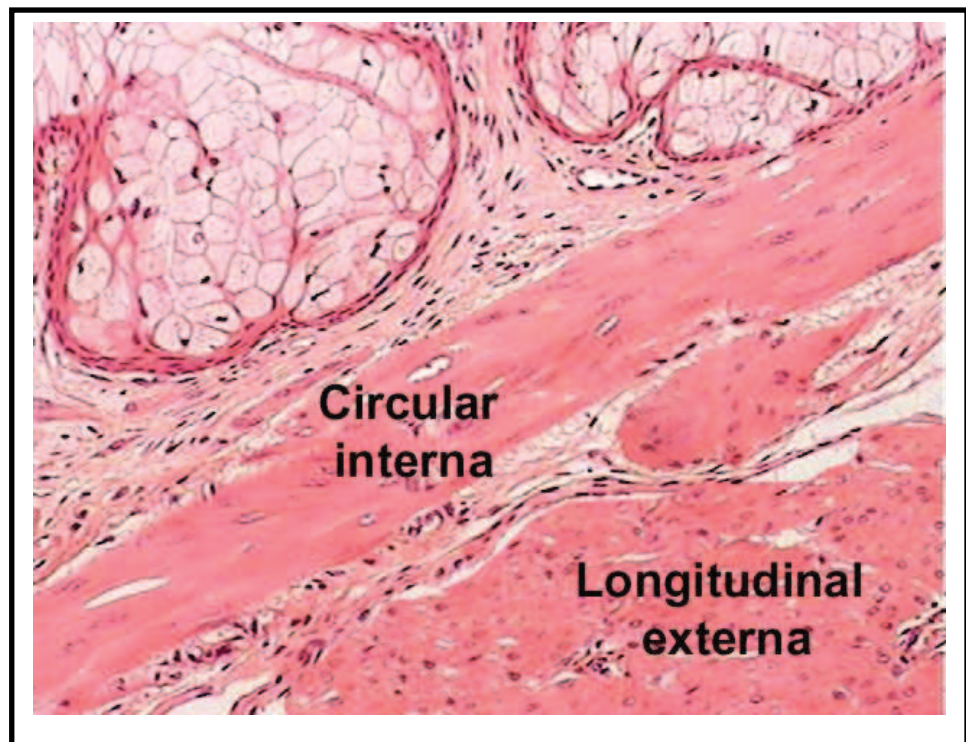


Figura 7: Fotomicrografía de las capas musculares interna y externa del útero del cobayo. Coloración: picosirius – hematoxilina. Magnificación X400. *Tomado de Rodríguez y col, sin publicar.*

El compartimiento vascular. Todos los tejidos dependen del aporte sanguíneo para su normal funcionamiento y este aporte es a su vez controlado por las células endoteliales de los vasos. Estas células generan ramificaciones en los diferentes órganos formando redes que hacen posible el crecimiento y la reparación de los tejidos. Los grandes vasos poseen una pared compuesta por tejido conectivo y músculo liso, separada de la capa de células endoteliales por una lámina basal. La composición celular de la pared del vaso es variable, de acuerdo con el diámetro y la función del mismo, pero en todos los casos poseen el revestimiento interno formado por una única capa de células endoteliales, responsables de la permeabilidad selectiva de sustancias (Alberts y col., 1994).

2.1.2. Canal duro de parto

La cintura pelviana es una articulación, que consiste en mitades simétricas constituidas por los coxales (*ossa coxarum*), que se unen ventralmente en la sínfisis pelviana o articulación interpúbica (*symphysis pelvina*) y establecen con el hueso sacro articulaciones firmes, no rígidas, en su parte dorsal. Junto con el sacro y las primeras vértebras caudales forma un anillo, que se conoce como pelvis ósea formando el contorno de la cavidad pelviana.

En los mamíferos, la articulación interpúbica es del tipo cartilaginoso y puede estar conectada a los huesos púbicos por cartílago hialino (sincondrosis) o fibroso (sínfisis), dependiendo de la especie analizada (Ruth, 1932; Gamble y col., 1986; Ortega y col., 2003). Por otra parte, desde hace muchos años se sabe que existe cierto dimorfismo sexual en la pelvis, que hace que la hembra tenga un canal de parto más amplio. Este ha sido descrito en muchos mamíferos incluyendo ratones, ratas, conejos, equinos y humanos (Sherwood, 1994). En el cobayo macho prepuberal la sínfisis púbica está formada enteramente por cartílago hialino, el que es reemplazado gradualmente por tejido óseo a medida que el animal alcanza la adultez. En la hembra, en cambio, la sínfisis púbica cartilaginosa es sustituida por tejido conectivo fibroso, formando un ligamento entre los huesos púbicos (Sherwood, 1994). La articulación interpúbica de la hembra de cobayo adulta está formada en su mayor parte por fibrocartílago, compuesto por fibras de colágeno compactas que están embebidas en una matriz amorfa. En la región central el colágeno se encuentra en forma de fibras gruesas que corren en diferentes direcciones (Ortega y col., 2003).

2.2. Adaptaciones fisiológicas

2.2.1. Canal blando

De la misma manera que el útero y el cérvix se distinguen morfológicamente, también se diferencian funcionalmente. Durante la preñez, el miometrio del útero se relaja para acomodar el feto en desarrollo, mientras que al final de la gestación abandona este estado de “quiescencia” (*quietud* uterina) y provee contracciones de mayor intensidad y frecuencia, típicas del trabajo de parto, necesarias para la

expulsión del contenido uterino. El cérvix, en cambio, permanece como una estructura rígida e inextensible durante casi toda la gestación resistiendo a las tensiones producidas por el peso y los movimientos de los fetos, de tal manera de sostenerlo y aislarlo del medio extrauterino. A lo largo de la gestación y al acercarse el momento del parto, el cérvix presenta un proceso de maduración (*cervical ripening*), por medio del cual se alteran profundamente sus propiedades mecánicas y lo transforman en un órgano flexible y fácilmente distensible. Estos cambios adaptativos permiten que, ante contracciones cada vez más frecuentes e intensas, el diámetro interno del cérvix se agrande lo suficiente para que los fetos pasen por el canal de parto con el menor traumatismo posible (Huszar y Walsh, 1991; Challis y Lye, 1994). Por lo tanto, una estrecha colaboración entre útero y cérvix es esencial para un parto normal.

2.2.1.1. Útero

2.2.1.1.1. Patrón de actividad contráctil durante la gestación y el parto

Durante la mayor parte de la preñez el miometrio es un tejido relativamente refractario a la estimulación por los principales agentes uterotónicos: oxitocina (OT), y prostaglandinas (PGE, PGF). Sin embargo, este tejido muscular no está totalmente inactivo. Contracciones de baja frecuencia (0.5-3/hora), baja amplitud (2-5 mmHg) y corta duración (5-8 min) aparecen a los 64 días de gestación en la oveja (longitud de la gestación: 145-150 días) y a los 110 días en *rhesus monkey* (longitud de la gestación: 167 días). Este tipo de contracciones pobremente coordinadas e indoloras, ocurren también en forma intermitente durante la gestación humana y se las conoce como contracciones de Braxton-Hicks o “contracturas” (Challis y Lye, 1994;). De manera similar que para el humano, se registraron ciclos de actividad contráctil intrauterina en el cobayo a lo largo de la gestación, que tienden a aumentar a medida que se acerca el parto (Porter, 1971). Esto contrasta con algunas especies, como el conejo, en la que no se registra actividad contráctil significativa hasta inmediatamente antes del parto (Fuchs, 1964; Porter y Schofield, 1966). Hasta el momento, se desconoce el rol fisiológico de estas contracciones.

El inicio del parto está asociado con una notable transformación en el patrón de la actividad contráctil del miometrio uterino, observándose un aumento progresivo tanto en la frecuencia como en la fuerza (amplitud) de la contracción (Figura 8). En la oveja esta transformación ocurre inmediatamente antes, entre 6-18 horas, del parto (Lye y Freitag, 1990). En humanos ocurre una transformación similar, la actividad contráctil del miometrio pasa de una frecuencia media de 0.32/h a las 25 semanas de edad gestacional a 2.33/h a las 40 semanas en las primíparas, y de 0.43/h a 2.27 en las multíparas (Challis y Lye, 1994). Sin embargo, a diferencia de lo que sucede en la oveja, el miometrio de primates y humanos comienza a experimentar cambios en la actividad contráctil varios días antes del comienzo del trabajo de parto (Challis y Lye, 1994). Se considera que esta evolución en el patrón de la actividad contráctil es la manifestación de un cambio profundo en la estructura y organización de las células musculares del miometrio (Challis y col., 2000).

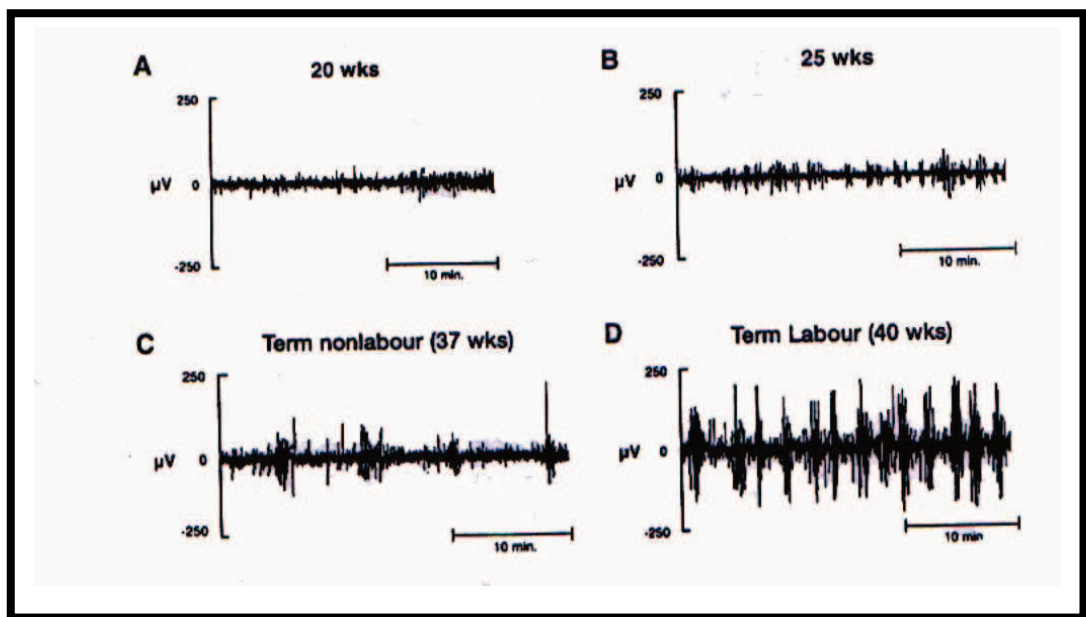


Figura 8: Registro de la actividad electromiográfica de la superficie abdominal humana durante la gestación y el trabajo de parto. **A:** 20 semanas de gestación, **B:** 25 semanas de gestación, **C:** semana 37 de la gestación, sin trabajo de parto, y **D:** paciente en trabajo de parto en la semana 40. *Modificado de Garfield y col. Human Reproduction Update, 4: 673-695, 1998.*

2.2.1.1.2. Bases de la contracción

El miometrio está formado por billones de pequeñas células de músculo liso. El proceso básico que controla las contracciones del miometrio es la transmisión de actividad eléctrica entre las células en forma de potenciales de acción. Los potenciales de acción se propagan entre las células musculares abriendo canales iónicos voltaje-dependientes (VDCC) que permiten una entrada masiva de los iones calcio, esenciales para producir la contracción (Figura 9). Estos potenciales de acción usualmente se propagan simultáneamente en grupo, formando una contracción. El número de contracciones en un tiempo dado determinan la frecuencia de las mismas, mientras que la extensión determina la duración de la contracción uterina.

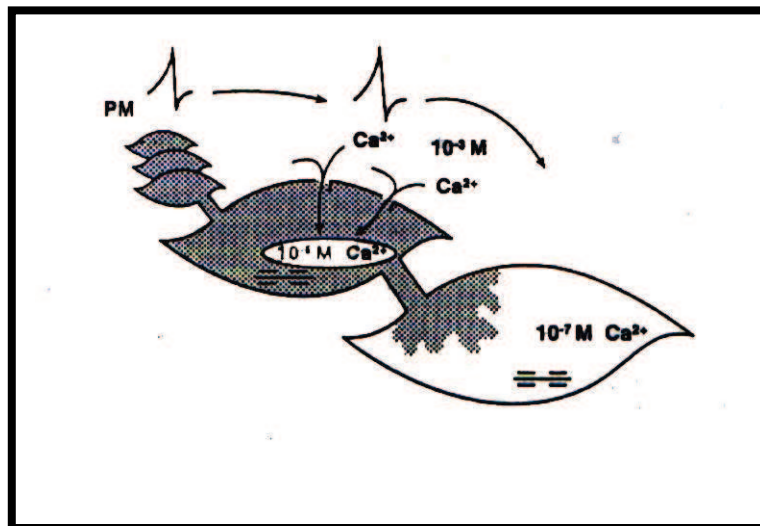


Figura 9: Esquema de un grupo de células miometriales interconectadas por canales de baja resistencia. A medida que el potencial de acción se propaga de una célula a otra, la concentración de calcio intracelular se va incrementando de 10^{-7} M a 10^{-5} M para producir una contracción. *Modificado de Garfield y col. Human Reproduction Update, 4: 673-695, 1998.*

Existen varios factores que determinan el óptimo funcionamiento del miometrio durante el trabajo de parto. Describiremos los más importantes.

2.2.1.1.3. **Acoplamiento eléctrico y excitabilidad**

La fuerza generada por todo el útero durante una contracción (amplitud de la contracción) depende de la facilidad de propagación de los potenciales de acción entre células vecinas y de la cantidad de masa muscular involucrada (Garfield y col., 1998). La capacidad para producir contracciones sincronizadas requiere un alto grado de **acoplamiento eléctrico** entre las células individuales (Challis y Lye, 1994). Algunos estudios demuestran que el acoplamiento eléctrico entre las células del miometrio depende del número de uniones *gap* intercelulares (*gap junctions*), presentes entre las membranas de células adyacentes (Garfield y col., 1977). Estas estructuras son poros que proveen canales para el transporte directo entre células de metabolitos pequeños (1-1.7 kDa). Son sitios de baja resistencia eléctrica y, por lo tanto, proveen vías para la conducción eficiente de potenciales de acción (Garfield y col., 1998).

El número de uniones *gap* entre células es bajo durante la mayor parte de la preñez, indicando un pobre acoplamiento y una baja conductancia eléctrica entre las células musculares. Esta condición favorece la quiescencia del músculo uterino y el mantenimiento de la gestación. En 1977, Garfield y col., cuantificaron el número de uniones *gap* en el miometrio de ratas durante la preñez, antes y durante el parto, y en el posparto. Los resultados demostraron claramente que las uniones *gap* sólo aparecen en número significativo entre las células al comienzo del parto, decayendo en el posparto inmediato (Garfield y col., 1977). Resultados similares se obtuvieron en todas las especies estudiadas hasta el momento, de tal manera que el acoplamiento eléctrico del tejido muscular se incrementa y lleva la capacidad de propagación de potenciales de acción a través del tejido a su máximo valor en el momento del parto (Garfield y col., 1998).

Estas uniones *gap* están formadas por proteínas denominadas conexinas (Cx). Estas moléculas pertenecen a una familia multigénica de proteínas formadoras de canales, altamente conservadas entre las especies a través de la evolución, las cuales se autoensamblan en hemicanales hexaméricos. Este grupo está constituido por unas trece proteínas en total, que se clasifican de acuerdo a su peso molecular. En el útero se ha demostrado la presencia de tres de estas

proteínas, siendo las Cx-26 y Cx-32 las que predominan en el endometrio, mientras Cx-43 predomina en el miometrio (Lenhart y col., 1999). Varios grupos de investigación han realizado trabajos con el objeto de establecer si el nivel de expresión de estas moléculas se incrementaba durante el avance de la gestación. Se ha podido establecer que ocurre un incremento, al momento del parto, en la expresión de ARNm y de proteínas de Cx-43 en el miometrio de ratas, ovejas, cerdos y humanos (Challis y col., 2000; Lye y col., 1993; Challis y Lye, 1994).

Otro elemento esencial para que la contracción muscular se lleve a cabo, es el ión calcio (Ca^{+2}). Así como las uniones *gap* entre células determinan el grado de acoplamiento eléctrico y consecuentemente la facilidad con la que los potenciales de acción se propagan por todo el tejido, el número de canales de calcio establece la **excitabilidad** de las células musculares. El calcio entra a la célula principalmente por canales VDCC, los cuales se abren cuando la membrana celular se despolariza ante el paso de un potencial de acción (Garfield y col., 1998). Luego, el ión penetra en el espacio intracelular a favor de gradiente y permite la contracción de los miofilamentos provocando la contracción. Si bien hay menos trabajos que evalúen la expresión de los canales iónicos a lo largo de la gestación, Tezuka y col (1995) evaluaron por RT-PCR la expresión de las subunidades que conforman los canales VDCC en miometrio de rata en distintos momentos de la gestación. Demostraron que el número de subunidades VDCC aumenta en el tejido miometrial durante el parto, tanto en condiciones normales, como en el parto pre-término (Tezuka y col., 1995).

En cuanto a la regulación hormonal de los factores que regulan la contracción del miometrio, varios trabajos sugieren que la progesterona (Pg) y los estrógenos (Eg) intervendrían en el control del número de uniones *gap*. Uno de los primeros trabajos realizados en ratas demostró que la eliminación por ovariectomía de la fuente de Pg a mitad de la gestación produce aborto y reabsorción de los fetos, junto con un aumento de la actividad contráctil del útero. Estos efectos fueron revertidos mediante el suministro de Pg. A partir de estos resultados los autores propusieron que la Pg intervendría en el control de la formación de las uniones *gap* (Garfield y col., 1977). Usando el mismo diseño experimental, este grupo

demostró que la administración de Pg durante la gestación redujo los niveles de Cx-43, mientras que la inyección de un antagonista (RU-486 o mifepristona) aumentó los niveles y el número de uniones *gap*. Más adelante se obtuvieron resultados similares en el cobayo. En esta especie, distintos trabajos demostraron un aumento significativo del acoplamiento intercelular y de Cx-43 cuando a animales preñados se los trató con inhibidores de Pg (mifepristona y ZK 98299) (Sakai y col., 1992; Chwalisz y col., 1991). Por su parte, los Eg incrementan la formación de uniones *gap*. Mediante la inyección de dosis únicas (5µg) de estradiol (E₂) a ratas no preñadas ovariectomizadas, Petrocelli y Lye (1993) observaron un incremento en los niveles de ARNm de Cx-43 dentro de las 6 horas post-inyección, permaneciendo elevados durante 24 hs, y bajando luego a valores basales. Este incremento en Cx-43 inducido por E₂ es bloqueado por la administración conjunta de Pg (Petrocelli y Lye., 1993).

2.2.1.1.4. Oxitocina (OT) y receptores para OT (OTR)

La OT es una hormona peptídica sintetizada por las neuronas magnocelulares de los núcleos supraóptico y paraventricular del hipotálamo. La OT hipotalámica es liberada dentro de la circulación sanguínea por la hipófisis posterior. Clásicamente, los efectos atribuidos a esta hormona son promover las contracciones del útero tanto en el parto, facilitando la expulsión del feto, como en el posparto, para controlar la hemorragia. La OT también estimula la eyección de leche por la glándula mamaria durante la lactancia (Challis y col., 2000). Si bien estos efectos son conocidos desde hace mucho tiempo, su papel en el parto no estaba claro debido a que los niveles circulantes de OT no aumentan significativamente a medida que la gestación avanza. En parte, la respuesta a esta discrepancia entre los niveles circulantes de OT y su papel en el parto, provino del descubrimiento de que a lo largo de la gestación hay un incremento en la susceptibilidad del miometrio a la OT, provocado por una mayor expresión miometrial de sitios receptores (Challis y Lye, 1994; Challis y col., 2000). A partir de aquí se demostró que, en todas las especies estudiadas, se produce un incremento en los niveles de receptores para OT (OTR) en el miometrio al acercarse el momento del parto (Challis y Lye, 1994; Fuchs, 1999). En humanos ocurre un incremento de 30 veces en la expresión de OTR entre la gestación

temprana y el inicio del trabajo de parto (Fuchs y Fuchs, 1984). Mientras que, en cobayos, los niveles de OTR se multiplican por 50 en el período comprendido entre el día 10 y el día 60 de la gestación (Alexandrova y Soloff, 1980; Chwalisz y col., 1991). En base a estos trabajos, se sugirió que el miometrio durante la preñez tardía es más sensible o reactivo a la OT debido a una mayor densidad tisular de OTR, lo que significa que respondería con contracciones más intensas ante los mismos niveles de OT (Garfield y col., 1998).

Con relación a la regulación hormonal del número de OTR, se ha demostrado que el tratamiento con Pg en ratas y ovejas los disminuye, mientras que en cobayos la administración de anti-Pg (mifepristona) induce un aumento de la respuesta del tejido miometrial a la administración exógena de OT. Esta mayor respuesta a la OT exógena no es debida a un aumento en la densidad tisular de OTR, sino que es atribuida a un aumento en las uniones *gap* (Chwalisz y col., 1991). Este, y otros trabajos, cuestionan la sugerencia de que un aumento en OTR sea la causa del incremento de la susceptibilidad uterina a la OT. En relación a los Eg, Reimer y col. (1986) observaron un aumento de OTR en el miometrio de conejos expuestos a diferentes dosis de E₂.

Para tratar de aclarar el rol fisiológico de la OT durante el parto, algunos grupos evaluaron el efecto del tratamiento de antagonistas de OTR en ratas y cobayos. Los resultados demostraron que el bloqueo de OTR no afecta el momento del inicio del parto ni la longitud de la gestación, en cambio, sí se altera la duración de la fase expulsiva (una vez iniciado el trabajo de parto) provocando una alta mortalidad fetal (Schellenberg, 1995; Schellenberg y col., 2000). Debido a esto, actualmente se considera que la OT sería necesaria para el normal desarrollo del parto una vez que éste ya se ha iniciado. También se cree que tendría un papel fundamental en la involución uterina posparto, previniendo la hemorragia primaria posparto (Nathanielsz y Smith, 1999).

2.2.1.1.5. Óxido nítrico (ON)

El ON es una molécula producida por una familia de enzimas, las sintetetasas de óxido nítrico (NOS), que liberan ON al convertir el aminoácido L-arginina a L-citrulina. Se han identificado tres enzimas NOS (Nathan y Xie, 1994):

- Neuronal: nc-NOS, b-NOS o tipo I
- Inducible: i-NOS o tipo II
- Endotelial: ec-NOS o tipo III

Una vez producido, el ON es una molécula rápidamente difusible, por lo que penetra rápidamente dentro de la célula muscular y estimula la guanilato ciclasa, elevando los niveles intracelulares de GMPc y produciendo relajación.

El sistema ON está presente en el útero de muchas especies y representa el mecanismo más importante para la relajación del miometrio uterino (Izumi y col., 1993). En estudios *in vitro* se ha demostrado que ON, sustratos de ON y donadores de ON inhiben las contracciones espontáneas del músculo uterino de ratas, cobayos y humanos, mientras que los inhibidores de NOS ejercen un efecto estimulador de la contracción (Izumi y col., 1993; Garfield, 1998).

En resumen, numerosos trabajos demuestran que Pg y Eg son los principales reguladores del estado de contracción-relajación del miometrio durante la gestación y el parto. La Pg ejerce un control fundamental sobre la quiescencia uterina a través de la inhibición de algunos genes esenciales para la contracción uterina (Cx-43, canales de calcio, receptores para OT) y de la formación de uniones *gap*. Por otro lado, estimularía mecanismos de relajación del músculo, fundamentalmente, a través del sistema ON. En cambio, los efectos de E₂ en el miometrio serían los contrarios a los de la Pg, incrementando la expresión de diversas proteínas de la contracción o estimulando la síntesis de PGs y la liberación de OT (Challis y Lye, 1994).

2.2.1.2. Cérvix

2.2.1.2.1. Cambios bioquímicos e histológicos del cérvix durante la gestación y el parto

Desde los primeros trabajos de Danforth (1947) se han realizado numerosas investigaciones con el fin de determinar cuales son las variaciones bioquímicas e histológicas que acompañan la dilatación del cérvix durante el parto. En este sentido, Bryant y Weeks (1968), realizaron un primer estudio intensivo usando 108 cérvices de rata, correlacionando el análisis histomorfológico con las variaciones bioquímicas de la matriz extracelular. En base a los resultados obtenidos, los autores propusieron que el rápido incremento en los niveles de agua y hexosamina tisular que experimentaba el cérvix uterino en el momento del parto, producía un desbalance entre las fuerzas cohesivas y adhesivas de las unidades estructurales de colágeno que llevaba a un clivaje longitudinal de dichas unidades.

En 1974, nuevamente Danforth y col., compararon las biopsias de mujeres embarazadas y no embarazadas para conocer los efectos del embarazo y el trabajo de parto sobre el colágeno, glicoproteínas y GAGs del estroma cervical. Las biopsias de cérvix tomadas inmediatamente después del parto presentaron un incremento en el contenido de agua, una marcada disminución en el contenido de colágeno y glicoproteínas y un aumento en los GAGs frente a las biopsias controles de no embarazadas. A la luz de estos resultados se propuso que en el momento del parto se produce una extensa degradación de las fibras de colágeno junto a significativas variaciones de la sustancia fundamental, componentes ambos de la matriz extracelular cervical (Muñoz-de-Toro y col., 2003). Como consecuencia de la evidencia de estos cambios bioquímicos, se concluyó que la dilatación cervical no es un proceso pasivo, sino más bien un conjunto de eventos complejamente relacionados, que permiten al órgano adecuar su elasticidad a los requerimientos del embarazo.

Desde entonces, numerosos trabajos han sumado evidencias a favor de la idea de que la dilatación cervical durante el parto es un proceso relacionado con la remodelación del colágeno. En 1978, Kleissl y col., estudiaron las variaciones de

las fracciones ácido-solubles e insolubles de colágeno en cérvices de mujeres embarazadas y no embarazadas. Se observaron diferencias significativas en el patrón electroforético de la fracción soluble en ácido acético indicando un gran aumento de la ruptura del colágeno en biopsias tomadas intraparto. El análisis de la fracción insoluble de colágeno reveló que el contenido de hidroxiprolina disminuía significativamente en los cérvices intraparto, en comparación con los controles. En 1980, usando biopsias de cérvix de mujeres obtenidas durante el parto, Junqueira y col. describieron mediante ME y MO un conjunto de alteraciones histológicas típicas de una extensa colagenólisis (Junqueira y col., 1980). Más adelante, Rajabi y col. (1988) aportaron la primera prueba directa de un aumento de los niveles de colagenasa intersticial en el cérvix de mujeres en trabajo de parto. En cobayos, también se ha demostrado que la degradación de colágeno tipo I, la principal molécula de colágeno en el cérvix, está aumentada en el parto (Rajabi y col., 1991a). Conjuntamente con este aumento de actividad colagenasa, el cérvix de cobayos durante el parto presenta imágenes de ME típicas de una disolución de las fibras de colágeno junto con un aumento de la sustancia amorfa interfibrilar (Hegele-Hartung y col., 1989). La remodelación del colágeno asociada a la dilatación cervical también se ha demostrado en otras especies, tales como ovejas (Luque y col., 1997) y ratas (Luque y col., 1996). En un interesante trabajo, Granström y col. (1989) investigaron los cambios bioquímicos que ocurren en el útero y cérvix durante el parto de la mujer. Sus resultados demostraron que, en ambos sitios, se produce una disminución en la concentración de colágeno asociada a una actividad colagenolítica incrementada, demostrando que en la mujer el proceso de remodelación del tejido conectivo ocurre tanto en el cuello uterino como en el cuerpo del útero.

2.2.1.2.2. Remodelación del colágeno cervical

Varios trabajos han demostrado que el proceso de maduración cervical en la rata está influido por las hormonas relacionadas con el parto: Pg, Eg y relaxina (Rlx) (Cullen y Harkness, 1960; Downing y Sherwood, 1986; Luque y col., 1996; Luque y col., 1998; Ramos y col., 2000). Evidencias similares se han obtenido en cobayos. Los resultados de una serie de trabajos realizados con células

cervicales en cultivo obtenidas en el día 50 de la gestación, demostraron que la síntesis proteica y de ARNm de colagenasa es estimulada por E₂, estrona, interleuquina (IL)-1 β , fosfolipasa A₂ y PGF_{2 α} . Los efectos estimulantes de E₂ e IL-1 β fueron inhibidos por el agregado de cicloheximida y actinomicina D, poniendo de manifiesto la necesidad de síntesis de proteína y de ARNm en la vía de acción de estos agentes sobre la actividad colagenasa. Además, el estímulo de E₂ fue bloqueado por tamoxifeno (antagonista de E₂), demostrando que la acción de E₂ es mediada a través del receptor de estrógeno (RE) (Rajabi y col., 1991a, 1991b). Con el mismo diseño experimental, este mismo grupo también demostró que el estímulo de E₂ y PGF_{2 α} sobre la síntesis de colagenasa involucra la activación de la proteína kinasa C (PKC) (Rajabi y col., 1992). El rol de la Pg también fue evaluado en estos trabajos, observándose un efecto estimulatorio o inhibitorio en función de la dosis empleada: cuando las células fueron expuestas a 10⁻⁸ M de Pg se produjo un incremento de los niveles de colagenasa, mientras que una concentración de 10⁻⁴ M promovió un descenso e inhibió el estímulo de E₂ sobre la síntesis de la enzima. Como los efectos de los niveles plasmáticos de Pg sobre el cérvix no se conocen, los autores sugirieron que, por la cercanía de la placenta, los niveles locales de Pg que llegan al cérvix podrían ser mayores que los plasmáticos. Finalmente propusieron que, durante la mayor parte de la preñez, los altos niveles locales de Pg bloquearían el estímulo de E₂ sobre la colagenasa intersticial; y que este bloqueo de la Pg desaparecería al final de la gestación mediante una disminución local que no se reflejaría en los niveles séricos (Rajabi y col., 1991a, 1991b). A pesar de lo interesante de esta hipótesis, los resultados experimentales fueron obtenidos *in vitro* utilizando modelos que no se corresponden con la fisiología de un animal preñado. Es decir, el diseño experimental carece de las condiciones normales de funcionamiento del organismo durante una preñez y parto normales *in vivo*. Con un modelo más cercano a las condiciones fisiológicas, Hegele-Hartung y col. (1989) obtuvieron resultados que apoyan el papel propuesto para la Pg: evaluaron el efecto de la administración en cobayos de onapristona (ONA) (antagonista de Pg), en el día 60 de la gestación. Se evaluaron por ME las alteraciones histológicas en el cérvix producidas por el tratamiento y se compararon con las modificaciones histológicas observadas durante la dilatación cervical en animales no tratados. El cérvix de los

animales tratados con ONA no mostró diferencias con el de los animales controles, presentando las características histológicas típicas de la dilatación cervical: disolución de las fibras de colágeno, aumento de la sustancia amorfa interfibrilar (edema estromal), aumento de la cantidad de fibroblastos activos vs inactivos e incremento de mastocitos y polimorfonucleares en las zonas de mayor actividad colagenolítica (Hegele-Hartung y col., 1989). En cambio, en este mismo modelo experimental, no se pudieron reproducir los efectos de E₂ sobre la dilatación cervical sugeridos por los resultados *in vitro*. Paradójicamente, la administración de E₂ atenuó significativamente la maduración cervical inducida por ONA en la preñez tardía en cobayos (Chwalisz y col., 1995). Más recientemente se han reportado observaciones similares en mujeres, poniendo en duda los efectos promotores de la maduración cervical de la administración de E₂ (Garfield y col., 1998).

Con el objetivo de conocer cuál es la célula de origen de la colagenasa cervical durante la gestación, se realizaron cultivos de células epiteliales y estromales del endocérnix de cobayos preñados (Rajabi y Singh, 1995). Los resultados demuestran que la colagenasa cervical es producida por las células estromales, mientras que las células epiteliales producen un factor (identificado como un péptido de 6 kDa) que estimula la actividad colagenasa. El mismo grupo estudió, posteriormente, el efecto de la relaxina recombinante humana (hrRlx), hormona peptídica de 6 kDa, sobre la actividad colagenasa de las células del cérvix de cobayos prepuberales, adultos no preñados y preñados. La hrRlx estimuló la actividad enzimática de las células cervicales de hembras adultas no preñadas y preñadas. En los animales prepuberales, sólo tuvo efecto sobre las células cervicales si éstas eran tratadas previamente con E₂. A partir de estos resultados los autores concluyeron que la Rlx participaría en el mecanismo de ablandamiento del cuello uterino estimulando la actividad de la enzima colagenasa intersticial producida por las células del estroma. Con relación al efecto de Rlx sobre las células cervicales de animales prepuberales, sugirieron que no responden a la Rlx porque carecen de receptores para esta hormona por ausencia de E₂; ya que cuando expusieron estas células a E₂ lograron observar el efecto estimulador de la Rlx sobre la actividad colagenasa. Concluyeron entonces que el tejido cervical

debe madurar para responder a Rlx, y que el agente madurador es E₂ (Mushayandebvu y Rajabi, 1995).

2.2.1.2.3. La maduración cervical como un proceso inflamatorio

Asociado temporalmente con los eventos de remodelación del tejido fibroso del cérvix uterino se ha descrito, hacia el final de la preñez, una infiltración de leucocitos provenientes del torrente sanguíneo (Tchernitchin y col., 1974; Padykula y Tansey, 1979; Zheng y col., 1988; Luque y Montes, 1989). Varios tipos de leucocitos se han observado en el útero y cérvix de diferentes especies durante la preñez y el parto. En la rata, con técnicas histoquímicas, se ha reportado la presencia de eosinófilos, mastocitos y monocitos (Padykula y Tansey, 1979; Luque y Montes, 1989) mientras que en la mujer y el cobayo se ha demostrado la presencia predominante de leucocitos polimorfonucleares neutrófilos (Junqueira y col., 1980; Hegele-Hartung y col., 1989). La Pg ejercería un control inhibitorio sobre la infiltración en el cobayo, ya que animales preñados tratados con ONA reproducen la invasión de leucocitos neutrófilos en niveles similares a los observados en animales intactos (Hegele-Hartung y col., 1989). En la mujer, en una serie de trabajos clínicos, se evaluó la capacidad de algunos antiprogestágenos (mifepristona y ONA) administrados junto con PGs, para inducir el parto. Todos los protocolos demostraron que el tratamiento previo con RU-486 redujo el intervalo de respuesta entre el tratamiento y el parto inducido, comparado con la inyección de PGs sola. El tratamiento combinado también redujo la dosis necesaria de PGs para inducir el parto y disminuir el dolor asociado al tratamiento. Los efectos fueron atribuidos a que la mifepristona induce el ablandamiento cervical sin estimular las contracciones uterinas (Chwalisz y Lye, 1994). Con relación a la participación de los Eg varios autores ponen “en tela de juicio” que la administración exógena de Eg en mujeres tenga algún efecto beneficioso sobre la inducción del parto (Garfield y col., 1998; Nathanielsz y Smith, 1999).

