



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL
LITORAL**

**FACULTAD DE BIOQUÍMICA Y CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

**LABORATORIO DE ENDOCRINOLOGÍA Y
TUMORES HORMONODEPENDIENTES. CÁTEDRA
DE FISIOLOGÍA HUMANA**

**ESTUDIO DE LA DILATACIÓN DEL CÉRVIX
UTERINO EN EL PARTO**

**REGULACIÓN ENDÓCRINA DE LAS
MODIFICACIONES DEL COLÁGENO Y LA
INFILTRACIÓN DE LEUCOCITOS EN EL CÉRVIX
UTERINO DE RATA Y OVEJA**

AUTOR: JORGE GUILLERMO RAMOS

DIRECTOR: PROF. DR. ENRIQUE H. LUQUE

**Santa Fe
2000**

AGRADECIMIENTOS

A mi amigo y Director, Prof. Dr. Enrique H. Laque, por haberme dado la oportunidad de compartir los inolvidables momentos del L.E.T.H., por la paciencia en escucharme y por la confianza en cada momento.

A la Prof. Dra. Mónica Muñoz de Toro, por su invaluable asesoramiento de estos últimos años, pero sobre todo por su cariño y alegría.

A mi amigo de toda la vida, Dr. Hernán A. Rodríguez, con quien tengo la suerte de compartir mi vocación por la Ciencia y el haber compartido partes de momentos de esta Tesis.

A mis queridos compañeros del L.E.T.H.: Mariel Maffei, Laura Ruiz, Pingo Orrego, María de los Milagros Becerra, Cami Fisher y Jara C. Villarreal, quienes me han regalado un bello tiempo de maravillosos recuerdos.

Al Prof. Dr. Gregorio S. V. de la Facultad de Medicina

Deseo dedicar esta Tesis a mi querida esposa y amiga, Jorgelina Varayoud, a quien le debo la fuerza y el amor que evitaron rendirme a la tentación de renunciar a mis ideales.

A la Prof. Dra. T. Espinosa

Laboratorio de Biología y

A mis padres Nelly y Federico

A los colaboradores de la Universidad de Chile, quienes me han brindado su apoyo para el desarrollo de esta Tesis.

AGRADECIMIENTOS

A mi amigo y Director, Prof. Dr. Enrique H. Luque, por haberme dado la oportunidad de compartir los inolvidables comienzos del L.E.T.H., por la paciencia en enseñarme y por la confianza en cada momento.

A la Prof. Dra. Mónica Muñoz de Toro, por su invaluable colaboración de todos estos años, pero sobre todo por su cariño y aliento.

A mi amigo de toda la vida, Dr. Horacio A. Rodríguez, con quien tengo la suerte de compartir mi vocación por la Ciencia y el haber obtenido juntos los resultados de esta Tesis.

A mis queridos compañeros del L.E.T.H.: Maricel Maffini, Laura Kass, Hugo Ortega, María de los Milagros Bassani, Cora Stoker y Juan C. Villarreal, quienes me han regalado un baúl lleno de hermosos recuerdos.

Al Prof. Dr. Gregorio S. Montes, Director del Laboratorio de Biología Celular de la Facultad de Medicina de la Universidad de San Pablo, por su inestimable y permanente colaboración en las pasantías que realicé en su Laboratorio.

A la Dra. Elia T. Espin García y al Dr. Jorge M. Da Costa Ferreira del Laboratorio de Biología Celular de la Facultad de Medicina de la Universidad de San Pablo, por su asistencia técnica y cariño.

A las autoridades de la Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas que brindaron su apoyo para el desarrollo experimental de esta Tesis.

A la Universidad Nacional de Litoral que a través del otorgamiento de subsidios y becas permitió la realización de este trabajo.

A todos los que tuvieron que hacerse cargo de mis tareas, mis ansiedades y mi mal humor durante el desarrollo de este trabajo.

A los siguientes condenados a prisión bibliotecaria perpetua por el delito de no pertenecer al Programa Vigente de la Carrera: Aristóteles, Tomás de Aquino, Galilei, Kant, Darwin, Ramón y Cajal, Einstein, Schrödinger, Maritain, Popper, Borges, Prigogine, Gödel, Houssay, Bunge, Feynman...

Gracias por permitirme los horarios de visita...

INDICE GENERAL

ABREVIATURAS UTILIZADAS	i
INDICE DE TABLAS	iii
INDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	vii
I. INTRODUCCIÓN	1
1- ANATOMÍA E HISTOLOGÍA DEL CÉRVIX	1
1.1 Generalidades	1
1.2 Composición del estroma cervical	6
1.2.1 Colágeno	6
1.2.1.1 Generalidades	6
1.2.1.2 Estructura del colágeno	8
1.2.1.3 Polimorfismo del colágeno	10
1.2.1.4 Colágeno en el cérvix	13
1.2.2 Sistema Elástico	19
1.2.2.1 Ultraestructura de las fibras del sistema elástico	19
1.2.2.2 Fibras elásticas en el cérvix	20
1.2.3 Sustancia Fundamental	22
1.2.3.1 Estructura química	22
1.2.3.2 Sustancia fundamental en el cérvix	26
2- VARIACIONES FISIOLÓGICAS DEL CÉRVIX EN EL PARTO	29
II. OBJETIVOS	38
III. MATERIALES Y MÉTODOS	40

1- ANIMALES	40
1.1 Ratas	40
1.2 Ovejas	40
2- OBTENCIÓN DE ANIMALES PREÑADOS	40
2.1 Ratas	40
2.2 Ovejas	41
3- OBTENCIÓN DE RATAS PSEUDOPREÑADAS (PSP)	41
4- CIRUGÍAS	42
4.1 Ovariectomías bilaterales en ratas	42
5- DISECCIONES Y OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS	43
5.1 Ratas	43
5.2 Ovejas	44
6- PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS	46
7- DETERMINACIÓN DEL TIPO Y CANTIDAD DE LEUCOCITOS QUE INFILTRAN EL CUELLO UTERINO	46
7.1 Eosinófilos	46
7.2 Neutrófilos y células mononucleares	48
8- ESTUDIO DE LA DISTRIBUCIÓN DEL COLÁGENO	48
9- PROCESAMIENTO PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA	49
10- TRATAMIENTO HORMONAL Y DISEÑO DE GRUPOS EXPERIMENTALES	50
11- ANÁLISIS ESTADÍSTICO	58
IV. RESULTADOS	60

V. DISCUSIÓN	82
VI. CONCLUSIONES	95
VII. BIBLIOGRAFÍA	97
VIII. PUBLICACIONES	119

Ag	Argentum
As	Antimonio
B	Boro
Ba	Bario
Br	Bromo
Ca	Calcio
Cl	Cloro
Co	Cobalto
Cu	Cobre
Fe	Hierro
Ge	Germanio
Li	Litio
Mg	Magnesio
Mn	Manganeso
N	Nitrogeno
Nb	Niobio
Na	Sodio
Ni	Niquel
Os	Osmio
P	Fosforo
Pb	Plomo
Pr	Praseodimio
Rb	Robio
S	Azufre
Se	Selenio
Si	Silicio
Sn	Estano
Sr	Stroncio
Ta	Tungsteno
Tb	Terbio
Ti	Titanio
Tl	Plomo
U	Uranio
V	Vanadio
W	Tungsteno
Xe	Xenon
Y	Yttrio
Zn	Zinc
Zr	Zirconio

ABREVIATURAS UTILIZADAS

OVX	Ovariectomizada/s, ovariectomía
D	Día
Eg	Estrógeno
Pg	Progesterona
E₂	17- β estradiol
hs	Horas
sc	Subcutánea
Rlx	Relaxina
psp	Pseudopreñada, pseudopreñez
Tx	Tamoxifeno
ARNm	Ácido ribonucleico (mensajero)
ACT-D	Actinomicina D
RER	Retículo endoplásmico rugoso
α	alfa
μm	micrómetro
ηm	nanómetro
DEHAS	Sulfato de dehidroepiandrosterona
PGE₂	Prostaglandina E ₂
PGF₂	Prostaglandina F ₂
GAG's	Glicosaminoglicanos
IL-1	Interleuquina 1

IL-8	Interleuquina 8	
g	Gramos	
°C	Grados centígrados	
Kg	Kilogramo	
UNL	Universidad Nacional del Litoral	Pag. 11
mm	Milimetro	
ml	Mililitro	
PBS	Buffer fosfato	Pag. 28
mg	Miligramo	
MO	Microscopio óptico	Pag. 54
M	molar	
ME	Microscopía electrónica	Pag. 60
ip	intraperitoneal	
Vv	Densidad de volumen	Pag. 70

INDICE DE TABLAS

TABLA 1: Principales características de los tipos de colágeno I, II y III.	Pag. 11
TABLA 2: Propiedades químicas de GAG's.	Pag. 28
TABLA 3: Esquema de administración de Rlx a ratas preñadas.	Pag. 54
TABLA 4: Valores obtenidos en los parámetros fetales en los distintos grupos experimentales.	Pag. 60
TABLA 5: Acción del E ₂ y Tx sobre el peso húmedo, seco y contenido de agua en los cuernos uterinos de la rata.	Pag. 70

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1:	Representación esquemática de cuernos y cérvix uterinos de la rata.	Pag. 2
FIGURA 2:	Micrografía de un cérvix uterino de rata a bajo aumento.	Pag. 3
FIGURA 3:	Niveles de organización que presentan las moléculas de colágeno.	Pag. 7
FIGURA 4:	Representación esquemática de los fenómenos biosintéticos y organelas que participan en la síntesis del colágeno.	Pag. 9
FIGURA 5:	Formación de enlaces cruzados inter e intramoleculares en el colágeno.	Pag. 10
FIGURA 6:	Micrografía electrónica de fibras elásticas.	Pag. 22
FIGURA 7:	Micrografía de lámina propia de endocérnix mostrando fibras elásticas, elaunínicas y oxitalánicas.	Pag. 22
FIGURA 8:	Detalle estructural de la conformación de un proteoglicano.	Pag. 24

FIGURA 9:	Interacción de las moléculas de ácido hialurónico con fibrillas de colágeno.	Pag. 27
FIGURA 10:	Micrografía de cérvix uterino de oveja extraído intraparto. Corte transversal.	Pag. 58
FIGURA 11:	Densidad media de volumen de eosinófilos (A) y áreas de birrefringencia (B) obtenidas en animales preñados y no preñados.	Pag. 62
FIGURA 12:	Densidad de volumen de eosinófilos (A) y áreas de birrefringencia (B) en animales psp tratados con E ₂ .	Pag. 63
FIGURA 13:	Fotomicrografías de secciones de cérvices uterinos en diferentes condiciones experimentales.	Pag. 65
FIGURA 14:	Densidad media de volumen de eosinófilos (A) y áreas de birrefringencia (B) en el estroma cervical de ratas preñadas OVX D22, tratadas con E ₂ y/o Rlx.	Pag. 67
FIGURA 15:	Fotomicrografías de secciones de cérvices uterinos de ratas en diferentes condiciones experimentales.	Pag. 69
FIGURA 16:	Efecto del Tx y del E ₂ sobre la infiltración de eosinófilos en el cérvix de ratas psp OVX el D9.	Pag. 72

FIGURA 17: Efecto inhibitorio de la Pg sobre la infiltración de eosinófilos en el cérvix de ratas psp OVX el D9. **Pag. 72**

FIGURA 18: Cinética de infiltración de eosinófilos en relación con el incremento de la dosis de E_2 y acción de la ACT-D en ratas psp OVX. **Pag. 75**

FIGURA 19: Infiltración de neutrófilos (A) y áreas de birrefringencia (B) en el cérvix de ovejas controles no preñadas vs hembras intraparto. **Pag. 79**

FIGURA 20: Densidad de volumen de leucocitos polimorfonucleares que infiltran la región subepitelial del estroma cervical de ovejas intraparto. **Pag. 80**

FIGURA 21: Fotomicrografías de estroma cervical de ovejas observado al microscopio de luz polarizada. **Pag. 80**

FIGURA 22: Micrografías electrónicas que muestran un cérvix de oveja control (A) y uno de oveja intraparto (B). **Pag. 81**

RESUMEN

Desde hace mucho tiempo se sabe que el cérvix actúa como una barrera anatómica y fisiológica que divide el medio externo, al cual se abre la vagina, y el medio intrauterino donde se desarrollan los fetos durante la gestación. Sin embargo, esta función de barrera protectora se revierte al momento del parto, en el cual el órgano se dilata aumentando de esta manera el diámetro del canal cervical permitiendo la salida de los fetos con el menor traumatismo posible. Desde el punto de vista histológico, se pueden distinguir dos zonas características: la primera comprende el epitelio, el cual sufre cambios graduales a medida que se asciende por el cérvix en sentido caudal-craneal; de tal manera de confundirse con el epitelio estratificado de la vagina en el ectocérnix, hasta llegar a un epitelio columnar alto, cercano al comienzo de los cuernos uterinos. Estas diferencias son más o menos marcadas de acuerdo al estadio del ciclo estral, haciéndose máximas durante el estro y menos notorias durante el diestro. La segunda zona comprende el estroma cervical, compuesto fundamentalmente por tejido conectivo y muscular liso, conformando las paredes del órgano y brindando sus propiedades elásticas. De la misma manera que ambas zonas se distinguen morfológicamente lo hacen también funcionalmente. El epitelio cervical juega un rol muy importante en la interacción moco cervical-semen durante el transporte espermático cervical, mientras que el estroma posee la plasticidad necesaria para permanecer como una barrera rígida durante la preñez y transformarse en una estructura blanda y flexible al momento del parto. Se han

realizado numerosas investigaciones con el fin de estudiar los mecanismos bioquímicos e histológicos que permitirían esta transformación. Se han observado modificaciones profundas en el entramado de colágeno, como así también cambios en la composición cuali y cuantitativa de los proteoglicanos, todas sustancias componentes de la matriz extracelular del tejido conectivo del cérvix uterino. Por otra parte se ha documentado que, durante el parto, el cérvix es invadido por leucocitos provenientes del torrente sanguíneo, proceso que, junto al aumento del contenido de agua del órgano, nos recuerda la imagen morfológica de un proceso inflamatorio. Estos eventos estarían endócrino y parácrinamente modulados de manera muy compleja, de tal forma que el mecanismo de regulación de este importante proceso está lejos de ser conocido.

Los objetivos de la presente tesis son: 1) Establecer si existe una asociación entre la infiltración de eosinófilos y los procesos de degradación del colágeno que se llevan a cabo en el cérvix de la rata durante el parto. 2) Conocer cuál es la participación y los mecanismos de acción de la Pg, el E₂ y la Rlx en la regulación de la infiltración de leucocitos y la remodelación del colágeno. 3) Investigar si en el cérvix de la oveja, especie de interés zootécnico y ampliamente utilizada como modelo animal para estudiar los mecanismos de control asociados con el parto, se observan los mismos fenómenos de infiltración leucocitaria y remodelación del colágeno que en especies de laboratorio (ejemplo: la rata).

Se usaron ratas cepa Wistar de 200 gr como mínimo y de edad aproximada a los 90 días. Por otra parte, se utilizaron ovejas de raza Corriedale, entre 3 y 4 años de edad, con un peso de 45 ± 2 kg. Con el objeto de estudiar el efecto de las hormonas E_2 y Pg sobre la infiltración de eosinófilos y el colágeno del cérvix uterino de la rata, se desarrolló un modelo de rata preñada OVX el D9 de preñez, tratada con terapia sustitutiva de esteroides, manteniendo niveles plasmáticos cercanos a los fisiológicos. Para conocer el efecto del E_2 en ausencia de Pg sobre los parámetros evaluados se generaron grupos de ratas psp OVX el D9 de psp e inyectadas con E_2 en dosis que simularon las concentraciones de la preñez. Con el fin de estudiar los efectos de la Rlx sobre la infiltración de eosinófilos y el colágeno del cérvix, se generaron grupos de ratas preñadas OVX el D22 de preñez inyectadas con Rlx porcina. Los cérvices de ovejas preñadas fueron divididos en dos zonas y se les estudió los tipos celulares que infiltran el órgano y la degradación del colágeno al momento del parto. Estos resultados se compararon con ovejas controles no preñadas.

Los resultados muestran que la infiltración de eosinófilos y la colagenólisis observadas en el cérvix de la rata al momento del parto son coincidentes en el tiempo pero parecen obedecer a controles hormonales diferentes. La infiltración de eosinófilos es promovida por el E_2 , mientras que la degradación del colágeno es promovida fundamentalmente por la Rlx. La colagenólisis observada en los animales preñados intactos pudo ser reproducida solamente en aquellos animales

tratados con Rlx, en cambio la infiltración de eosinófilos no se vió afectada por esta hormona. Dicha infiltración se vió promovida por el E₂ e inhibida por la Pg, dicha inhibición es revertida con el suministro del antiprogéstágeno RU-486 lo que indicaría que el efecto inhibitorio de la Pg necesita de la interacción hormona-receptor. Coincidentes con trabajos anteriores realizados sobre cuernos uterinos de ratas inmaduras, la acción promovedora de la infiltración del E₂ es mediada por la síntesis de proteínas, dado que dicha acción se vió bloqueada con el inhibidor de síntesis de RNA ACT-D. En los cérvices de ovejas preñadas se observó una profusa infiltración de leucocitos neutrófilos al momento del parto, siendo mayor en la zona subepitelial que en las zonas de estroma profundo. La colagenólisis en los cérvices de los animales preñados fue extensa en todo el órgano, no habiendo diferencias significativas entre las diferentes zonas evaluadas. Por otra parte se observaron diferencias significativas cuando se compararon estos resultados con ovejas controles no preñadas. Los cérvices de estos últimos presentaron bajos niveles de infiltración leucocitaria en todas las zonas evaluadas y ausencia de colagenólisis en todo el estroma del cérvix uterino.

Los resultados obtenidos en esta tesis nos permiten elaborar las siguientes conclusiones: 1) Los fenómenos de infiltración de eosinófilos y la colagenólisis en el cérvix uterino de la rata intraparto son fenómenos sincrónicos pero regulados por hormonas diferentes e independientes entre sí. 2) La colagenólisis

en el cérvix uterino de la rata intraparto es promovida fundamentalmente por la Rlx, aunque trabajos previos indican la necesidad de priming por parte del E_2 , para que la Rlx sea biológicamente activa. 3) La infiltración de eosinófilos en el cérvix de la rata es un fenómeno promovido por el E_2 e inhibido por la Pg. 4) El efecto promovedor del E_2 e inhibitorio de la Pg implicaría la interacción receptor-hormona esteroidea. 5) El efecto promovedor del E_2 sería mediado por la síntesis de proteínas. 6) El cérvix uterino de la oveja intraparto presenta altos niveles de infiltración de polimorfonucleares neutrófilos y una extensa colagenólisis. 7) La infiltración leucocitaria y la colagenólisis del cérvix uterino de la oveja intraparto son fenómenos que no guardan correlación en su distribución morfológica, comportándose como eventos independientes

I. INTRODUCCIÓN

1-ANATOMÍA E HISTOLOGÍA DEL CÉRVIX

Introducción

La anatomía fisiológica del cervix es diferente en muchas especies de mamíferos. En algunos animales el cervix es un órgano que se encuentra en la parte superior de la vagina y que actúa como una barrera para la entrada de los microbios. En otros animales, como el hombre, el cervix es un órgano que se encuentra en la parte inferior de la vagina y que actúa como una barrera para la entrada de los microbios. En algunos animales, como el hombre, el cervix es un órgano que se encuentra en la parte superior de la vagina y que actúa como una barrera para la entrada de los microbios. En otros animales, como el hombre, el cervix es un órgano que se encuentra en la parte inferior de la vagina y que actúa como una barrera para la entrada de los microbios.

En el hombre, el cervix es un órgano que se encuentra en la parte superior de la vagina y que actúa como una barrera para la entrada de los microbios. En otros animales, como el hombre, el cervix es un órgano que se encuentra en la parte inferior de la vagina y que actúa como una barrera para la entrada de los microbios. En algunos animales, como el hombre, el cervix es un órgano que se encuentra en la parte superior de la vagina y que actúa como una barrera para la entrada de los microbios. En otros animales, como el hombre, el cervix es un órgano que se encuentra en la parte inferior de la vagina y que actúa como una barrera para la entrada de los microbios.