Debido al renovado interés por describir un nexo funcional entre las modificaciones histomorfológicas de la matriz extracelular del cuello uterino durante la preñez y el parto con la presencia de leucocitos infiltrantes, Luque y col. (1996) estudiaron el papel de las hormonas esteroides ováricas en el control de la infiltración y la remodelación del colágeno cervical. Para ello usaron ratas preñadas o pseudopreñadas ovariectomizadas el día 9 (D9) de gestación o pseudopreñez y las trataron con E₂ y/o Pg en dosis similares a las de una gestación normal, de manera de asegurar la viabilidad fetal. En los cérvices de ratas preñadas, ovariectomizadas y tratadas con E₂+Pg ó Pg no se observó la infiltración de eosinófilos ni la remodelación del colágeno observadas en los animales sin tratamiento. En el cérvix de ratas ovariectomizadas durante la pseudopreñez y tratadas con E₂ hubo una infiltración de eosinófilos similar a la del parto normal; sin embargo, la combinación de E₂+Pg inhibió la infiltración de leucocitos. En ninguno de estos grupos se reprodujo la remodelación del colágeno característica de un parto fisiológico. Estos resultados demostraron que E₂ induce la infiltración de eosinófilos en el cérvix al final de la gestación, mientras que la Pg la inhibe. Ninguna de las dos hormonas evaluadas (Pg y E₂) promovió la remodelación de las fibras de colágeno del tejido cervical. Para profundizar el estudio de la regulación hormonal de la dilatación cervical, Luque y col (1998) investigaron el rol de la Rlx y E₂ en el período inmediatamente previo al parto. En este trabajo se usaron cérvices de ratas preñadas ovariectomizadas el D22 de la gestación, las que fueron tratadas con E₂, Rlx o E₂+Rlx y sacrificadas una hora antes del parto esperado. En los animales que recibieron E₂ o E₂+Rlx se observaron altos niveles de infiltración de eosinófilos, mientras que las hembras tratadas con Rlx tuvieron niveles de infiltración significativamente menores. La remodelación del colágeno sólo se reprodujo en los animales cuyo tratamiento incluyó Rlx, ya sea administrada de forma individual o con E₂. Estos trabajos demostraron que la infiltración de eosinófilos y la remodelación del colágeno descritos en el cérvix de la rata en el momento del parto son fenómenos independientes y bajo el control de diferentes hormonas: E₂ estimula la invasión del cérvix por los eosinófilos y la Rlx promueve la remodelación de las fibras de colágeno de forma independiente de la infiltración eosinofílica.

Por otro lado, en numerosos trabajos se estudiaron los eventos parácrinos que ocurren en el estroma cervical a término en especies como: conejo (Ito y col., 1988; Ito y col., 1994; El Maradny y col., 1996), cobayo (Rajabi y col., 1991c; Rajabi y Singh, 1995), cerdo (Huang y col., 1993) y la mujer (Osmers y col., 1992; Rath y col., 1993; Yoshida y col., 1993; Kaminski y col., 1994; Osmers y col., 1995; El Maradny y col., 1996). Así se observó la acción de algunas citoquinas, tales como la IL-1, que actuarían como mediadores en el proceso de maduración cervical. Su aplicación en forma de supositorios vaginales promovió, en el cérvix de conejo, aumento de la actividad colagenasa y del contenido de agua del órgano, aumento de la concentración de IL-8 e indujo la infiltración de neutrófilos (El Maradny y col., 1995). Experimentos *in vitro* demostraron que cuando se tratan fibroblastos de cérvices de conejas preñadas con IL-1, hay un aumento de IL-8 en el medio de cultivo, mientras que el tratamiento de estas células con Pg inhibió el aumento de IL-8 mediado por la IL-1. Previamente, estos mismos autores habían propuesto un papel modulador de la Pg a través de la supresión de la producción de metaloproteinasas (MMP) intersticiales y del aumento de la síntesis de sus inhibidores (Ito y col., 1994). En cobayos preñados la aplicación intracervical de IL-8 e IL-1 β en el período D48-D50 de la gestación (longitud de la gestación: 67 $\pm$ 3 días) produce niveles de infiltración y degradación de colágeno en el cérvix similares a los observados en animales intraparto (Chwalisz y col., 1994). La administración local de ON, desencadenó cambios morfológicos en el cérvix similares a los observados durante la dilatación cervical fisiológica: disolución de las fibras de colágeno, edema estromal, dilatación arterial e infiltración de neutrófilos y mononucleares (Chwalisz y col., 1997).

Otras moléculas que han sido estudiadas como posibles factores parácrinos son PGE₂ y PGF₂. La aplicación de PGE₂ en cérvices de mujeres durante el primer trimestre de embarazo, aumentó la actividad de colagenasa y elastasa (Rath y col., 1993). Un estudio prospectivo con 296 pacientes durante trabajo de parto demostró que la aplicación intracervical de PGF₂ α incrementa significativamente la actividad colagenasa y moderadamente la actividad elastasa, en comparación con los cérvices de pacientes tratadas sólo con OT (Kaminski y col., 1994). Sin

embargo, en ninguno de estos tratamientos se logró obtener índices de dilatación cervical semejantes a los fisiológicos.

A la luz de todos estos trabajos, en la actualidad, el mecanismo de ablandamiento cervical es considerado un proceso bioquímicamente activo que ocurre de forma independiente de las contracciones uterinas y que se asemeja a un proceso inflamatorio, siendo la incrementada remodelación del colágeno el evento principal que explicaría la caída de la resistencia cervical (Muñoz-de-Toro y col., 2003). En este contexto, la Pg actuaría como un agente inmunosupresor: una caída en la acción de la Pg a nivel local en el cérvix desencadenaría la reacción inflamatoria asociada con la dilatación cervical (Garfield y col., 1998).

Una serie de trabajos recientes en mujeres reafirman la validez de esta hipótesis. En biopsias de cérvices de mujeres con grados crecientes de dilatación, se demostró que los niveles de proteína y de ARNm de IL-8, MMP-8, MMP-9, IL-6 y el número de neutrófilos se incrementan a medida que el cérvix se va dilatando (Winkler y col., 1999; Sennström y col., 2000). En el mismo sentido, Osman y col. (2003) han demostrado que durante el parto aumentan los niveles de ARNm de IL-1 β , IL-6 e IL-8 en cérvix, miometrio, corion, decidua y amnios, mientras que la infiltración de neutrófilos y macrófagos aumenta en el cérvix simultáneamente con el inicio del trabajo de parto.

Tradicionalmente, el parto pretérmino es considerado como el inicio prematuro del proceso del parto. Sin embargo, en concordancia con la hipótesis del parto como un proceso inflamatorio, se ha propuesto que el parto prematuro no ocurre simplemente porque el mecanismo fisiológico del parto es iniciado antes de tiempo, sino que es el resultado de una respuesta inflamatoria exacerbada, con una elaboración excesiva de citoquinas y MMPs. Esta cantidad anormalmente alta de agentes relacionados con la reacción inflamatoria serían los responsables de desencadenar el parto antes de tiempo (Greene, 2003; Peltier, 2003).

2.2.2. Canal duro

En el cobayo ocurre una marcada separación de los huesos pélvicos de la hembra a medida que se acerca el parto. Esta separación es posible gracias a la formación de un ligamento ventral entre los 2 huesos pélvicos. La formación de este ligamento, y su hormonodependencia, fue comunicada posteriormente por Hisaw en 1926, cuando mediante la inyección de suero de cobayos hembras o conejas preñadas a animales pre-tratados con Eg, logró la relajación de los huesos púbicos. Posteriormente, se demostró que es posible lograr la formación del ligamento interpúbico mediante un tratamiento de 3-4 días con Pg en animales pre-tratados con Eg (Zarrow, 1948).

Los Eg y la Rlx son las hormonas que estarían más relacionadas con los cambios de la sínfisis púbica del cobayo durante la gestación. Los Eg promueven el crecimiento del ligamento interpúbico ya que el tratamiento prolongado (10 a 24 días) de cobayos con E₂ aumenta 2 a 3 veces la distancia interpúbica. Este incremento en la longitud del ligamento interpúbico inducido por los Eg, ha sido atribuido a proliferación del tejido conectivo, resorción de hueso e incremento en el contenido de agua (Zarrow, 1948; Talmage, 1950). Los Eg también cumplen un papel importante en la preparación de la sínfisis para que responda al estímulo de la Rlx. Mientras la Rlx tiene poco o ningún efecto sobre el tejido conectivo de la sínfisis de cobayos sin estimulación estrogénica, ésta posee una marcada y rápida acción en animales pretratados con Eg: cuando se administra Rlx a cobayos hembras adultas castradas tratadas previamente -durante 4 o más días- con Eg, ocurre una rápida transformación del tejido conectivo de la sínfisis (6 a 8 hs) (Zarrow, 1948; Frieden y Hisaw, 1951). Luego del tratamiento con Rlx, hay una extensa disolución y desorganización de las fibras colágenas (Chihal y Espey, 1973), la sínfisis púbica se vuelve sanguinolenta, esponjosa y altamente flexible (Frieden y Hisaw, 1951).

La mayoría de los trabajos coinciden en que los máximos niveles séricos de Rlx durante la gestación se asocian con el mayor crecimiento del ligamento interpúbico. La Pg también promovería la relajación del ligamento interpúbico en el cobayo, pero este efecto sería indirecto, por intermedio de la estimulación de la

síntesis de Rlx por el útero del cobayo (O'Byrne y Steinetz, 1976; Boyd y col., 1981)..

Toda esta serie de evidencias indican que la Pg, los Eg y la Rlx estarían involucradas en la transformación de la articulación interpúbica del cobayo. El mecanismo por medio del cual la Rlx promueve la remodelación del colágeno en la articulación interpúbica del cobayo no se conoce. Los tipos celulares a los que se une no han sido determinados aunque se piensa que podrían ser los fibroblastos (Sherwood, 1994). Chihal y Espey (1973) sugieren que la desorganización del colágeno podría estar causada por una sustancia liberada a partir de estructuras multivesiculares presentes en la superficie celular de fibroblastos ubicados cerca del sitio de digestión del colágeno. Otra posible explicación sería que la Rlx ejerza su efecto, al menos en parte, desagregando los complejos de proteoglicanos dentro de la matriz intercelular. Perl y Catchpole (1950) observaron que los proteoglicanos altamente polimerizados de ligamentos interpúbicos no relajados, son insolubles en agua y tienen poca afinidad por el colorante azul de Evans (esto puede deberse a cambios en la disponibilidad de grupos activos sobre las moléculas despolimerizadas y a la permeabilidad vascular). Luego del tratamiento con Rlx, los proteoglicanos se hacen hidrosolubles, y la coloración con azul de Evans se vuelve más intensa en aquellas áreas que evidencian mayor despolimerización. Mediciones electrométricas han demostrado que la densidad de cargas del coloide de la matriz extracelular se reduce en animales tratados con Rlx (Catchpole y col., 1952) y que este efecto se ejerce a través de la desagregación de los proteoglicanos cargados negativamente. De acuerdo con esto, la desagregación de los proteoglicanos podría de alguna manera evitar el arreglo ordenado del colágeno recién formado dentro de fibrillas.

Si consideramos la articulación interpúbica de otras especies, como por ejemplo la rata, la Rlx también parece tener un potente efecto sobre la estructura del colágeno que estaría potenciado por Eg y antagonizado por Pg (Samuel y col., 1996; 1998). En el caso del ratón, y tal como ocurre en el cobayo, la combinación de Eg y Rlx promueve la máxima relajación de la articulación interpúbica. Una

única aplicación de Eg o de Rlx a ratones hembras no preñadas induce un pequeño incremento en la separación interpúbica, comparado con el observado durante la preñez o después de la administración de Eg más Rlx (Crelin y Haines, 1955; Crelin y Levin, 1955).

En la mujer, antes del parto, hay una modesta relajación de los ligamentos pélvicos y la articulación interpúbica se separa 3-10 mm (MacLennan y col., 1986). El severo dolor pélvico y excesiva laxitud articular que ocurren en ciertas mujeres durante el final de la gestación parecen ser atribuibles, al menos en parte, a altos niveles plasmáticos de Rlx (MacLennan y col., 1986). También altos niveles plasmáticos de Rlx (ovarios hiperestimulados para fertilización *in vitro*) están asociados con mujeres con alto riesgo de parto prematuro (Iams y col., 2001).

Como comentamos anteriormente, el ablandamiento cervical previo al parto es un proceso activo, que se asemeja a un proceso inflamatorio, siendo la disolución del colágeno el evento principal que lleva a una caída de la rigidez cervical. Recientemente, nuestro grupo pudo demostrar que los cambios en el ligamento interpúbico del cobayo previos al parto también semejan una reacción inmune (Rodríguez y col., 2003a). En este trabajo observamos que el proceso de remodelación del colágeno que permite la separación de los huesos púbicos durante el parto está asociado temporalmente con un influjo masivo de leucocitos (eosinófilos, neutrófilos y células mononucleares) en el ligamento interpúbico. En este trabajo, además describimos numerosas imágenes histológicas típicas de eosinófilos en proceso de degranulación, rodeados por una zona con signos de intensa remodelación del colágeno.

3. Inicio del parto

3.1. Generalidades

En la mayoría de las especies el inicio del parto está asociado con el pasaje de un medio ambiente endocrino dominado por la Pg a otro dominado por los Eg (Lye, 1996). En algunas especies este cambio de medio ambiente hormonal no está asociado con cambios significativos en los niveles séricos hormonales a medida

que se acerca el parto. Sin embargo, los niveles séricos no reflejan necesariamente la actividad local de las hormonas en los tejidos: la acción ejercida por las mismas a nivel tisular depende de varios factores (concentración de hormona libre, metabolismo local, etc). Desde hace un tiempo se considera que uno de las principales variables a tener en cuenta en la acción ejercida a nivel de los tejidos por las hormonas es la concentración, afinidad y porcentaje de ocupación de sus receptores específicos en las células blanco (Fuchs y Fuchs, 1984). En consecuencia, el nivel de expresión de un receptor específico en un tejido particular ha sido usado como un índice del grado de sensibilidad a una hormona (Katzenellenbogen, 1980). La mayoría de las células expresan receptores de hormonas esteroides; sin embargo algunos órganos blanco, como el útero, expresan muy altas cantidades en comparación con otros tejidos. Si bien no se ha determinado aún cuántos receptores son necesarios para que una célula genere respuesta a la hormona, se considera que células con mayor cantidad de receptores generan una respuesta mayor frente a los cambios en las concentraciones plasmáticas de su hormona específica (Ing, 1999). Un aspecto interesante es que los niveles de receptores de hormonas esteroides son controlados por diversos factores, entre ellos, las mismas hormonas que actúan como ligandos específicos (Clark y Mani, 1994; Ing, 1999). Los avances en la comprensión de la biología molecular y celular de los receptores hormonales nucleares extendieron el marco conceptual con el que se puede analizar las acciones a nivel tisular de los Eg y otras hormonas que actúan a través de receptores nucleares. La acción de un Eg en particular dependería de tres componentes principales: a) la estructura del ligando, b) el tipo de RE con el que el ligando se une para formar un complejo binario ligando-RE con una conformación particular, y c) la interacción de este complejo binario con una batería de moléculas efectoras (coactivadores o correpresores) que le permiten al receptor interactuar con el aparato regulatorio del gen (Ing, 1999; Katzenellenbogen y Katzenellenbogen, 2000; Diel, 2002). Otro punto importante a considerar es que, aunque la célula exprese un determinado receptor, no todos los genes que contienen elementos de respuesta hormonal (ERH) serán activados. La mayoría están silentes debido a su empaquetamiento en la estructura de la cromatina, la cual se modifica durante el desarrollo y el

crecimiento cambiando la accesibilidad de los receptores una vez activados (Clark y Mani, 1994). En definitiva, la acción de una hormona depende en gran parte de la existencia de receptores celulares y la maquinaria post-receptor a la cual el receptor está acoplado (Ing, 1999). Teniendo en cuenta estos aspectos del mecanismo de acción hormonal, en los puntos siguientes describiremos brevemente la biología del RE y del receptor de Pg (RP).

3.2. Receptores de hormonas esteroides

Los receptores de esteroides son factores de transcripción activados por ligando que actúan normalmente por unión a secuencias específicas del ADN (ERH) (Beato y Sánchez-Pacheco, 1996). Estos receptores pertenecen a la superfamilia de los receptores nucleares cuyos miembros se encuentran entre los primeros factores de transcripción clonados y caracterizados (Evans, 1988; Tsai y O'Malley, 1994).

La biología de la superfamilia es compleja, con ejemplos de múltiples genes para receptores que unen una misma hormona (designados alfa, beta, gamma), ARNm múltiples a partir de un mismo gen (generados por activación de diferentes promotores y *splicing* alternativos) y formas de proteínas múltiples (designadas A, B, C) (Ing, 1999). Determinados elementos estructurales, llamados dominios, son comunes a todos los miembros de la familia de los receptores de esteroides (Figura 10): dominio amino terminal llamado **A/B**, usualmente contiene una función de activación (AF-1) que contribuye a la actividad transcripcional del receptor y es independiente del ligando. Adyacente al dominio A/B se encuentra el dominio **C** de unión al ADN que es la zona más conservada entre los distintos receptores. Este dominio posee un motivo de dos dedos de zinc coordinados por ocho residuos de cisteína estrictamente conservados. Una pequeña región bisagra o dominio **D** permite que el receptor cambie su conformación o se pliegue, está menos caracterizada y es pobremente conservada entre los distintos receptores. Por último, el dominio carboxi-terminal, o dominio **E/F**, contiene capacidad de unión a ligando y una función de transactivación 2 (AF-2), la que en la mayoría de los receptores es dependiente de la presencia del ligando (Petterson y Gustafsson, 2001).

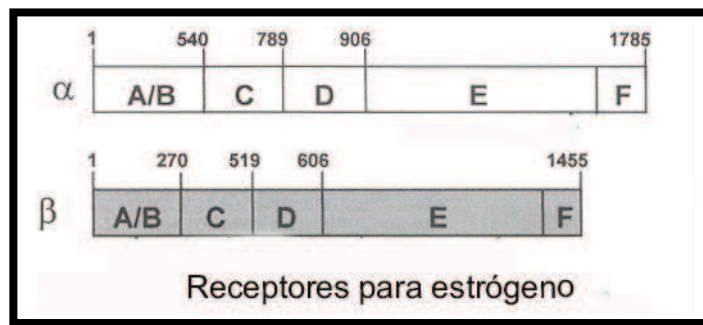


Fig. 10: Esquema de los dominios presentes en la estructura proteica de los receptores para estrógeno descriptos: α y β . *Modificado de Pillai y col. Biol Reprod 67: 1919-1926, 2002.*

3.3. Biología de RE y de RP

La presencia de receptores de unión para Eg en el útero fue descrita en la década del 60 por los trabajos de Jensen y Jacobsen (1962) y Toft y Gorski (1966). Durante años se creyó que sólo existía un tipo de receptor en el núcleo de la célula blanco, sin embargo, en 1996 se descubre un segundo mediador de los efectos fisiológicos del E₂ que fue llamado receptor de estrógeno beta (RE β), y al receptor clásico se lo denominó RE alfa (RE α) (Kuiper y col., 1996). Estos receptores son proteínas diferentes codificadas por genes que están localizados en distintos cromosomas (Kuiper y col., 1996). Ambos subtipos poseen los dominios ya definidos y tienen una alta afinidad a la hormona, pero su expresión es diferencialmente regulada (Kuiper y col., 1997). El análisis molecular de ambos receptores reveló que presentan un 95% y un 55% de homología en el dominio de unión a ADN y en el dominio de unión a ligando, respectivamente (Kuiper y col., 1997).

Inicialmente, el reconocimiento de las funciones del RE β recayó principalmente en su homología con el RE α . Sin embargo, nuevos estudios han demostrado que las diferencias en las secuencias de algunos de sus dominios, particularmente AF-1 y AF-2, resulta en funciones diferentes (Cowley y col., 1997; Pasqualini y col., 1999; Dupont y col., 2000). Los dominios AF son los encargados de interactuar con una serie de cofactores tales como los coactivadores de receptores esteroides y otros

factores de transcripción ubicuos que regulan la expresión de genes corriente abajo. La distribución y el nivel relativo de los RE varía entre los diferentes órganos blanco. En la rata hembra adulta se ha descrito la mayor expresión de RE α en el útero y en la hipófisis, mientras que la mayor expresión de RE β fue observada en ovario y cerebro (Kuiper y col., 1997). Con respecto a este último receptor, el conocimiento sobre su distribución ha sido establecido mediante estudios de ARNm por RT-PCR e hibridación *in situ* (Kuiper y col., 1997), mientras que a nivel proteína los resultados aún son contradictorios (Wang y col., 2000; Weihua y col., 2000; Okada y col., 2002; Mendoza-Rodriguez y col., 2003).

En general el mecanismo de acción de ambos RE se cree que es similar. Cuando el receptor se une a la hormona se activa y se produce su dimerización. El receptor transformado se une a los ERH localizados en la región promotora de los genes sensibles. Además, el RE α puede formar heterodímeros con RE β en las células que coexpresan ambos receptores. Por lo tanto, los RE tienen la habilidad de interactuar con los genes blanco formando tres complejos diferentes: homodímeros de RE α , homodímeros de RE β y heterodímeros RE α /RE β (Pavao y Traish, 2001).

Un aspecto muy importante en la biología del RE es que el RE α en parte es regulado negativamente por el nuevo receptor descrito: el RE β . En respuesta a Eg, RE β puede activar los mismos genes que RE α pero con menor eficiencia. Sin embargo, se describió una potente acción del RE β como inhibidor dominante de la actividad transcripcional y de la proliferación celular promovida a través del RE α en células que coexpresan ambos receptores (Maruyama y col., 1998; Kass y col., 2004). Estos resultados son apoyados por el incremento significativo en la sensibilidad a Eg observado en el útero de ratones deficientes genéticamente en RE β (Weihua y col., 2000).

Respecto a los receptores que específicamente unen Pg (RP), éstos fueron inicialmente caracterizados en el útero de mamíferos en 1970 (Milgrom y Baulieu, 1970). En este caso un único gen codifica para RP y puede producir 9 transcritos

diferentes mediante mecanismos de *splicing* diferenciales. En varias especies animales se han reportado 4 isoformas proteicas, 2 de ellas son las más abundantes en humanos y roedores: RP-A (81-83 kDa) y RP-B (116-120 kDa) (Funk y DeMayo, 1999). Estas isoformas se originan por la activación de diferentes sitios promotores: RP-A, es una isoforma naturalmente truncada de RP-B, funciona como un transactivador en algunas células en las que actúa como homodímero y como represor del RP-B cuando ambas isoformas están presentes (Graham y Clarke, 1997, Pieber y col. 2001).

3.4.El control hormonal de los receptores

El útero de la rata ha servido como un excelente modelo para el estudio de los efectos de las hormonas esteroides sobre sus propios receptores. Los Eg y la Pg regulan numerosos procesos fisiológicos que ocurren en el útero a nivel molecular y celular. Los Eg estimulan una gran variedad de respuestas uterotrópicas en algunas especies mientras que los efectos de Pg son, en general, antagonistas de las acciones estrogénicas (Kraus y Katzenellenbogen, 1993). Por otro lado, algunas acciones de Pg son dependientes de una exposición previa a Eg (Katzenellenbogen, 1980). El interjuego de ambas hormonas es fundamental para el control de los eventos uterinos durante situaciones fisiológicas como el ciclo estral, la preñez y el parto (Clark y Mani, 1994).

Es importante destacar que la regulación de la expresión de los receptores hormonales es específica de cada tipo celular y que la respuesta del útero a la estimulación de un esteroide es el resultado de las respuestas combinadas de los varios tipos celulares que lo componen. Las acciones antagónicas de Eg y Pg, observadas en el útero, resultan de una regulación interdependiente de la expresión de $RE\alpha$ y RP (Katzenellenbogen, 1980). En general, el $RE\alpha$ en el útero es regulado hacia abajo en respuesta a altos niveles de Eg y Pg (Kraus y Katzenellenbogen, 1993; Ing, 1999). En el caso de los Eg en el útero del ratón, Tibbets y col (1998) demostraron que ejercen efectos específicos sobre cada receptor dependiendo del compartimiento celular. Concretamente, el $RE\alpha$ presenta una disminución en el compartimiento estromal y en el epitelio glandular

del útero, mientras que -por el contrario- se observa un aumento en el epitelio luminal y el miometrio. Por otro lado, estos autores observaron que los Eg ejercen un efecto dual sobre el RP, disminuyendo el nivel de expresión en el epitelio luminal y aumentando su expresión en el resto de los compartimientos mencionados. También demostraron la regulación hacia abajo que ejerce la Pg sobre su propio receptor y que es más prominente en el epitelio glandular. Este trabajo plantea claramente los efectos pleiotrópicos de Eg y Pg en el útero de ratones adultos, mediados por una compleja inter-regulación hormonal de $RE\alpha$ y RP en los compartimientos uterinos específicos (Tibbets y col., 1998).

En varios órganos y tejidos, y dependiendo de la situación fisiológica, el RP ha sido considerado como una proteína inducida por Eg (Ing, 1999). Sin embargo, sorpresivamente se ha observado que el RP es regulado hacia abajo por Eg en el epitelio luminal del útero de la rata y el ratón (Parczyk y col., 1997; Tibbets y col., 1998; Kurita y col., 2000). Estudios recientes han demostrado que la inducción de RP por Eg es compleja y ambos RE podrían participar de su control (Kurita y col., 2001).

3.5. Modelos de inicio del parto

Durante la gestación, las contracciones del miometrio uterino están inhibidas, mientras que la estructura del cérvix uterino permanece cerrada y de consistencia rígida e inextensible. Por más de 60 años, ha sido atribuido a la Pg el rol de agente inhibidor de la contracción del útero. Por ello, el inicio del parto ha sido considerado como una salida de este estado inactivo del músculo uterino gracias a una liberación del bloqueo ejercido por la Pg (Csapo y Pinto-Dantas, 1965). Los Eg también son reguladores críticos del parto, oponiéndose a la acción de la Pg, promoviendo la actividad contráctil del miometrio uterino por el estímulo de los genes de proteínas activadoras de la contracción (CAPs), tales como las proteínas que forman los canales iónicos, receptores para PGs y OTR y *gap junctions*, evento conocido como activación por Eg. Por lo tanto, el inicio del parto estaría determinado por una disminución de la acción de bloqueo que la Pg ejerce durante la mayor parte de la preñez (caída de la Pg) asociada a un incremento de los Eg (activación de los Eg) (Challis y Lye, 1994; Lye, 1996; Mesiano, 2004).

Actualmente se sugieren tres posibles mecanismos por los cuales se produciría el inicio del parto, que varían según las especies analizadas. Estos mecanismos serían: a) luteolítico, b) mediado por ACTH-cortisol fetal, y c) caída funcional.

3.5.a. Luteólisis

En varias especies el cuerpo lúteo se mantiene como la fuente principal de Pg hasta el final de la gestación. Al acercarse el momento del parto se produce la regresión del cuerpo lúteo (luteólisis), ocasionando la caída de los niveles séricos de la Pg y una caída del efecto de la hormona sobre sus órganos blanco. Asociado con esta caída y, en sentido inverso, ocurre un incremento de los niveles séricos de Eg. Estos fenómenos darían comienzo al parto. Este mecanismo está descrito en ratas, ratones, conejos, cabras y cerdos (Fields y Fuchs, 1999).

3.5.b ACTH-cortisol fetal

El mecanismo de inicio del parto en la oveja ha sido ampliamente estudiado y gran parte de sus pasos están claramente establecidos. En esta especie la señal que desencadena el inicio del parto proviene del feto. El núcleo paraventricular fetal estimula la síntesis y liberación de cortisol por la hipófisis fetal. El aumento en los niveles de cortisol induce un aumento en la producción de 17 α -hidroxilasa, la enzima placentaria que convierte Pg en Eg. Se produce entonces un aumento en los niveles circulantes maternos de Eg y, al mismo tiempo, una disminución de la Pg desencadenando el parto (Fields y Fuchs, 1999; Nathanielsz y Smith, 1999).

3.5.c Mecanismos funcionales

El tercer mecanismo es el sugerido para cobayos, primates y humanos. En estas especies, a diferencia de las mencionadas en los dos puntos anteriores, el parto se desarrolla sin una caída significativa de los niveles séricos de Pg ni con un manifiesto incremento de los Eg. La luteólisis ocurre en la gestación temprana y luego la síntesis de Pg y Eg queda a cargo de la placenta. Además, la placenta no expresa actividad 17 α -hidroxilasa. Por lo tanto, en estas especies animales, ni la luteólisis ni la conversión placentaria de Pg a Eg son mecanismos que podrían

estar relacionados con el inicio del parto. Se ha propuesto entonces que el parto en estas especies debe estar asociado a un mecanismo de “caída funcional de la Pg”, que no se reflejaría en los niveles séricos. Entre los mecanismos propuestos están: a) disminución en las concentraciones de RP en los órganos blanco, b) cambios en la relación de isoformas RP-A/RP-B, c) unión de la Pg a una proteína de alta afinidad con la consecuente disminución en los niveles de hormona libre, y d) transformación a nivel local de la Pg a un metabolito inactivo (Nathanielsz y Smith, 1999; Pieber y col., 2001). Ninguna de todas estas opciones están claramente demostradas y, por ello, aún existen controversias en cuál sería el mecanismo responsable de iniciar el parto. De la misma manera que para una caída en la acción de la Pg en estas especies se han propuesto mecanismos funcionales, la activación por Eg estaría mediada por cambios funcionales en la capacidad de respuesta del útero a los Eg circulantes, es decir, por mecanismos de activación funcional del Eg, el cual consistiría en cambios en la expresión de los RE (Mesiano y col., 2002; Mesiano, 2004).

3.6. Consideraciones adicionales para especies que cursan el parto sin variaciones de Pg y Eg

A partir de los resultados de numerosos trabajos realizados para evaluar el efecto de la Pg y sus antagonistas sobre el inicio del parto, algunos autores propusieron que el parto está dividido en dos etapas o fases: la primera relativamente larga, **fase preparatoria o condicionante**, y la segunda corta y rápida, la **fase activa** (Figura 11). Durante el transcurso de la fase preparatoria ocurrirían cambios en el miometrio y el cuello uterino que prepararían a estos órganos para responder adecuadamente en la segunda fase a la acción de los distintos agentes activadores del parto. En el miometrio, estos cambios adaptativos de la fase preparatoria son el aumento en la expresión de Cx-43, uniones *gap*, canales iónicos, receptores para OT y PGs, mientras que en el cérvix los cambios adaptativos consistirían en un aumento en la remodelación del tejido conectivo con una disolución gradual de las fibras de colágeno y una infiltración de células inflamatorias (Garfield y col., 1998; Muñoz-de-Toro y col., 2003).

En esta fase preparatoria ha sido incluido el cérvix, ampliando las evidencias por las cuales el cuello uterino, junto con los demostrados para el útero, son los componentes centrales en el mecanismo del parto (Garfield y col., 1998). Nosotros sugerimos recientemente que también debería ser incluida la sínfisis, debido a que observamos en la sínfisis cambios similares a aquellos por los cuales se incluye al cérvix en esta fase (Rodríguez y col., 2003a).

De acuerdo con este modelo dual de fase preparatoria y activa, a lo largo de la gestación habría cambios en la “susceptibilidad” del tejido (*responsiveness*). El mecanismo que controlaría este proceso de maduración de los órganos ocurriría a nivel de la regulación de RE y RP tisulares, debido a que la susceptibilidad a Pg y Eg en el órgano blanco podría deberse al tipo y cantidad de los receptores específicos presentes en el tejido (Mesiano y col., 2002). Esta última hipótesis no ha podido confirmarse debidamente ni tampoco se han podido establecer cuáles son los mecanismos que regularían los cambios en la expresión de los receptores.

Por otro lado, también se ha demostrado que varias moléculas asociadas temporalmente con el parto muestran una regulación espacial además de la temporal. Evaluando la producción de ON en útero y cérvix de mujeres durante el parto, Buhimschi y col. (1996) hallaron que los niveles de ON en el útero caen abruptamente en el parto y el posparto, mientras que en el cérvix se produce un incremento en el mismo momento. Sparey y col. (1999) demostraron que en mujeres la proteína miometrial formadora de uniones *gap*, Cx-43, se expresa en mayor cantidad en el segmento uterino alto (SUA) comparativamente al bajo (SUB), y que esta diferencia se profundiza significativamente en el momento del trabajo de parto. De esta manera, la expresión diferencial de Cx-43 permitiría la propagación de las contracciones en la dirección SUA hacia SUB, facilitando de esa manera la expulsión del feto.

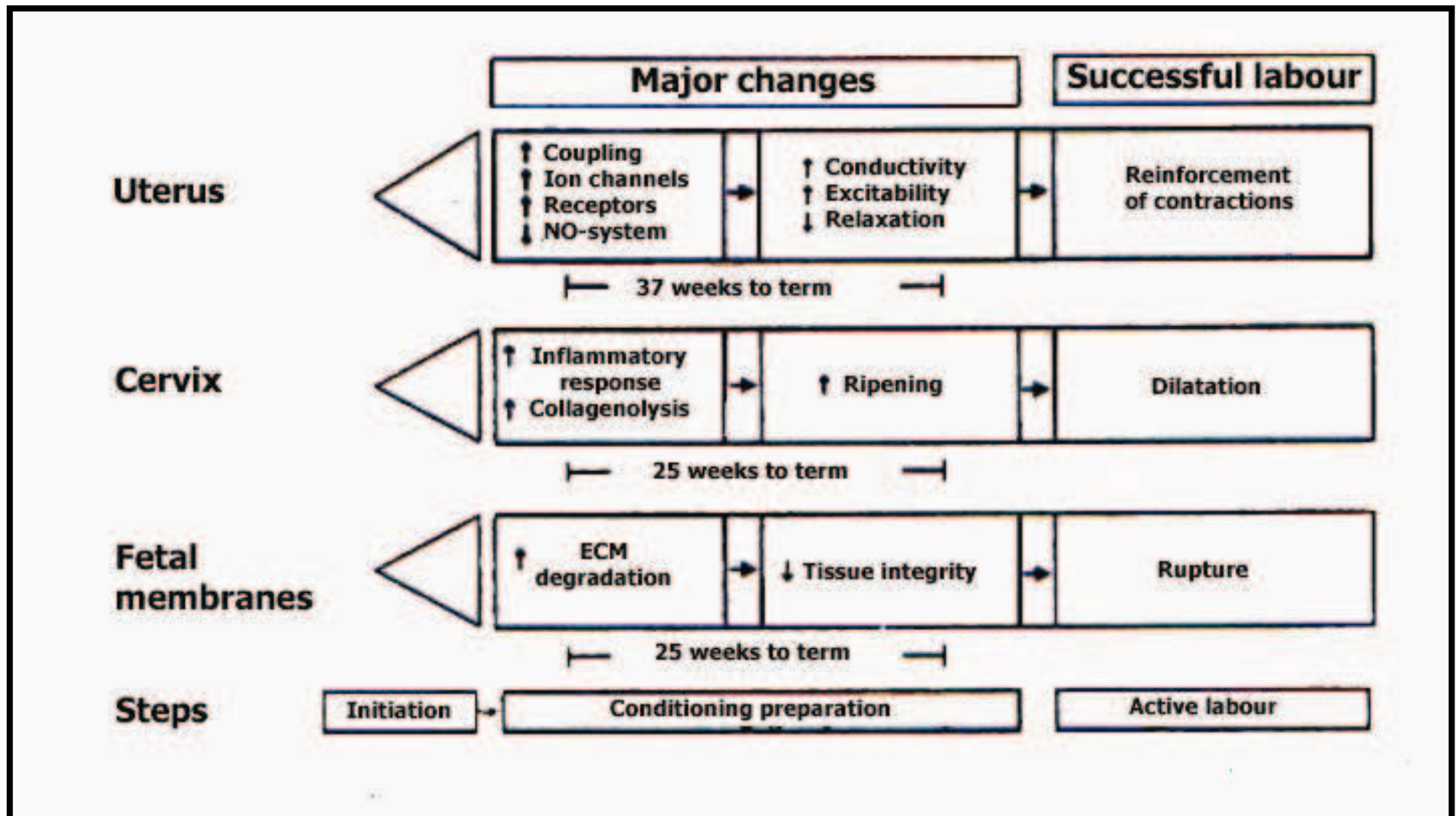


Figura 11: Modelo propuesto para el parto en el humano, indicando la existencia de una fase condicionante para útero (miometrio), cérvix y membranas fetales. *Modificado de Garfield y col. Human Reproduction Update, 4: 673-695, 1998.*

A raíz de estas consideraciones, algunos autores (Challis y col., 2000) recientemente propusieron que en las especies con altos niveles séricos de Pg durante el parto esta hormona sería la encargada de efectuar una regionalización del útero: en el SUA habría una caída en la acción de la Pg sobre el tejido, mientras que en el SUB se daría un aumento de la acción ejercida por la hormona o se mantendría sin variaciones. De esta manera, la liberación del bloqueo sobre la actividad contráctil del útero se efectuaría en la dirección SUA hacia SUB, permitiendo la expresión de las proteínas CAPs de forma preferencial en el SUA. De esta manera, las contracciones uterinas se propagarían en la dirección SUA hacia SUB, facilitando de esa manera la expulsión del feto. Si esta hipótesis es correcta, los altos valores plasmáticos de Pg, junto con eventos locales de regulación de la acción de la Pg, son necesarios, de tal manera de producir cambios sectorizados en la susceptibilidad del órgano blanco a la acción de la hormona.