I. INTRODUCCIÓN

1-ANATOMÍA E HISTOLOGÍA DEL CÉRVIX

1.1 Generalidades

Si bien la anatomía macroscópica del útero es diferente en muchas especies de mamíferos, todas ellas presentan en la porción caudal un cuello uterino o cérvix. Desde hace mucho tiempo se sabe que el cérvix actúa como una barrera anatómica y fisiológica que divide el medio externo, al cual se abre la vagina, y el medio intrauterino donde se desarrollan los fetos durante la gestación (Calder, 1981). Sin embargo, esta función de barrera protectora se revierte al momento del parto, en el cual el órgano se dilata aumentando de esta manera el diámetro del canal cervical permitiendo la salida de los fetos con el menor traumatismo posible (Liggins *et al.*, 1977).

En la rata, el útero presenta dos cuernos con un único cérvix dividido completamente por un septum cervical, dicho septum divide al órgano en dos compartimientos que se comunican en un sentido craneal con el cuerno uterino correspondiente, mientras que en sentido caudal ambos canales cervicales desembocan en vagina fusionados en un único orificio (Fig. 1A) (Nalbandov, 1969; Knudsen *et al.*, 1994). La porción caudal del cérvix, que penetra en el espacio vaginal, se denomina ectocérvis mientras que la porción craneal recibe el nombre de endocérvis (Hafez, 1970) (Fig. 1B).

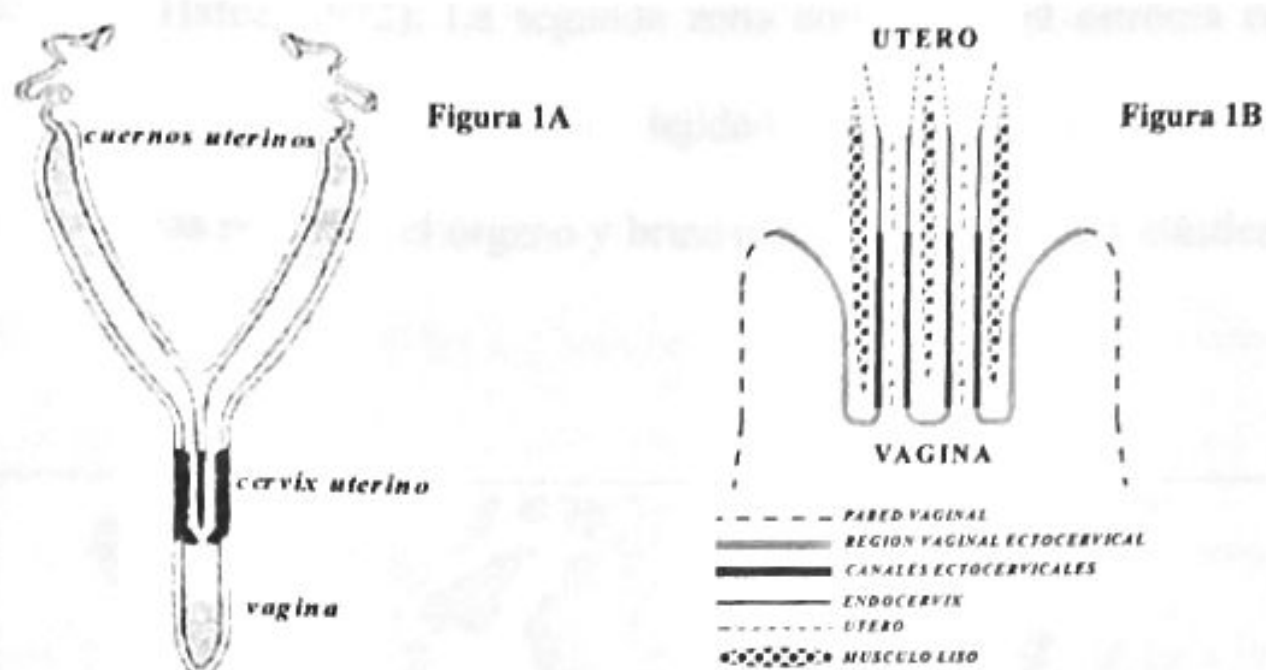


Figura 1: A) Representación esquemática de los cuernos y cérvix uterinos en la rata. Nótese el cérvix completamente dividido por un septum, donde cada canal cervical se comunica en forma independiente con su correspondiente cuerno uterino. Modificado de: Nalbandov, A.V. (1969) *La estructura de los sistemas reproductores*. En: *Fisiología de la Reproducción*. Ed. Nalbandov, A.V., Acribia-Zaragoza, España. B) Esquema de las diferentes zonas en el cérvix de la rata. Modificado de: Da Costa Ferreira Junior, J. (1995) *Estudo morfológico da modulação das fibras do sistema elástico induzida por esteróides ováricos na lâmina própria da cérvix uterina da rata*. Tese apresentada ao USP para obtenção do título do Doutor em Ciências.

Desde el punto de vista histológico, se pueden distinguir dos zonas características: la primera comprende el epitelio, el cual sufre cambios graduales a medida que se asciende por el cérvix en sentido caudal-craneal; de tal manera de confundirse con el epitelio estratificado de la vagina en el ectocérnix, hasta llegar a un epitelio columnar alto, cercano al comienzo de los cuernos uterinos. Estas diferencias son más o menos marcadas de acuerdo al estadio del ciclo estral, haciéndose máximas durante el estro y menos notorias durante el diestro

(El-Banna & Hafez, 1972). La segunda zona comprende el estroma cervical, compuesto fundamentalmente por tejido conectivo y muscular liso, conformando las paredes del órgano y brindando sus propiedades elásticas (Fig. 2).

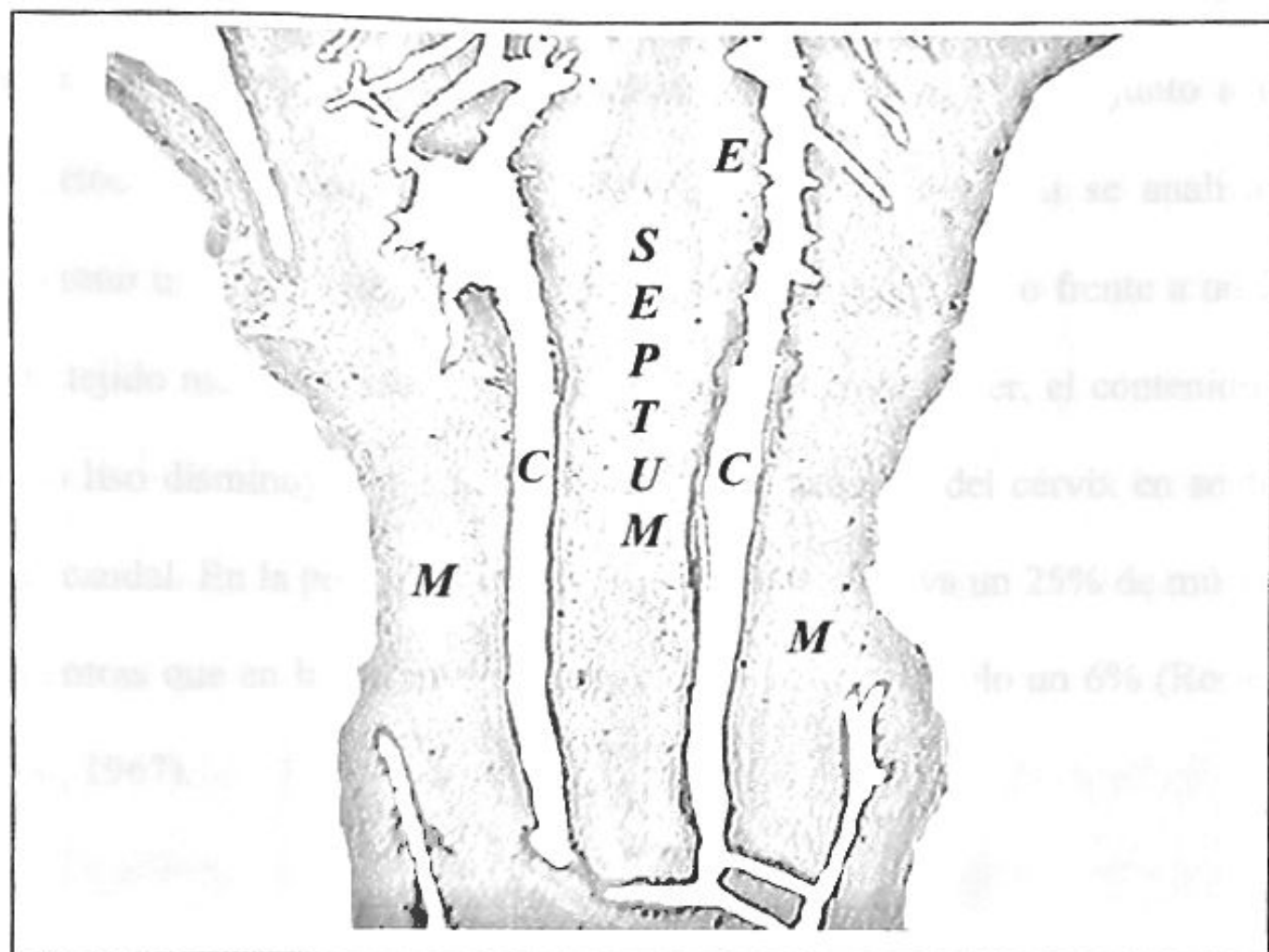


Figura 2: Fotomicrografía del cérvix uterino de una rata a bajo aumento. Se observa claramente el septum dividiendo el cérvix en dos canales independientes (C). Las zonas más claras del tejido corresponden al estroma fibroso subepitelial (E), las zonas mas rojizas al músculo liso (M).

De la misma manera que ambas zonas se distinguen morfológicamente lo hacen también funcionalmente. El epitelio cervical juega un rol muy importante en la interacción moco cervical-semen durante el transporte espermático cervical, mientras que el estroma posee la plasticidad necesaria para permanecer como

una barrera rígida durante la preñez y transformarse en una estructura blanda y flexible al momento del parto (Danforth, 1983). La composición del estroma cervical de la rata también varía de acuerdo a la zona del cérvix que se analice (Harkness & Harkness, 1959). La parte craneal del endocérvix está constituida por un 40-50% de músculo liso, sin embargo si se recorre el órgano en sentido caudal se observa un pronunciado aumento de tejido conjuntivo, junto a una disminución del contenido de musculatura lisa. En síntesis, si se analiza el cérvix como un todo se obtiene un 50-75% de tejido conjuntivo frente a un 20-40% de tejido muscular liso. De la misma manera, en la mujer, el contenido de músculo liso disminuye de acuerdo a la altura anatómica del cérvix en sentido craneal-caudal. En la porción más alta del cérvix se observa un 25% de músculo liso mientras que en la porción ectocervical se encuentra sólo un 6% (Rorie & Newton, 1967).

La diferencias estructurales entre el cérvix y el cuerpo del útero hacen que ambos elementos se comporten como sistemas biomecánicos bien diferenciados. En efecto durante casi todo el período de gestación el cérvix permanece rígido e inextensible, propiedades que permiten mantener a los productos de la concepción dentro del útero en forma segura, resistiendo a las tensiones producidas por el peso y los movimientos de los fetos. Sin embargo, al final de la gestación el cérvix sufre una serie de cambios profundos en sus propiedades mecánicas, transformándose en el momento del parto, en un órgano flexible,

cuyo diámetro interno deberá aumentar lo suficiente para dejar pasar los fetos sin riesgo de traumatismo. Se han realizado numerosas investigaciones con el fin de estudiar los mecanismos bioquímicos e histológicos que permitirían esta transformación. Se han observado modificaciones profundas en el entramado de colágeno (Junqueira *et al.*, 1980; Downing & Sherwood, 1986) como así también cambios en la composición cuali y cuantitativa de los proteoglicanos (Danforth *et al.*, 1974; El Maradny *et al.*, 1997), todas sustancias componentes de la matriz extracelular del tejido conectivo cervical. Por otra parte se ha documentado que, durante el parto, el cérvix es invadido por leucocitos provenientes del torrente sanguíneo (Junqueira *et al.*, 1980; Luque & Montes, 1989), proceso que, junto al aumento del contenido de agua del órgano, nos recuerda la imagen morfológica de un proceso inflamatorio. Estos eventos estarían endócrino y parácrinamente modulados de manera muy compleja, de tal forma que el mecanismo de regulación de este importante proceso está lejos de ser conocido.

Para comprender los procesos que ocurren en el cérvix al momento del parto es necesario comentar en detalle la composición celular y extracelular del estroma cervical.

1.2 Composición del estroma cervical

1.2.1 Colágeno

1.2.1.1 Generalidades

Con el término colágeno se denomina una familia de proteínas presente en numerosos organismos metazoarios, preferentemente de ubicación extracelular, con propiedades químicas y morfológicas características. La mayoría de los diferentes tipos de colágeno forman extensos polipéptidos que se asocian para formar triples hélices. Estas estructuras se agregan para formar las fibrillas de colágeno, visibles al microscopio electrónico. Grupos de fibrillas se asocian para formar las fibras de colágeno, visibles al microscopio óptico (Fig. 3) (Montes & Junqueira, 1982).

El colágeno es la proteína más abundante del reino animal, constituyendo aproximadamente un 25% del peso corporal en los mamíferos, a su vez, es de aparición temprana en la escala evolutiva, dado que a partir de observaciones realizadas en algunos Poríferos, éstos presentan tres tipos diferentes de colágeno (Garrone *et al.*, 1975). El rápido desarrollo en años recientes, de métodos inmunológicos y citoquímicos para el estudio del colágeno, ha permitido demostrar que lo que antaño se consideraba como una simple proteína de colágeno, en realidad involucra una familia de moléculas proteicas que pueden ser caracterizadas por su estructura química, morfología, distribución y propiedades funcionales (Montes & Junqueira, 1982).

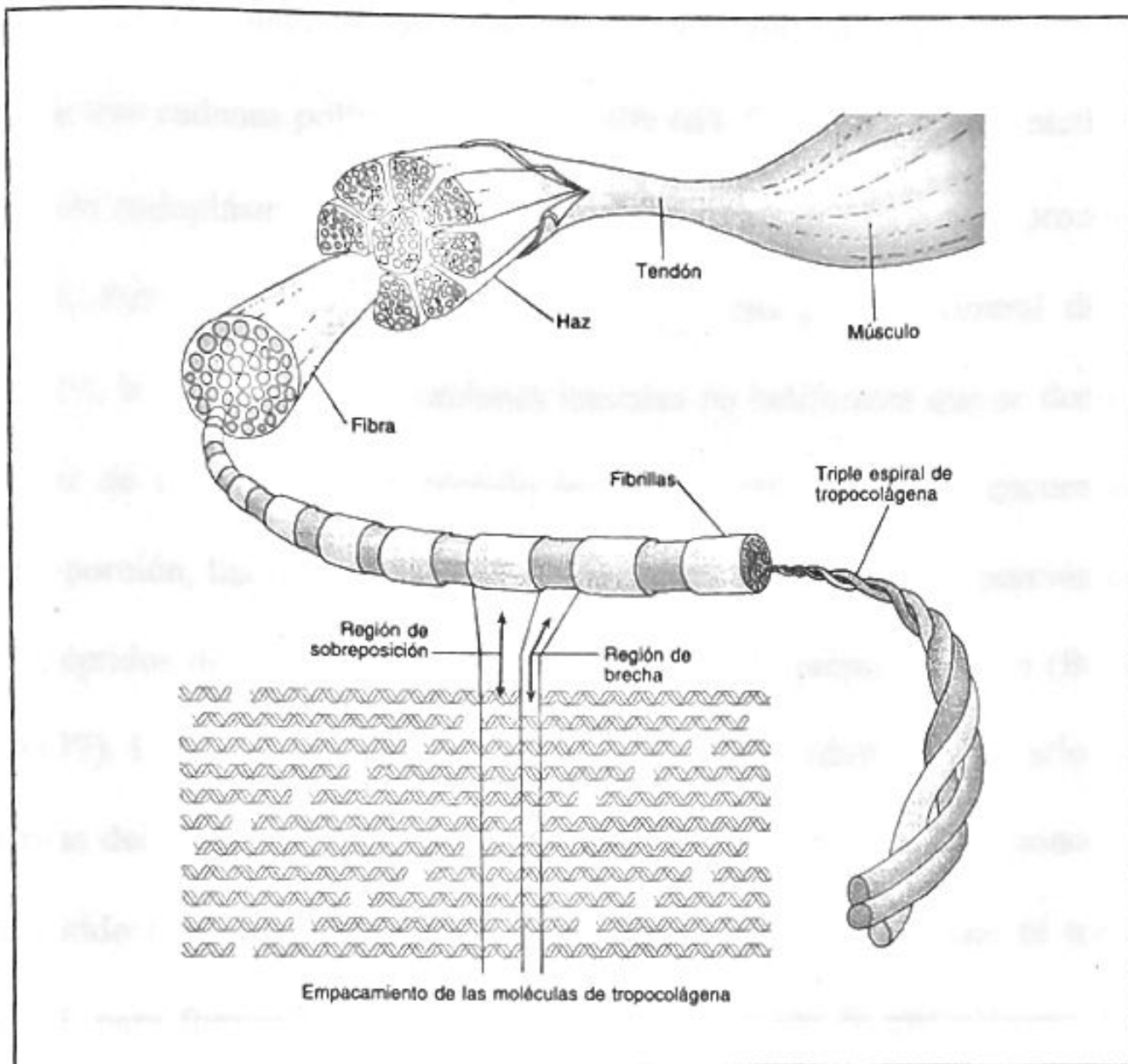
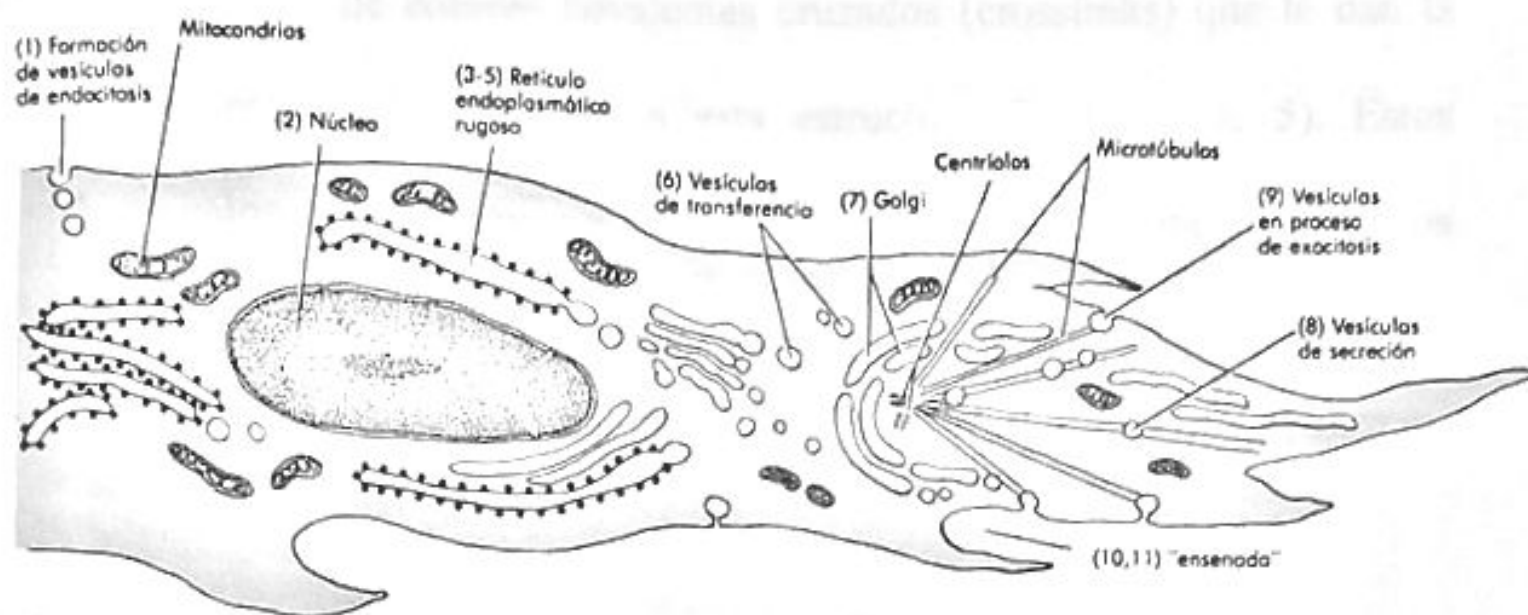


Figura 3: Niveles de organización que presentan las moléculas de colágeno. Nótese el origen de las regiones de superposición y brecha, a partir del arreglo ordenado y constante de las moléculas de tropocolágeno. Modificado de Gartner & Hiatt (1997) *Histología*. Eds Mc Graw-Hill Interamericana, México.