3.7. Modelo animal propuesto: Similitudes en la biología del parto entre la mujer y el cobayo.

Las ideas mencionadas y discutidas anteriormente presentan serios inconvenientes para poder ser investigadas en estudios en humanos. A las dificultades de obtener muestras de cérvix de mujeres en cantidad suficiente para estos estudios, se le agrega la imposibilidad ética de diseñar estudios que abarquen toda la gestación, el parto y el posparto (Rajabi y col., 1988; Challis y Lye, 1994). Por estos motivos, se hace necesario el estudio de la fisiología del parto en un modelo animal semejante al humano.

El cobayo es un miembro del orden Rodentia, suborden Hystricomorpha, familia Caviidae, género *Cavia*, especie *porcellus*: *Cavia porcellus*. Es un animal de laboratorio ampliamente usado en líneas de investigación relacionadas con la endocrinología de la reproducción. Entre sus características más sobresalientes podemos destacar su naturaleza dócil y que presenta grandes similitudes reproductivas con la mujer (Trewin y Hutz, 1999). La gestación en el cobayo tiene una duración promedio de 63-68 días y puede ser dividida en tres “trimestres” de aproximadamente 3 semanas cada uno. La cantidad de crías por cada parto es generalmente entre 1 y 3, y la longitud de la

gestación se correlaciona con el número de fetos, de tal manera que un mayor número de crías se asocia con una gestación más corta. Los fetos son palpables a partir de la 4°-5° semana de gestación y al momento del parto alcanzan un peso promedio entre 60-100 g. En el posparto, la lactancia dura hasta los 14-21 días de edad de las crías, cuando ya han alcanzado un peso de 150-200 g (Trewin y Hutz, 1999).

Una serie de características son compartidas entre cobayos y mujeres:

- a)** no hay caída en los niveles séricos de Pg previo al parto
- b)** en la preñez avanzada, la secreción de Pg proviene de la placenta y, por lo tanto, esta secreción no es interrumpida por la castración
- c)** no hay un incremento significativo de los niveles séricos de Eg previamente al inicio del parto
- d)** la administración de Eg luego del “primer trimestre” de la gestación no induce aborto ni parto prematuro
- e)** la administración de dexametasona no induce parto prematuro
- f)** la respuesta contráctil del miometrio a PGE_2 es mucho más intensa que a $PGF_{2\alpha}$, por lo que PGE_2 es más efectiva como tratamiento en la inducción del aborto
- g)** la duración de la gestación es relativamente larga
- h)** las ratas y los conejos tienen un comienzo de trabajo de parto rápido, mientras que cobayos, humanos y primates no-humanos poseen un trabajo de parto de desarrollo lento.

Este conjunto de similitudes hacen del cobayo un modelo animal adecuado para el diseño de estudios de la fisiología de reproducción humana y, más concretamente, de estudios relacionados con el mecanismo del parto (Chwalisz, 1994; Trewin y Hutz, 1999).

Objetivos

Objetivos

Objetivo General

De lo comentado en la introducción, surge la hipótesis de que en las especies sin cambios abruptos en los niveles circulantes de esteroides ováricos (ie: caída de Pg e incremento de Eg) inmediatamente antes del parto, el inicio del mismo involucraría cambios en la susceptibilidad del útero a estos esteroides circulantes. Nosotros postulamos que estos cambios en la susceptibilidad: ocurren en todo el canal de parto y son los encargados de sincronizar las adaptaciones de los órganos durante la etapa preparatoria del mismo. Por lo tanto, en los tejidos de los órganos involucrados en el parto (útero, cérvix y sínfisis púbica) ocurrirían mecanismos funcionales que modifican la respuesta del tejido a la Pg y los Eg en circulación.

El uso del cobayo nos permitió investigar nuestra hipótesis en un modelo animal con una endocrinología de la preñez y del parto similar a la de la mujer (Chwalisz, 1994; Trewin y Hutz, 1999).

Objetivos Específicos

1. Determinar los niveles séricos de Pg y Eg durante la gestación y el parto.
2. Establecer, durante la gestación, el parto y el posparto, si la infiltración leucocitaria y la remodelación del colágeno ocurren asociados temporalmente y si hay diferencias entre ambos procesos según las zonas del útero y el cérvix analizadas.
3. Investigar en el ligamento interpúbico y en los diferentes compartimientos tisulares del útero y el cérvix, si la expresión de RE α y RP se modifica previamente al parto.
4. Correlacionar la expresión de RE α y RP en el útero y el cérvix con la remodelación del colágeno.

5. Determinar la expresión de ARNm de RE α y RE β en útero, cérvix y sínfisis púbica.

Materiales y Métodos

4. Materiales y Métodos

4.1. Animales

Se utilizaron cobayos de la cepa *American Short Hair*, provenientes del Bioterio del Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral. Los animales fueron mantenidos con ciclo de luz-oscuridad controlado (luces prendidas entre 6:00-20:00 hs), temperatura de 20-24°C y alimento balanceado comercial para conejos (Avigan, Esperanza, Santa Fe). Los animales recibieron suplemento con heno y vitamina C (0,5 g/kg). Antes de ser asignadas a los diferentes grupos experimentales, hembras adultas de 15 semanas de edad (350 g) fueron examinadas diariamente durante al menos dos ciclos consecutivos para determinar el día de la apertura vaginal. El día con apertura vaginal completa fue usado para identificar el comienzo del estro y se designó como el primer día (D0) del ciclo estral (Jurow y Arbor, 1943; Croix y Franchimont, 1975). Los animales preñados se obtuvieron colocando hembras adultas en jaulas colectivas con un macho de fertilidad comprobada. Diariamente se efectuaron 2 extendidos vaginales (uno por la mañana y otro por la tarde), para determinar la presencia de espermatozoides, considerándose día 1 (D1) de gestación cuando el examen fue positivo. Posteriormente, las hembras preñadas se colocaron en jaulas individuales hasta el momento del parto.

Se sacrificaron cobayos machos y hembras no preñadas (animales adultos de 15 semanas de edad) y cobayos hembras en distintos estadios de la gestación y posparto (Tabla 1). Las hembras no preñadas fueron sacrificadas en el estro. Los animales clasificados como posparto inmediato (PPI), fueron hembras sacrificadas dentro de un lapso no mayor a 1,5 horas después de la expulsión del feto/s. Junto con la longitud de la gestación, se registró la dilatación de la sínfisis púbica (Ortega y col., 2003). Todos los animales correspondientes al D63 tuvieron una dilatación igual o mayor a 15 mm. Como ha sido descripto en la literatura, esta dilatación indica que el parto va a suceder en un lapso no mayor a 48 hs (Trewin y Hutz, 1999). Además de los cobayos, también se utilizaron ratones hembras sexualmente maduras (8 semanas de edad). En

estos animales el ciclo estral fue determinado mediante extendidos vaginales diarios, y los animales se sacrificaron en el mediodía del estro.

Tabla N° 1: Grupos experimentales y número de animales (N) estudiados.

Animales experimentales	N
Hembras en estro (Es)	5
Día 21 (D21) de gestación (3era semana)	3
D28 (4ta semana) de gestación	3
D35 (5ta semana) de gestación	3
D42 (6ta semana) de gestación	5
D49 (7ma semana) de gestación	5
D56 (8va semana) de gestación	5
D63 (9na semana) de gestación	5
Hembras en el posparto inmediato (PPI)	5
1 día posparto (1DPP)	7
3DPP	5
5DPP	4
7DPP	4
10DPP	4
15DPP	4
30DPP	4

4.2. Obtención y procesamiento de las muestras

4.2.1. Cirugías

Antes de la cirugía se sumergió el instrumental en alcohol al 70%. Los cobayos fueron sacrificados por decapitación. Se recogió sangre entera en tubos de hemólisis, se dejó coagular a 37°C durante 15 minutos (min), se centrifugó, y el suero se colocó en tubos eppendorf de 1,5 ml para almacenarlo a -80°C. Se coloca al animal en la tabla de disección sujetándolo de las cuatro patas, con el abdomen hacia arriba. Luego se levanta la piel con pinza de punta "diente de ratón" a unos 1,5 cm del orificio vaginal y con la tijera de punta roma se practica una incisión en un ángulo de 45° hacia los laterales hasta la altura de las últimas costillas, quedando expuestos los músculos abdominales en los que se practica la misma maniobra quirúrgica, exponiendo la cavidad abdominal. Con pinza anatómica de punta roma se separaron las asas intestinales y la grasa mesentérica hacia un lado, visualizando el aparato genital interno junto con los fetos (para hembras preñadas). Con tijera de punta fina se procedió a disecar los fetos y con pinza anatómica de punta roma se extrajeron los fetos y sus respectivas placentas. De forma inmediata, se observaron y registraron sus características generales (color, aspecto, tamaño, etc.). Luego se disecaron la vagina, el cérvix, los cuernos uterinos, y el ligamento interpúbico. Estas muestras fueron destinadas para procesamiento histológico. Una porción del cérvix, de los cuernos uterinos y del ligamento interpúbico fue obtenida en condiciones de esterilidad, pesada, congelada inmediatamente en nitrógeno líquido y conservada a -80°C para su posterior procesamiento para extracción de ARN o de proteínas.

Mediante un procedimiento quirúrgico similar al descrito previamente, se obtuvieron muestras de cuernos uterinos de ratones hembras no preñadas, en estro. Estas muestras fueron inmediatamente sumergidas en nitrógeno líquido y conservadas a -80°C hasta su posterior homogeneización y obtención de proteínas.

4.2.2. Procesamiento histológico

Las muestras destinadas a procesamiento histológico se sumergieron en una solución de formol al 4%, tamponada a pH = 7,5 con PBS. La fijación se realizó durante 6 hs a temperatura ambiente (TA), luego se efectuaron dos lavados de

10 min cada uno con PBS y la muestra se colocó en una solución de alcohol al 70%. Posteriormente, las muestras fueron procesadas hasta su inclusión en tacos de parafina siguiendo técnicas histológicas de rutina (Junqueira y Junqueira, 1983). Las muestras se ubicaron en los tacos de tal forma de poder obtener cortes que abarquen todo el órgano a lo largo del eje longitudinal. Los tacos fueron cortados en un micrótomos rotativo manual (Leica Jung RM 2025), obteniendo cortes de 5 μ m de espesor. Dichos cortes se montaron sobre portaobjetos previamente tratados con 3-aminopropyl triethoxysilane (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) como sustancia adherente. Al menos un corte de cada muestra fue teñido de rutina con Hematoxilina-Eosina y Picrosirius-Hematoxilina para realizar una evaluación microscópica general. El resto de los cortes fueron sometidos a diferentes tinciones, las que se mencionan en las secciones correspondientes.

4.2.3. Extracción de ARN

Se realizó extracción de ARN en porciones de cervix, cuernos uterinos y sínfisis púbica con el kit comercial “TRIzol Reagent” (Invitrogen Argentina, Buenos Aires, Argentina), siguiendo las instrucciones del fabricante. Este procedimiento es una modificación a la técnica de aislamiento de ARN total descrita por Chomczynski y Sacchi (Chomczynski y Sacchi, 1987) y se basa en el uso de una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina. En el contenedor del homogeneizador Ultra Turrax® T25 Basic (IKA®- Werke GMBH & Co.KG, Staufen, Germany) se agregó 1000 μ l de reactivo TRIzol por cada 50-100mg de tejido congelado, y se homogeneizó suavemente utilizando un vástago tipo 8 G. Durante la homogeneización de la muestra el reactivo preserva la integridad del ARN. El agregado de cloroformo y posterior centrifugación, separa la solución en una fase acuosa y otra fase orgánica. El ARN permanece exclusivamente en la fase acuosa, de donde es recuperado por precipitación con alcohol isopropílico, lavado con etanol al 80% y redisoluelto en agua libre de ribonucleasas.

4.2.3.1. Lectura espectrofotométrica de ácidos nucleicos

La concentración final de ARN en las muestras procesadas se estimó mediante la lectura en espectrofotómetro (Beckman DU® 530) de una dilución 1/100 de las mismas. En los ensayos realizados solamente se utilizaron muestras que presentaron una relación mayor a 1,9 entre las absorbancias obtenidas a 260nm (punto de máxima absorción de ácidos nucleicos) y 280nm (punto de máxima absorción de proteínas). Para el cálculo de la concentración de ARN se utilizó la siguiente fórmula:

$$\begin{aligned} 1 \text{ unidad de Abs.}_{260} &= 40\mu\text{g Ac. ribonucleico/ml} \\ \text{Abs.}_{260} \times 40\mu\text{g/ml} \times 100 &= [\text{ARN}] \mu\text{g/ml} \end{aligned}$$

4.2.3.2. Geles de agarosa con formaldehído

La integridad física del ARN extraído se constató a través de la visualización de las bandas correspondientes a los ARN ribosomales en geles de agarosa con formaldehído. Para la preparación de estos geles se utilizaron materiales y soluciones estériles libres de ribonucleasas. Las electroforesis se realizaron en geles de agarosa al 1,5% con 7% de formaldehído utilizando buffer MAE 1X (MOPS pH 7 20 mM; Acetato de sodio 2 mM; EDTA 1 mM) como solución reguladora. La solución de siembra se preparó en un tubo con 20μg de ARN incógnita, 2μl de buffer MAE 10X, 4μl de formaldehído 37%, 10μl de formamida, 0,5μl de bromuro de etidio (500μg/ml), 2μl de buffer de siembra y se completó con agua estéril hasta 25μl. Las corridas se realizaron en una cuba de electroforesis horizontal Bio-Rad Power Pac® 300 manteniendo el voltaje constante a 60V y se revelaron los geles en un transiluminador Fotodyne® Foto/UV® 15.

4.2.4 Extracción de proteínas

Se obtuvieron extractos proteicos de cuernos uterinos, cérvix y sínfisis de cobayo y cuernos uterinos de ratón. Estos últimos fueron usados como control positivo en los ensayos de *Western blot*. La extracción de los tejidos se realizó en buffer frío de lisis RIPA [Nonidet P40 1%, deoxicolato de sodio 0,5%, SDS 0,1%, EDTA 2mM, fluoruro de sodio 50 mM, vanadato de sodio 1mM, aprotinina 0,20 mg/ml (Sigma, St. Louis, MO, USA) en PBS, pH = 7], siguiendo

el protocolo descripto previamente (Maffini y col., 2002). El tejido es homogeneizado con un homogeneizador Ultra-Turrax T25 Basic (IKA®- Werke GMBH & Co.KG, Staufen, Germany), luego se agregan 100 µg/ml de fluoruro de fenilmetisulfonilo (PMSF), y se incuba la solución por 30 min a TA. El homogenato es centrifugado a 4°C por 20 min a 14.000 rpm, se recolecta el sobrenadante y se almacena a -80°C.

4.3. Determinación de las concentraciones séricas hormonales

Para la determinación de Pg y E₂ se utilizó el suero de los cobayos sacrificados por decapitación. La determinación de ambas hormonas se realizó mediante un análisis enzimoimmunométrico quimioluminiscente secuencial en fase sólida (Dancoine y col., 1997; Burtis y Ashwood, 1999). Se utilizó un analizador IMMULITE 2000 con el kit DPC-LKPG1, que incluye todos los reactivos utilizados (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, USA). En este sistema, todas las reacciones ocurren en una unidad de reacción donde las muestras son procesadas automáticamente por el sistema. Dentro de esta unidad se encuentra una pequeña esfera recubierta de anticuerpo policlonal de conejo anti-Pg o anti-E₂, el equipo coloca 50µl de la muestra a ser dosada (Figura 12A). Luego de 2 ciclos de incubación de 30 min cada uno, los tubos son centrifugados a través de su eje longitudinal a 8000 rpm para transferir el líquido a las cámaras de descarte (Figura 12B y 12C). Seguidamente, se incuba con la hormona sintética marcada con un ligando y fosfatasa alcalina conjugada con un anti-ligando. Finalmente se agrega el substrato quimioluminiscente y la luz emitida es medida a través de un tubo fotomultiplicador (Figura 12D).

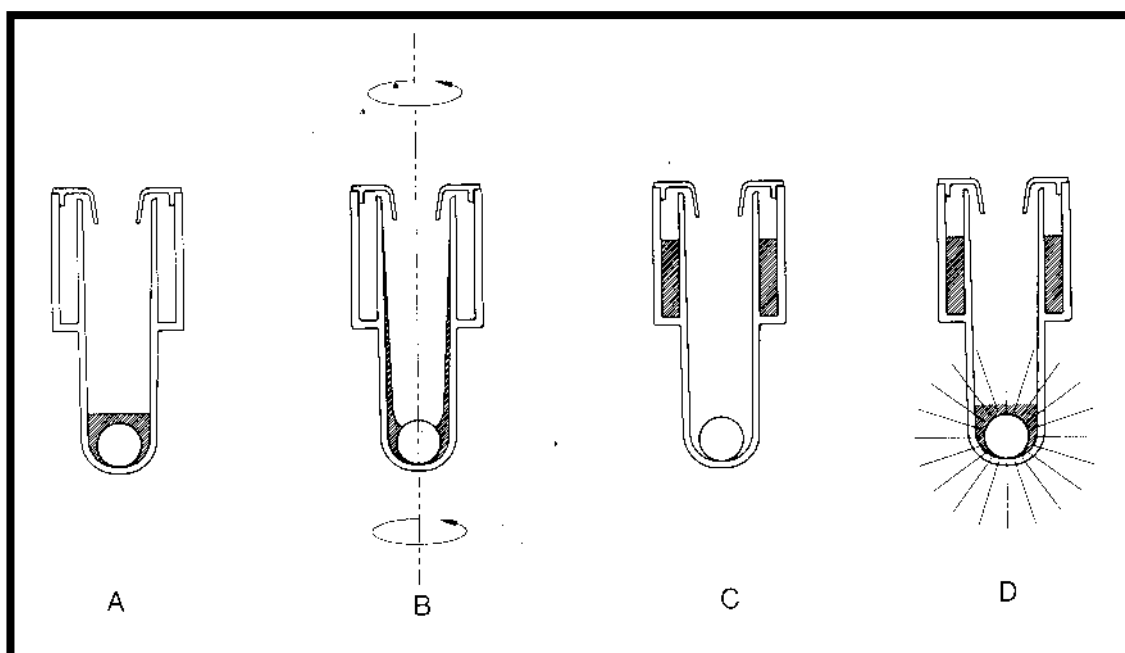


Figura 12: Esquema de funcionamiento del analizador IMMULITE 2000. Dentro de la unidad (A) se encuentra una pequeña esfera que está recubierta de anticuerpo policlonal anti-Pg o anti-E₂, y el equipo coloca 50µl de la muestra a ser dosada. Luego de 2 ciclos de incubación de 30 min cada uno, los tubos son centrifugados (B) a través de su eje longitudinal a 8000 rpm y así se transfiere el líquido de incubación a las cámaras de descarte (C). Seguidamente se incuba con la hormona sintética marcada con un ligando y fosfatasa alcalina conjugada con un anti-ligando. Finalmente se agrega el sustrato quimioluminiscente y la luz emitida (D) es medida a través de un tubo fotomultiplicador. En algunas muestras fue necesario realizar diluciones (con un diluyente provisto por el fabricante), para adecuarnos a los rangos de confianza del sistema. *Modificado de: Burtis y Ashwood, 1999: Principles of immunochemical techniques. En: Tietz Textbook of Clinical Chemistry. Burtis C.A. y Ashwood E.R., Ed: W.B.Saunders Company, Third Edition, USA.*

Según nuestro conocimiento, ésta es la primera vez que este sistema diagnóstico es usado para la medición de los niveles de hormonas séricas en muestras de cobayos, por lo que previamente se realizó la validación del método. Para ello, se midieron los niveles de Pg y E₂ en un grupo de sueros controles, se calcularon parámetros de desempeño analítico y se compararon los resultados obtenidos con los valores publicados en la literatura.

La mayoría de los perfiles hormonales del ciclo y gestación de los cobayos descritos en la literatura fue realizada por radioinmunoanálisis (RIA) (Challis y

col., 1971; Joshi y col., 1973; Hossain y col., 1979; Illingworth y col., 1974; Croix & Franchimont, 1975). En todos estos trabajos se debe realizar una extracción previa de los sueros, para extraer los esteroides de la matriz en la que están disueltos y recuperarlos en una fase orgánica. Para el caso de la Pg, en los sueros de los cobayos preñados es necesario agregar a la extracción, un paso de desnaturalización de las muestras con NaOH 2,5% p/v. Este paso se realiza para desnaturalizar una proteína de unión a Pg de alta afinidad, (Challis y col., 1971).

Por todo lo mencionado, para la validación del método propuesto hicimos la medición de las concentraciones de Pg y E₂ en sueros controles y provenientes de diferentes momentos de la gestación (D42 y D56), y hembras controles, esperando valores presumiblemente bajos, intermedios y altos, de acuerdo a la literatura. Cada una de estas muestras fue procesada por triplicado, y se ensayaron las siguientes condiciones para cada una:

- Muestras puras, sin extracción ni desnaturalización (P)
- Muestras puras con extracción (P+E)
- Muestras puras con extracción y desnaturalización (P+E+D)

Las interferencias por reactividad cruzada con otras sustancias para los dos antisueros (Pg y E₂) fueron determinadas por el fabricante como menor a 1,5%. La exactitud de los ensayos fue evaluada mediante la medición de cantidades conocidas de Pg (10, 100 y 300 ng/ml) y de E₂ (25, 35 y 50 pg/ml), disueltos en suero de macho pre-tratado con carbón activado (sueros controles). La variación intra-ensayo fue calculada como el promedio del coeficiente de variación de mediciones por sextuplicado de un suero control conteniendo 100 ng/ml de Pg o 35 pg/ml de E₂. Estos sueros control fueron corridos en todos los ensayos. El coeficiente de variación inter-ensayo fue calculado a partir de los resultados obtenidos de estos controles en todos los ensayos. La recuperación fue calculada a partir de un suero control de un macho castrado con 10 ng/ml de Pg. Los resultados de los diferentes ensayos fueron corregidos según la recuperación calculada.

4.4 Determinación de leucocitos polimorfonucleares que infiltran el cuello y el cuerpo del útero

Además del reconocimiento de sus características morfológicas distintivas observadas con Hematoxilina-Eosina, también se caracterizó la infiltración de polimorfonucleares neutrófilos mediante la tinción de Giemsa prolongado, adaptada para cortes en parafina. Los mejores resultados se obtuvieron desparafinando el corte hasta su inmersión en agua y luego sumergiendo el tejido en una dilución 1/10 del colorante durante 120 min.

Las muestras fueron observadas en MO con aumento de 100x. En cada corte de tejido coloreado con Giemsa se evaluaron morfométricamente 80 campos diferentes, contando el número de células que coincidían con las intersecciones de las líneas de un retículo graduado de 0,8 x 0,8 mm, ubicado en el ocular del microscopio. El número de campos que debían ser contados se determinó haciendo una gráfica de número de campos vs desviación estándar. Cuando la desviación estándar permanece constante, el número de campos que se corresponde con ese valor es el mínimo que se debe contar para cometer el menor error posible. Los neutrófilos que se contaron fueron aquellos que se ubicaron en el subepitelio del cérvix o del cuerno uterino. Se evaluaron dos cortes por animal y los resultados se expresaron como valores medios.

La variable morfométrica que se calculó para medir la infiltración celular por neutrófilos fue la densidad de volumen de los neutrófilos sobre cada corte de tejido (Gundersen y col., 1988). Para ello se empleó la relación de Weibel (1969):

$$V_v = P_i/P$$

donde:

V_v= densidad de volumen de un determinado componente (volumen de leucocitos/estroma del cérvix/útero).

P_i= número de puntos incidentes sobre el componente en estudio (puntos incidentes sobre neutrófilos).

P = total de puntos del retículo (total de puntos incidentes en el estroma del órgano evaluado).

4.5. Estudio de la distribución del colágeno

Debido a que las moléculas de colágeno normalmente se disponen en forma ordenada con una orientación paralela, una de las características clásicas de las estructuras de colágeno es presentar birrefringencia (Junqueira y col., 1978). De esta manera, el grado de organización de estas fibras está directamente relacionado con la birrefringencia de estas moléculas cuando son excitadas con una luz polarizada: una molécula ordenada de colágeno es altamente birrefringente, mientras que la birrefringencia cae cuando la molécula se desordena. Por lo tanto, cuando esta proteína presenta algún proceso de remodelación o degradación (colagenólisis) dicha birrefringencia disminuye considerablemente. Por otro lado, dichas moléculas son ricas en aminoácidos básicos, lo que les confiere gran avidez por los colorantes ácidos como el Picrosirius. Dicho colorante incrementa la birrefringencia de las moléculas ordenadas y enteras de colágeno, ya que adopta una disposición paralela a la de la fibra de colágeno. Esto último posibilita la evaluación cuantitativa de los niveles de colágeno organizado mediante la medición de la intensidad de birrefringencia, por el método de Picrosirius-polarización (Junqueira y col., 1978; Montes, 1996). Los cortes histológicos fueron teñidos con Picrosirius (solución saturada de Sirius rojo al 0,1% en ácido pícrico) durante 30 min y finalmente montados en resina sintética.

Para estudiar la organización del colágeno al MO, la luz polarizada fue obtenida mediante 2 filtros Polaroid: uno de ellos colocado sobre el condensador y el otro, sobre las objetivas del microscopio. La evaluación cuantitativa de los preparados se efectuó con el sistema de análisis digital de imágenes Image Pro-Plus 4.1.0.1® (Media Cybernetics, Silver Spring, MA, USA), conectada a una PC con procesador Pentium IV Intel. Las imágenes fueron generadas a través de una videocámara Sony ExwaveHAD, conectada a un microscopio Olympus BH2 con lámpara de tungsteno-halógeno de 12V/100W y fuente de energía estabilizada. Se utilizaron objetivas planoacromáticas de 4, 10, 20, 40 y 100 aumentos. El microscopio fue calibrado para lograr una iluminación de tipo Koehler, una imagen de un campo vacío se utilizó para calibrar la iluminación. Las imágenes se almacenaron en formato TIFF, con una resolución de 640x480 pixels de tamaño y 32 bits de profundidad de color.

Para la evaluación de los preparados, las imágenes se transformaron a escala de grises (256 tonos) y, utilizando una escala de calibración que asignaba un valor de 0 al background y 100 a la coloración mas intensa observada, se asignó un valor de intensidad de coloración al área evaluada. Para automatizar el proceso de medición, se generó un programa para cuantificar en forma automática la intensidad de la misma, utilizando el lenguaje de programación del sistema de análisis de imágenes. La valoración se efectuó en forma diferencial, evaluando las áreas correspondientes al estroma subepitelial del cérvix y de los cuernos uterinos.

4.6. Determinación de RE α y RP

4.6.1. Western blot

Para determinar la expresión de RE α y RP en cobayos se usaron anticuerpos primarios generados para su uso en biopsias de otras especies. Por lo tanto, antes de su uso en inmunohistoquímica, se confirmó la especificidad de los anticuerpos contra RP y RE α de cobayos por medio de la técnica de *Western-blot*. Las proteínas del homogenato del útero de cobayos y ratones obtenidas como se describió anteriormente (ver punto 4.2.4), fueron resueltas en un gel desnaturalizante de poliacrilamida-duodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS) al 15% sembrando 50 μ g de proteína/calle, junto con un patrón de peso molecular de amplio espectro (Bio-Rad Laboratories, CA, USA). Una vez realizada la corrida, se transfirieron las proteínas del gel a una membrana de nitrocelulosa (*Protran nitrocellulose membrane*), BA 83, tamaño del poro 0,22 μ m (Schleicher and Schuell, USA). Se bloquearon las uniones inespecíficas incubando la membrana a TA toda la noche en agitación (Orbital Shaker Thermo Forma, Ohio, USA) en buffer de bloqueo (PBS-leche al 5%). Al día siguiente se hicieron 3 lavados con TBS-Tween (TBS-T) y se incubó durante 2 horas a TA con anti-RE α 1:50 (NCL-ER-LH2, clon CC4-5, Novocastra Laboratories Ltd., Newcastle upon Tyne, UK) o anti-RP 1:100 (MA1-410, clon PR-AT 4.14, Affinity Bioreagents Inc., Golden, USA). Luego se incubó a TA durante 1 hora con el conjugado de anticuerpo secundario-peroxidasa (anti-mouse IgG, horseradish peroxidase, Amersham Pharmacia Biotech, UK) en una dilución 1:500, y la reacción se reveló con el kit de quimioluminiscencia ECL (Amersham

Biosciences UK Limited, Buckinghamshire, UK) y placas radiográficas Biomax (Eastman Kodak Company, NY, USA). Se hicieron controles negativos con *blots* no expuestos al anticuerpo primario.

4.6.2. Inmunohistoquímica

Las inmunomarcaciones se hicieron en cortes de 5 μm de espesor con el método avidina-biotina peroxidasa, siguiendo un protocolo previamente descrito (Muñoz de Toro y Luque, 1995; Muñoz de Toro y col., 1998), con algunas modificaciones. Previo a cada paso de la técnica se lavaron las muestras en PBS y el protocolo seguido fue:

- Desparafinización e hidratación de los cortes histológicos
- Pretratamiento en horno microondas, sumergiendo las muestras en 0,01M Buffer Citrato pH 6,0.
- Bloqueo de la actividad endógena de peroxidasa, sumergiendo las muestras durante 15 min en una solución al 3% de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) 30 volúmenes en metanol absoluto.
- Bloqueo de los sitios de unión no-específicos, incubando 30 min a TA con la solución de bloqueo (Novostain Super ABC Kit universal, Novocastra Laboratories Ltd., Newcastle upon Tyne, UK).
- Incubación con el anticuerpo primario para RE α (dilución 1:80, NCL-ER-LH2, clon CC4-5, Novocastra Laboratories Ltd., Newcastle upon Tyne, UK) o RP (dilución 1:100, MA1-410, clon PR-AT 4.14, Affinity Bioreagents Inc., Golden, USA MA1-410, clon PR-AT 4.14, Affinity Bioreagents Inc., Golden, USA) en cámara húmeda durante toda la noche a 4°C.
- Incubación con el anticuerpo secundario biotinilado (Novostain Super ABC Kit universal, Novocastra Laboratories Ltd., Newcastle upon Tyne, UK) durante 30 min a TA.
- Incubación con el complejo ABC (Novostain Super ABC Kit universal, Novocastra Laboratories Ltd., Newcastle upon Tyne, UK) por 30 min a TA.

- Revelado de la reacción con Diaminobenzidina (Liquid DAB Substrate Kit, Novocastra Laboratories Ltd., Newcastle upon Tyne, UK) durante 4 min a TA.
- Contracoloración con Hematoxilina de Mayer y montado en PMyR (Instrumental Pasteur S.R.L., Buenos Aires, Argentina).

La cuantificación de RE α y RP se realizó en el cérvix, cuernos uterinos y ligamento interpúbico provenientes de animales de D42, D56 y D63, PPI y 1DPP. En el cérvix y los cuernos uterinos se evaluaron por separado las siguientes regiones: endocervix, exocervix, *septum* y cuernos uterinos bajos, de acuerdo a la regionalización que se muestra en la Figura 13. Al MO, se delimitó cada región por sus características histológicas, descritas en la introducción. La cuantificación fue realizada en cada una de estas regiones. Para cada una de ellas, los resultados fueron expresados para las diferentes regiones tisulares que se detallan en la Tabla 2. Al menos 1000 células/tipo celular fueron contadas en dos muestras por animal. Todos los núcleos inmunomarcados, independientemente de la intensidad, fueron considerados positivos. Los resultados fueron expresados como el porcentaje de células positivas sobre el número total del correspondiente tipo celular.

Tabla N° 2: Regiones tisulares evaluadas para la cuantificación de RE α y RP por inmunohistoquímica.

Región del órgano	Región tisular
Endocervix	epitelio luminal, subepitelio, músculo
Exocervix	
Septum	epitelios luminal y glandular, subepitelio, músculo
Cuerno uterino bajo	

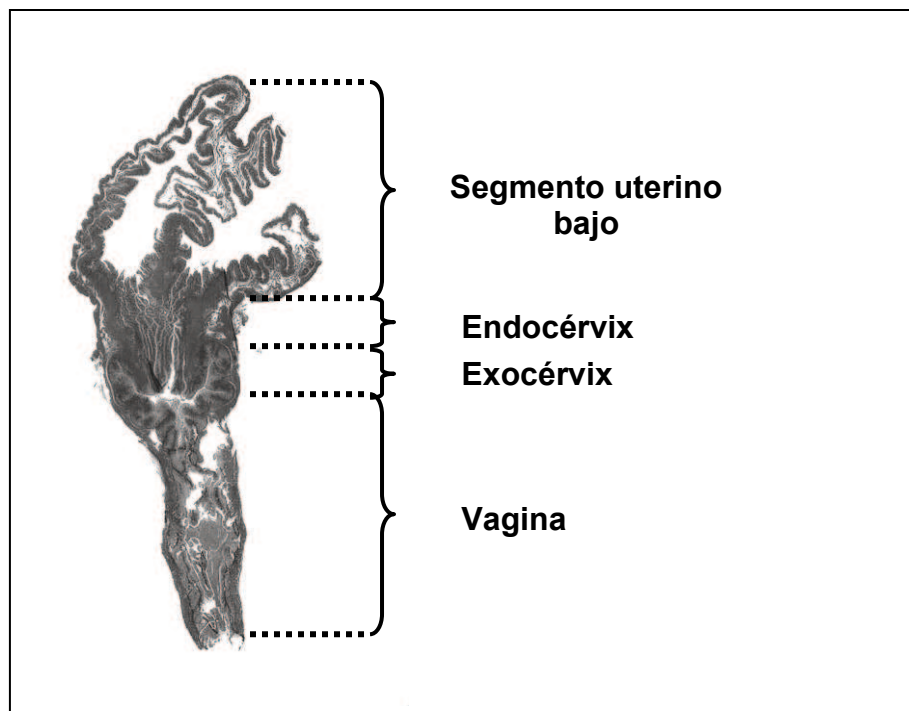


Figura 13: Fotomicrografía a bajo aumento del útero de un cobayo. Se observa el segmento uterino bajo, el endocérnix, el exocérnix y la vagina. Barra = 5 mm. Tomado de Rodríguez y col, sin publicar

4.7. Estudio de la expresión del ARNm del RE α y RE β

La expresión del ARNm de RE α y RE β fue evaluada por transcripción reversa (RT) seguida de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) competitiva (RT-PCR competitiva). Se usaron competidores del tipo heterólogo. Las etapas de trabajo necesarias para la obtención de los mismos son la generación *in vitro* del fragmento de ADN que va a actuar como competidor, la inserción de esta secuencia en el vector de clonado y su posterior clonación.