1.2.1.2 Estructura del colágeno

La molécula de colágeno está conformada por una triple hélice construida a partir de tres cadenas polipeptídicas tipo alfa (α). Cada cadena es sintetizada en el retículo endoplásmico rugoso (RER) bajo la denominación de preprocolágeno (Fig. 4). Este polipéptido está compuesto por una porción central de forma heliforme, limitada por dos porciones laterales no heliformes que se denominan péptidos de registro. En la porción inicial del polipéptido se encuentra una tercera porción, llamada péptido señal, que conjuntamente con la porción central y los péptidos de registro constituyen el polipéptido preprocolágeno (Becker *et al.*, 1977). Una vez que esta macromolécula se encuentra en el interior de las cisternas del RER, sufre el clivaje del péptido señal, resultando entonces en el polipéptido llamado procolágeno. Tres cadenas α de procolágeno se torsionan entre sí, para formar la triple hélice llamada molécula de procolágeno. Luego, las moléculas neoformadas de procolágeno son transportadas al aparato de Golgi, que permitirá la formación de vesículas que finalmente producirán la extrusión dentro del espacio extracelular. Durante el proceso de extrusión, los péptidos de registro son clivados debido a la acción de dos enzimas proteolíticas (procolágeno peptidasas) (Fessler *et al.*, 1981). La proteína resultante, llamada molécula de colágeno por los químicos y tropocolágeno por los histólogos, está compuesta por un segmento alargado conformado como triple hélice, con dos porciones no heliformes pequeñas en sus extremos. El siguiente paso, ocurre en el espacio extracelular en forma espontánea y consiste en el ensamble del



ACONTECIMIENTOS EN LA SÍNTESIS DEL COLÁGENO

Acontecimientos intracelulares

(1) Captación de aminoácidos (prolina, lisina, etc) por endocitosis.

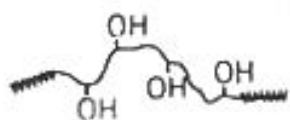
(2) Formación de ARNm



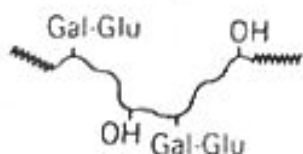
(3) Síntesis de cadenas alfa con péptidos de registro por los ribosomas (*procólágeno*)



(4) Hidroxilación de residuos de prolina y lisina y separación de la secuencia de señal en el RER



(5) Glucosilación de residuos hidroxilisilo específicos en el RER



(6) Formación de moléculas de procólágeno (triples hélices) en el RER y pasaje a vesículas de transferencia



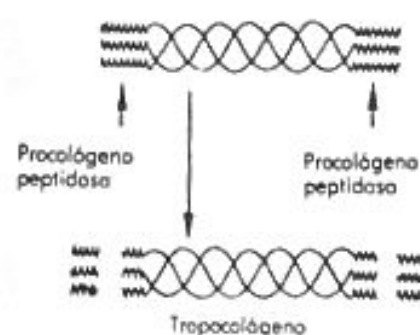
(7) Embalaje del procólágeno en vesículas de secreción en el aparato de Golgi

(8) Movimiento de las vesículas hacia la membrana plasmática con asistencia de microfilamentos y microtúbulos

(9) Exocitosis del procólágeno

Acontecimientos extracelulares

(10) Separación de los extremos no helicoidales, registrados, del procólágeno para formar tropocolágeno



(11) Polimerización del tropocolágeno para formar la fibrilla colágena (inicialmente en las 'ensenadas')

Figura 4: Representación esquemática de los fenómenos biosintéticos y de las organelas que participan en la síntesis del colágeno. Modificado de Ross et al. (1992) Histología, 2^{da} edición. Editorial Panamericana, Bs. As., Argentina.

tropocolágeno para constituir las fibrillas de colágeno. En estas fibrillas se producen una serie de enlaces covalentes cruzados (crosslinks) que le dan la característica resistencia tensional a esta estructura fibrilar (Fig. 5). Estos enlaces cruzados, catalizados por una lisil oxidasa, pueden darse entre los polipéptidos de una misma molécula de tropocolágeno (intramoleculares) o entre diferentes moléculas de tropocolágeno (intermoleculares) (Silver, 1982).

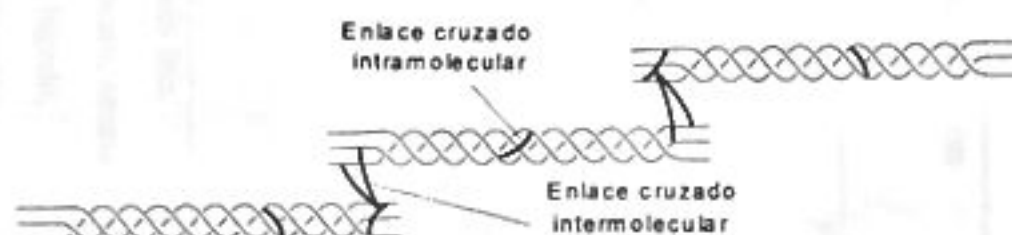


Figura 5: Formación de enlaces cruzados inter e intramoleculares que permiten dar al entramado de colágeno su rigidez tensional característica. Modificado de Alberts et al., (1994) *Molecular Biology of the cell*. 3^{ra} edición. Eds: Garland Publishing Inc., New York, USA.

1.2.1.3 Polimorfismo del colágeno

Más de 11 diferentes tipos de colágeno se han identificado y caracterizado hasta la fecha en tejidos de vertebrados. Dentro de esta variedad creciente, describiremos las características fundamentales de los colágenos intersticiales tipo I, II y III. Estas características están resumidas en la Tabla 1.

Tabla I: Principales características de los tipos de colágeno I, II y III. (Reproducido parcialmente de Montes & Junqueira, 1982).

Tipo de Colágeno	Fórmula Molecular	Distribución	Microscopía óptica	Ultraestructura	Lugar de síntesis	Función
I	$[\alpha_1(I)]_2 [\alpha_2(I)]$	Dermis, Hueso,	Fibras gruesas, no argirofílicas,	Fibrillas gruesas, densamente	Fibroblastos, osteoblastos,	Resistencia a la tensión.
		Tendón, Dentina,				
		Cartilago fibroso, Cérnix.	allamente birrefringentes.	empaquetadas con marcas	odontoblastos y condroblastos.	
II	$[\alpha_1(II)]_3$			variaciones en el diámetro.		
		Cartilago elástico e hialino	Redes laxas de colágeno, solamente visibles con ayuda de Picrosirius-Polarización.	No forman fibras, fibrillas delgadas embebidas en sustancia basal.	Condroblastos	Resistencia a presiones intermitentes.
III	$[\alpha_1(III)]_3$	Músculo liso,	Forman fibras de	Pobrementemente	Célula muscular	Mantenición de
		endoneuro, arterias, útero, hígado, pulmón, riñón.	baja birrefringencia verdosa, argirofílicas. Llamadas fibras reticulares.	empaquetadas, diámetros uniformes.	lisa, fibroblastos, células reticulares, células de Schwann y hepatocitos.	estructuras básicas en órganos expansibles.

Colágeno tipo I

Este tipo de colágeno contribuye en mayor proporción al contenido total de colágeno en vertebrados, constituyendo el componente más abundante en hueso y piel. Está también presente en tendón, cápsulas de órganos, dentina, pericondrio y cartilago fibroso. Las células capaces de producir este tipo de colágeno son: fibroblastos, osteoblastos y odontoblastos. Al enfocar con el microscopio óptico sobre dichos tejidos adultos normales, el colágeno tipo I aparece como fibras gruesas (2-10 μm), densamente empaquetadas (Montes & Junqueira, 1982). La morfología ultraestructural de este tipo de colágeno difiere de la de los tipos II y III, de tal manera de permitir su caracterización a través de la microscopía electrónica. Cuando se observan estas fibras en cortes longitudinales, las bandas características originadas por las regiones de superposición y brecha (Fig. 3) formadas cada 68 nm, son muy notorias. El colágeno tipo I está presente en aquellos órganos que soportan fuertes tensiones mecánicas cumpliendo fundamentalmente una función estructural.

Colágeno tipo II

Este tipo de colágeno no forma fibras visibles con las técnicas usuales de microscopía óptica. Al microscopio electrónico aparece como una malla de fibras muy finas (20 nm) flojamente empaquetadas con un patrón de bandas poco visible. Es producido por condroblastos, se encuentra en cartílagos hialinos y elásticos y presenta una intensa interacción con proteoglicanos que permite

mantener una eficaz resistencia ante la acción de presiones intermitentes en el cartílago (Zambrano *et al.*, 1982).

Colágeno tipo III

Este tipo de colágeno se encuentra usualmente entremezclado con colágeno tipo I en varios tejidos (ejemplos.: útero, arterias, piel, etc). Evidencias obtenidas a partir de estudios histoquímicos permiten definir al colágeno III como fibras delgadas (0,5-2 μm) argirofílicas, poco refringentes que se corresponden con las fibras reticulares descritas previamente por los histólogos (Junqueira *et al.*, 1978; Montes *et al.*, 1980). Cuando se las observa al microscopio electrónico, las fibras reticulares se componen por grupos de fibrillas delgadas, pobremente empaquetados. El espacio interfibrilar presenta puentes cortos y delgados que unen las fibrillas entre sí (Montes *et al.*, 1980). El colágeno tipo III es producido por células de músculo liso, fibroblastos, células reticulares y células de Schwann. Este colágeno está siempre presente en aquellos órganos que poseen un andamiaje estructural móvil tales como arterias, útero, intestino, etc.