4.7.1. Generación de los competidores

Para obtener fragmentos de ADN que actúen como competidores heterólogos se utilizó una técnica desarrollada en nuestro laboratorio (Ramos y col., manuscrito en preparación). Se realiza una PCR con oligonucleótidos específicos para RE α o RE β de cobayo, utilizando como molde el ADN genómico del fago lambda (λ) que no posee la secuencia de genes que queremos estudiar. Para lograr productos de amplificación usamos un protocolo de ciclado con muy baja temperatura de *annealing* en los ciclos

iniciales, forzando de esta manera la obtención de fragmentos de ADN cuyos extremos 5' y 3' poseen las secuencias de los oligonucleótidos utilizados como cebadores (*primers*). Para esta reacción se utilizó la enzima Pfu (Stratagene), que sintetiza fragmentos de ADN con extremos romos. La composición final del tubo de reacción fue: dNTP 0,2 mM de cada uno, buffer PF1 de la enzima Pfu 1X, 20 pmol de cada *primer*, ADN fago lambda 0,80 µg/µl, y 1,5 U de enzima Pfu (Stratagene). El protocolo de ciclado se detalla en la Tabla 3.

Tabla N° 3: Programa de ciclado de PCR

Programa de ciclado	Temperatura	Tiempo	N° de ciclos
<i>Desnaturalización inicial</i>	96°C	1 minuto	1X
<i>Amplificación</i>	96°C 42°C 72°C	1 minuto 1 minuto 1 minuto	7X
<i>Amplificación</i>	96°C	1 minuto	30X
	56°C	1 minuto	
	72°C	1 minuto	
<i>Extensión final</i>	72°C	5 minutos	1X

El producto de la PCR se sembró en un gel de agarosa de bajo punto de fusión (LMP Agarose, Gibco) al 3%. Las electroforesis horizontales en geles de agarosa (concentraciones de agarosa entre 1% p/v y 3% p/v) se realizaron utilizando buffer TAE 1X (Tris-acetato pH 8 40 mM; EDTA 1 mM) como solución reguladora de electroforesis. El agente revelador utilizado fue bromuro de etidio, el cual se agregó al gel en una concentración final de 0,5 µg/ml. Las corridas se realizaron en una cuba de electroforesis horizontal Bio-Rad Power Pac® 300 manteniendo el voltaje constante a 60V hasta que todo el frente de corrida ingresara al gel, para luego subir hasta 85V. Los geles fueron revelados en un transiluminador Fotodyne® Foto/UV® 15 y para la captura de imágenes se utilizó el sistema UVP® de Laboratory Products.

Se seleccionó una banda cuyo PM sea cercano al producto de amplificación específico de nuestra secuencia blanco ($RE\alpha$ y $RE\beta$). Luego se recortó la porción del gel que contiene la banda a purificar con un bisturí estéril y se purificó usando el kit Wizard SV gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Al terminar la purificación se obtuvieron 10-20 μ l de producto de PCR disueltos en agua libre de ADNasas. Para evaluar la pureza del producto de purificación, se sembraron 3 μ l en un gel de agarosa 1,5%, observándose una única banda. Posteriormente, se procedió a la inserción del fragmento de ADN seleccionado como competidor en un plásmido pBluescript pSK- (Stratagene, USA).

4.7.1.1. Cepa bacteriana y vector utilizados

La cepa bacteriana utilizada fue *E.coli* DH5 α (Invitrogen™) y como vector de transformación se usó el plásmido pBluescript SK- (Stratagene®) (Figura 14).

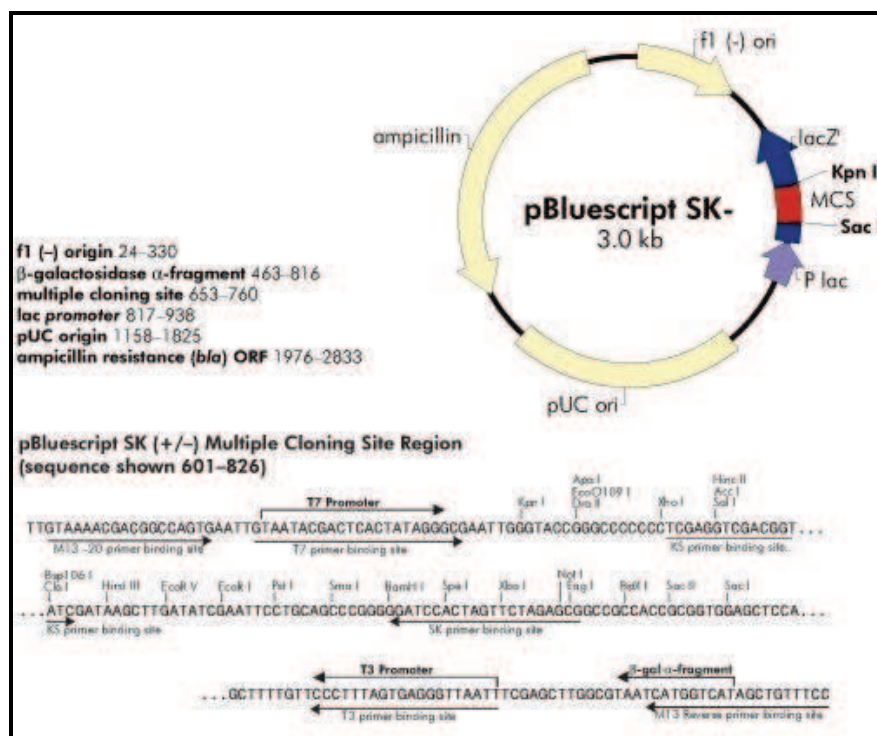


Figura 14: Plásmido pBluescript SK-, Stratagene®. En el gráfico puede observarse el sitio de múltiple clonado. Modificado de [http://www.stratagene.com/vectors/maps/pdf/pBluescript SK minus.pdf](http://www.stratagene.com/vectors/maps/pdf/pBluescript_SK_minus.pdf)

4.7.1.2. Minipreparación de ADN plasmídico

Las preparaciones de ADN plasmídico se realizaron empleando el equipo comercial *Wizard® Plus Minipreps System* (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante.

4.7.1.3. Digestión del ADN con endonucleasas de restricción

Las digestiones de ADN plasmídico se realizaron con enzima *EcoR V*, que genera segmentos con extremos romos, en las condiciones de reacción recomendadas por el fabricante. En todos los casos fueron utilizadas 1 a 5 U de enzima por cada microgramo de ADN a digerir.

4.7.1.4. Ligación de moléculas de ADN

La ligación de fragmentos de ADN (ADN plasmídico e inserto) se llevó a cabo utilizando 1U de T4 ADN ligasa (Promega), en un volumen de reacción de 10 μ l y empleando el buffer de reacción provisto por el fabricante de la enzima. Se utilizaron cantidades de inserto y vector tales que la relación molar entre ambos fuera de 4 a 1. La incubación se realizó durante 16 hs a 4°C.

4.7.1.5. Transformación de *E. coli* por el método del $CaCl_2$

Para la transformación de células de *E. coli* se siguió el protocolo descrito en Sambrook y col. (2001). Las células de la cepa DH5 α se cultivaron toda la noche en agitación a 37°C, en 2ml de medio de cultivo Luria Bertani (LB). Con este cultivo saturado se inocularon 2ml de medio fresco (dilución 1/100) y el nuevo cultivo se dejó crecer en las mismas condiciones hasta alcanzar una D.O.₆₀₀ = 0,4. Las células fueron cosechadas por centrifugación a 4000rpm durante 5 minutos a 4°C y posteriormente resuspendidas en 500 μ l de solución de transformación I (Buffer MOPS pH 7 0,25 ml; Cloruro de potasio 100 mM 2,5 ml; Agua desmineralizada destilada 22,25 ml). Después de una nueva centrifugación en las mismas condiciones, el sedimento se resuspendió en 500 μ l de solución de transformación II y se incubó a 4°C durante al menos 15 min. Luego de centrifugar y resuspender el sedimento en 100 μ l de solución de transformación II las células fueron incubadas en presencia del ADN correspondiente (en general 5 μ l de la reacción de ligación) durante una hora a 4°C. Posteriormente se las sometió a choque térmico incubándolas 45 segundos en un baño de agua a 42°C. A continuación se les agregó 1ml de

medio LB y se las incubó una hora a 37°C. El sedimento celular obtenido por centrifugación, se resuspendió en 100µl del mismo medio LB y se empleó una alícuota (25-50µl) para su siembra con espátula de Drigalsky sobre placas de Petri conteniendo medio LB-Agar (1,5% p/v). A este medio se le adicionó previamente ampicilina (100µg/ml) y la presencia de colonias recombinantes se analizó mediante α -complementación, para tal fin el medio se suplementó con IPTG 0,3 mM y X-gal 0,006% p/v.

4.7.1.6. Generación de stocks de bacterias transformadas

Se tomó con ansa aguja o escarbadiantes estéril una colonia recombinante de la placa correspondiente. Se la dispersó en un tubo conteniendo 2ml de medio LB+ampicilina y se incubó entre 14-16hs a 37°C en agitación. Luego, se agregó en un eppendorf estéril 750µl de medio de cultivo con las bacterias y 750µl de glicerol calidad biología molecular (Sigma) de manera de obtener un volumen final de 1500µl y se conservó a -80°C.

Las minipreparaciones de plásmidos recombinantes conteniendo el fragmento competidor para RE α y RE β se realizaron empleando el equipo comercial *Wizard® Plus Minipreps System* (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante.

4.7.1.7. Cálculo del número de moléculas de competidor

Por lectura en UV (260/280) se determinó la concentración de ácidos nucleicos presentes luego de la purificación. Se multiplicó la lectura obtenida a 260 nm por 50 µg/ml (1 DO = 50 µg/ml), obteniendo la concentración de ácidos nucleicos de la muestra. Para calcular el número de moléculas se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{Moléculas/ml} = \frac{\text{Concentración de ácidos nucleicos } [\mu\text{g/ml}] \times 1.10^{-6} \text{ g}/\mu\text{g} \times 6,023 \cdot 10^{23}}{\text{Peso del (plásmido + inserto) [g/mol]}}$$

4.7.2. Determinación del ARNm de RE α y RE β

4.7.2.1. Transcripción reversa

Se retrotranscribieron 4 μ g de ARN total utilizando la enzima Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase (MMLV-RT, Promega), usando como cebadores hexanucleótidos con secuencias al azar. La composición final del medio de reacción fue: ARN 4 μ g, Tris-HCl pH 8,3 50mM, Cloruro de potasio 75mM, cloruro de magnesio 3mM, DTT 10mM, dNTP 0,3mM de cada uno, hexanucleótidos 1 μ g, inhibidor de ribonucleasas RNaseOut™ (Invitrogen) 20 U y 200 U de enzima transcriptasa reversa.

La reacción de transcripción reversa se realizó a 22°C por 8 min, luego a 30° por 15 min y 37° por 60 min y se finalizó calentando a 80° por 5 min y a 94° por 30 segundos y posterior enfriamiento en hielo. Todas las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 30 μ l, diluyendo hasta 60 μ l con agua estéril libre de ARNasas una vez concluida la reacción. El producto de reacción se guardó a -20°C hasta su posterior utilización.

4.7.2.2. Selección de oligonucleótidos específicos

Como las secuencias de RE α y de RE β de cobayo no han sido publicadas, usamos oligonucleótidos generados contra RE α y RE β de rata. Estos oligonucleótidos cebadores, diseñados y seleccionados previamente en nuestro laboratorio (Ramos y col., 2003), amplifican secuencias de los genes RE α y RE β altamente conservadas entre especies. Todos los oligonucleótidos cebadores fueron sintetizados y desalinizados por Invitrogen™ en una escala de 10nM. Los *primers* utilizados están detallados en la Tabla 4.

Tabla N° 4: Secuencia de los *primers* utilizados

<i>Primer</i>	Secuencia	Tamaño del producto (pb)
RE α sentido RE α antisentido	5_-AAT TCT GAC AAT CGA CGC CAG-3_ 5_-GTG CTT CAA CAT TCT CCC TCC TC-3_	345

REβ sentido REβ antisentido	5_-TTC CCG GCA GCA CCA GTA ACC-3_ 5_-TCC CTC TTT GCG TTT GGA CTA-3_	262
r18S sentido r18S antisentido	5_-CAA CTT TCG ATG GTA GTC GC-3_ 5_-CGC TAT TGG AGC TGG AAT TAC-3_	285

Para verificar la especificidad de la reacción se analizaron los productos de amplificación obtenidos por cortes con enzimas de restricción, tomando como referencia el mapa de restricción de los genes RE α y RE β de rata.

4.7.2.3. Digestión con endonucleasas de restricción

Las digestiones de ADN con enzimas de restricción se realizaron en las condiciones de reacción recomendadas por los fabricantes. En todos los casos fueron utilizadas 1 a 5 U de enzima por cada microgramo de ADN a digerir. Se utilizaron las enzimas Hinf I para RE α y Hinf I y Hind III para RE β . Los productos de corte fueron resueltos en geles de agarosa al 3%, observándose las bandas del PM esperado en cada tubo de corte.

4.7.2.4. Determinación del rango de diluciones

Para establecer el rango de diluciones del fragmento de ADN competidor para cada RE, se realizaron reacciones en cadena de la polimerasa competitivas con distintas series de diluciones del competidor. Expresándolo como logaritmo negativo de la dilución ($-\log \text{dil}$), el rango establecido para RE α fue: 4,3; 4,6; 4,9; 5,2; 5,5; 5,8; 6,1. El rango establecido para RE β fue: 5, 6, 7, 8, 9 y 10.

4.7.2.5. Evaluación de la variabilidad en la carga inicial de ADNc

Para ajustar y corregir la variabilidad en la carga inicial de ADN entre muestras, se hicieron reacciones en cadena de la polimerasa para ARN ribosomal de la subunidad 18S (r18S) como normalizador interno, con los oligonucleótidos específicos detallados en la Tabla 4. La composición final del tubo de reacción fue: dNTP 0,2 mM de cada uno, buffer PF1 de la enzima Pfu 1X, 20 pmol de cada primer, ADNc de cobayo equivalente a 650 ng de ARN total, y 1,5 U de

enzima Pfu (Stratagene). Las variables de la reacción se ajustaron de forma empírica. El protocolo de ciclado utilizado se detalla en la Tabla 5.

Tabla N° 5: Protocolo de ciclado de PCR para r18S.

Programa de ciclado	Temperatura	Tiempo	N° de ciclos
<i>Desnaturalización inicial</i>	95°C	1 minuto	1X
<i>Amplificación</i>	95°C 57°C 72°C	1 minuto 1 minuto 1 minuto	24X
<i>Extensión final</i>	72°C	5 minutos	1X

4.7.2.6. Medición de la expresión del ARNm del RE α y RE β

La expresión de ARNm de RE α y RE β de cobayo fue cuantificada por RT-PCR competitiva en muestras de segmento uterino bajo, cérvix y ligamento interpúbico de cobayos hembras de D42 y D60 y PPI. Las PCR se realizaron para cada grupo experimental por triplicado siguiendo los protocolos de ciclado que se detallan en las Tablas 6 y 7.

Tabla N° 6: Programa de ciclado de PCR para RE α

Programa de ciclado	Temperatura	Tiempo	N° de ciclos
<i>Desnaturalización inicial</i>	95°C	1 minuto	1X
<i>Amplificación</i>	95°C 57°C 72°C	1 minuto 45 segundos 1 minuto	35X
<i>Extensión final</i>	72°C	5 minutos	1X

Tabla N° 7: Programa de ciclado de PCR para RE β

Programa de ciclado	Temperatura	Tiempo	N° de ciclos
<i>Desnaturalización inicial</i>	95°C	1 minuto	1X
<i>Amplificación</i>	95°C 60°C 72°C	1 minuto 1 minuto 1 minuto	36X
	72°C	5 minutos	1X

Extensión final			
------------------------	--	--	--

Se sembraron los productos de amplificación en gel de agarosa 1-1,5%, y se cuantificó la intensidad de densidad óptica (IOD) de las bandas correspondientes al competidor y a la secuencia blanco con el sistema de análisis digital de imágenes Image Pro-Plus 4.1.0.1® (Media Cybernetics, Silver Spring, MA, USA), conectado a una PC con procesador Pentium IV Intel. Con estos valores se calculó la relación (R) IOD competidor/IOD secuencia blanco para cada dilución de competidor. Se graficó el log de relación (log R) en función del log de número de copias de competidor presente en cada dilución. Por análisis de regresión lineal se obtuvieron los parámetros de la ecuación de esta curva, y se dedujo el número de atomoles de ARNm de ER α o ER β / μ g de ARN total.

5. Análisis estadístico

Se aplicó el análisis de variancia no paramétrico intergrupos de Kruskal-Wallis. Para la comparación de pares de grupos se utilizó el post-test de Dunn. Cuando fue necesario, se utilizó el análisis de Pearson para test de correlación entre determinadas variables medidas (Siegel, 1956). En todos los casos se consideró estadísticamente significativo un $p < 0,05$.

6. Normas éticas y de bioseguridad.

Se respetaron las normas éticas en el manejo de los animales experimentales siguiendo protocolos internacionales para el cuidado y uso de los mismos descritos en la Guía de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Academia Nacional de Ciencias (USA). Se prestó especial atención en el uso y manejo de residuos de drogas o reactivos potencialmente contaminantes.

Resultados

7. Resultados

7.1. Niveles hormonales

7.1.1. Validación del método

Los resultados de la medición de las concentraciones séricas de Pg y E₂ en muestras con distintos tratamientos (ie: muestras puras, con extracción y/o desnaturalización) de hembras adultas no preñadas en estro (Es) y en diferentes momentos de la gestación (D42 y D56), se presentan en las Tablas 8 y 9.

Tabla N° 8: Valores de Pg sérica en muestras puras (P), puras con extracción (P + E) y puras con extracción y desnaturalización (P + E + D) provenientes de hembras adultas no preñadas en estro (Es), D42 y D56 de la gestación.

	P	P + E	P + E + D
Es	3.8	3.1	3.4
D42	292.0	46.0	145.7
D56	164.0	16.0	41.1

Tabla N° 9: Valores de E₂ sérico en muestras puras (P) y puras con extracción (P + E) provenientes de hembras adultas no preñadas en estro (Es), D42 y D56 de la gestación.

	P	P + E
Es	18.9	16.7
D42	36.5	39.2
D56	34.8	29.6

Los resultados obtenidos en muestras puras fueron similares a los descriptos en la literatura (Challis y col., 1971; Joshi y col., 1973; Hossain y col., 1979; Illingworth y col., 1974; Croix & Franchimont, 1975). Con relación a los valores de E₂ y Pg de hembras Es, no hubo diferencias significativas entre las condiciones ensayadas. En cambio, las mediciones que obtuvimos de Pg en

sueros de animales preñados, sólo fueron comparables a los resultados publicados en muestras puras sin extracción ni desnaturalización. Teniendo en cuenta estos resultados, las mediciones de ambos esteroides se realizaron sobre muestras puras, eliminando la necesidad de realizar los procesos previos de extracción y/o desnaturalización.

Los parámetros de desempeño analítico del método que utilizamos fueron los siguientes:

Exactitud: constatamos una buena correlación entre los resultados obtenidos con sueros controles (sueros de macho pre-tratados con carbón activado más el agregado de cantidades conocidas de cada esteroide: 10, 100 y 300 ng/ml de Pg; 25, 35 y 50 pg/ml de E₂) y las concentraciones de los grupos experimentales: $r = 0,969$ para Pg (Figura 15A) y $r = 0,878$ para E₂ (Figura 15B). Estos sueros controles fueron corridos en todos los ensayos y a partir de los valores obtenidos se calculó el porcentaje de recuperación para cada ensayo. Este porcentaje siempre fue superior al 90%, y las mediciones fueron corregidas según la recuperación calculada.

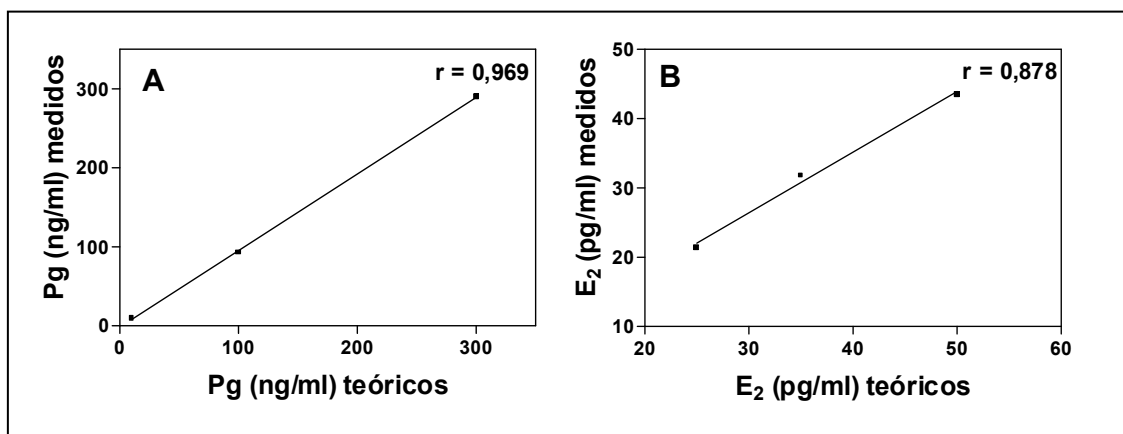


Figura 15: Correlaciones entre la cantidad conocida de Pg (A) o E₂ (B) agregada (eje X) a sueros de machos preabsorbidos con carbón dextrán y los valores obtenidos (eje Y). r = coeficiente de correlación.

Variación intra-ensayo: corresponde al promedio del coeficiente de variación de mediciones por sextuplicado de un suero control

conteniendo 100 ng/ml de Pg o 35 pg/ml de E₂. Estos valores fueron de 5,8 % y 14,0 %, respectivamente.

Variación inter-ensayo: fue calculada a partir de los resultados obtenidos de los sueros controles evaluados en todos los ensayos. Este valor fue de 7,2% para Pg y 12,0 % para E₂.

7.1.2. Niveles séricos de E₂ y Pg

Una vez validado el método de medición, se realizaron las determinaciones de E₂ y Pg en sueros de hembras Es, preñadas (D42, D56 y D63), PPI y 1DPP. La Figura 16 es la gráfica de los resultados obtenidos. Es importante recordar que las muestras estudiadas en el PPI son obtenidas dentro de las 1,5 horas posteriores al parto, por lo que consideramos que este grupo es el equivalente a una muestra intraparto. En las hembras Es se detectaron los valores más bajos, tanto para E₂ (17,61 ± 5,41 pg/ml) como para Pg (9,30 ± 2,35 ng/ml). Las concentraciones más altas de Pg sérica se registraron en D42 (316,20 ± 19,91 ng/ml), disminuyeron en D56 (177,71 ± 16,20 ng/ml), mientras que en D63 (245,45 ± 31,51 ng/ml) y PPI (225,02 ± 24,36 ng/ml) se observaron valores elevados que no fueron diferentes entre sí (Figura 16). Una caída aguda en los niveles circulantes de Pg recién ocurre 24 horas después del parto (1DPP).

Por otro lado, los niveles de E₂ aumentan gradualmente entre D42 y D63 (29,43 ± 5,75 pg/ml y 42,85 ± 1,52 pg/ml, respectivamente) y se mantienen elevados durante el parto (PPI: 41,67 ± 3,76 pg/ml). Estos valores altos caen a concentraciones similares a los de los animales no preñados en el posparto temprano (1DPP: 23,20 ± 5,97 pg/ml).

Los perfiles séricos obtenidos confirman que, en el cobayo, el parto se lleva a cabo sin cambios significativos en la circulación periférica de los niveles de E₂ y Pg.

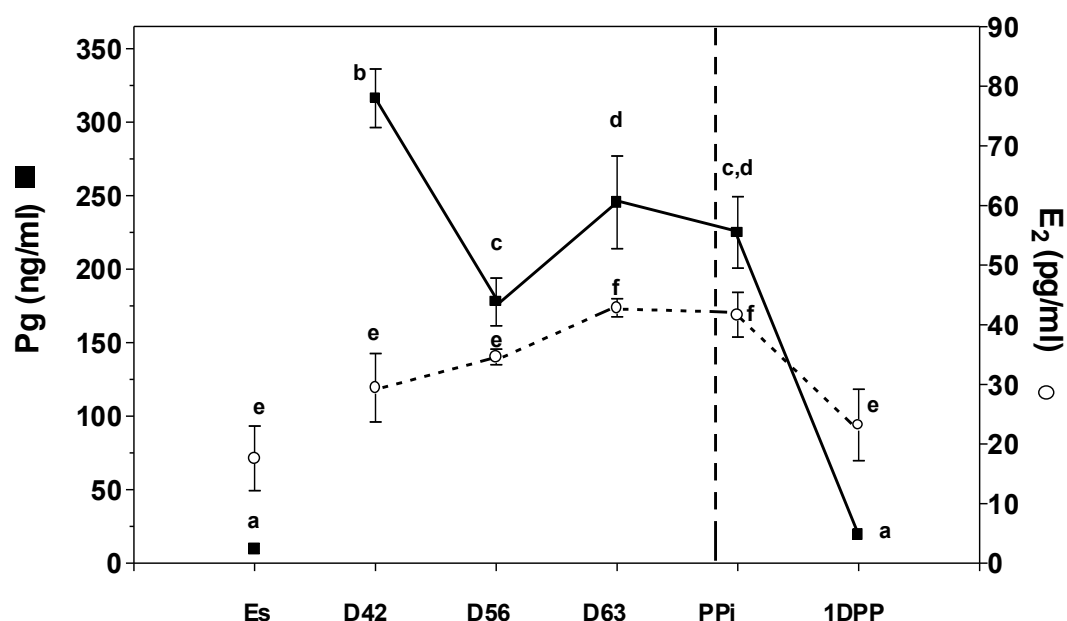


Figura 16: Niveles séricos de Pg y E₂ en hembras adultas no preñadas en estro (Es), en hembras preñadas a lo largo de la gestación (D42, D56, D63), en el posparto inmediato (PPI), y 1 día posparto (1DPP). Las determinaciones se realizaron mediante un ensayo inmunométrico secuencial, según lo descrito en *Materiales y Métodos*. Los valores graficados representan el promedio $\pm$ SEM de al menos 5 animales por grupo. La línea vertical indica el momento del parto. Las diferentes letras en minúscula indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

7.2. Infiltración de neutrófilos y remodelación del colágeno

7.2.1. Cérvix

La Figura 17A corresponde a los valores de densidad de volumen (Vv) de neutrófilos en el estroma del cérvix uterino de hembras Es, a lo largo de la gestación (D21, D28, D35, D42, D49, D56, D63), posparto inmediato (PPI) y durante el posparto (D1PP, D3PP, D5PP, D7PP, D10PP, D15PP y D30PP). La menor densidad de neutrófilos se registró en las hembras Es. Estos valores bajos se mantuvieron sin variación durante la etapa temprana de la gestación, comenzando a elevarse de forma gradual a partir del D42. Los niveles más altos de densidad de neutrófilos que infiltran el cérvix uterino se observaron alrededor del momento del parto, en el PPI y D1PP. A continuación se observó un descenso en D5PP, alcanzando niveles similares a los de animales no preñados recién en D30PP.

Para estudiar los cambios en la remodelación de las fibras de colágeno durante la gestación, el parto y el posparto, se cuantificaron los niveles de birrefringencia (ie: colágeno organizado) por el método de Picrosirius-polarización. Tal como se explicó en Materiales y Métodos, un proceso de remodelación del colágeno produce una caída en la intensidad de la birrefringencia. En la Figura 17B se observa que los animales preñados de D21 y D28 mantuvieron altos niveles de colágeno organizado, similares a los observados en hembras no preñadas (Es). La primera disminución significativa se observa en D35, mientras que luego del D42 comienza una disminución gradual en la organización del colágeno hasta alcanzar su mínima expresión alrededor del momento del parto (PPi y D1PP). En D3PP los valores vuelven a aumentar, estabilizándose a partir del D5PP en adelante. Nótese que los valores de intensidad de birrefringencia no vuelven a alcanzar los valores correspondientes a los de un animal no preñado, al menos en el período evaluado (hasta 30 días después del parto).

De la comparación entre las gráficas que muestran la infiltración de neutrófilos y los niveles de remodelación del colágeno, se puede observar que los animales que presentaron altos niveles de infiltración leucocitaria poseen muy bajos valores de birrefringencia y viceversa, los grupos con una baja infiltración de neutrófilos tuvieron valores muy altos de birrefringencia. En conclusión, los momentos de máxima remodelación de colágeno, reflejados en los mínimos valores de intensidad de birrefringencia, coinciden con la mayor infiltración de neutrófilos en el estroma subepitelial cervical.

La baja birrefringencia del colágeno asociada a una presencia masiva de leucocitos neutrófilos se puede apreciar visualmente al MO. En la Figura 18 se observan imágenes que ponen de manifiesto la presencia de neutrófilos en el estroma cervical de los animales sacrificados de forma inmediata después del parto (PPi) (Figura 18A) y la alta remodelación (ie: baja birrefringencia) del colágeno que se manifiesta, aplicando el método de Picrosirius-polarización, por una escasa birrefringencia (Figura 18B). Por el contrario, en el estroma de

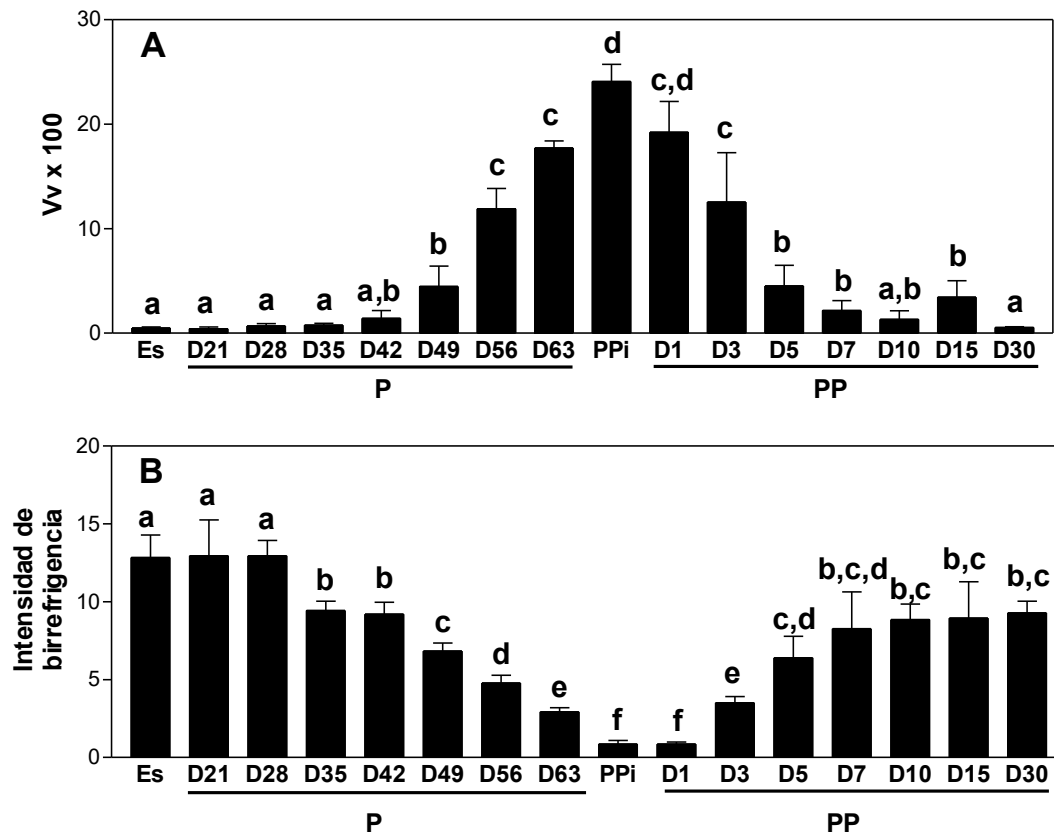


Figura 17: Densidad de volumen (Vv) de neutrófilos (**A**) e intensidad de birrefringencia (**B**) en el subepitelio de cérvix uterino de hembras adultas no preñadas en estro (Es), hembras preñadas (P) en diferentes días (D) de la gestación (D21, D28, D35, D42, D49, D56, D63), en el posparto inmediato (PPi), y durante el posparto (PP) (D1, D3, D5, D7, D10, D15 y D30). **A)** Se observa una gran infiltración antes (D63) y durante (PPi) el parto y el primer día del posparto (D1PP) vs los valores de animales en gestación temprana (D21, D28 y D35), cuya infiltración fue semejante a la de animales adultos no preñados (Es). **B)** La remodelación de colágeno fue evaluada por el método de Picrosirius-polarización como cambios en la intensidad de birrefringencia. Nótese que la mayor remodelación de colágeno, reflejada en los mínimos valores de intensidad de birrefringencia, coincide con los máximos valores de infiltración de neutrófilos. Las barras representan el promedio $\pm$ SEM, las diferentes letras en minúscula indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

animales en el D21 hay una escasa infiltración de neutrófilos (Figura 18C) asociada con un colágeno altamente organizado (ie: alta birrefringencia) (Figura 18D).

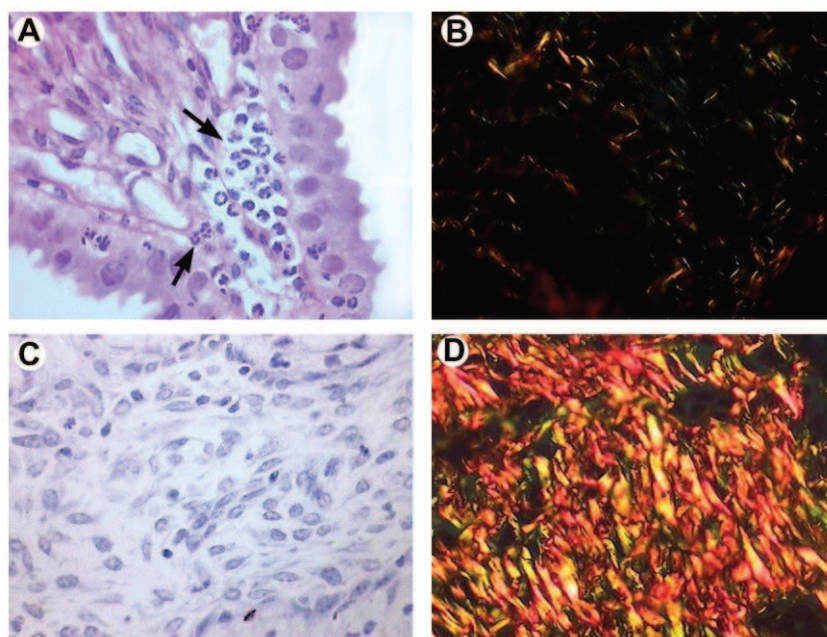


Figura 18: Fotomicrográficas de secciones de cérvices uterinos obtenidos inmediatamente después del parto (PPI) (**A,B**) y en D21 de la gestación (**C,D**). El estroma cervical de las hembras sacrificadas en PPI muestra una masiva infiltración de neutrófilos (flechas) (**A**) asociada con alto nivel de remodelación del colágeno (ie: baja organización del colágeno) (**B**). En animales sacrificados en el D21 de la gestación hay una baja infiltración (**C**) y baja remodelación del colágeno (ie: elevada organización del colágeno) (**D**). Magnificación 200X.

7.2.2. Cuernos uterinos

También evaluamos la infiltración de neutrófilos y la remodelación de colágeno en el subepitelio de los cuernos uterinos de hembras no preñadas en estro (Es), hembras preñadas (P) a lo largo de la gestación (D21, D28, D35, D42, D49, D56, D63), del posparto inmediato (PPI), y durante el posparto (D1PP, D3PP, D5PP, D7PP, D10PP, D15PP y D30PP) (Figura 19). De forma similar a lo observado en el cérvix, la densidad de neutrófilos en los cuernos uterinos se mantiene en valores bajos, similares a los de hembras en estro (Es), hasta el D42. Entre D42 y D49 comienza un aumento gradual que alcanza los niveles más altos de infiltración alrededor del parto (PPI) y el posparto temprano (D1PP) (Figura 19A). Luego del parto, hay una primera disminución en los valores de infiltración de neutrófilos en el D3PP, disminuyendo gradualmente hasta alcanzar niveles similares a los observados en animales no preñados (Es) a partir del D15PP.

Con relación al estudio del nivel de organización de las fibras de colágeno en los cuernos uterinos, los resultados demostraron que la mayor remodelación de estas fibras, evidenciada por una rápida caída en la intensidad de birrefringencia, ocurre tempranamente en la gestación (entre D35 y D42), permaneciendo sin cambios hasta el D3PP (Figura 19B). Desde D3PP en adelante, las fibras de colágeno alcanzaron un nivel de organización similar al de los animales en estro (Es).

Analizando de forma conjunta las gráficas de la Figura 19, se observa una disociación entre la invasión por leucocitos del estroma subepitelial de los cuernos uterinos y la remodelación de las fibras de colágeno: en el momento en que el tejido es invadido por los neutrófilos, las fibras de colágeno ya han llevado a cabo los mayores cambios en sus niveles de organización.

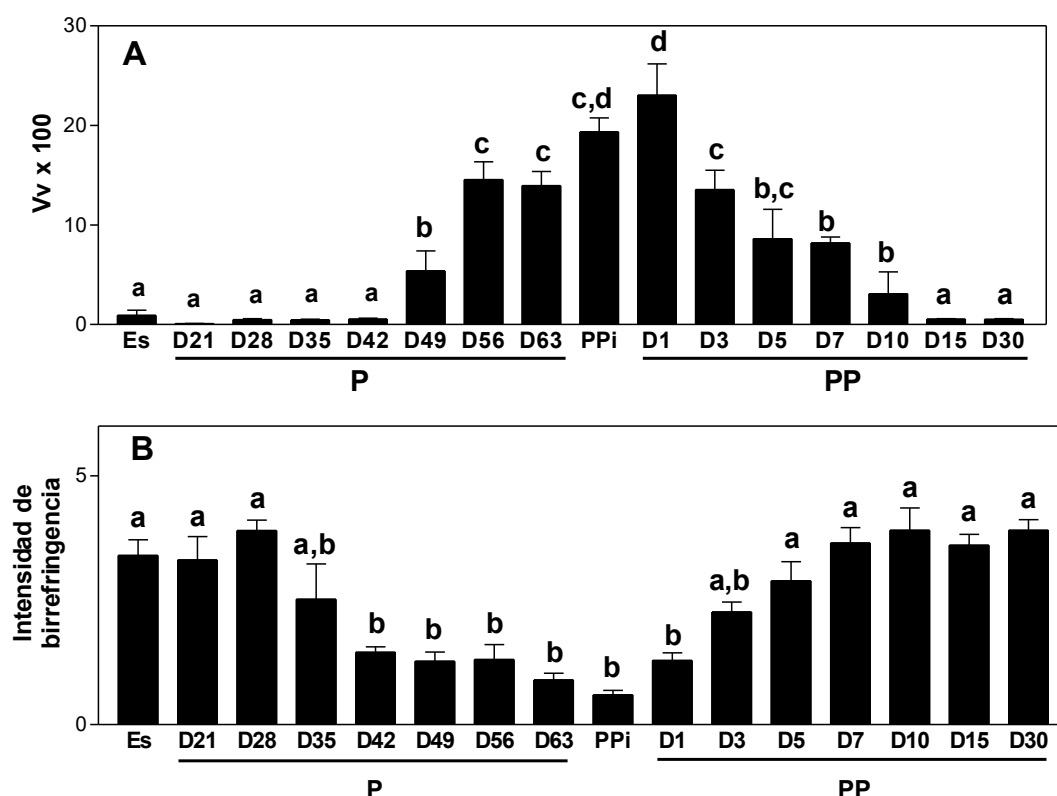


Figura 19: Densidad de volumen de neutrófilos (A) e intensidad de birrefringencia (B) en el subepitelio de los cuernos uterinos de hembras no preñadas en estro (Es), en hembras preñadas (P) a lo largo de la gestación (D21, D28, D35, D42, D49, D56, D63), en el posparto inmediato (PPi), y durante el posparto (D1, D3, D5, D7, D10, D15 y D30). A) Se observa que la infiltración aumenta entre D42 y D49, aumentando

gradualmente hasta alcanzar su máximo valor en el primer día posparto (D1PP). **B)** La remodelación de colágeno fue evaluada por el método de Picrosirius-polarización como cambios en la intensidad de birrefringencia. Nótese que la mayor remodelación de colágeno, evidenciada por la caída en los valores de intensidad de birrefringencia, se presenta tempranamente en la gestación (entre D35 y D42) y permanece sin cambios hasta los primeros días del posparto (D3PP). La remodelación de colágeno en los cuernos uterinos ocurre con anterioridad al incremento en los valores de infiltración de neutrófilos. Las barras representan el promedio $\pm$ SEM, las diferentes letras en minúscula indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

7.3. Expresión de RE y RP

La expresión de receptores para hormonas esteroideas fue evaluada por inmunohistoquímica (RE α y RP) y por RT-PCR competitiva (RE α y RE β), en el segmento uterino bajo, el cérvix y la sínfisis púbica.

El estudio de la expresión de RP y RE α por inmunohistoquímica se realizó en las células del epitelio luminal, el subepitelio y la región muscular del endocérnix, el exocérnix, el *septum* y el segmento uterino bajo de hembras preñadas, desde el D42 de la gestación hasta 1 día posparto (D42, D56, D63, PPI y 1DPP). Como no hubo diferencias significativas entre los resultados del endocérnix vs exocérnix, y entre *septum* vs cuernos uterinos bajos, los resultados fueron expresados como cérvix (endocérnix + exocérnix) y útero (*septum* + cuernos uterinos), respectivamente. En el útero también fue evaluada la expresión de RE α y RP en las células del epitelio glandular. En todos los ensayos realizados, la intensidad de marcación de las células positivas fue homogénea, por lo que consideramos que el porcentaje de células positivas refleja las variaciones en la cantidad de proteína presente en las células.

7.3.1. Especificidad de los anticuerpos usados para el estudio de RE α y RP.

Por medio de la técnica de inmunomarcación por *Western blot* de los homogeneizados de cuernos uterinos confirmamos que los anticuerpos usados para la inmunohistoquímica detectan específicamente RE α y RP en tejidos de cobayo. Se detectó una banda de aproximadamente 60 kDa en las calles

incubadas con el anticuerpo primario (identificadas con el signo +), correspondiente al RE α (Figura 20A). Esta banda aparece tanto en el control positivo (útero de ratón) como en el de cobayo, no observándose ninguna reacción cuando el anticuerpo primario es omitido (calles identificadas con el signo -). Otras bandas de menor PM se marcan y corresponden a productos inespecíficos identificados con el anticuerpo secundario, tal como se deduce de la reacción positiva en las calles incubadas sin anticuerpo primario. En la Figura 20B se demuestra que el anticuerpo primario dirigido contra RP marca específicamente dos bandas de aproximadamente 110 y 80 kDa en el útero de ratón, que se corresponden con el PM de las isoformas descritas en esta especie. Estas bandas desaparecen cuando la incubación se realiza sin anticuerpo primario (-). En el cobayo el anticuerpo reconoce específicamente cuatro bandas, de aproximadamente 110, 90, 80 y 60 kDa. El PM de las variantes observadas de RP en el cobayo se corresponde con el PM de las siguientes isoformas descritas: B (~110 kDa), A1 (~90 kDa), A2 (~76-82 kDa) y C (~60-64 kDa). Estas bandas no aparecen cuando la incubación se realiza en ausencia del anticuerpo primario.

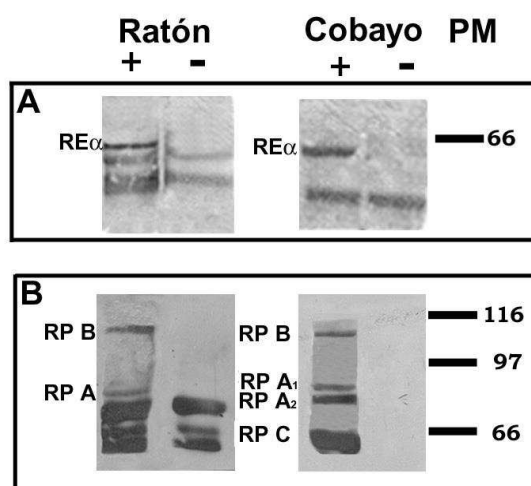


Figura 20: Inmunomarcación de RE α (A) y RP (B) en útero de ratón y cobayo. El extracto proteico del útero de ratón fue usado como control positivo. Las calles incubadas con o sin el anticuerpo primario están identificadas con los signos (+) y (-), respectivamente. La posición y tamaño de los patrones de peso molecular (PM) están indicados a la derecha de la figura, en kDa.

7.3.2. Expresión de RE α y RP en los cuernos uterinos

La expresión de RP y RE α en las células del epitelio glandular presentó un patrón similar para ambos receptores (Figura 21A y B) entre D42 y D56. Por el contrario, antes del parto (D63), los valores de RE α aumentaron mientras que los de RP disminuyeron. La expresión de RP volvió a incrementarse (PPI y 1DPP), mientras que el RE α permaneció elevado desde D63 hasta 1DPP. Cuando la expresión de ambos receptores se graficó como la relación entre ambos valores: RE α /RP, se observó claramente un incremento relativo en la expresión de RE α inmediatamente antes del parto (Figura 21C).

La expresión de RP en el epitelio luminal se mantuvo sin variaciones significativas desde D56 hasta 1DPP, inclusive. Por el contrario, la expresión de RE α presentó un incremento gradual hacia el parto, alcanzando su máxima expresión en 1DPP (Figura 22).

En el subepitelio uterino, los niveles de RP permanecieron elevados y sin cambios a lo largo de la gestación (D42, D56 y D63) y el posparto inmediato (PPI), cayendo bruscamente en 1DPP. Los niveles de RE α alcanzaron los máximos valores de expresión en D63, para luego disminuir hacia el posparto temprano (PPI y 1DPP) (Figura 22).

Las células musculares del útero presentaron disminuciones antes (D63) y después del parto (PPI) para RP, y una expresión elevada y sostenida de RE α desde D56 en adelante (Figura 22).

En fotomicrografías representativas de la expresión de RP y RE α en el estroma subepitelial de los cuernos uterinos (Figura 23) se observa que ambos receptores están altamente expresados en esta región inmediatamente antes del parto (D63).

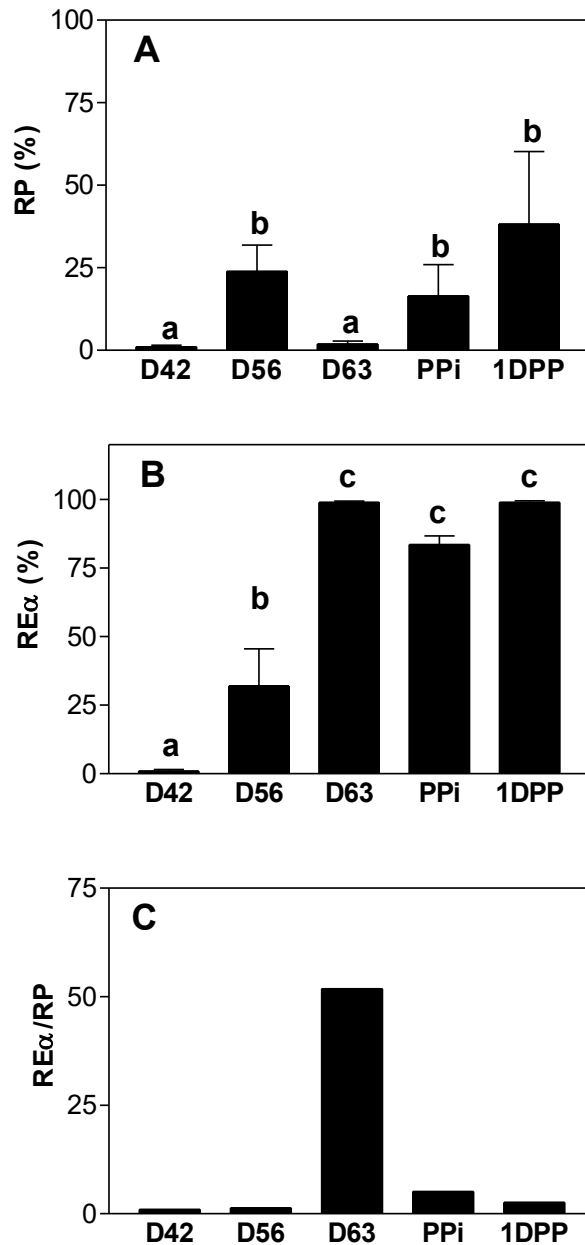


Figura 21: Expresión de RP (A) y REα (B) en células del epitelio glandular de los cuernos uterinos durante la gestación (D42, D56 y D63), en el posparto inmediato (PPi) y 24 hs posparto (1DPP). La presencia de ambos receptores se estudió por inmunohistoquímica y los resultados fueron expresados como porcentaje de células positivas (%). Las barras representan el promedio $\pm$ SEM de al menos 5 animales por grupo. Las diferentes letras en minúscula indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Nótese que la relación entre REα vs RP aumenta notoriamente inmediatamente antes del parto (D63), como se aprecia claramente al graficar la relación REα /RP (C).

CUERNOS UTERINOS

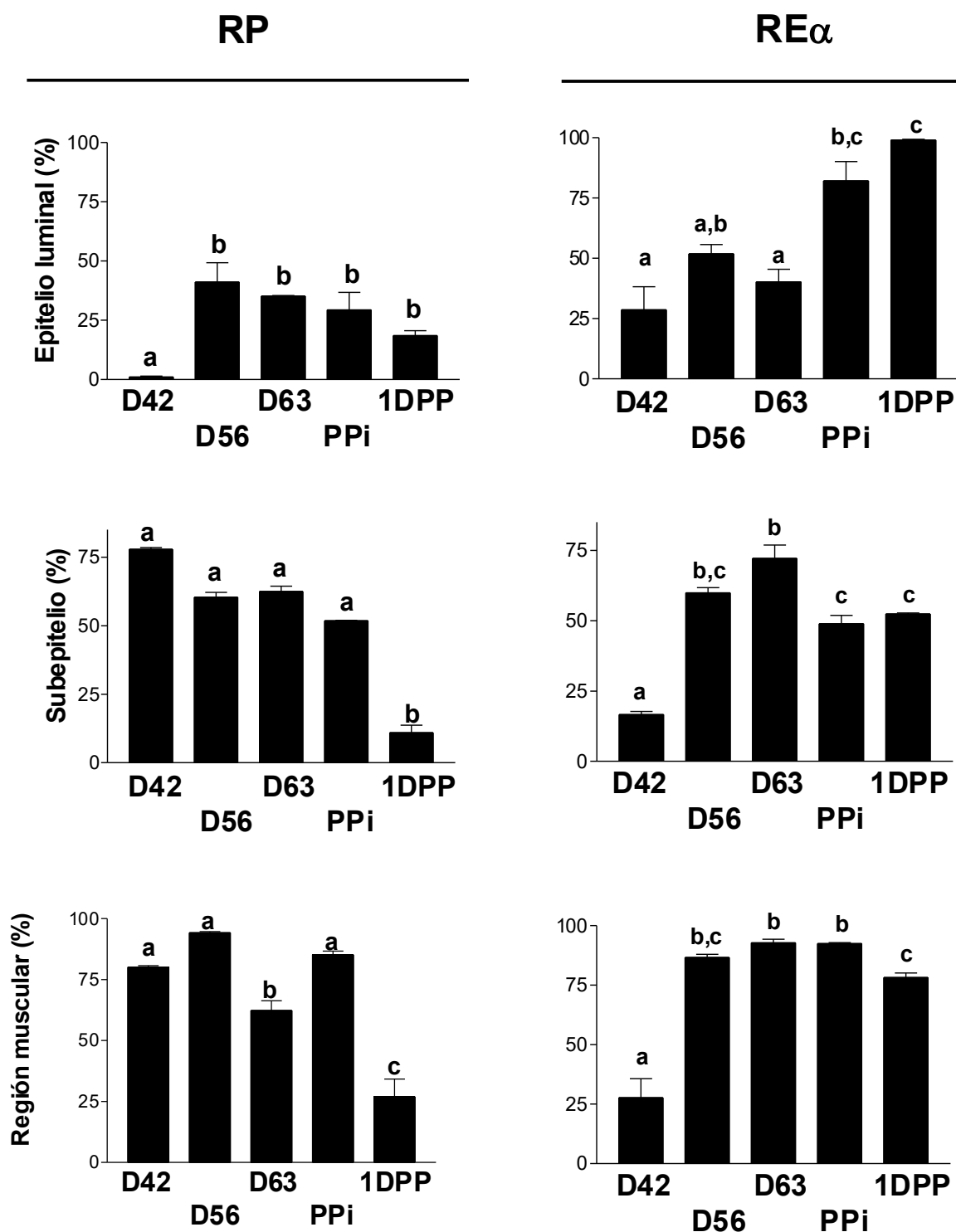


Figura 22: Expresión de RP y RE α en células del epitelio luminal, estroma subepitelial y estroma muscular de los cuernos uterinos durante la gestación (D42, D56 y D63), en

el posparto inmediato (PPI) y 24 hs posparto (1DPP). Las regiones evaluadas fueron definidas en Materiales y Métodos. La expresión de ambos receptores se estudió por inmunohistoquímica y los resultados fueron expresados como porcentaje de células positivas (%). Las barras representan el promedio $\pm$ SEM de al menos 5 animales por grupo. Las diferentes letras en minúscula indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

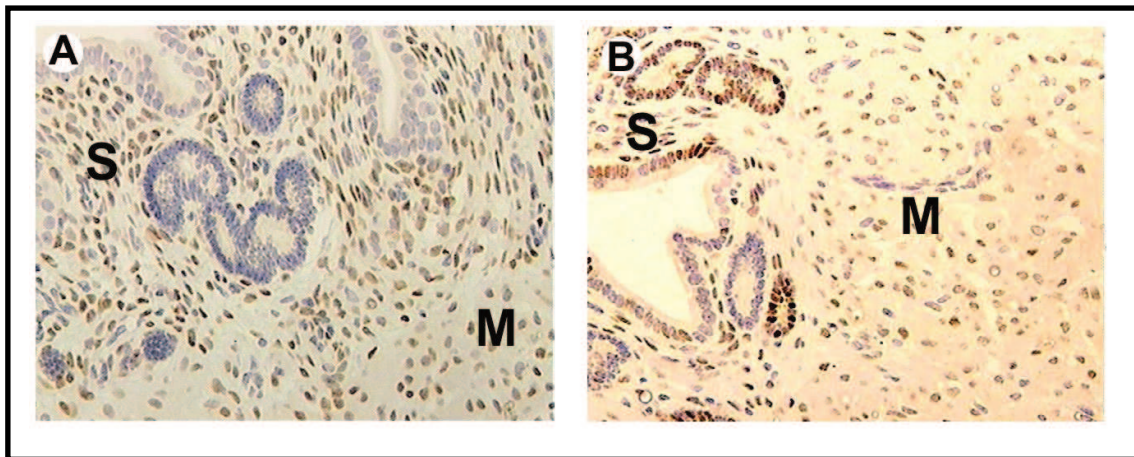


Figura 23: Fotomicrografías de secciones de cuernos uterinos de cobayos en D63 de la gestación inmunomarcadas para RP (**A**) y RE α (**B**). Obsérvese que en el subepitelio (S) coinciden una alta expresión de RP (**A**) con alta expresión de RE α (**B**). M: músculo. Magnificación 200X.

Por otro lado, los resultados obtenidos por medio de RT-PCR competitiva demuestran que la expresión del ARNm del RE α alcanzó su pico alrededor del parto (PPI), duplicándose respecto al D60 (Figura 24A). En cambio, el ARNm del RE β aumentó significativamente en el D60, permaneciendo elevado durante el parto (PPI) (Figura 24B). Las Figuras 25 y 26 muestran imágenes de geles de agarosa donde se puede observar el aumento simultáneo en la expresión del ARNm de RE α y RE β en los cuernos uterinos del SUB al acercarse el parto.

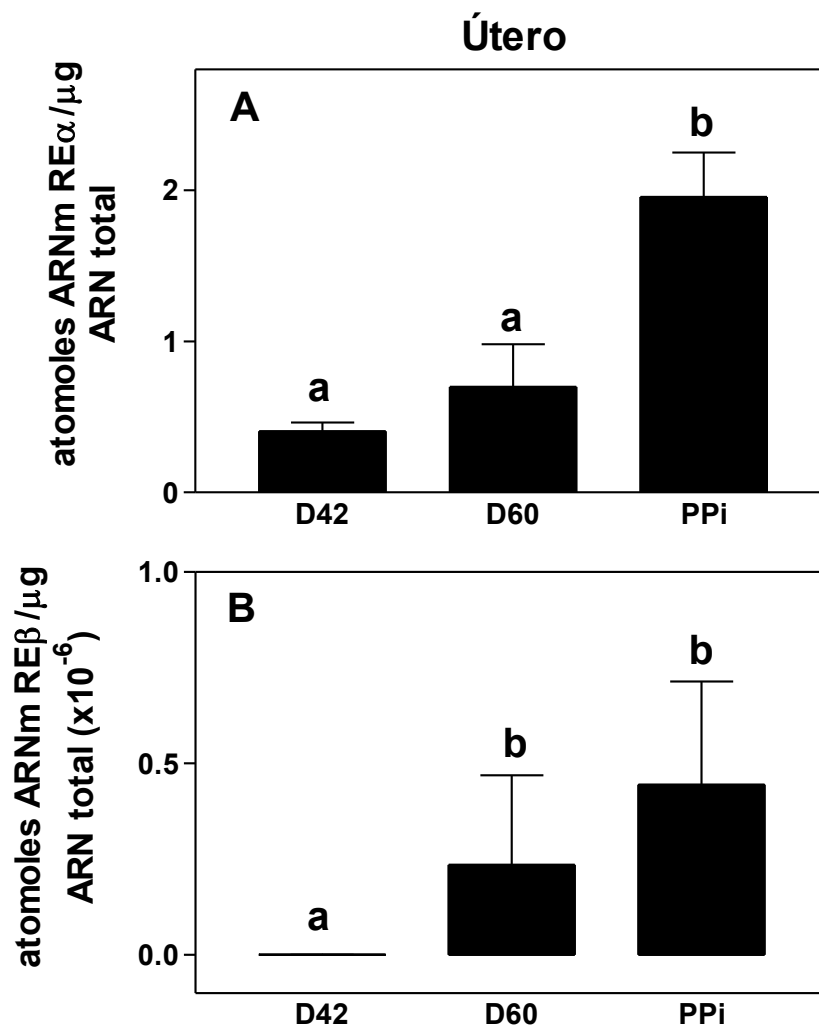


Figura 24: Expresión de ARNm de $RE\alpha$ (A) y $RE\beta$ (B) en el segmento bajo de los cuernos uterinos en D42 y D60 de la gestación, y en el posparto inmediato (PPI). Los ARNm de ambos receptores se estudiaron por RT-PCR competitiva y los resultados fueron expresados como atomoles de ARNm de $RE\alpha$ o $RE\beta/\mu g$ de ARN total. Las barras representan el promedio $\pm$ SEM de al menos 5 animales por grupo. Las diferentes letras en minúscula indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

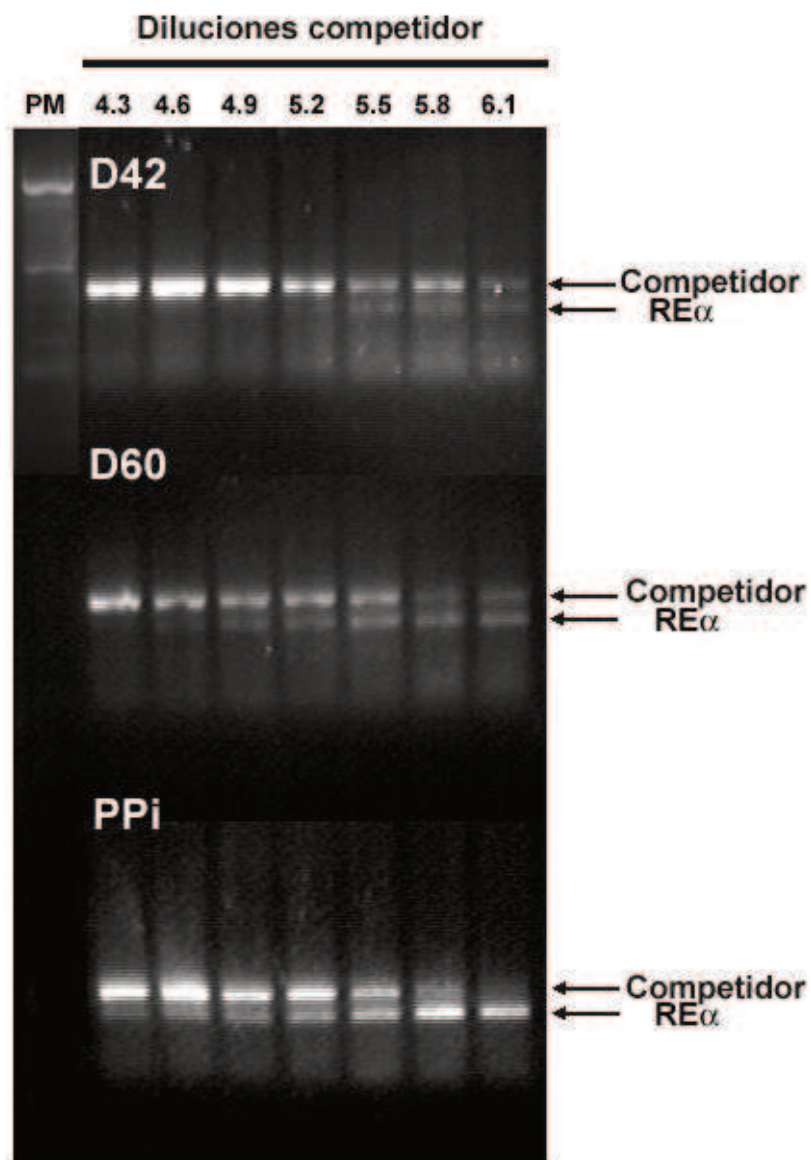


Figura 25: Análisis por RT-PCR competitiva de la expresión de ARNm de RE α en el segmento bajo de los cuernos uterinos en D42 y D60 de la gestación, y en el posparto inmediato (PPI). El rango de diluciones de competidor fue expresado como logaritmo negativo de la dilución ($-\log \text{dil}$): 4.3, 4.6, 4.9, 5.2, 5.5, 5.8 y 6.1. Se observa un aumento en la expresión de ARNm de RE α al acercarse el momento del parto.

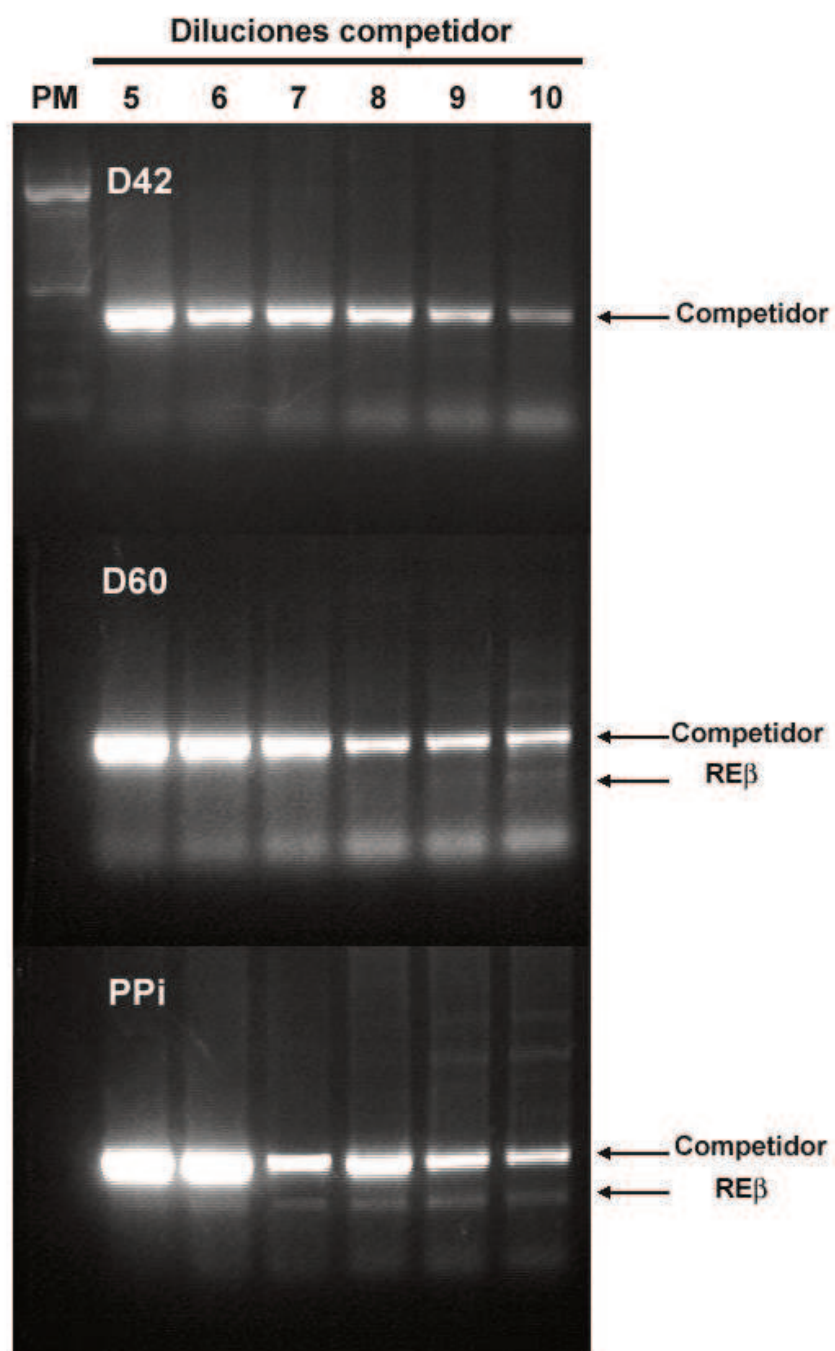


Figura 26: Análisis por RT-PCR competitiva de la expresión de ARNm de RE β en el segmento bajo de los cuernos uterinos en D42 y D60 de la gestación, y en el posparto inmediato (PPI). El rango de diluciones de competidor fue expresado como logaritmo negativo de la dilución ($-\log$ dil): 5, 6, 7, 8, 9 y 10. Se observa un aumento en la expresión de ARNm de RE β al acercarse el momento del parto.

7.3.3. Expresión de receptores en el cérvix

En el epitelio del cérvix hay una alta expresión de RP, la que se mantuvo sin variaciones significativas en todos los grupos estudiados (Figura 27). Por otro lado, la expresión epitelial de RE α disminuyó en forma gradual desde D56 hasta el momento del parto inclusive (PPi), volviendo a aumentar en el posparto temprano (1DPP).

En contraste con lo descrito para el epitelio, el porcentaje de células positivas para RP disminuyó antes del parto (D63) en el subepitelio cervical. Esta baja expresión se mantuvo durante el parto (PPi) y llegó a su menor expresión en el primer día del posparto (1DPP). Paralelamente con lo descrito para el RP, la expresión del RE α aumentó entre el D42 y D56 y permaneció elevada hasta el posparto (1DPP) (Figura 27).

Por último, las células musculares poseen elevados niveles de expresión de RP durante el parto, con una caída significativa antes (D63) y después del mismo (1DPP). También se observaron porcentajes elevados de expresión de RE α en la región muscular, desde el D56 hasta el PPi inclusive, disminuyendo a valores similares a los de D42 en 1DPP (Figura 27).

De acuerdo a estos resultados, en el subepitelio cervical de los días previos al parto coexiste una baja expresión de RP (Figura 28A) con una alta expresión de la proteína RE α (Figura 28B). La Figura 28 muestra fotomicrografías de cortes histológicos de cérvices uterinos de hembras de D63 de la gestación, que ilustran la expresión de RP y RE α en el subepitelio cervical previo al parto.

En el cérvix, el ARNm de RE α y RE β demuestra una situación diferente a del útero. El ARNm de RE α se expresó sin variaciones significativas en todos los días de la gestación evaluados mientras que no hubo expresión de ARNm del RE β en el mismo período (Figura 29). Las imágenes de los geles de agarosa donde se sembraron los productos de PCR muestran una expresión similar de RE α en los tres grupos estudiados, mientras que no se detectaron productos de amplificación para RE β (Figuras 30 y 31).

CÉRVIX

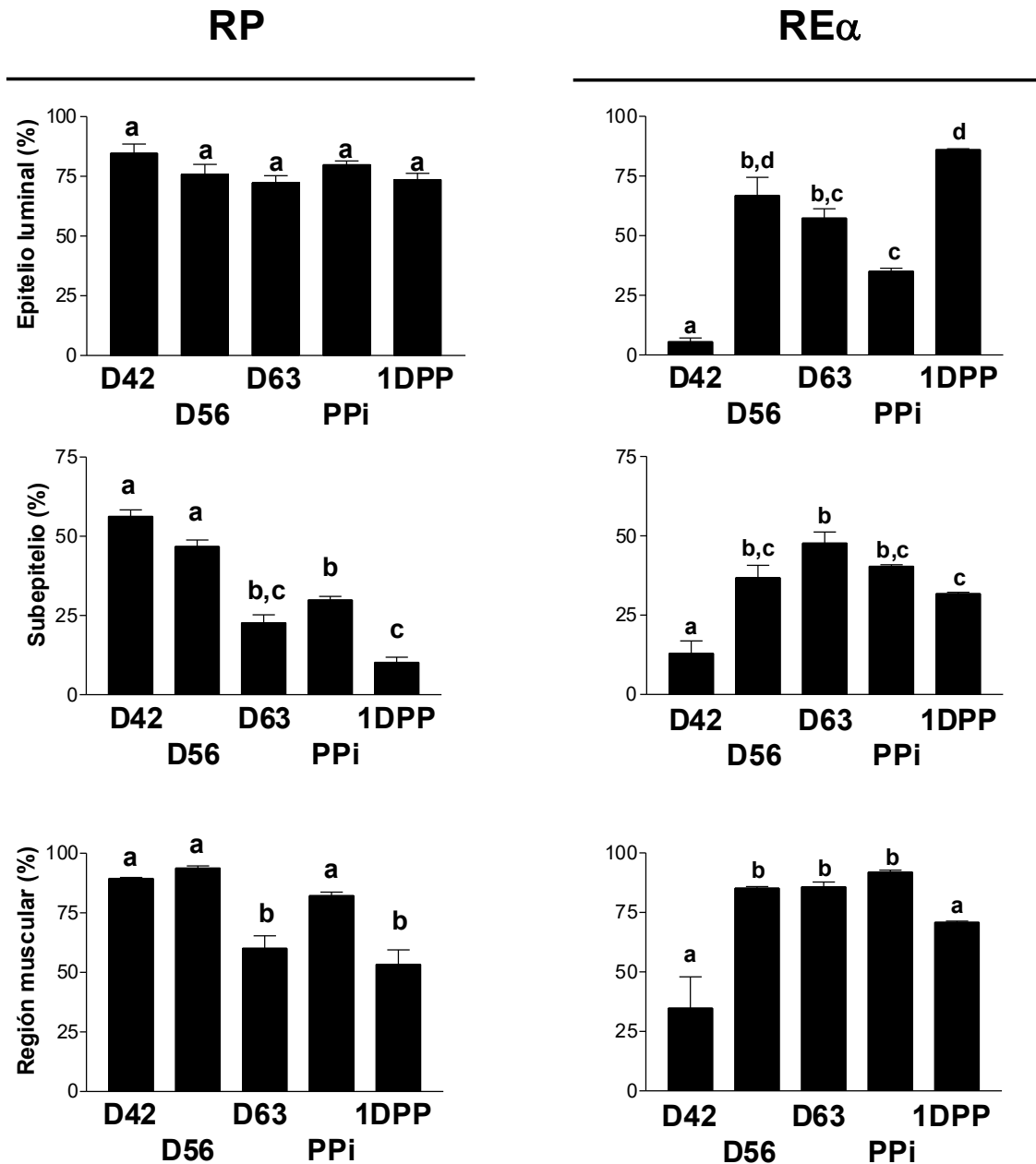


Figura 27: Expresión inmunohistoquímica de RP y RE α en el epitelio luminal, estroma subepitelial y estroma muscular del cérvix durante la gestación (D42, D56 y D63), el posparto inmediato (PPI) y 24 hs posparto (1DPP). Las regiones evaluadas fueron definidas en Materiales y Métodos. Los resultados fueron expresados como porcentaje de células positivas (%). Las barras representan el promedio $\pm$ SEM de al menos 5 animales por grupo. Las diferentes letras en minúscula indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

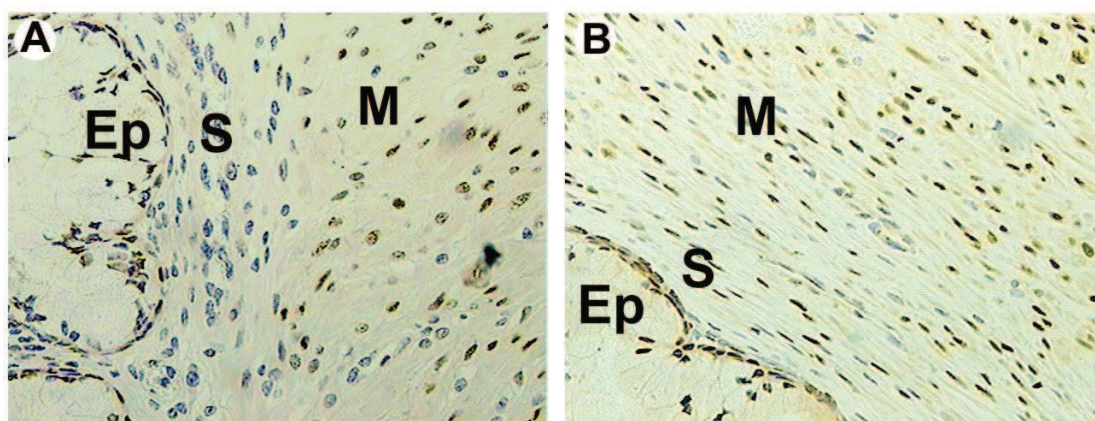


Figura 28: Fotomicrografías de secciones de cérvices uterinos de hembras de D63 de la gestación, inmunomarcadas para RP (**A**) y para RE α (**B**). Obsérvese que en el subepitelio (S) hay una baja expresión de RP (**A**), simultáneamente con una alta expresión de RE α (**B**) en la misma zona. Ep: epitelio, M: músculo. Magnificación 200X.