1.2.1.4 Colágeno en el cérvix

Luego de las primeras observaciones efectuadas por Danforth (1947) donde se pone de relieve la naturaleza predominantemente conjuntiva del tejido cervical, la matriz extracelular comenzó a ser observada como un tejido dotado de un intenso dinamismo y gobernado por procesos de biosíntesis y degradación. En el

cérvix las moléculas de colágeno se encuentran dispuestas en fibras ordenadas embebidas en la matriz extracelular del tejido conectivo cervical (Kleiss *et al.*, 1978). El tropocolágeno, unidad estructural del colágeno, posee la típica estructura de triple hélice conformada a partir de tres cadenas α con un peso molecular de 100.000 cada una aproximadamente (Bornstein *et al.*, 1979). Estas cadenas α poseen una alta concentración de prolina e hidroxilisina, llegando en este último caso a constituir el 10% de los residuos de aminoácidos totales que componen las cadenas. La hidroxiprolina es un aminoácido exclusivo de la molécula de colágeno, permitiendo a través de su dosaje determinar la concentración de colágeno en diferentes tejidos, incluyendo el cérvix (Brodsky *et al.*, 1982). El colágeno contribuye aproximadamente con el 85% del peso seco del cérvix (Uldbjerg *et al.*, 1983a). Como hemos visto, se clasifica a las fibras de colágeno de acuerdo a la composición de sus cadenas α , siendo la mayoría del colágeno cervical de tipo I $[\alpha_1(I)]_2[\alpha_2(I)]$, acompañado hasta un 30% por colágeno tipo III $[\alpha_1(III)]_3$ (Minamoto *et al.*, 1987). No existen evidencias directas que la proporción de los tipos de colágeno cervicales cambie durante la gestación (Kleiss *et al.*, 1978).

Las modificaciones en las propiedades biomecánicas del cérvix durante el parto son conocidas desde hace mucho tiempo. En el cérvix a término la estructura rígida e inflexible se pierde para transformarse dramáticamente en un órgano plástico y dotado de gran extensibilidad. Este proceso es conocido como

maduración cervical, siendo un factor crucial para lograr un parto normal y con el menor riesgo de traumatismo fetal. Se han realizado numerosos intentos para correlacionar estos cambios en las propiedades físicas con eventos bioquímicos que ocurren en el seno de la matriz extracelular del cérvix. Numerosos trabajos han descrito modificaciones en la estructura física y química del colágeno cervical concurrentes en el tiempo con el proceso de maduración. Sin embargo, el aumento del contenido de colágeno en el cérvix durante la gestación no es tan notorio como ocurre en el útero. En la rata el contenido de colágeno cervical se incrementa en el doble durante el último tercio de la gestación, mientras que en los cuernos uterinos dicho aumento se eleva entre ocho y diez veces (Harkness & Harkness, 1954). En el ratón el incremento en el colágeno cervical durante la gestación es de aproximadamente el 30% del correspondiente a la rata, las mismas cifras se aprecian para la oveja y la mujer, mientras que en el conejo el contenido de colágeno cervical es igual en hembras preñadas como no preñadas (Fosang *et al.*, 1984; Uldbjerg *et al.*, 1983b). Huszar *et al.* (1984) encuentran una disminución en la concentración y un aumento en la solubilidad del colágeno en cérvices de ratas en el día de parto. Downing y Sherwood (1986) observaron que existe una degradación importante del colágeno cervical de la rata durante las últimas horas de la gestación. Luque y Montes (1989), utilizando el método de Picrosirius-Polarización para estudiar la agregación física del colágeno en cérvices de ratas intraparto, observaron la pérdida del entramado rígido y ordenado de colágeno y en su lugar encontraron fibras de colágeno

dispuestas en orientaciones aleatorias. Conjuntamente con estas modificaciones físicas del colágeno observaron una extensa infiltración del órgano por leucocitos eosinófilos. La existencia del proceso colagenolítico durante la maduración cervical se ha encontrado en otras especies incluyendo al ser humano. Junqueira (1980), utilizando el método cuantitativo de Picrosirius-Polarización, encuentra degradación del colágeno cervical en biopsias de mujeres intraparto, asociado a una extensa infiltración de leucocitos polimorfonucleares neutrófilos. Rajabi *et al.* (1991) observan un proceso colagenolítico similar durante el trabajo de parto del cobayo. En la oveja, Owiny *et al.* (1995) describen una infiltración de leucocitos neutrófilos en el momento del parto, mientras que Fosang *et al.* (1984) observaron una significativa infiltración de leucocitos eosinófilos en los cuellos uterinos de ovejas intraparto. Además de esta aparente contradicción en el tipo celular que infiltra el cérvix de la oveja durante el parto, ninguno de estos autores atribuyó un rol funcional a esta infiltración.

Existen algunos experimentos *in vitro*, utilizando fibroblastos provenientes de cérvices de conejo, han mostrado que algunas sustancias, tales como la vitamina C, inhiben la actividad de la colagenasa. Existe una profunda controversia sobre el mecanismo bioquímico que subyace a la pérdida del ordenamiento rígido del entramado de colágeno en el cérvix. Numerosos trabajos sugieren que la colagenasa intersticial, metaloproteinasa específica que interviene en la proteólisis del colágeno en numerosos tejidos de los mamíferos, sería la responsable de llevar adelante este proceso. Dicha enzima es sintetizada en células del tejido conectivo, tales como fibroblastos y

células del músculo liso (Wooley, 1984), como así también en leucocitos polimorfonucleares (Murphy *et al.*, 1977). Ito *et al.* (1977) encontraron por primera vez un incremento de actividad enzimática colagenolítica en cérvices de mujeres intraparto. Rajabi *et al.* (1988) hallaron un incremento sustancial de actividad colagenasa en la porción inferior del útero de mujeres durante el trabajo de parto. Sin embargo, los autores no pudieron distinguir el origen de esta enzima, ya que el tejido se encontraba infiltrado por leucocitos neutrófilos. En ratas tratadas con el antiprogéstágeno RU-486 en el día 18 (D18) de preñez se observó un incremento de la actividad colagenasa cervical concurrente con el trabajo de parto inducido por el fármaco (Ikuta *et al.*, 1991). Conjuntamente con estos eventos se han descripto inhibidores de colagenasa en el cérvix uterino, que podrían intervenir como reguladores tisulares de la actividad proteolítica (Jeffrey *et al.*, 1980).

Por otra parte algunos experimentos *in vitro*, utilizando fibroblastos provenientes de cérvices de conejo, han mostrado que algunas sustancias, tales como sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEAS) y prostaglandinas F_2 (PGF_2) y E_2 (PGE_2), son capaces de producir moderados incrementos en la producción de colagenasa en el medio de cultivo (Sakyo *et al.*, 1986; Goshowaki *et al.*, 1988).

A pesar de los hallazgos enunciados anteriormente, no existen estudios que demuestren fehacientemente que las profundas modificaciones biomecánicas que sufre el cérvix al momento del parto se deban fundamentalmente a la ruptura proteolítica típica del colágeno efectuada por las colagenasas intersticiales. Uno de los ejemplos más notorios en este sentido es el cérvix de conejo. Durante la gestación y en el período postparto no existe modificación alguna en el contenido de colágeno del órgano a pesar de sufrir una transformación dramática en sus propiedades tensoriales que permiten el nacimiento de las crías sin traumatismo (Koob *et al.*, 1981). Si la actividad colagenasa fuese un factor clave para mediar los cambios funcionales que se registran durante el proceso de maduración cervical, el colágeno que sería degradado por esta enzima debería ser reemplazado inmediatamente por colágeno sintetizado *de novo*, de tal manera que la velocidad de síntesis sea igual a la de su degradación. Si bien este mecanismo podría ser operativo, nunca ha sido demostrado (Jeffrey, 1991).

Por otra parte, se han estudiado las estructuras químicas del colágeno cervical durante su proceso de maduración, donde se han encontrado evidencias que indicarían que los monómeros que conforman las fibrillas de colágeno estarían intactos; a su vez los mapeos proteicos efectuados sobre estas moléculas no diferirían de aquellos realizados sobre moléculas de colágeno controles. Estas evidencias llevarían a la conclusión de que las estructuras primarias del

colágeno extractado de los cérvices intraparto estarían intactas (Koob *et al.*, 1981; Jeffrey, 1991). Sobre la base de estos hallazgos, también cabe la interpretación que el aumento de la distensibilidad cervical no se debería a la acción de las clásicas colagenasas sino más bien a la actividad de proteasas neutras que clivarían al colágeno en sus porciones terminales no-helicoidales. Dichas porciones están implicadas en la formación de la red ordenada y rígida de fibrillas de colágeno a través de la generación de enlaces cruzados. De esta manera se explicarían numerosos hallazgos encontrados en cérvices peri o intraparto tales como la pérdida de las estructuras rígidas de colágeno, altamente birrefringentes, por microscopía de polarización (Luque & Montes, 1989).

1.2.2 Sistema Elástico

1.2.2.1 Ultraestructura de las fibras del sistema elástico

La ultraestructura de las fibras elásticas demuestra que están compuestas por una porción central que contiene material amorfo, abundante y homogéneo, identificado como elastina, rodeado por microfibrillas de aproximadamente 10-12 nm de diámetro que, en secciones transversales, muestran un perfil tubular electro-denso (Fig. 6) (Montes, 1996). Durante el desarrollo de la fibra elástica, las microfibrillas aparecen primero seguidas por el depósito gradual de material amorfo que se va incluyendo entre estas. En algunos sitios anatómicos sólo aparecen los paquetes de microfibrillas sin el depósito de material amorfo, este tipo de fibras componentes del sistema elástico se las denomina fibras

oxitalánicas. Las llamadas fibras elaunínicas, en cambio, son aquellas que poseen material amorfo dispuesto en forma de parches mezclados entre las microfibrillas. Esto muestra que no todos los paquetes microfibrilares están destinados a conformar fibras elásticas maduras; de acuerdo a Cotta-Pereira *et al.* (1976) las fibras oxitalánicas y elaunínicas representan interrupciones en las fases de desarrollo sucesivas de las fibras elásticas. Por lo tanto un paquete de microfibrillas puede estar destinado a ser progenitor de una fibra elástica madura o bien una entidad independiente del tejido conectivo (fibra oxitalánica). Esta es la razón por la cual Fullmer *et al.* (1974) propuso el término oxitalánica para aquellas fibras presentes en áreas anatómicas del estado adulto que nunca desarrollarán a fibras elásticas características, y el término fibras pre-elásticas a aquellas que componen el tejido elástico en desarrollo de aquellas estructuras que están madurando hacia fibras elásticas características. La existencia de estos tres tipos de fibras fue confirmada por Cotta-Pereira *et al.* (1976) a través del microscopio electrónico, mostrando que las fibras del sistema elástico pertenecen a una serie continua y ordenada cronológicamente durante la histogénesis en oxitalánicas, elaunínicas y elásticas maduras (Fig. 7).