Cérvix

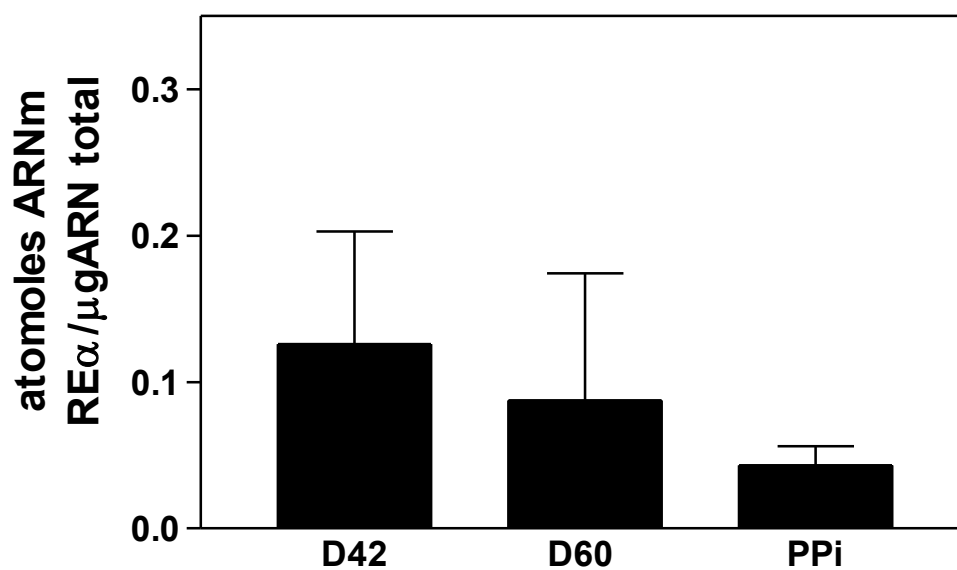


Figura 29: Expresión de ARNm de RE α en el cérvix durante la gestación (D42 y D60) y en el posparto inmediato (PPI). La expresión del ARNm se estudió por RT-PCR competitiva y los resultados fueron expresados como atomoles de ARNm de RE α / μ g de ARN total. Las barras representan el promedio $\pm$ SEM de al menos 5 animales por grupo.

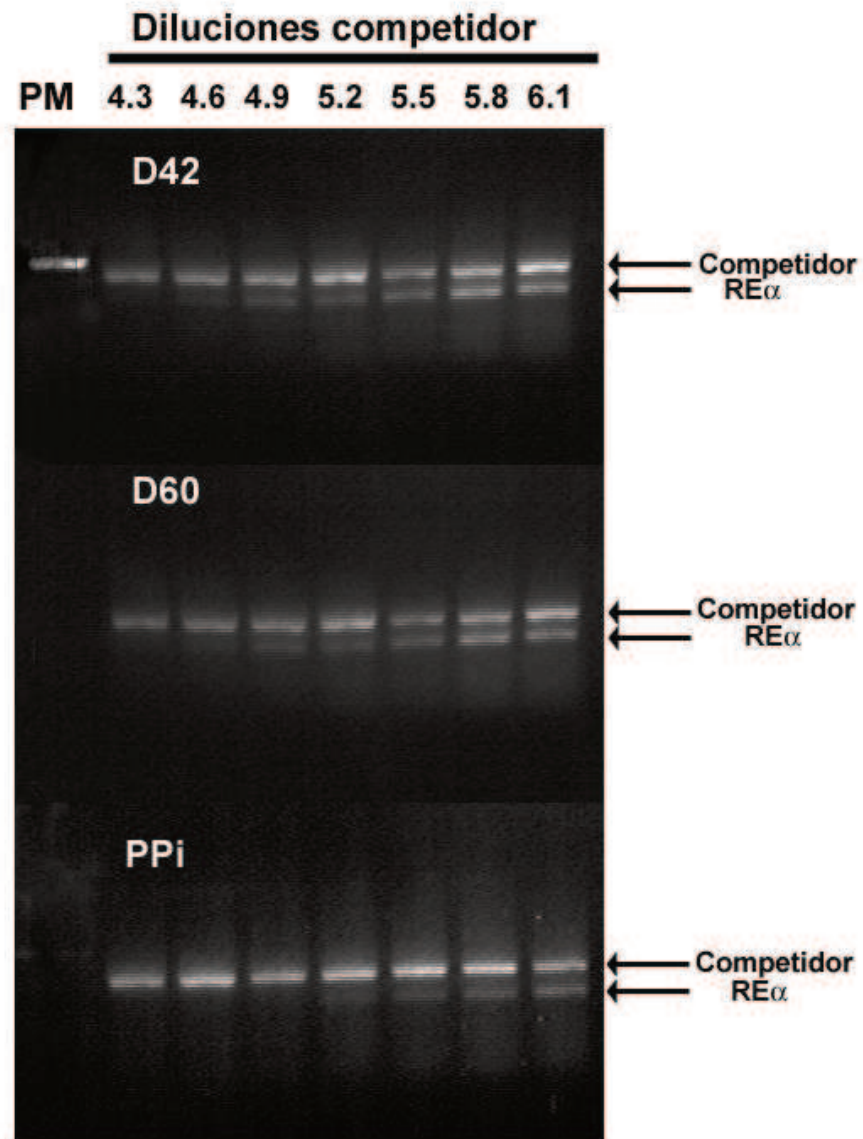


Figura 30: Análisis por RT-PCR competitiva de la expresión de ARNm de RE α en el cuello uterino de D42 y D60 de la gestación, y del posparto inmediato (PPI). El rango de diluciones de competidor fue expresado como logaritmo negativo de la dilución ($-\log \text{dil}$): 4.3, 4.6, 4.9, 5.2, 5.5, 5.8 y 6.1. El ARNm de RE α se expresa en los tres grupos evaluados, durante el período previo al parto.

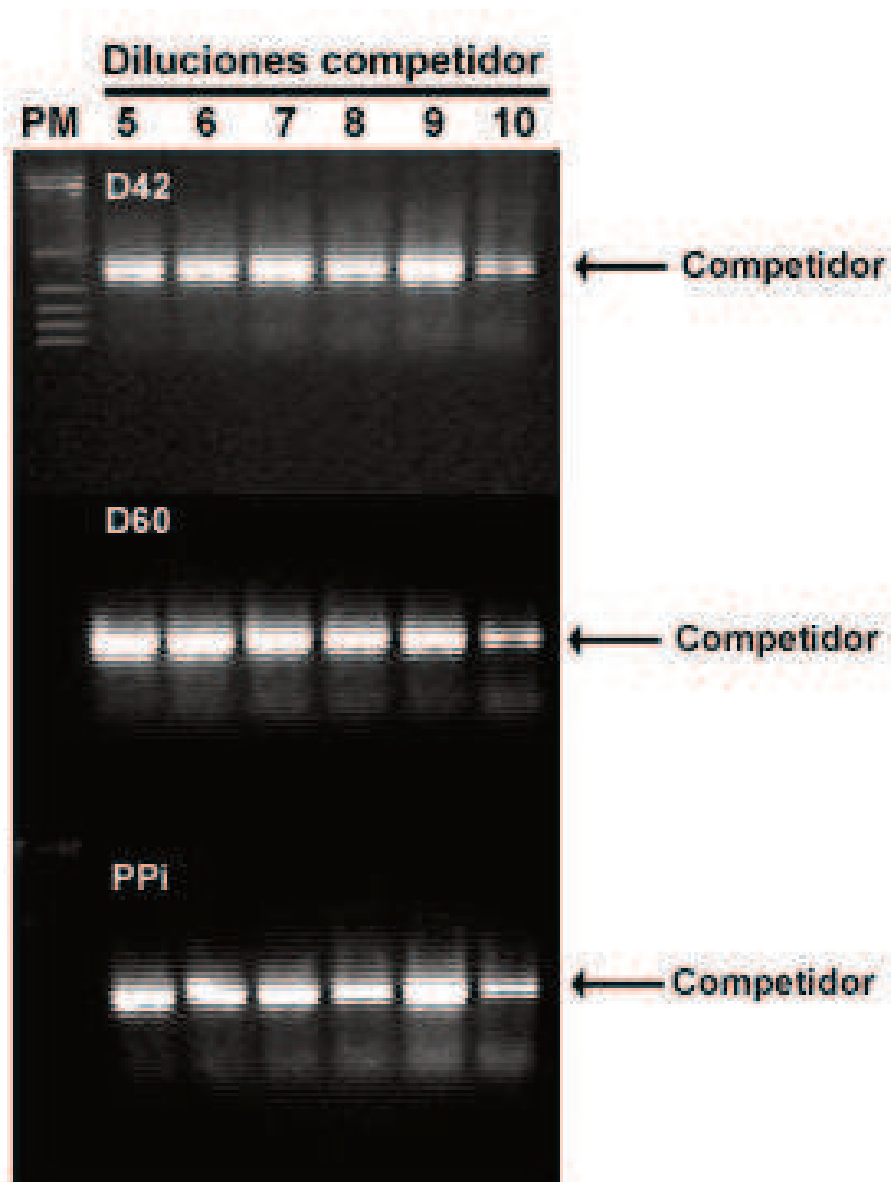


Figura 31: Análisis por RT-PCR competitiva de la expresión de ARNm de RE β en el cuello uterino de D42 y D60 de la gestación, y del posparto inmediato (PPI). El rango de diluciones de competidor fue expresado como logaritmo negativo de la dilución (–log dil): 5, 6, 7, 8, 9 y 10. No se detectó expresión de ARNm de RE β de forma previa al parto, en ninguno de los grupos estudiados.

7.3.3.1. RE α y RP en el ligamento interpúbico

La expresión de RE α en el ligamento interpúbico no varió durante el período estudiado (Figura 32), demostrando que el parto en el cobayo ocurre sin cambios significativos en la expresión de RE α en el ligamento de la sínfisis púbica. Por el contrario, hay una disminución en la expresión de RP antes del parto: los niveles de RP fueron elevados en D56 y disminuyeron hacia el D63 y PPI, volviendo a aumentar en 1DPP. En imágenes al MO representativas de la expresión de RP en D56 (Figura 33A) y D63 (Figura 33B) de la gestación, se puede observar que es menor el porcentaje de células positivas para RP en D63.

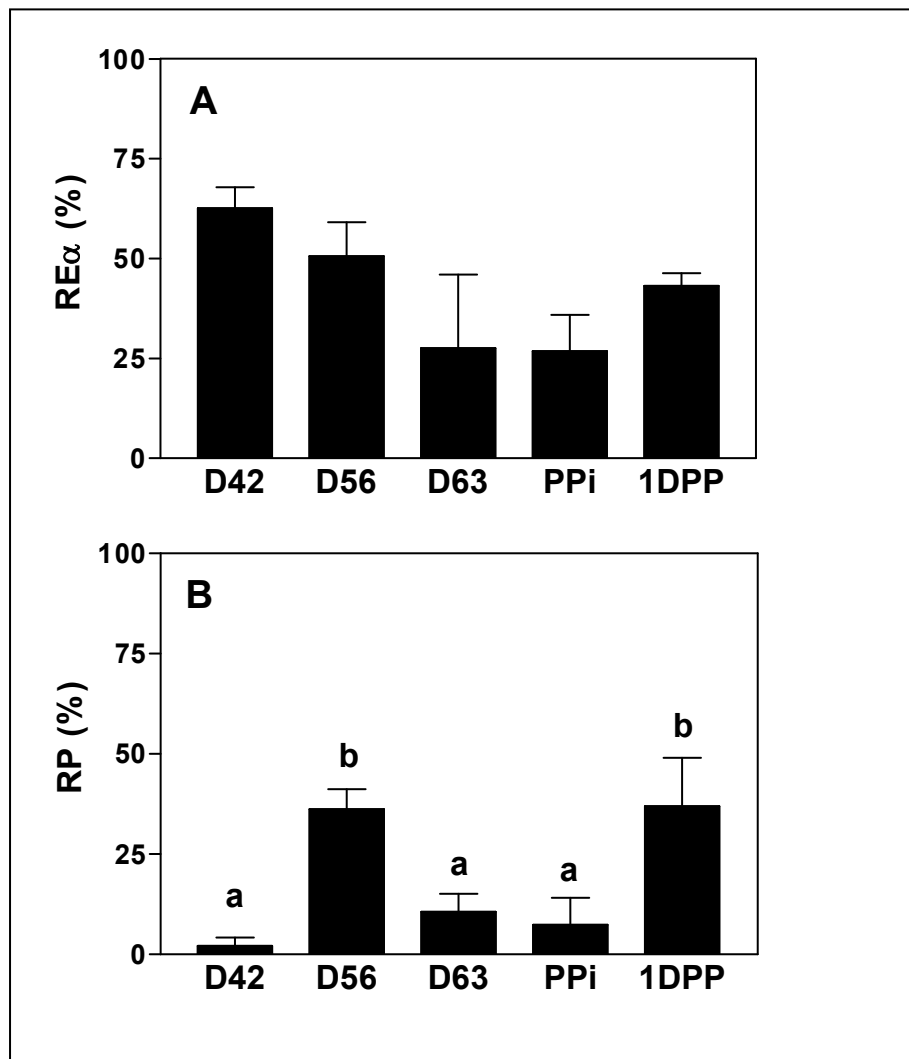


Figura 32: Expresión inmunohistoquímica de RE α (A) y RP (B) en el estroma del ligamento interpúbico durante la gestación (D42, D56 y D63), en el posparto inmediato (PPI) y 1 día posparto (1DPP). Los resultados fueron expresados como porcentaje de células positivas (%). Las barras representan el promedio $\pm$ SEM de al menos 5 animales por grupo. Las diferentes letras en minúscula indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

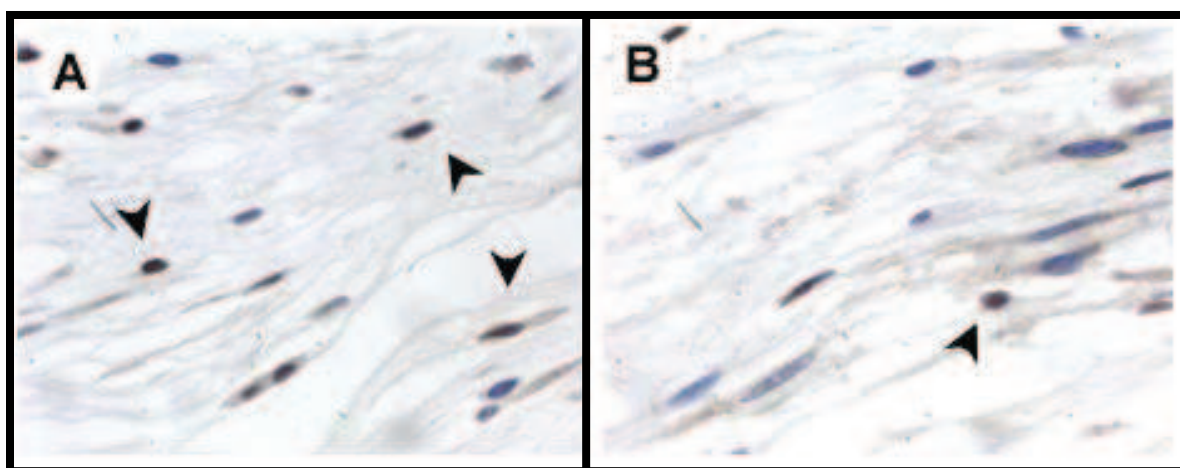


Figura 33: Fotomicrografías de secciones del ligamento interpúbico de cobayos en D56 (A) y D63 (B) de la gestación inmunomarcadas para el RP (puntas de flecha). Obsérvese la menor cantidad de células positivas para RP en D63 con relación a D56. Magnificación 400X.

El ARNm de RE α y RE β en el ligamento interpúbico posee un patrón de expresión sustancialmente diferente al encontrado en el cérvix y el útero. El ARNm del RE α prácticamente sólo se hace presente en el ligamento interpúbico en el momento del parto, cuando el ligamento alcanza su máxima dilatación (Figura 34A), mientras que el RE β alcanzó sus valores más bajos de expresión en el mismo período (Figura 34B). El parto transcurre con altos niveles de ARNm de RE α y con una bajísima expresión de RE β en el ligamento de la sínfisis púbica. Los geles sembrados con los productos de PCR correspondientes ilustran la expresión de estos receptores en la sínfisis púbica (Figuras 35 y 36).

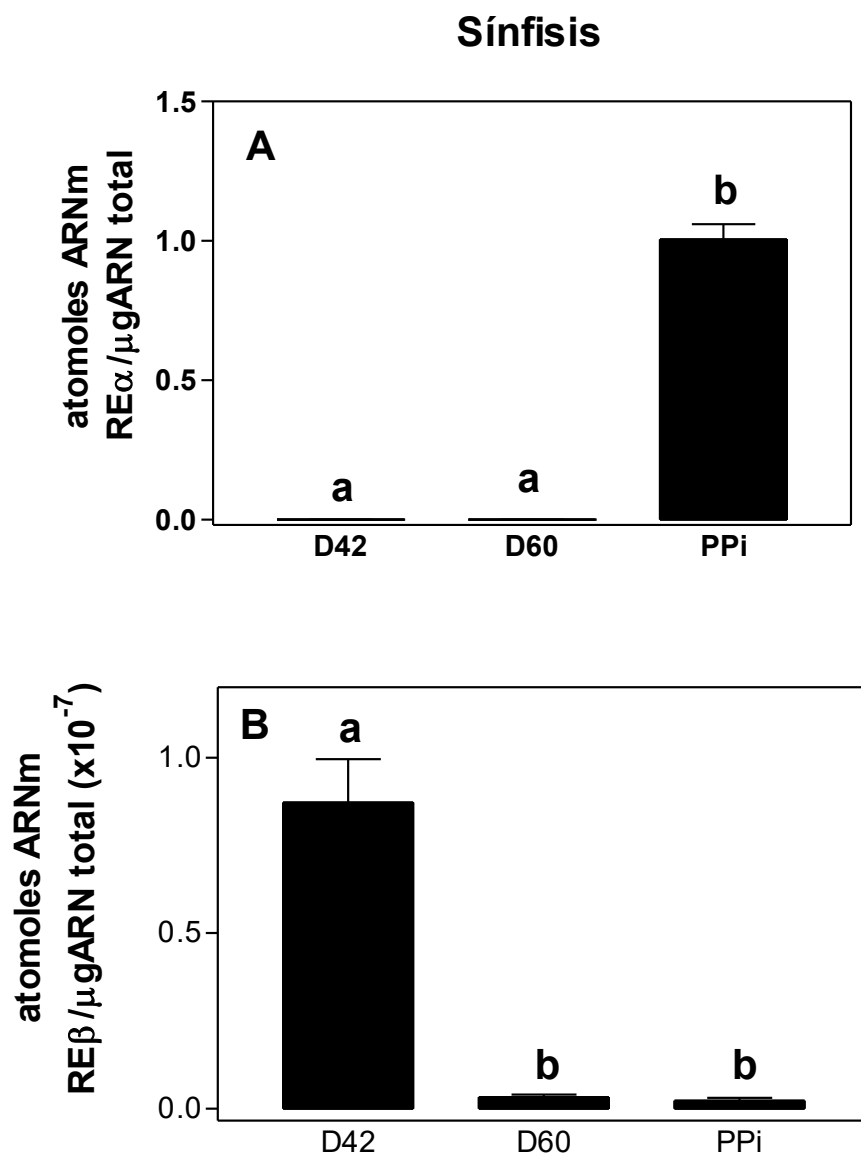


Figura 34: Expresión de REα (**A**) y REβ (**B**) en el ligamento interpúbico durante la gestación (D42 y D60) y en el posparto inmediato (PPi). La expresión de ambos receptores se estudió por RT-PCR competitiva y los resultados fueron expresados como atomoles de ARNm de REα o REβ/μg de ARN total. Las barras representan el promedio $\pm$ SEM de al menos 5 animales por grupo. Las diferentes letras en minúscula indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

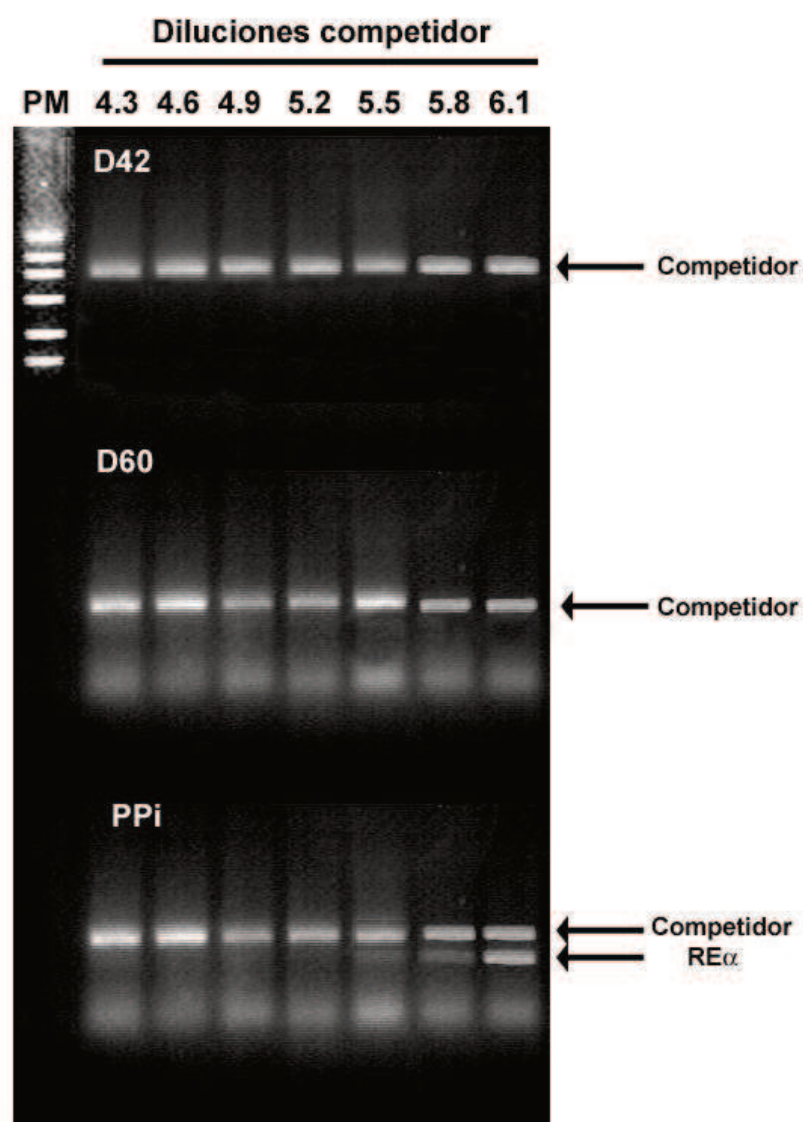


Figura 35: Análisis por RT-PCR competitiva de la expresión de ARNm de RE α en el ligamento interpúbico de D42 y D60 de la gestación, y del posparto inmediato (PPI). El rango de diluciones de competidor fue expresado como logaritmo negativo de la dilución ($-\log \text{dil}$): 4.3, 4.6, 4.9, 5.2, 5.5, 5.8 y 6.1. En las imágenes se puede observar que el acercamiento del parto coincide con un aumento en la expresión de ARNm de RE α .

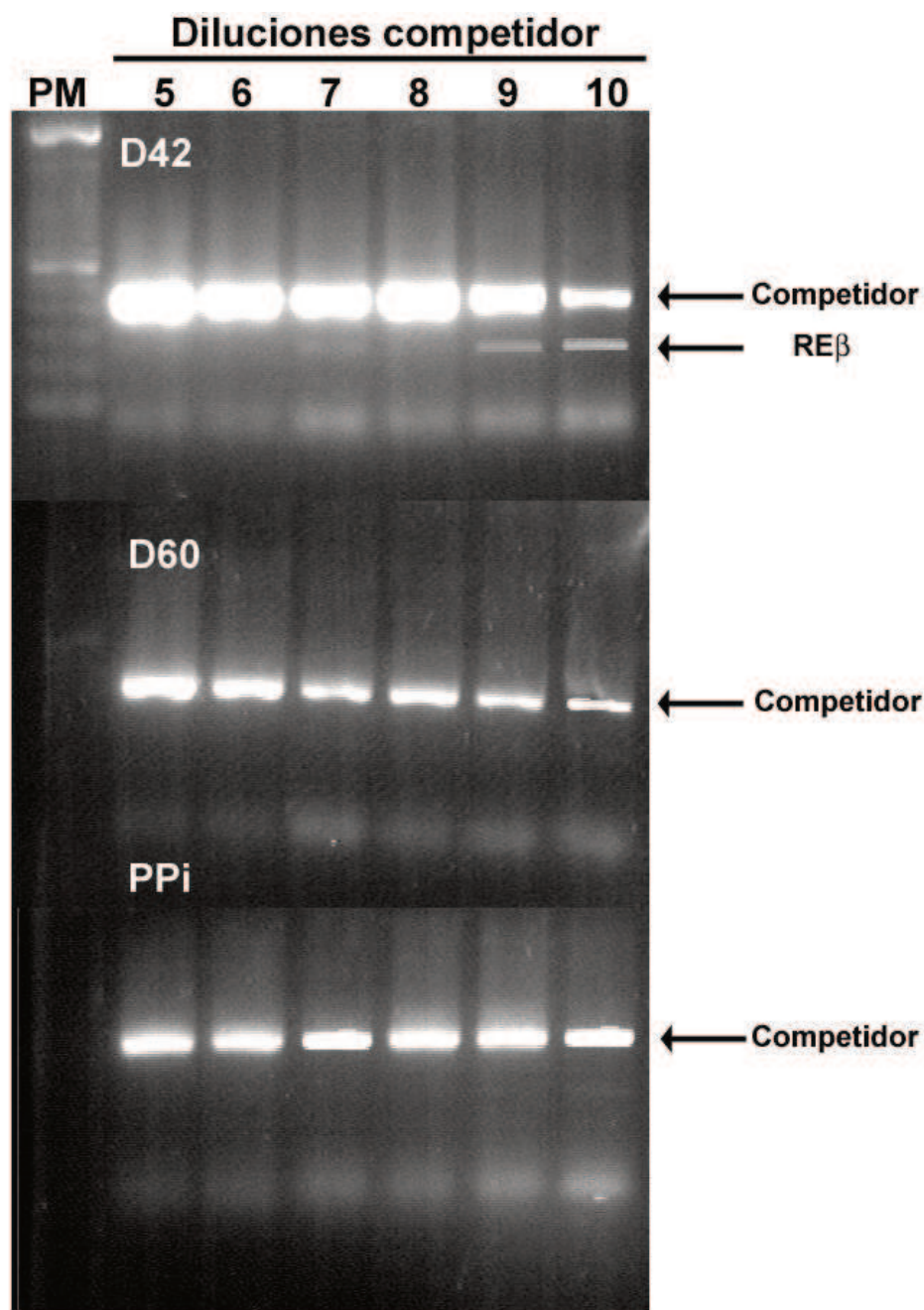


Figura 36: Análisis por RT-PCR competitiva de la expresión de ARNm de RE β en el ligamento interpúbico de D42 y D60 de la gestación, y del posparto inmediato (PPI). El rango de diluciones de competidor fue expresado como logaritmo negativo de la dilución ($-\log \text{dil}$): 5, 6, 7, 8, 9 y 10. A diferencia de lo observado para RE α (Figura 35), el ARNm de RE β disminuye a medida que avanza la gestación.

Teniendo en cuenta que, de acuerdo a los resultados presentados hasta ahora, el estroma subepitelial del cérvix es una región donde ocurren cambios significativos a medida que nos acercamos al parto (ie: remodelación de las fibras de colágeno, cambios en los niveles de expresión de RE α y RP), se decidió analizar con mayor profundidad esta región. Por ello, se investigó si los cambios que fueron descriptos para esta región tisular tenían algún tipo de patrón de asociación temporal. Para esto, se ensayaron una serie de análisis de correlación desde D42 de la gestación hasta PPI inclusive, con los resultados obtenidos en el subepitelio del cérvix y útero. Se analizaron parámetros que intentan reflejar fenómenos histofisiológicos relacionados con cambios en la tensión de los tejidos (ie: la intensidad de birrefringencia que mide los niveles de remodelación del colágeno) y el porcentaje de células positivas para RE α y RP que indicarían la sensibilidad de los órganos de interés en relación a los niveles circulantes de Eg y Pg.

Los resultados demuestran que, en el subepitelio cervical, la expresión del RP se correlaciona positivamente con la caída en la intensidad de birrefringencia (Figura 37A, $r = 0,8168$, $p < 0,001$), mientras que la expresión de RE α tiene una correlación inversa (Figura 37B, $r = -0,7353$, $p < 0,01$). Recordando que la intensidad de birrefringencia está inversamente relacionada con la remodelación de colágeno (ver Materiales y Métodos), estas asociaciones indican que, durante la gestación y el parto, la mayor remodelación del colágeno del cérvix está asociada temporalmente con una caída en la expresión de RP y un aumento del RE α . También observamos que ambos receptores, RE α y RP, presentan una asociación inversa a medida que nos acercamos al parto (Figura 38: $r = -0,5999$, $p < 0,01$).

Por el contrario, el análisis de la expresión de RP y RE α en el estroma subepitelial de los cuernos uterinos, demuestra que ambos receptores no están asociados temporalmente con la remodelación del colágeno (Figura 39A: $r = 0,1796$, $p > 0,01$ y Figura 39B: $r = -0,04820$, $p > 0,01$). Tampoco presentan ningún tipo de asociación entre ambos receptores (Figura 40, $r = -0,4483$, $p > 0,01$).

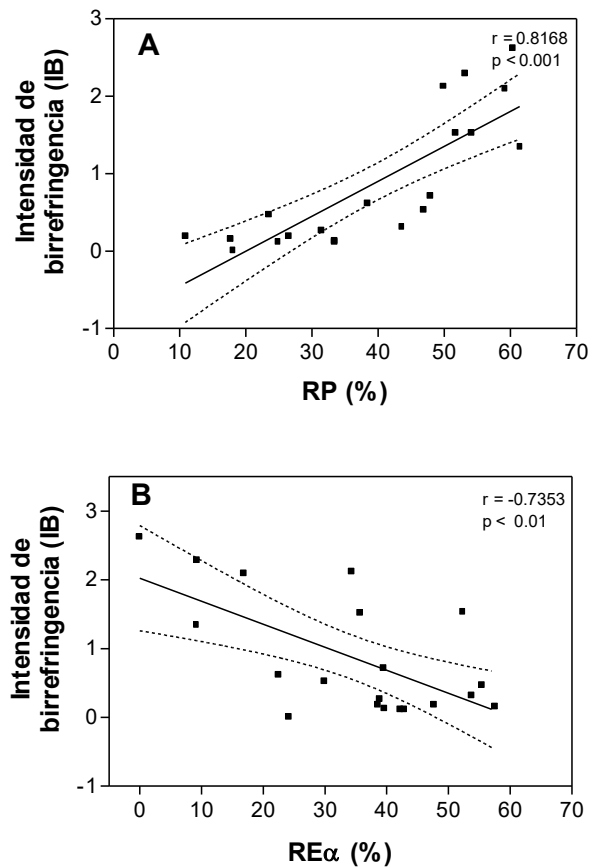


Figura 37: Análisis de correlación entre la intensidad de birrefringencia y expresión de RP (**A**) o REα (**B**) en el subepitelio del cérvix uterino durante la gestación (D42, D56 y D63) y el posparto inmediato (PPI). Las gráficas demuestran que en el estroma subepitelial del cérvix, la expresión de RP y de REα están positiva ($r = 0,8168$, $p < 0,001$) y negativamente ($r = -0,7353$, $p < 0,01$) correlacionadas con la remodelación del colágeno, respectivamente. r = coeficiente de correlación.

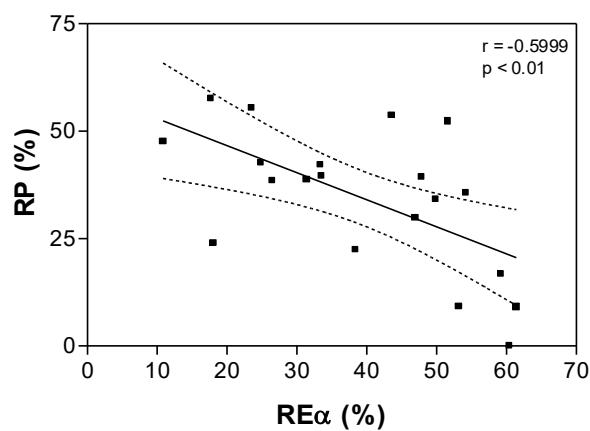


Figura 38: Análisis de correlación entre la expresión de RP y REα en el subepitelio del cérvix uterino durante la gestación (D42, D56 y D63) y el posparto inmediato (PPI). Se

observa una correlación inversa entre ambos receptores ($r = -0,5999$, $p < 0,01$), durante el período estudiado. r = coeficiente de correlación.