1.2.2.2 Fibras elásticas en el cérvix

En términos generales los resultados encontrados en la bibliografía indican que la composición cuantitativa en elastina del cérvix es baja. En los primeros trabajos Danforth (1947) encuentra que las fibras elásticas componen apenas el

1% del tejido fibroso cervical de la mujer, sin observar modificaciones sensibles entre pacientes grávidas y no embarazadas. Sin embargo, cuando se correlacionó la composición cuantitativa de diferentes órganos con la capacidad funcional del tejido elástico, se observó que aunque existan pequeñas cantidades de este tipo de fibras son fundamentales para el cumplimiento de la función del órgano; sobre todo en aquellos en donde la distensibilidad y el retorno a la forma original son dos propiedades esenciales, tal como ocurre en la piel y los pulmones (Leppert *et al.*, 1982). Sin embargo no son claros los resultados cuando se intentan comparar las composiciones cuantitativas de elastina en cérvices de mujeres grávidas y no grávidas. Leppert y Yu (1991) encontraron modificaciones muy pequeñas entre ambos grupos experimentales mientras que Gunja-Smith y Woessner (1985) observaron diferencias de hasta 4,3 veces por encima en el contenido de elastina en cérvix de mujeres embarazadas.

En un estudio cuantitativo realizado con analizador de imágenes, se reveló que la densidad de volumen de elastina en el cérvix de mujeres en el parto ($0,73 \pm 0,11$) era significativamente menor que en cérvices de mujeres no grávidas ($1,33 \pm 0,08$) (Rotten *et al.*, 1988). En este mismo estudio los autores observaron una progresiva desorganización de las fibras elásticas a medida que el embarazo progresaba, sin embargo entre 5 y 7 semanas luego del parto el tejido elástico apareció completamente reestructurado. En base a estos resultados los autores

proponen que la elastina interviene en los procesos de maduración y reconstrucción cervical durante el parto y pos-parto.

Figura 6

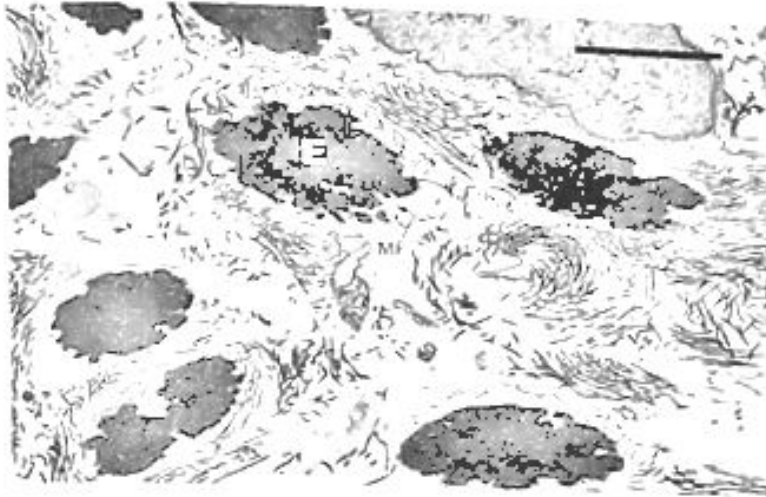


Figura 6: Fotomicrografía electrónica mostrando una sección transversal de fibras elásticas en desarrollo en un ligamento de feto bovino de 230 días de desarrollo. La elastina (E) forma un depósito central rodeada por microfibrillas (MF) en la periferia de una fibra en crecimiento. La barra superior derecha indica una distancia de 0,3 μm . Tomado de Gross, J. (1981) *Cell biology of extracellular matrix*. Eds: Hay, E.D., Plenum Press, NY, USA.

Figura 7

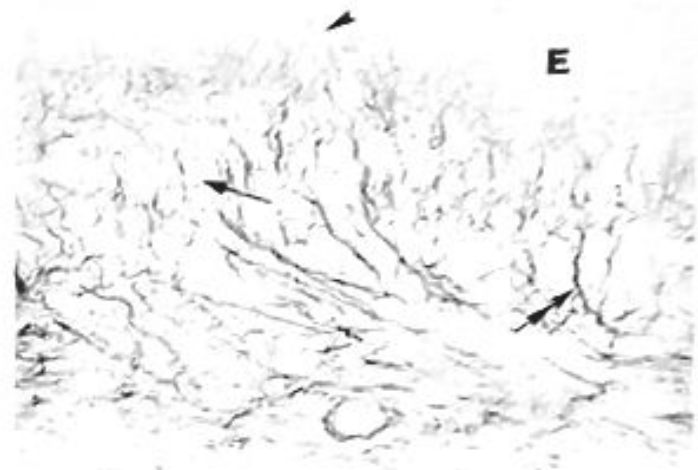


Figura 7: Fotomicrografía de lámina propia de endocérnix de rata, mostrando fibras elásticas (doble flecha), fibras elastinicas (flecha simple) y fibras oxitalánicas (cabeza de flecha). Resorcina-fucsina de Weigert precedida por oxidación. Magnificación 710x. E: epitelio. Modificado de: Da Costa Ferreira Junior, J. (1995) *Estudo morfológico da modulação das fibras do sistema elástico induzida por esteróides ováricos na lámina própria da cérnix uterina da rata*. Tese do título do Doutor em Ciencias.

1.2.3 Sustancia Fundamental

1.2.3.1 Estructura química

Se denomina sustancia fundamental al conjunto de moléculas que componen la sustancia amorfa que llena los espacios entre las células y las fibras del tejido

conectivo. Las macromoléculas que componen dicha sustancia pueden ser agrupadas en dos clases:

- glicosaminoglicanos (GAG's)
- glicoproteínas estructurales.

Acompaña a estas macromoléculas el agua en forma de agua unida o de solvatación.

Los GAG's son una familia de polisacáridos heterogéneos, compuestos por unidades disacáridas repetitivas consistentes en una hexosamina (generalmente N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina) unida por enlace glucosídico a ácido urónico o galactosa (Tabla 2). Con la excepción del ácido hialurónico, todos los GAG's poseen azúcares sulfatados. Como consecuencia de ello, los GAG's poseen una configuración polianiónica debida a la alta densidad de carga electrónica aportada por los residuos sulfato y carboxilo. Esta propiedad eléctrica es determinante a la hora de analizar sus características funcionales en solución. La capacidad de "llenar espacios" surge a partir de la repulsión electrostática de estos residuos aniónicos, permitiendo mantener alejadas a las cadenas de polisacáridos y de esta manera ocupar todo el espacio disponible (Fig. 8). Esta conducta química es la que determina su funcionalidad biológica, al ser extremadamente aptas para rodear y encapsular completamente las células y fibras extracelulares. La alta densidad de carga aniónica junto con su gran capacidad de unión a proteínas permite que se forme una matriz extracelular

entramada. La mayoría de los GAG's, a excepción del ácido hialurónico, normalmente no se encuentran como polímeros libres, sino más bien unidos a proteínas formando complejos conocidos como proteoglicanos (Brandt, 1981). En estos complejos, la porción proteica siempre es mucho menor que las cadenas laterales de GAG's; estas cadenas se unen mediante enlaces electrostáticos a proteínas extracelulares como el colágeno (Fig. 9).

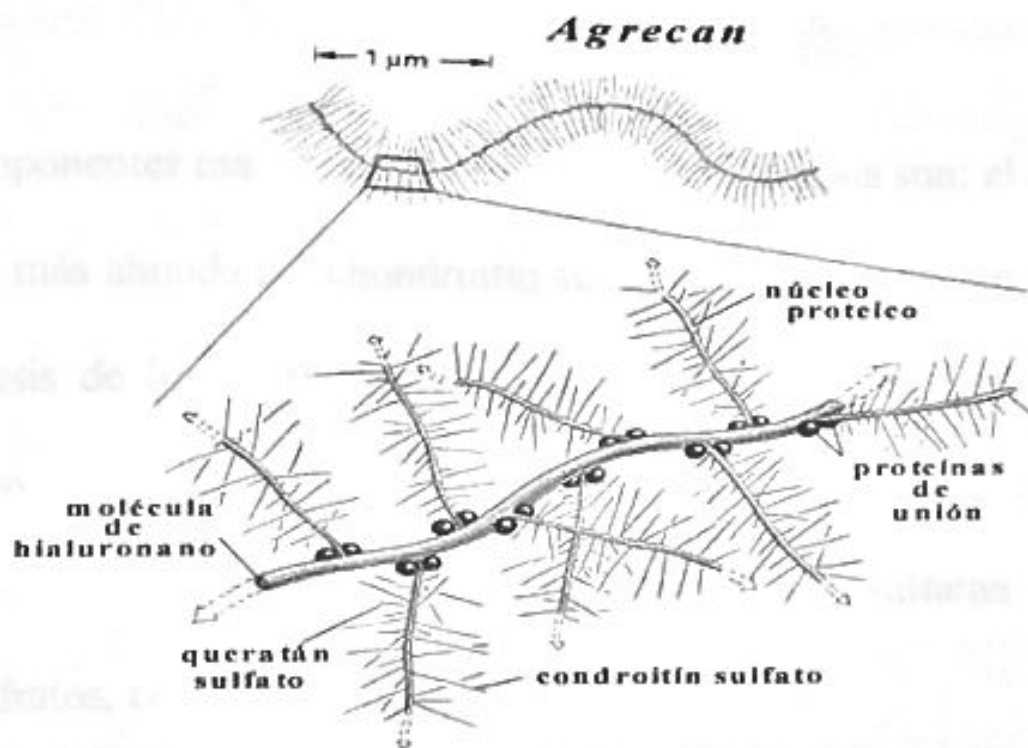


Figura 8: Detalle estructural de la conformación de un proteoglicano (agrecan). Las proteínas de unión permiten la adhesión de numerosas ramas conformadas por un core proteico de la cual se desprenden las cadenas de GAG's. Esta estructura arborificada permite ocupar extensos volúmenes tisulares y penetrar entre los entramados celulares y fibrosos. Modificado de Alberts et al., (1994) *Molecular Biology of the cell*. 3^{ra} edición. Eds: Garland Publishing Inc., New York, USA.