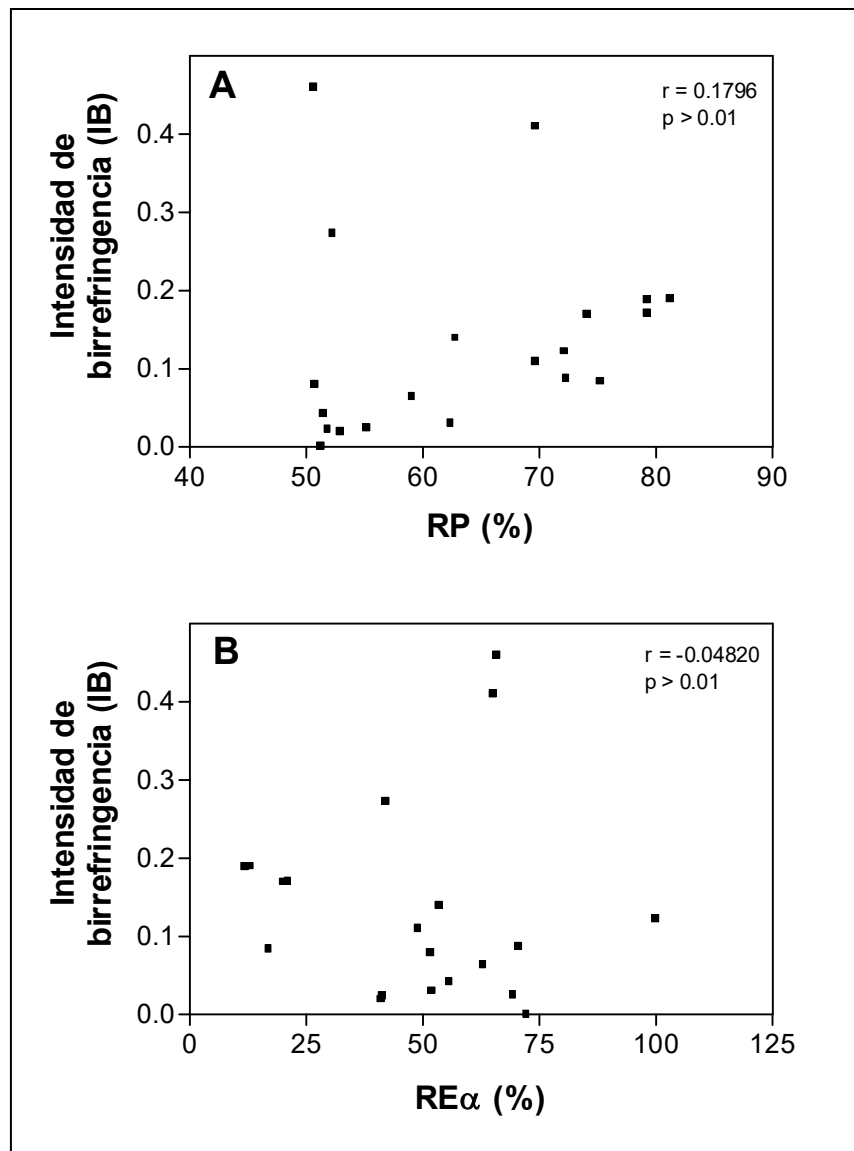


Figura 39: Análisis de correlación entre la intensidad de birrefringencia y la expresión de RP (A) o RE α (B) en el subepitelio de los cuernos uterinos durante la gestación (D42, D56 y D63) y el posparto inmediato (PPI). Se muestra que en el estroma subepitelial uterino la expresión de RP ($r = 0,1796$, $p > 0,01$) y RE α ($r = -0,04820$, $p > 0,01$) no están asociadas con la intensidad de birrefringencia. r = coeficiente de correlación.

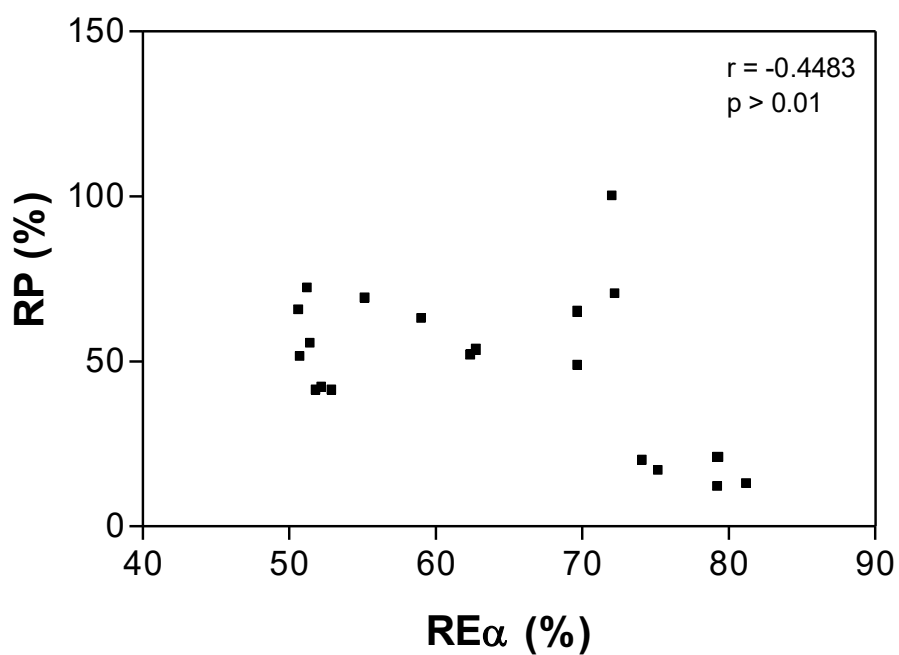


Figura 40: Análisis de correlación entre la expresión de RP y REα en el subepitelio de los cuernos uterinos durante la gestación (D42, D56 y D63) y el posparto inmediato (PPI). Se observa que las expresiones de RP y REα no están correlacionadas durante el período estudiado ($r = -0,4483$, $p > 0.01$). r = coeficiente de correlación.

Discusión

8. Discusión

El parto está dividido en dos etapas o fases: una primera relativamente larga, fase preparatoria o condicionante, y una segunda corta y rápida, la fase activa (Garfield y col., 1998). Para el momento en que comienza la fase activa, los órganos del canal de parto deben estar preparados: es necesario que el útero se transforme de una estructura que ha permanecido en relativa inactividad durante toda la gestación (quiescencia uterina), a una estructura capaz de producir contracciones intensas y coordinadas; en cambio, el cérvix se debe ablandar de tal manera que se dilate fácilmente ante la presión del feto, impulsado por las contracciones intensas del útero (Challis y Lye, 1994; Hafez, 2000; Muñoz-de-Toro y col., 2003). Además de estas transformaciones del útero y del cérvix, también es necesaria una extensa separación de los huesos pélvicos para permitir el pasaje de los fetos durante el parto (Sherwood, 1994; Ortega y col., 2003). Recientemente, hemos demostrado que en la sínfisis púbica del cobayo a medida que se acerca el parto, ocurren cambios histomorfológicos similares a los del cérvix, por lo que sugerimos incluir al ligamento interpúbico dentro de la fase preparatoria (Rodríguez y col., 2003a). Este último evento es mucho más evidente en algunas especies animales, como cobayo, murciélago, ratón y en la mujer (aunque en esta última es comparativamente menos notable que en las especies animales citadas).

Por lo tanto, un parto exitoso requiere que la fase activa del mismo recién se inicie cuando los tejidos del útero, el cérvix y la sínfisis púbica estén preparados. Esta preparación tendría lugar durante la última etapa de la gestación, (Chwalisz, 1994; Challis y Lye, 1994; Garfield, 1998; Muñoz-de-Toro y col, 2003).

Como detallamos en la introducción, todas las hipótesis propuestas para explicar el inicio del parto se basan en el cambio de un medio ambiente endocrino dominado por la Pg a otro dominado por los Eg (Challis y Lye, 1994; Garfield y col., 1998, Challis y col., 2000; Mesiano y col., 2002; Mesiano, 2004). En la mayoría de los mamíferos este cambio se realiza a través de modificaciones en los niveles circulantes de Pg y Eg maternos (disminución de Pg e incremento de Eg), causados por un cambio en la actividad

estereoidogénica placentaria (ovejas) o por la regresión del cuerpo lúteo (ratas, ratones, conejos, cabras y cerdos). Sin embargo, en algunas especies (cobayos, primates no humanos y mujeres) la última etapa de la preñez y el parto transcurre en ausencia de cambios significativos en los niveles séricos de ambas hormonas. En consecuencia, el modelo del parto propuesto para las mencionadas especies tiene características particulares:

- La acción biológica que la Pg y los Eg ejercen sobre el útero no estaría determinada por variaciones en sus niveles circulantes sino por cambios en la susceptibilidad del tejido. Como los mecanismos que modifican la susceptibilidad de los tejidos a las hormonas circulantes, producen una variación en la acción biológica de la hormona por una vía diferente a los cambios en la concentración sérica hormonal, se los ha denominado mecanismos funcionales. Uno de los principales mecanismos funcionales propuestos es la modificación en la expresión tisular de los receptores para Pg y Eg.
- Challis y col (2000), basándose en que varias moléculas asociadas temporalmente con el parto también presentan una regulación espacial, postularon que la Pg promovería una regionalización funcional en el útero. En el SUA habría una caída en la acción biológica de la Pg (*functional progesterone withdrawal*) mientras que en el SUB ocurriría un aumento de la misma o se mantendría sin variaciones. La caída funcional de Pg en el SUA permitiría el estímulo de los Eg sobre la expresión de los genes de proteínas asociadas a la contracción (*functional estrogen activation*), aumentando la actividad contráctil en esta zona, mientras que el SUB seguiría bajo el bloqueo de la Pg y se mantendría en estado de relajación. De acuerdo con esta hipótesis, los niveles altos de Pg serían necesarios para que la acción biológica ejercida sobre el músculo uterino difiera entre las zonas alta y baja del útero: la zona alta se contraería con fuerza, mientras que la zona baja se mantendría en estado de relajación.

La hipótesis que orientó el presente trabajo supone que los órganos de todo el canal de parto se preparan sincronizadamente durante la última parte de la gestación a través de mecanismos funcionales que modifican la susceptibilidad de sus tejidos a los niveles circulantes de Pg y Eg. El uso del cobayo, que es un modelo animal con una endocrinología de la preñez y del parto similar a la de la mujer (Chwalisz, 1994; Trewin y Hutz, 1999), nos permitió investigar si en los tejidos de los órganos que conforman el canal duro (sínfisis púbica) y blando (útero y cérvix) del parto se producen modificaciones en la expresión tisular de los receptores durante la última etapa de la gestación presentando un patrón de regionalización determinado.

El cérvix uterino debe experimentar una serie de adaptaciones para permitir un parto exitoso. Estas adaptaciones consisten principalmente en modificaciones en la matriz extracelular y en los compartimientos celulares (Ludmir y Sehdev, 2000). Trabajos previos de nuestro laboratorio han podido definir las principales adaptaciones que sufre el cérvix uterino y un resumen de estos resultados forma parte de una revisión publicada recientemente (Muñoz-de-Toro y col., 2003). Brevemente, demostramos que el cérvix de la rata experimenta profundas transformaciones en la composición física del tejido conectivo durante la preñez y en el momento del parto (Luque y col., 1996; Luque y col., 1998). Concretamente, se produce una gran desorganización del colágeno tipo I, proceso promovido fundamentalmente por la Rlx (Luque y col., 1998). En la mujer, además, se ha demostrado que este proceso de desorganización ocurre tanto en el cérvix como en el cuerpo del útero (Granström y col., 1989). Por otra parte, asociado con la colagenólisis se ha demostrado la presencia de células infiltrantes provenientes del torrente sanguíneo (Luque y Montes, 1989). En la rata, la infiltración es de polimorfonucleares eosinófilos, y es un fenómeno promovido por el E₂ e inhibido por la Pg, a través de la interacción hormona-receptor (Luque y col., 1996; Ramos y col., 2000). En la oveja, el cobayo y la mujer, los leucocitos que invaden el cuello uterino al momento del parto son polimorfonucleares neutrófilos (Junqueira y col., 1980; Hegele-Hartung y col., 1989; Luque y col., 1997). En el presente trabajo de tesis investigamos una posible asociación entre la remodelación de colágeno, como principal proceso fisiológico de adaptación del cuello uterino durante la etapa preparatoria del

parto, y la expresión de RE y RP, como mecanismo funcional responsable de modificar la susceptibilidad del tejido a los niveles circulantes de Pg y Eg.

A. La remodelación del colágeno ocurre tanto en el cérvix como en el útero, pero en distintos momentos de la gestación.

El cuello uterino se prepara para el parto mediante un proceso conocido como maduración cervical (*cervical ripening*). Este es un proceso activo, donde un conjunto de eventos bioquímicos alteran la elasticidad del órgano y lo transforman en una estructura fácilmente distensible ante las contracciones del músculo uterino, de manera que el diámetro interno del cérvix se agrande lo suficiente para que los fetos atraviesen sin traumatismos el canal de parto. Este proceso de maduración consiste fundamentalmente en una extensa reorganización de las fibras de colágeno, junto a profundas variaciones de los componentes de la matriz extracelular cervical (Muñoz-de-Toro y col., 2003). Granström y col. (1989) investigaron en mujeres si estos cambios en el cérvix también ocurrían en el tejido conectivo del cuerpo del útero. Sus resultados demostraron una disminución en la concentración de colágeno, de glicosaminoglicanos y de ácido hialurónico, junto con una reorganización de las fibras de colágeno y un incremento en la actividad colagenolítica en ambos sitios (cérvix y cuerpo del útero). De esta manera concluyeron que, en la mujer, el tejido conectivo del cuerpo del útero realiza un proceso de maduración similar al demostrado para el cérvix. En la primera parte de esta tesis, mediante el empleo del método de Picrosirius-polarización, evaluamos la remodelación de colágeno en el cérvix y los cuernos uterinos. Nuestros resultados demuestran que en cobayos, el útero realiza una remodelación de las fibras de colágeno similar a la observada en el cérvix (Figuras 17 y 19). En el cobayo, como en la mujer, habría un proceso de reorganización del colágeno del tejido conectivo tanto en el útero como en el cérvix.

En nuestro modelo animal pudimos investigar el proceso de remodelación fibrilar del colágeno durante un período prolongado, abarcando la gestación, el parto y el posparto. De esta manera observamos que, a medida que nos acercamos al momento del parto, el aumento en la remodelación y

reordenamiento del colágeno ocurre antes en el útero que en el cérvix (Figuras 17 y 19). Esta diferencia podría explicarse si se tiene en cuenta que durante la preñez el útero debe relajarse para ir acomodando su estructura al feto que va creciendo en tamaño, mientras que el cérvix debe mantener una estructura firme y permanecer cerrado hasta el momento del parto (Huszar y Naftolin, 1984; Huszar y Walsh, 1991). Otra posible explicación, sugerida para las mujeres, es que el aumento en la reorganización de las fibras de colágeno en el miometrio uterino puede facilitar la formación de *gap junctions* entre las células musculares y favorecer el desarrollo posterior de contracciones coordinadas y sincronizadas durante la etapa activa del trabajo de parto (Granström y col., 1989).

B. La infiltración de polimorfonucleares y la remodelación del colágeno en el útero son procesos disociados temporalmente.

Analizando los resultados de la cinética de la infiltración de neutrófilos en asociación con la remodelación del colágeno (Figuras 17 y 19), observamos que ambos procesos biológicos están relacionados temporalmente en el cérvix pero no en el útero. Los resultados de esta tesis demuestran que los momentos de máxima remodelación del colágeno en el cuello uterino coinciden con la mayor infiltración de polimorfonucleares neutrófilos al tejido, mientras que en el útero ambos procesos están temporalmente disociados: en el momento en que los neutrófilos invaden el útero las fibras de colágeno ya han completado los mayores cambios en sus niveles de organización.

El mecanismo que permite el ablandamiento cervical es considerado un proceso bioquímicamente activo que se asemeja a un proceso inflamatorio. A partir de esta observación, numerosos trabajos han postulado que los polimorfonucleares infiltrantes, a través de la síntesis y/o secreción de colagenasas o activación de colagenasas preexistentes en el tejido, serían los encargados de promover la remodelación de las fibras de colágeno, evento necesario para permitir la caída de la resistencia cervical al momento del parto (Luque y col., 1996; Luque y col., 1998; Muñoz-de-Toro y col., 2003). El hecho de que el proceso de remodelación del colágeno en el útero se efectúe antes

de que el órgano sea invadido por los leucocitos, podría significar que estos dos eventos no tienen una relación causal entre sí. Esta explicación está de acuerdo con los resultados obtenidos por nuestro grupo en un trabajo previo realizado en ratas donde investigamos el papel de la Rlx y el E₂ en el control hormonal de la dilatación cervical. En este trabajo demostramos que la Rlx promueve la remodelación de las fibras de colágeno en ausencia de la infiltración de polimorfonucleares eosinófilos (Luque y col., 1998). De acuerdo con los resultados de esta tesis, la infiltración de neutrófilos y la remodelación del colágeno descritos para el útero del cobayo en el momento del parto también serían fenómenos independientes.

C. La actividad contráctil del útero, regulada por Pg y Eg, presenta cambios funcionales regionales.

Nuestros resultados demuestran una disminución transitoria en el porcentaje de células musculares del SUB que expresan RP en el período previo al parto (Figura 22). Esta disminución es transitoria ya que la expresión de RP vuelve a elevarse en el PPI, indicando que el parto transcurre con altos niveles de expresión de RP en la zona baja del útero. Este resultado sugiere que no habría una caída en la acción biológica de la Pg en el SUB mediada por un menor número de RP. Esto apoyaría el concepto de regionalización del útero propuesto por Challis y col. (2000), según el cual el SUB se mantendría en estado de relajación por una persistente acción de la Pg que inhibiría el estímulo de los Eg sobre la expresión de los genes de las proteínas activadoras de la contracción en esta zona del útero.

Otra posible explicación para la alta expresión de RP en el SUB durante el parto, es que sí ocurra una caída en la acción biológica de la Pg sobre el miometrio uterino de esta zona, pero que la misma no sea consecuencia de la disminución en la expresión de RP sino que esté mediada por otro mecanismo. Recientemente, Pieber y col (2001) demostraron un incremento del ARNm de RP-A en las células musculares del útero de mujeres en trabajo de parto. Otro trabajo, también en mujeres, estudió la expresión de moléculas en biopsias de útero antes y después del trabajo de parto (Mesiano y col., 2002) observando

un aumento en la expresión del ARNm de RP-A y en la relación RP-A/RP-B asociado al comienzo del trabajo de parto. Estos estudios demostraron que el inicio de la fase activa del trabajo de parto en mujeres estaría relacionado con un incremento en la cantidad relativa de RP-A respecto de RP-B. Basados en que en la mayoría de las células y sistemas promotores estudiados el RP-A inhibe la actividad transcripcional estimulada por RP-B, estos autores postulan que la caída funcional de la acción de la Pg en el útero humano ocurre por un incremento relativo de RP-A en relación a RP-B en las células musculares (Pieber y col. 2001; Mesiano y col., 2002; Mesiano, 2004). Los resultados obtenidos en esta tesis, en los *Western blot* para RP, demuestran que en útero de cobayo hay cuatro isoformas de RP, similares a las descritas en mujeres: RP-A, RP-B y RP-C (Figura 20). Este hallazgo nos permite sugerir que en el cobayo, al igual que en la mujer, el mecanismo funcional que provocaría una disminución en la acción de la Pg sobre las células musculares uterinas podría consistir en un cambio en la relación RP-A/RP-B. Teniendo en cuenta esta última posibilidad, no podemos concluir si existe o no una disminución funcional de la acción de la Pg en esta región del útero.

Como describiéramos en la introducción, el RE β presenta una potente acción inhibitoria sobre el estímulo de la actividad transcripcional promovida a través del RE α en células que coexpresan ambos receptores (Maruyama y col., 1998; Kass y col., 2004). Esta propiedad fundamenta el hecho de que los cambios en la expresión de RE α y de RE β puedan ser tomados como un mecanismo funcional que modifique la acción biológica de los Eg circulantes sobre las células del SUB (activación funcional a Eg) (Mesiano y col. 2002; Mesiano, 2004). El uso de la metodología de RT-PCR competitiva, puesta a punto en nuestro laboratorio (Ramos y col., manuscrito en preparación), nos permitió cuantificar con precisión la expresión de los ARNm del RE α y RE β . Observamos que, a medida que progresa la gestación y se acerca el parto, los ARNm de RE α y RE β aumentan de forma paralela en el SUB. Este incremento simultáneo y paralelo podría indicar que el estímulo promovido por los Eg a través de RE α podría estar bloqueado por un aumento en la expresión de RE β en esta zona baja del útero (SUB). La confirmación de esta hipótesis requiere, entre otros, estudios que evalúen la co-localización celular de ambos RE.

La alta expresión de RP y del ARNm de RE β en la porción baja del útero (SUB) durante el parto sugeriría que esta región no se transformaría en un tejido con capacidad de generar contracciones intensas y coordinadas ante los altos niveles circulantes de agentes estimulantes como la OT y las PGs. Teniendo presente la regionalización propuesta por Challis y col. (2000) para el útero, decidimos investigar mecanismos que modifiquen la susceptibilidad del tejido uterino en el SUA. Para ello, extendimos nuestro estudio de los ARNm de ambos RE a la zona alta del útero (SUA). Resultados preliminares, muestran que en el SUA los cambios son diferentes de los descritos en el SUB: hay un aumento del ARNm del RE α asociado con una disminución del RE β . Estos resultados, de confirmarse en un mayor número de animales, sugerirían un aumento en la acción biológica ejercida por los Eg sobre el tejido de la zona alta del útero. Esto promovería la mayor expresión de las proteínas activadoras de la contracción (proteínas que forman los canales iónicos, receptores para PGs y OTR y *gap junctions*) en la zona alta del útero con respecto a la zona baja. De esta manera, el útero respondería con contracciones fuertes y sincronizadas sólo en la porción alta, mientras que la zona baja permanecería en un relativo estado de relajación. Esto último explicaría el mecanismo de tránsito del feto desde su ubicación en el útero hacia el canal cérvico-vaginal.

D. La remodelación del colágeno en el cérvix uterino está asociada con mecanismos funcionales que modifican la susceptibilidad del tejido a la Pg y Eg.

Con el objeto de evaluar si la expresión de RE y RP varía en el cérvix uterino al acercarse el parto, investigamos por inmunohistoquímica la expresión de RP y RE α en el tejido cervical. Como la maduración cervical ocurre fundamentalmente por cambios histomorfológicos de la región subepitelial (Huszar y Walsh, 1991), dividimos el estudio del cérvix en regiones tisulares, cuantificando por separado la expresión de receptores en epitelio, subepitelio y músculo cervical. Observamos que, hacia el final de la gestación, las células del estroma subepitelial disminuyen progresivamente su expresión de RP mientras que mantienen una alta expresión de RE α (Figura 27). Aplicando

análisis estadísticos de correlación, confirmamos que la variación de estos receptores está asociada temporalmente de forma inversa: a medida que nos acercamos al momento del parto la expresión de RP cae, manteniéndose elevada la expresión de RE α (Figura 38). A los resultados obtenidos por inmunohistoquímica, se suman los de la expresión del ARNm de RE α y RE β cuantificado por RT-PCR competitiva. En el período evaluado, desde D42 de la gestación hasta el PPI, el ARNm del RE β no se expresó en el tejido cervical mientras que sí lo hizo el ARNm del RE α (Figura 29).

La disminución de RP en las células del estroma subepitelial, junto con la alta expresión del RE α (tanto de la proteína como del ARNm), y la ausencia del ARNm del RE β , indican que en el cérvix uterino ocurren de manera simultánea una caída en la acción biológica de la Pg y un aumento en la de los Eg. Esto significa que, durante la etapa preparatoria del parto, y de manera localizada en el estroma subepitelial del cuello uterino, se produce un cambio del estímulo endocrino con predominio de acción de la Pg a otro donde prevalecen las distintas acciones biológicas promovidas por los Eg. Este cambio en el microambiente endocrino que ocurre por mecanismos en el tejido blanco, liberaría de manera localizada a esta región tisular del bloqueo ejercido por la Pg para pasar a depender de la acción de los Eg.

Como demostramos previamente, en esta región del cérvix (estroma subepitelial) ocurre un activo proceso de remodelación del colágeno durante la última etapa de la gestación, permitiendo que el cuello uterino se prepare para dilatarse en el momento en que comienza el trabajo de parto. Numerosos trabajos demuestran la dependencia del proceso de ablandamiento del cuello uterino con un mayor estímulo de los Eg sobre las células del estroma cervical. Previamente, se ha demostrado que la degradación de colágeno del cérvix depende de la actividad de collagenasa cervical (Rajabi y col, 1988, 1991a) y que la síntesis y secreción de esta enzima está a cargo de las células estromales cervicales (Rajabi y Singh, 1995). La actividad de esta enzima sería estimulada por E₂ y Rlx, e inhibida por concentraciones farmacológicas y fisiológicas de Pg (Rajabi y col, 1991a, 1991b; Marbaix y col., 1992; Mushayandebvu y Rajabi, 1995). Basados en estos antecedentes, analizamos

si la remodelación del colágeno descrita tenía una asociación temporal con las variaciones halladas para la expresión de RE α y RP en esta región tisular. El resultado de los análisis de correlación demostró que la remodelación del colágeno del cérvix durante la última etapa de la gestación está asociada temporalmente tanto con la caída en la expresión de RP como con la alta expresión del RE α (Figura 37).

En conjunto, los resultados descriptos para el cérvix sugieren que el proceso de ablandamiento que este órgano realiza como preparación para el momento del trabajo de parto, es desencadenado por cambios regionales en la expresión de RE y RP que sensibilizan al estroma cervical para responder a los altos niveles de Eg en circulación. Trabajos en realización en nuestro laboratorio aportarán más evidencias para confirmar esta hipótesis.

E. El ablandamiento del ligamento interpúbico se asocia con una sensibilización funcional a los Eg.

En una tesis previa de nuestro laboratorio, se estableció que la relajación progresiva del ligamento de la sínfisis púbica del cobayo y del ratón están asociadas con la remodelación del colágeno llevada a cabo en la matriz extracelular del ligamento (Ortega, 2002). Recientemente demostramos (Rodríguez y col., 2003a) que en el ligamento de la sínfisis púbica del cobayo ocurre una invasión masiva de células infiltrantes asociada con la remodelación del colágeno, por lo que sugerimos que este órgano también debería ser incluido entre los que llevan a cabo una preparación para el momento del parto (es decir, la fase preparatoria del parto incluiría no sólo al útero y al cérvix, sino también a la sínfisis púbica).

En la introducción habíamos analizado varios trabajos que evaluaban el efecto de la Pg y sus antagonistas sobre el inicio del parto en diferentes especies animales (Elger y col., 1987; Hegele-Hartung, 1989; Chwalisz y col., 1991; Chwalisz, 1994; Garfield y col, 1998). Como conclusión general estos trabajos demuestran que el tratamiento con antagonistas de la Pg tiene resultados que difieren de acuerdo con la especie tratada. Las especies que no presentan una

caída en los niveles de Pg circulante al final de la gestación (cobayos, primates no humanos y humanos), responden al tratamiento con estos antagonistas con un aumento en la susceptibilidad del miometrio uterino a agentes estimulantes uterinos, tales como PGs y OT, y estimulan la maduración del tejido conectivo cervical. Un cambio descripto marginalmente en estos trabajos es que, en el cobayo, el tratamiento con antagonistas de Pg al promediar la preñez produce una notable separación de los huesos púbicos y un ablandamiento del ligamento interpúbico. Esto último sugiere que la separación de los huesos púbicos podría estar asociada a mecanismos funcionales que modifiquen la acción de la Pg y los Eg en el estroma del ligamento interpúbico. En esta tesis profundizamos este concepto evaluando la existencia de cambios en la expresión de RE y RP, durante la etapa preparatoria del parto en la sínfisis púbica del cobayo. Observamos que la progresiva relajación de la sínfisis púbica que ocurre durante el período evaluado (D42 de la gestación hasta el PPI) está relacionada con una disminución en la expresión de RP (Figura 32). Junto con esta caída de RP en el estroma del ligamento interpúbico, hay un aumento del ARNm de RE α y una disminución en el de RE β (Figura 34). De forma similar a lo que demostramos para el cérvix, la relajación del ligamento interpúbico durante la etapa preparatoria del parto también estaría asociada a un cambio funcional del microambiente endocrino que inhibiría el efecto biológico de la Pg favoreciendo una mayor acción biológica de los Eg.

F. En el epitelio glandular del útero hay un incremento en la relación RE α /RP antes del parto.

En varios trabajos usando metodologías diferentes, han demostrado que la síntesis y secreción de Rlx en el cobayo es realizada por las células del epitelio glandular del útero (Pardo y col., 1980; Pardo y Larkin, 1982; Pardo y col., 1984). Si bien en las células glandulares del útero de cobayos no preñados o en lactancia no se detectan gránulos conteniendo Rlx, éstos aumentan a medida que avanza la preñez (Larkin y Renegar, 1986). También se ha demostrado que la inyección conjunta de Pg y E₂ induce un aumento y acumulación de gránulos secretores de Rlx en las células del epitelio glandular uterino (Larkin y col., 1987). Teniendo en cuenta estos antecedentes,

evaluamos por inmunohistoquímica si la expresión de RP y RE α del epitelio glandular uterino presentaba modificaciones durante la última parte de la preñez. Los resultados demuestran un notable aumento antes del parto (D63) en los niveles de RE α y en la relación RE α /RP de las células productoras de Rlx del cobayo (Figura 21). Esto sugiere que un aumento en la acción de los Eg a través de su receptor sobre las células del epitelio glandular uterino del cobayo, podría ser el mecanismo fisiológico por el cual se incrementan los niveles locales de Rlx en coincidencia con el momento en que la remodelación del colágeno cervical alcanza su máxima actividad.

G. El cobayo como modelo animal para estudiar el control hormonal del parto.

El cobayo ha sido definido como un modelo animal similar al humano en cuanto a la endocrinología de la gestación y el parto, conclusión basada -en parte- por la similitud en los perfiles séricos de Eg y Pg (Trewin y Hutz, 1999). Nuestros resultados confirman este concepto y amplían estas similitudes con la mujer a otros aspectos de la fisiología de la gestación y el parto.

Por medio de un ensayo enzimoimmunométrico quimioluminiscente secuencial en fase sólida determinamos los perfiles séricos de E₂ y Pg en cobayos no preñados en estro (Es), durante la gestación (D42, D56 y D63), el posparto inmediato (PPI) y el posparto temprano (1DPP). Para este proceso se utilizó un analizador IMMULITE 2000. Como esta metodología no había sido usada previamente en cobayos, la primera etapa consistió en la validación del método, determinando los parámetros de desempeño analítico de esta metodología y comparando los resultados obtenidos en sueros con cantidades conocidas de Pg y E₂. También hicimos pruebas para determinar si, antes de la medición, era necesario realizar extracción y/o desnaturalización de los sueros. Los resultados permitieron realizar las mediciones de Pg y E₂ en muestras de suero puras; ie, sin necesidad de hacer extracción o desnaturalización de las mismas. Los perfiles séricos para E₂ y Pg fueron similares a los publicados en la literatura, confirmando que la última etapa de la gestación de cobayos transcurre en ausencia de cambios significativos en los niveles de ambos

esteroides ováricos. Un aspecto llamativo, es que los valores más bajos de Pg (obtenidos en Es y 1DPP) son los que presentan un menor desvío estadístico en comparación con los observados en los grupos de animales preñados (Figura 16). Esta observación concuerda con trabajos publicados previamente, donde se destaca la alta variabilidad entre animales del mismo momento de la gestación (Challis y col, 1971). Una posible explicación sería que durante la gestación habría niveles pulsátiles de Pg.

Otros resultados presentados en esta tesis extienden la similitud entre el cobayo y la mujer. Mediante análisis por *Western blot*, demostramos que el útero del cobayo tiene isoformas de RP similares a las descritas para la mujer (Wei y col., 1990) y la rata (Ogle y col., 1997). En muestras de cérvix de mujeres obtenidas previo al trabajo de parto, se demostró una menor expresión de RP en comparación con el cérvix de mujeres no embarazadas (Stjernholm y col., 1996). Esto último coincide con nuestros resultados en cobayos, que demuestran que hay una caída en la expresión de RP localizada en el estroma subepitelial durante la última etapa de la gestación y el posparto inmediato (Rodríguez y col, 2003b).

No sólo los niveles circulantes de Eg y Pg son semejantes durante la gestación y el parto entre mujeres y cobayos sino que también lo son otros aspectos relacionados con la expresión del RP y con cambios en su localización en los tejidos blanco. Todo esto amplía y confirma la utilidad del cobayo como modelo animal adecuado para el estudio de los mecanismos que controlan la gestación y el parto en humanos.

H. Conclusión general

A modo de resumen, los resultados presentados en esta tesis aportan evidencias originales que apoyan aspectos importantes del modelo de parto propuesto para mujeres y cobayos. Fundamentalmente, nuestros resultados demuestran que la acción biológica ejercida por la Pg y los Eg varía entre los tejidos de los distintos órganos involucrados en el parto (útero, cérvix y sínfisis), mediante una expresión diferencial de sus receptores. Esta expresión

diferencial de RE y RP ocurre en la última etapa de la gestación, en función de las adaptaciones que cada órgano del canal de parto realiza durante la etapa preparatoria del mismo.

De esta manera, una variación regionalizada de la susceptibilidad de los tejidos formaría parte del mecanismo fisiológico del parto en especies que transcurren la última etapa de la preñez sin cambios significativos en los niveles circulantes de Pg y Eg. Esto último dificultaría el diseño de terapias basadas en la administración de antagonistas de la Pg (Hoffmann y Schuler, 2000), pensadas para evitar el parto pre-término, ya que este tratamiento no reproduciría la expresión diferencial de RE y RP en los tejidos blanco. La demostración de una acción biológica regionalizada por parte de la Pg y los Eg sobre los órganos de los canales blando y duro del parto, explicaría algunos resultados observados en cobayos tratados con antagonistas de la Pg. La administración de ONA en un período inmediatamente antes del parto (D60) induce aborto y adelanta el parto. Sin embargo, en un alto porcentaje de estos partos las crías no son expulsadas a pesar de tener el canal cervical completamente abierto, esto se debería a que el útero de estos animales tratados no es capaz de generar contracciones efectivas. Esta incapacidad del útero para expulsar los fetos, se debería a que la administración de un antagonista de la Pg produce una inhibición general de la acción de esta hormona en todos los tejidos blanco por igual, perturbando la acción diferencial por regiones de su acción.

Por último, pensamos que los resultados aportados en el desarrollo de esta tesis realzan la validez del cobayo como modelo animal para el desarrollo de estudios de endocrinología de la gestación y regulación del inicio del parto, y como modelo para la experimentación de drogas diseñadas para evitar un parto prematuro.

Bibliografia

Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J. (1994) Molecular biology of the cell. Third edition. Eds. Garland Publishing Inc., New York, USA.

Alexandrova, M.; Soloff, M.S. (1980) Oxytocin receptors and parturition in the guinea pig. Biol Reprod 22: 1106-1111.

Bartol, F.F. (1999) Uterus, nonhuman. En: Encyclopedia of Reproduction. Eds. Knobil, E. & Neill, J.D.; Academic Press, New York, USA.

Battlehner, C.N.; Caldini, E.G.; Pereira, J.C.; Luque, E.H.; Montes, G.S. (2003) How to measure the increase in elastic system fibres in the lamina propria of the uterine cervix of pregnant rats. J Anat 203:405-418..

Beato, M.; Sanchez-Pacheco, A. (1996) Interaction of steroid hormone receptors with the transcription initiation complex. Endocr Rev 17: 587-609.

Boyd, S.; Kendall, J.Z.; Mento, N.; Bryant-Greenwood, G.D. (1981) Relaxin immunoactivity in plasma during the reproductive cycle of the female guinea pig. Biol Reprod 24:405-414.

Bryant WM, Greenwell JE, Weeks PM. (1968) Alterations in collagen organization during dilatation of the cervix uteri. Surg Gynecol Obstet. 126:27-39.

Buhimschi, I.; Ali, M; Jain, V.; Chwalisz, K; Garfield, R.E. (1996) Differential regulation of nitric oxide in the rat uterus and cervix during pregnancy and labour. Hum Reprod 11: 1755-1766.

Burtis, C.A.; Ashwood, E.R. (1999) Principles of immunochemical techniques. En: Tietz Textbook of Clinical Chemistry. Burtis C.A. y Ashwood E.R., Ed: W.B.Saunders Company, Third Edition, USA.

Catchpole H.R.; Joseph N.R.; Engel M.B. (1952) The action of relaxin on the pubic symphysis of the guinea-pig, studied electrometrically. *J Endocrinol* 8:377-385.

Challis, J.R.G.; Heap, R.B.; Illingworth, D.V. (1971) Concentrations of oestrogen and progesterone in the plasma of non-pregnant, pregnant and lactating guinea-pigs. *J Endocr* 51: 333-345.

Challis, J.R.G.; Lye, S.J. (1994) Parturition. En: *The Physiology of Reproduction, Second Edition*. Eds. Knobil, E. & Neill, J.D.; Raven Press, Ltd, New York, USA.

Challis, J.R.G.; Matthews, S.G.; Gibb, W.; Lye, S.J. (2000) Endocrine and paracrine regulation of birth at term and preterm. *Endoc Rev* 21: 514-550.

Chihai, H.J.; Espey, L.L. (1973) Utilization of the relaxed symphysis pubis of guinea pigs for clues to the mechanism of ovulation. *Endocrinology* 93: 1441-1445.

Chomczynski, P.; Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 162:156-159.

Chwalisz, K; Fahrenholz, F.; Hackenberg, M., Garfield, R.; Elger, W. (1991) The progesterone antagonist onapristone increases the effectiveness of oxytocin to produce delivery without changing the myometrial oxytocin receptor concentration. *Am J Obstet Gynecol* 165: 1760-1770.

Chwalisz, K. (1994) The use of progesterone antagonists for cervical ripening and as an adjunct to labour and delivery. *Hum Reprod* 9 (Suppl 1): 131-161.

Chwalisz, K.; Benson, M.; Scholz, P.; Daum, J.; Beier, H.M.; Hegele-Hartung, C. (1994) Cervical ripening with the cytokines interleukin 8,

interleukin 1 β and tumour necrosis factor α in guinea-pigs. Hum Reprod 9: 2173-2181.

Chwalisz, K.; Kosub, B.; Garfield, R.E. (1995) Estradiol inhibits the onapristone (ZK 98299)-induced preterm parturition in guinea pigs by blocking cervical ripening. J Soc Gynecol Invest 2: P101, Scientific Abstracts.

Chwalisz, K.; Shao-Qing, S.; Garfield, R.E.; Beier, H.M. (1997) Cervical ripening in guinea-pigs after a local application of nitric oxide. Hum Reprod 12: 2093-2101.

Clark, J.H.; Mani, S.K. (1994) Actions of ovarian steroid hormones. En: The Physiology of Reproduction, Second Edition. Eds. Knobil, E. & Neill, J.D.; Raven Press, Ltd, New York, USA.

Cowley, S.M.; Hoare, S.; Mosselman, S.; Parker, M.G. (1997) Estrogen receptors alpha and beta form heterodimers on DNA. J Biol Chem 272: 19858-19862.

Crelin, E.S.; Haines, A.L. (1955) The effects of locally applied estrogen on the pubic symphysis and knee joint in castrated mice. 56: 461-470.

Crelin, E.S.; Levin, J. (1955) The prepuberal pubic symphysis and uterus in the mouse: their response to estrogen and relaxin. Endocrinology 57:730-747.

Croix, D.; Franchimont, P. (1975) Changes in the serum levels of the gonadotrophins progesterone and estradiol during the estrous cycle of the guinea pig. Neuroendocrinology 19: 1-11.

Csapo, A.I.; Pinto-Dantas, C.A. (1965) The effect of progesterone on the human uterus. Proc Natl Acad Sci USA 54: 1069-1076

Cullen, B.M.; Harkness, R.D. (1960) The effect of hormones on the physical properties and collagen content of the rat's uterine cervix. *J Physiol.* 152 :419-436.

Dancoine, F.; Couplet, G.; Buvat, J.; Guittard, C.; Marcolin, G.; Fourlinnie, J.C. (1997) Analytical and clinical evaluation of the Immulite estradiol assay in serum from patients undergoing in vitro fertilization: estradiol increase in mature follicles. *Clin Chem* 43: 1165-1171.

Danforth, D.N. (1947) The fibrous nature of the human cervix, and its relation to the isthmic segment in gravid and nongravid uteri. *Am J Obstet Gynecol* 53: 541-548.

Danforth, D.N.; Veis, A.; Breen, M. (1974) The effect of pregnancy and labor on the human cervix. Changes in collagen, glycoproteins and glycosaminoglycans. *Am J Obstet Gynecol* 120: 641-651.

Diel, P. (2002) Tissue-specific estrogenic response and molecular mechanisms. *Toxicology Letters* 127: 217-224.

Downing, S.J.; Sherwood, O.D. (1986) The physiological role of relaxin in the pregnant rat. IV. The influence of relaxin on cervical collagen and glycosaminoglycans. *Endocrinology* 118: 471-479.

Dupont, S.; Krust, A.; Gansmuller, A.; Dierich, A.; Chambon, P.; Mark, M. (2000) Effect of single and compound knockouts of estrogen receptors α (ER α) and β (ER β) on mouse reproductive phenotypes. *Development* 127: 4277-4291.

El-Banna, A.A.; Hafez, E.S.E. (1972) The uterine cervix in mammals. *Am J Obstet Gynecol* 112: 145-164.

El-Maradny, E.; Kanayama, N.; Halim, A.; Maehara, K.; Sumimoto, K.; Terao, T. (1995) The effect of interleukin-1 in rabbit cervical ripening. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 60:75-80.

El Maradny, E.; Kanayama, N.; Halim, A.; Maehara, K.; Sumimoto, K.; Terao, T. (1996) Biochemical changes in the cervical tissue of rabbit induced by interleukin-8, interleukin-1 β , dehydroepiandrosterone sulphate and prostaglandin E₂: a comparative study. *Hum Reprod* 11:1099-1104.

Elger, W.; Fährnrich, M.; Beier, S.; Qing, S.S.; Chwalisz, K. (1987) Endometrial and myometrial effects of progesterone antagonists in pregnant guinea pigs. *Am J Obstet Gynecol* 157: 1065-1074.

Evans, R.M. (1988) The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*. 240:889-895.

Frieden, E.H.; Hisaw, F.L. (1951) The mechanism of symphyseal relaxation, the distribution of reducing groups, hexoseamine, and proteins in symphysis of normal and relaxed guinea pigs. *Endocrinology* 48: 88-97.

Fuchs, A.R. (1964) Oxytocin and the onset of labour in rabbits. *J Endocrinol*. 30: 217-224.

Fuchs, A.; Fuchs, F. Endocrinology of human parturition: a review. (1984) *Br J Obstet Gynaecol* 91: 948-967.

Funk, C.R.; DeMayo, F.J. (1999) Progesterone actions on reproductive tract. En: *Encyclopedia of Reproduction*. Eds. Knobil, E. & Neill, J.D.; Academic Press, New York, USA.

Gamble, J.G.; Simmons, S.C.; Freedman, M. (1986) The symphysis pubis. Anatomic and pathologic considerations. *Clin Orthop*. 203:261-272.

Garfield, R.E.; Sims, S.; Daniel, E.E. (1977) Gap junctions: their presence and necessity in myometrium during parturition. *Science* 198: 958-960.

Garfield, R.E.; Saade, G.; Buhimschi, C.; Buhimschi, I.; Shi, L.; Shi, S-Q.; Chwalisz, K. (1998) Control and assessment of the uterus and cervix during pregnancy and labour. *Human Reproduction Update* 4: 673-695.

Geneser, F. (2000) Órganos de la reproducción. En: *Histología, Sobre bases biomoleculares*. 613-637. Tercera edición. Ed. Panamericana, Bs. As., Argentina.

Graham, J.D.; Clarke, C.L. (1997) Physiological action of progesterone in target tissues. *Endoc Rev* 18: 502-519.

Granström, L.; Ekman, G.; Ulmstem, U.; Malmström, A. (1989) Changes in the connective tissue of corpus and cervix uteri during ripening and labour in term pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 96: 1198-1202.

Greene, M.F. (2003) Progesterone and preterm delivery-Déjà vu all over again. *N Engl J Med* 348: 2453-2455.

Gundersen, H.J.; Bendtsen, T.F.; Korbo, L.; Marcussen, N.; Moller, A.; Nielsen, K.; Nyengaard, J.R.; Pakkenberg, B.; Sorensen, F.B.; Vesterby, A.; West, M.J. (1988) Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 96: 379-394.

Hafez, E.S.E. (1970) Female reproductive organs. En: *Reproduction and breeding techniques for laboratory animals*. Hafez, E.S.E. 74-106. Ed: Lea and Febiger, Philadelphia, USA.

Hafez, E.S.E.; Hafez, B. (2000) Gestation, prenatal physiology and parturition. En: *Reproduction in farm animals, Seventh edition*. Eds: Hafez, B. y Hafez, E.S.E. Lippincott Williams & Wilkins, Maryland, USA.

Hegele-Hartung, C; Chwalisz, K.; Beier, H.M.; Elger, W. (1989) Ripening of the uterine cervix of the guinea-pig after treatment with the progesterone antagonist onapristone (ZK 98.299): an electron microscopic study. *Hum Reprod* 4: 369-377.

Hoffmann, B.; Schuler, G. (2000) Receptor blockers-general aspects with respect to their use in domestic animal reproduction. *Anim Reprod Sci* 60-61: 295-312.

Hossain, M.I.; Lee, C.S.; Clarke, I.J.; O'Shea, J.D. (1979) Ovarian and luteal blood flow, and peripheral plasma progesterone levels, in cyclic guinea-pigs. *J Reprod Fert* 57: 167-174.

Huang, C.; Li, Y.; Anderson, L.L. (1993) Stimulation of collagen secretion by relaxin and effect of oestrogen on relaxin binding in uterine cervical cells of pigs. *J Reprod Fertil* 98:153-158.

Huszar, G.; Naftolin, F. (1984) The myometrium and uterine cervix in normal and preterm labor. *N Engl J Med* 311: 571-581.

Huszar, G.B.; Walsh, M.P. (1991) Relationship between myometrial and cervical functions in pregnancy and labor. *Semin Perinatol* 15: 97-117.

Iams, J.D.; Goldsmith, L.T.; Weiss, G. (2001) The preterm prediction study: maternal serum relaxin, sonographic cervical length, and spontaneous preterm birth in twins. *J Soc Gynecol Investig* 8: 39-42.

Illingworth, D.V.; Challis, J.R.G.; Ackland, N.; Burton, A.M.; Heap, R.B.; Perry, J.S. (1974) Parturition in the guinea-pig; plasma levels of steroid hormones, steroid-binding proteins, and oxytocin, and the effect of corticosteroids, prostaglandins and adrenocorticotrophin. *J Endocr* 63: 557-570.

Ing, N.H. (1999) Steroid Hormone Receptors. En: Encyclopedia of Reproduction. Eds. Knobil, E. & Neill, J.D.; Academic Press, New York, USA.

Ito, A.; Hiro, D.; Ojima, Y.; Mori, Y. (1988) Spontaneous production of interleukin-1-like factors from pregnant rabbit uterine cervix. *Am J Obstet Gynecol.* 159:261-265.

Ito, A.; Imada, K.; Sato, T.; Kubo, T.; Matsushima, K.; Mori, Y. (1994) Suppression of interleukin 8 production by progesterone in rabbit uterine cervix. *Biochem J.* 301:183-186.

Izumi, H.; Yallampalli, C.; Garfield, R.E. (1993) Gestational changes in L-arginine-induced relaxation of pregnant rat and human myometrial smooth muscle. *Am J Obstet Gynecol.* 169: 1327-1337.

Jenkin, G.; Young, I.R. (2004) Mechanism responsible for parturition; the use of experimental models. *Anim Reprod Sci* 82-83: 567-581.

Jensen, E.; Jacobsen, H. (1962) Basic guides to the mechanism of estrogen action. *Recent Prog Horm Res* 18: 387-414.

Joshi, H.S.; Watson, D.J.; Labhsetwar, A.P. (1973) Ovarian secretion of oestradiol, oestrone, 20-dihydroprogesterone and progesterone during the oestrous cycle of the guinea-pig. *J Reprod Fertil* 35: 177-181.

Junqueira, L.C.; Cossermelli, W.; Brentani, R. (1978) Differential staining of collagens type I, II and III by Sirius Red and polarization microscopy. *Arch Histol Jpn* 41: 267-274.

Junqueira, L.C.U.; Zugaib, M.; Montes, G.S.; Toledo, O.M.S.; Krisztán, R.M.; Shigihara, K.M. (1980) Morphologic and histochemical evidence for the occurrence of collagenolysis and for the role of neutrophilic

polymorphonuclear leukocytes during cervical dilation. *Am J Obstet Gynecol.* 138:273-281.

Junqueira, L.C.U.; Junqueira, L.M. (1983) Técnicas básicas de citología e histología. Ed. Livraria Santos Com. Imp. Ltda. Sao Paulo, Brasil.

Jurow, H.N.; Arbor, A. (1943) Cyclic variations in the cervix of the guinea pig. *Am J Obstet Gynecol* 45: 762-774.

Kass, L.; Durando, M.; Ramos, J.G.; Varayoud, J.; Powell, C.E.; Luque, E.H.; Munoz-de-Toro, M. (2004) Association of increased estrogen receptor beta2 expression with parity-induced alterations in the rat mammary gland. *J Steroid Biochem Mol Biol* 91: 29-39.

Katzenellenbogen, B.S. (1980) Dynamics of steroid hormone receptor action. *Annu Rev Physiol* 42: 17-35.

Katzenellenbogen, B.S.; Katzenellenbogen, J.A. (2000) Estrogen receptor transcription and transactivation estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta: regulation by selective estrogen receptor modulators and importance in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2: 335-344.

Kleissl, H.P.; van der Rest, M.; Naftolin, F.; Glorieux, F.H.; de Leon, A. (1978) Collagen changes in the human uterine cervix at parturition. *Am J Obstet Gynecol.* 130:748-753.

Kraus WL, Katzenellenbogen BS. (1993) Regulation of progesterone receptor gene expression and growth in the rat uterus: modulation of estrogen actions by progesterone and sex steroid hormone antagonists. *Endocrinology* 132: 2371-2379.

Kuiper, G.G.; Enmark, E.; Peltö-Huikko, M.; Nilsson, S. Gustafsson, J.A. (1996) Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 5925-5930.

Kuiper, G.G.; Carlsson, B.; Grandien, K.; Enmark, E.; Haggblad, J.; Nilsson, S.; Gustafsson, J.A. (1997) Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 138:863-870.

Kurita, T.; Lee, K.J.; Cooke, P.S.; Taylor, J.A.; Lubahn, D.B.; Cunha, G.R. (2000) Paracrine regulation of epithelial progesterone receptor by estradiol in the mouse female reproductive tract. *Biol Reprod* 62: 821-830.

Kurita, T.; Lee, K.; Saunders, P.T.; Cooke, P.S.; Taylor, J.A.; Lubahn, D.B.; Zhao, C.; Makela, S.; Gustafsson, J.A.; Dahiya, R.; Cunha, G.R. (2001) Regulation of progesterone receptors and decidualization in uterine stroma of the estrogen receptor-alpha knockout mouse. *Biol Reprod* 64:272-283.

Larkin, L.H.; Renegar, R.H. (1986) Immunochemical and cytochemical studies of relaxin-containing cells in the guinea pig uterus. *Am J Anat* 176: 353-365.

Larkin, L.H.; Ogilvie, S.; Wubbel, L.; Welch, D.E. (1987) Effects of estradiol and progesterone on accumulation of relaxin- and carbohydrate-containing granules in endometrial gland cells of the guinea pig. *Am J Anat* 179: 333-341.

Lenhart, J.A.; Ryan, P.L.; Ohleth, K.M.; Bagnell, C.A. (1999) Expression of connexin-26, -32, and -43 gap junction proteins in the porcine cervix and uterus during pregnancy and relaxin-induced growth. *Biol Reprod* 61: 1452-1459.

Ludmir, J.; Sehdev, H.M. (2000) Anatomy and physiology of the uterine cervix. *Clin Obstet Gynecol.* 43:433-439

Luque, E.H.; Montes, G.S. (1989) Progesterone promotes a massive infiltration of the rat uterine cervix by the eosinophilic polymorphonuclear leukocytes. *Anat Rec* 223: 257-265.

Luque, E.H.; Ramos, J.G.; Rodríguez, H.A.; Muñoz-de-Toro, M. (1996) Dissociation in the control of cervical eosinophilic infiltration and collagenolysis at the end of pregnancy or after pseudopregnancy in ovariectomized steroid-treated rats. *Biol Reprod* 55: 1206-1212.

Luque, E.H.; Bassani, M.M.; Ramos, J.G.; Maffini, M.; Canal, A.; Kass, L.; Caldini, E.G.; Ferreira Jr, J.M.C.; Muñoz-de-Toro, M.; Montes, G.S. (1997) Leukocyte infiltration and collagenolysis in cervical tissue from intrapartum sheep. *J Vet Med A* 44: 501-510.

Luque, E.H.; Muñoz-de-Toro, M.; Ramos, J.G.; Rodríguez, H.A.; Sherwood, O.D. (1998) Role of relaxin and Estrogen in the control of eosinophilic invasion and collagen remodeling in rat cervical tissue at term. *Biol Reprod* 59: 795-800.

Lye, S.J.; Freitag, C.L. (1990) Local and systemic control of myometrial contractile activity during labour in the sheep. *J Reprod Fertil.* 90:483-492.

Lye, S.J.; Nicholson, B.J.; Mascarenhas, M.; MacKenzie, L.; Petrocelli, T. (1993) Increased expression of connexin-43 in the rat myometrium during labor is associated with an increase in the plasma estrogen:progesterone ratio. *Endocrinology.* 132:2380-2386.

Lye, S.J. (1996) Initiation of parturition. *Anim Reprod Sci* 42: 495-503.

MacLennan, A.H.; Nicolson, R.; Green, R.C.; Bath, M. (1986) Serum relaxin and pelvic pain of pregnancy. *Lancet* 2:243-245.

Maffini, M.V.; Geck, P.; Powell, C.E.; Sonnenschein, C.; Soto, A.M. (2002) Mechanism of androgen action on cell proliferation: AS3 protein as a

mediator of proliferative arrest in the rat prostate. *Endocrinology* 143: 2708-2714.

Marbaix, E.; Donnez, J.; Courtoy, P.J.; Eeckhout, Y. (1992) Progesterone regulates the activity of collagenase and related gelatinases A and B in human endometrial explants. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 11789-11793.

Maruyama, K.; Endoh, H.; Sasaki-Iwaoka, H.; Kanou, H.; Shimaya, E.; Hashimoto, S.; Kato, S.; Kawashima, H. (1998) A novel isoform of rat estrogen receptor beta with 18 amino acid insertion in the ligand binding domain as a putative dominant negative regular of estrogen action. *Biochem Biophys Res Commun* 246: 142-147.

Mendoza-Rodriguez, C.A.; Merchant-Larios, H.; Segura-Valdez, M.L.; Moreno-Mendoza, N.; Cruz, M.E.; Arteaga-Lopez, P.; Camacho-Arroyo, I.; Dominguez, R.; Cerbon, M. (2003) c-fos and estrogen receptor gene expression pattern in the rat uterine epithelium during the estrous cycle. *Mol Reprod Dev* 64: 379-388.

Mesiano, S.; Chan, E.; Fitter, J.T.; Kwek, K.; Yeo, G.; Smith, R. (2002) Progesterone withdrawal and estrogen activation in human parturition are coordinated by progesterone receptor A expression in the myometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 2924-2930.

Mesiano, M. (2004) Myometril progesterone responsiveness and the control of human parturition. *J Soc Gynecol Investig* 11: 193-202.

Milgrom, E.; Baulieu, E.E. (1970) Progesterone in uterus and plasma. I. Binding in rat uterus 105,000 g supernatant. *Endocrinology* 87:276-286.

Montes, G.S.; Junqueira, L.C.U. (1988) Biochemistry and Biomechanics. Histochemical localization of collagen and of proteoglycans in tissues. En: *Collagen*, vol 2, 42-72. Eds Nimmi, M.E., CRC Press Inc, Boca Raton.

Montes, G.S. (1996) Structural biology of the fibres of the collagenous and elastic systems. *Cell Biol Int*. 20: 15-27.

Muñoz-de-Toro, M.; Luque, E.H. (1995) Effect of microwave pretreatment on proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections. *J Histotechnol* 18: 11-15.

Muñoz-de-Toro, M.; Maffini, M.V.; Giardina, R.H.; Luque, E.H. (1998) Processing fine needle aspirates of prostate carcinomas for standard immunocytochemical studies and in situ apoptosis detection. *Pathol Res Prac* 194: 631-636.

Muñoz-de-Toro, M.; Varayoud, J.; Ramos, J.G.; Rodríguez, H.A.; Luque, E.H. (2003) Collagen remodeling during cervical ripening is a key event for succesful vaginal delivery. *Braz J Morphol Sci* 20: 75-84.

Mushayandebvu, T.I.; Rajabi, M.R. (1995) Relaxin stimulates interstitial collagenase activity in cultured uterine cervical cells from nonpregnant and pregnant but not immature guinea pigs; estradiol-17 β restores relaxin's effect in immature cervical cells. *Biol Reprod* 53: 1030-1037.

Nalbandov, A.V.(1969) La estructura de los sistemas reproductores. En: *Fisiología de la Reproducción*. Ed. Acribia, Zaragoza, España.

Nathan, C.; Xie, Q.W. (1994) Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem*. 269:13725-13728.

Nathanielsz, P.W.; Smith, G.C.S. (1999) Labor and delivery, human. En: *Encyclopedia of Reproduction*. Eds. Knobil, E. & Neill, J.D.; Academic Press, New York, USA.

Norwitz, E.R.; Robinson, J.N.; Challis, J.R.G. (1999) The control of labor. *N Engl J Med* 341: 660-666.

O'Byrne, E.M.; Steinetz, B.G. (1976) Radioimmunoassay (RIA) of relaxin in sera of various species using an antiserum to porcine relaxin. *Proc Soc Exp Biol Med* 152:272-276.

Ogle, T.F.; Dai, D.; George, P.; Mahesh, V.B. (1998) Regulation of the progesterone receptor and estrogen receptor in decidua basalis by progesterone and estradiol during pregnancy. *Biol Reprod* 58: 1188-1198.

Okada, A.; Ohta, Y.; Buchanan, D.L.; Sato, T.; Inoue, S.; Hiroi, H.; Muramatsu, M.; Iguchi, T. (2002) Changes in ontogenetic expression of estrogen receptor alpha and not of estrogen receptor beta in the female rat reproductive tract. *J Mol Endocrinol* 28: 87-97.

Ortega, H.H. (2002) Tesis para la obtención del título de Dr. En Cs Biológicas. Tema: Estudio histofisiológico del cérvix uterino y de la sínfisis púbica durante el parto. Director: Prof.Dr. E. H. Luque, Fac. De Bioquímica y Cs Biológicas, UNL.

Ortega, H.H.; Muñoz-de-Toro, M.M.; Luque, E.H.; Montes, G.S. (2003) Morphological characteristics of the interputic joint (symphysis pubica) of rats, guinea pigs and mice in different physiological situations. A comparative study. *Cells Tissues Organs* 173: 105-114.

Osman, I.; Young, A.; Ledingham, M.A.; Thomson, A.J.; Jordan, F.; Greer, I.A.; Norman, J.E. (2003) Leukocyte density and pro-inflammatory cytokine

expression in human fetal membranes, deciduas, cervix and myometrium before and during labour at term. *Mol Hum Reprod* 9: 41-45.

Osmers, R.; Rath, W.; Adelman-Grill, B.C.; Fittkow, C.; Kuloczik, M.; Szeverényi, M.; Tschesche, H.; Kuhn, W. (1992) Origin of cervical collagenase during parturition. *Am J Obstet Gynecol* 166: 1455-1460.

Osmers, R.G.; Adelman-Grill, B.C.; Rath, W.; Stuhlsatz, H.W.; Tschesche, H. Kuhn, W. (1995) Biochemical events in cervical ripening dilatation during pregnancy and parturition. *J Obstet Gynaecol* 21:185-194.

Padykula, H.A.; Tansey, T.R. (1979) The occurrence of uterine stromal and intraepithelial monocytes and heterophils during normal late pregnancy in the rat. *Anat Rec.* 193:329-356

Parczyk, K.; Madjno, R.; Michna, H.; Nishino, Y.; Schneider, M.R. (1997) Progesterone receptor repression by estrogens in rat uterine epithelial cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 63:309-316.

Pardo, R.; Larkin, L.H.; Fields, P.A. (1980) Immunocytochemical localization of relaxin in endometrial glands of the pregnant guinea pig. *Endocrinology* 107: 2110-2112.

Pardo, R.J.; Larkin, L.H. (1982) Localization of relaxin in endometrial gland cells of pregnant, lactating, and ovariectomized hormone-treated guinea pigs. *Am J Anat* 164: 79-90.

Pardo, R.J.; Larkin, L.H.; Renegar, R.H. (1984) Immunoelectron microscopic localization of relaxin in endometrial gland cells of the pregnant guinea pig. *Anat Rec* 209: 373-379.

Pasqualini, C.; Guivarc'h, D.; Boxberg, Y.V.; Nothias, F.; Vincent, J.D.; Vernier, P. (1999) Stage- and region-specific expression of estrogen receptor alpha isoforms during ontogeny of the pituitary gland. *Endocrinology* 140: 2781-2789.

Pavao, M.; Traish, A.M. (2001) Estrogen receptor antibodies: specificity and utility in detection, localization and analyses of estrogen receptor alpha and beta. *Steroids* 66:1-16.

Peltier, M.R. (2003) Immunology of term and preterm labor. *Reproductive Biology and Endocrinology* 1: 122-133.

Perl, E.; Catchpole, H.R. (1950) Changes induced in the connective tissue of the pubic symphysis of the guinea pig with estrogen and relaxin. *Arch Pathol (Chic)* 50: 233-239.

Pettersson, K.; Gustafsson, J.A. (2001) Role of estrogen receptor beta in estrogen action. *Annu Rev Physiol* 63: 165-192.

Petrocelli, T.; Lye, S.J. (1993) Regulation of transcripts encoding the myometrial gap junction protein, connexin-43, by estrogen and progesterone. *Endocrinology* 133: 284-290.

Pieber, D.; Allport, V.C.; Hills, F.; Johnson, M.; Bennett, P.R. (2001) Interactions between progesterone receptor isoforms in myometrial cells in human labour. *Mol Hum Reprod* 7: 875-879.

Porter, D.G.; Schofield, B.M. (1966) Intra-uterine pressure changes during pregnancy and parturition in rabbits. *J Endocrinol.* 36:291-299

Porter, D.G. (1971) Quantitative changes in myometrial activity in the guinea-pig during pregnancy. *J Reprod Fert* 27: 219-226.

Rajabi, M.R.; Dean, D.D.; Beydoun, S.N.; Woessner, J.F. Jr. (1988) Elevated tissue levels of collagenase during dilation of uterine cervix in human parturition. *Am J Obstet Gynecol.* 159:971-976.

Rajabi, M.R.; Dodge, G.R.; Solomon, S.; Poole, A.R. (1991a) Immunochemical and Immunohistochemical evidence of estrogen-mediated collagenolysis as a mechanism of cervical dilatation in the guinea-pig at parturition. *Endocrinology* 128: 371-378.

Rajabi, M.; Solomon, S.; Poole, A.R. (1991b) Hormonal regulation of interstitial collagenase in the uterine cervix of the pregnant guinea pig. *Endocrinology* 128: 863-871.

Rajabi, M.R.; Solomon, S.; Poole, A.R. (1991c) Biochemical evidence of collagenase-mediated collagenolysis as a mechanism of cervical dilatation at parturition in the guinea pig. *Biol Reprod* 45: 764-772.

Rajabi, M.R.; Singh, A. (1995) Cell origin and paracrine control of interstitial collagenase in the guinea pig uterine cervix. Evidence for a low molecular weight epithelial cell-derived collagenase stimulator. *Biol Reprod* 52: 516-523.

Rajabi, M.R.; Solomon, S.; Poole, A.R. (1992) Activation of protein kinase C stimulates collagenase production by cultured cells of the cervix of the pregnant guinea pig. *Am J Obstet Gynecol* 167: 194-200.

Ramos, J.G.; Varayoud, J.; Kass, L.; Rodriguez, H.; Muñoz de Toro, M.; Montes, G.S.; Luque, E.H. (2000) Estrogen and progesterone modulation of eosinophilic infiltration of the rat uterine cervix. *Steroids*. 65:409-414.

Ramos, J.G.; Varayoud, J.; Kass, L.; Rodriguez, H.; Costabel, L.; Munoz-De-Toro, M.; Luque, E.H. (2003) Bisphenol a induces both transient and permanent histofunctional alterations of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in prenatally exposed male rats. *Endocrinology* 144: 3206-3215.

Rath, W.; Osmers, R.; Adelman-Grill, B.C.; Stuhlsatz, H.W.; Szevereny, M.; Kuhn, W. (1993) Biochemical changes in human cervical connective tissue after intracervical application of prostaglandin E2. *Prostaglandins* 45:375-384.

Rodríguez, H.A.; Ortega, H.H.; Ramos, J.G.; Muñoz-de-Toro, M.; Luque, E.H. (2003a) Guinea-pig interpubic joint (symphysis pubica) relaxation at parturition: underlying cellular processes that resemble an inflammatory response. *Reprod Biol Endocrinol* 1:113-221

Rodríguez, H.A.; Kass, L.; Varayoud, J.; Ramos, J.G.; Ortega, H.H.; Durando, M.; Muñoz-de-Toro, M.; Luque, E.H. (2003b) Collagen remodelling in the guinea-pig uterine cervix at term is associated with a decrease in progesterone receptor expression. *Mol Hum Reprod* 9:807-813.

Ruth, E.B. (1932) A study of the development of the mammalian pelvis. *Anat Rec* 53: 207-225.

Ross, M.H. (1992) Aparato genital femenino. En: *Histología*, segunda edición. 623-680. Ed. Médica Panamericana, Bs As, Argentina.

Sakai, N.; Blennerhassett, M.G.; Garfield, R.E. (1992) Effects of antiprogesterones on myometrial cell-to-cell coupling in pregnant guinea pigs. *Biol Reprod* 46: 358-365.

Samuel, C.S.; Butkus, A.; Coghlan J.P.; Bateman, J.F. (1996) The effect of relaxin on collagen metabolism in the nonpregnant rat pubic symphysis: the influence of estrogen and progesterone in regulating relaxin activity. *Endocrinology* 137: 3884-3890.

Samuel, C.S.; Coghlan, J.P.; Bateman, J.F. (1998) Effects of relaxin, pregnancy and parturition on collagen metabolism in the rat pubic symphysis. *J Endocrinol* 159: 117-125.

Schellenberg, J.C. (1995) The effect of oxytocin receptor blockade on parturition in guinea pigs. *J Clin Invest* 95: 13-19.

Schellenberg, J.C.; Pliska, V.; Lutz, R.A. (2000) Oxytocin receptors in guinea pig myometrium near term and during labor. *Biol Reprod* 62: 427-431.

Sennstrom, M.B.; Ekman, G.; Westergren-Thorsson, G.; Malmstrom, A.; Bystrom, B.; Endresen, U.; Mlambo, N.; Norman, M.; Stabi, B.; Brauner, A.

(2000) Human cervical ripening, an inflammatory process mediated by cytokines. *Mol Hum Reprod* 6: 375-381.

Sherwood, O.D. (1994) Relaxin. En: *The Physiology of Reproduction*, Second Edition. Eds. Knobil, E. & Neill, J.D.; Raven Press, Ltd, New York, USA.

Siegel, S. (1956) *Nonparametric statistics for the behavioral sciences*. New York, Mc Graw-Hill.

Sparey, C.; Robson, S.C.; Bailey, J.; Lyall, F.; Europe-Finner, G.N. (1999) The differential expression of myometrial connexin-43, cyclooxygenase-1 and -2 and G α s proteins in the upper and lower segments of the human uterus during pregnancy and labor. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 1705-1710.

Stjernholm, Y.; Sahlin, L., Akerberg, S.; Elinder, A.; Eriksson, H.A.; Malmström, A.; Ekman, G. (1996) Cervical ripening in humans: potential roles of estrogen, progesterone, and insulin-like growth factor-I. *Am J Obstet Gynecol* 174: 1065-1071.

Talmage, R.V. (1950) The role of estrogen in the estrogen-relaxin relationship in symphyseal relaxation. *Endocrinology* 47: 75-82.

Tchernitchin, A.; Roorijck, J.; Tchernitchin, X.; Vandenhende, J.; Galand, F. (1974) Dramatic early increase in uterine eosinophils after oestrogen administration. *Nature* 248:142-143.

Tezuka, N.; Ali, M.; Chwalisz, K.; Garfield, R.E. (1995) Changes in transcripts encoding calcium channel subunits of rat myometrium during pregnancy. *Am J Physiol*. 269:C1008-1017.

Tibbetts, T.A.; Mendoza-Meneses, M.; O'Malley, B.W.; Conneely, O.M. (1998) Mutual and intercompartmental regulation of estrogen receptor and

progesterone receptor expression in the mouse uterus. *Biol Reprod.* 59:1143-1152.

Toft, D.; Gorski, J. (1966) A receptor molecule for estrogens: isolation from the rat uterus and preliminary characterization. *Proc Natl Acad Sci USA* 55: 1574-1581.

Trewin, A.L.; Hutz, R.J. (1999) Guinea pig, female. En: *Encyclopedia of Reproduction*. Eds. Knobil, E. & Neill, J.D.; Academic Press, New York, USA.

Tsai, M.J.; O'Malley, B.W. (1994) Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu Rev Biochem* 63: 451-486.

Wang, H.; Eriksson, H.; Sahlin, L. (2000) Estrogen receptors α and β in the female reproductive tract of the rat during the estrous cycle. *Biol Reprod* 63: 1331-1340.

Wei, L.L.; Gonzalez-Aller, C.; Wood, W.M.; Miller, L.A.; Horwitz, K.B. (1990) 5'-Heterogeneity in human progesterone receptor transcripts predicts a new amino-terminal truncated "C"-receptor and unique A-receptor messages. *Mol Endocrinol* 4: 1833-1840.

Weibel, E.R. (1969) Stereological principles for morphometry in electron microscopic cytology. *Int Rev Cytol* 26: 235-302.

Weihua, Z.; Saji, S.; Mäkinen, S.; Cheng, G.; Jensen, E.V.; Warner, M.; Gustafsson, J. (2000) Estrogen receptor (ER) β , a modulator of ER α in the uterus. *PNAS* 11: 5936-5941.

Winkler, M.; Fischer, D.C.; Ruck, P.; Marx, T.; Kaiserling, E.; Oberpichler, A.; Tschesche, H.; Rath, W. (1999) Parturition at term: parallel increases in

interleukin-8 and proteinase concentrations and neutrophil count in the lower uterine segment. Hum Reprod 14: 1096-1100.

Yoshida, K.; Tahara, R.; Nakayama, T.; Yanaihara, T. (1993) Effect of dehydroepiandrosterone sulphate, oestrogens and prostaglandins on collagen metabolism in human cervical tissue in relation to cervical ripening. J Int Med Res 21:26-35.

Zarrow, M.X. (1948) The role of the steroid hormones in the relaxation of the symphysis pubis of the guinea pig. Endocrinology 42: 129-140.

Zheng, Y.; Zhou, Z.Z.; Lyttle, C.R.; Teuscher, C. (1988) Immunohistochemical characterization of the estrogen-stimulated leukocyte influx in the immature rat uterus. J Leukoc Biol. 44:27-32.