Una de los terminales de la cadena proteinica central del proteoglicano contiene menor cantidad de GAG's, en su lugar posee un sitio de unión para ácido hialurónico. Mediante un péptido de unión y a través de enlaces no covalentes, aproximadamente 100 proteoglicanos se unen a una larga molécula de ácido hialurónico (Hascall & Hascall, 1981). Como consecuencia de la repulsión electrostática, las cadenas de polisacáridos se separan unas de otras y de esta manera ocupan todo el espacio que se encuentra entre las fibrillas de colágeno.

Los componentes más frecuentes de los proteoglicanos son: el ácido hialurónico, como el más abundante, chondroitin sulfato, dermatán sulfato y heparán sulfato. La síntesis de los proteoglicanos comienza en el RER generando primero el esqueleto proteico y luego agregando las cadenas de carbohidratos. La glicosilación termina en el Golgi donde se sulfatan los respectivos carbohidratos, componentes de las cadenas laterales.

Varias células son las responsables de la degradación de los proteoglicanos haciendo que el recambio de estas sustancias sea relativamente rápido (2-4 días en el caso del ácido hialurónico y 7-10 días para los GAG's sulfatados), comparado con el recambio fisiológico de las moléculas de colágeno.

1.2.3.2 Sustancia fundamental en el cérvix

En tejidos conectivos fibrosos, tales como la piel, los tendones y el cérvix uterino los proteoglicanos contribuyen alrededor de un 0,2% del peso húmedo. El GAG predominante en el cérvix es el dermatán sulfato llamado decorín o PG-S2 (proteoglycan small 2) que constituye hasta un 90% de los galactosaminoglicanos totales. Dicho proteoglicano está acompañado predominantemente por un biglicano llamado PG-S1, la diferencia estructural radica en que en el PG-S1 se ubican dos cadenas de dermatán sulfato (de ahí su clasificación como biglicano). Además del PG-S1 y PG-S2 aparecen pequeñas cantidades de heparán sulfato (Uldbjerg & Malmstrom, 1991).

Numerosos trabajos muestran que durante la preñez y el parto se producen algunas modificaciones en la composición relativa de proteoglicanos en el cérvix. Durante el parto se ha observado una disminución de hasta un 40% de la concentración de PG-S2, mientras que la relación PG-S2/colágeno se ha visto duplicada (Uldbjerg *et al.*, 1983; Kokenyesi *et al.*, 1990). Debido a que existen trabajos que reportan un incremento en la síntesis de colágeno a término (Fosang *et al.*, 1984) es atractivo especular que este colágeno neosintetizado formaría fibras y fibrillas en un medio ambiente de proteoglicanos diferente al del cérvix de animales no preñados y estas características influirían sobre las propiedades biomecánicas del cérvix a término (Fig. 9) (Uldbjerg & Malmstrom, 1991). Golichowski *et al.* (1980) estudiaron los cambios en los contenidos de GAG's

durante la preñez en el cérvix de la rata. Los autores concluyen que durante los primeros 15 días de preñez no se observan cambios significativos en el contenido de GAG's cervicales, mientras que a partir del día 16 y hasta el 21 observaron un importante incremento en las cantidades de hexosamina sulfatada y ácido urónico. El análisis por cromatografía en papel reveló un incremento significativo en keratán sulfato en la última parte de la preñez. Este incremento de keratán sulfato, molécula con menor afinidad por el colágeno que el dermatán sulfato, llevó a los autores a postular un efecto facilitador por parte de aquella molécula, en el mecanismo colagenolítico.

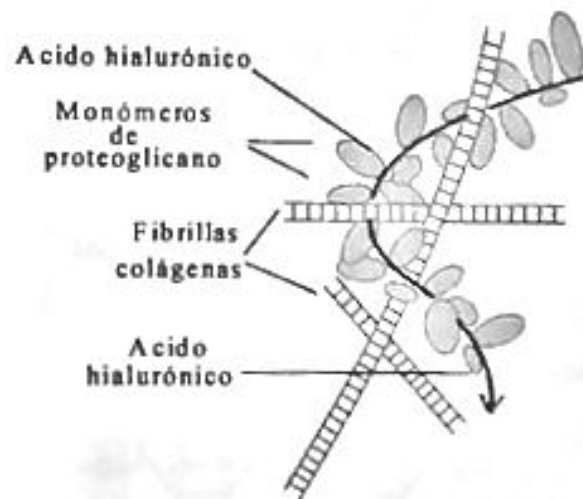
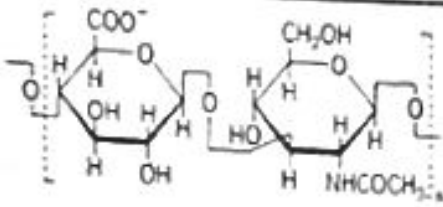
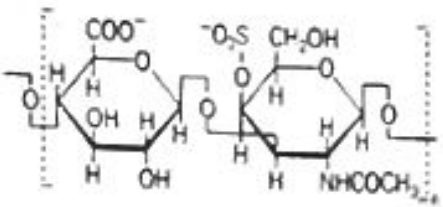
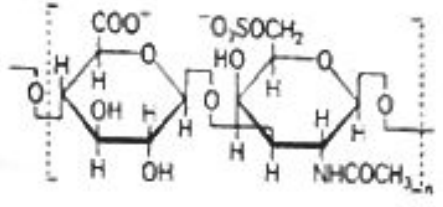
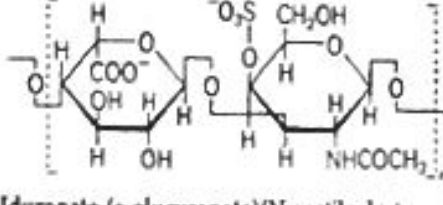
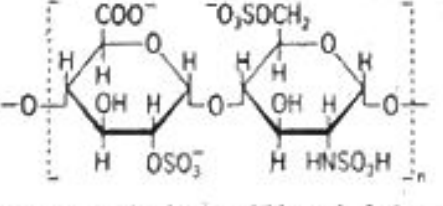
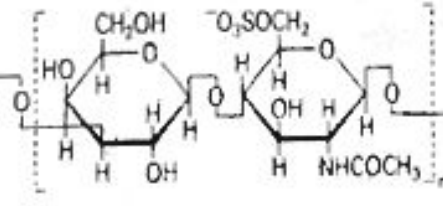


Figura 9: Molécula de ácido hialurónico formando un conglomerado lineal con múltiples monómeros de proteoglicano e interaccionando con una malla de fibras colágenas. Modificado de Ross et al. (1992) *Histología*, 2^{da} edición. Editorial Panamericana, Bs. As., Argentina.

Tabla 2: Propiedades químicas de los glicosaminoglicanos (GAG's)

Glicosaminoglicano	Peso molecular	Disacárido repetido	Sulfato/ disacárido	Unido a proteína	Distribución en tejidos
Hialuronano (ácido hialurónico o hialuronato)	4000-8 millones		0	-	Varios tejidos conjuntivos cordón umbilical, cresta de gallo Fluido sinovial, cartilago, humor vitreo, piel, riñón, válvulas cardiacas
Condroitina 4-sulfato	5000-50 000		0.2-1.0	+	Cartilago, córnea, hueso, piel, arterias, núcleo pulposo joven
Condroitina 6-sulfato	5000		0.2-2.3	+	Cartilago, córnea, hueso, piel, pared arterial, cordón umbilical, tendón, disco intervertebral
Dermatano sulfato	15 000-40 000		1.0-2.0	+	Piel, tendón, ligamentos, cordón umbilical, válvulas cardiacas
Heparina	6000-25 000		1.0-2.0	+	Pared arterial, pulmón, hígado, piel, células cebadas
Heparina sulfato	5000-12 000	Como la heparina	0.2-3.0	+	Pulmón, arterias, superficies celulares, membranas basales
Queratano sulfato	4000-12 000		0.9-1.8	+	Cartilago, córnea, disco intervertebral, hueso

Modificado de Smith & Wood (1997) *Biología Celular*. Eds: Addison Wesley Iberoamericana, Wilmington, Delaware, USA.

2- VARIACIONES FISIOLÓGICAS DEL CÉRVIX EN EL PARTO

Desde los primeros trabajos de Danforth (1947; 1954) 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 *et al.* (1968) realizaron un primer estudio intensivo sobre cérvix de rata, correlacionando el análisis histomorfológico con las variaciones bioquímicas de la matriz extracelular halladas en 108 cérvices de rata. 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 *et al.* compararon las biopsias de mujeres embarazadas y no embarazadas con el objeto de conocer los efectos del embarazo y el trabajo de parto sobre el colágeno, glicoproteínas y GAG's del estroma cervical. Las biopsias de cérvices tomadas inmediatamente después del parto mostraron incremento en el contenido de agua, una marcada disminución en el contenido de colágeno y glicoproteínas y un aumento en los GAG's frente a las controles 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. 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.

En 1978, Kleissl *et al.* sumaron evidencias a favor del proceso colagenolítico durante el parto. Estos autores estudiaron las variaciones de las fracciones ácido-solubles e insolubles de colágeno en cérvices de mujeres embarazadas y no embarazadas. Se encontraron significativas diferencias 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 tomados intraparto en comparación con los controles.

Varios trabajos han mostrado que el proceso de maduración cervical en la rata está influido por las hormonas relacionadas con el parto: progesterona (Pg), estrógeno (Eg) y relaxina (Rlx) (Cullen & Harkness, 1960; Downing & Sherwood, 1986). El mecanismo de ablandamiento del tejido cervical en el parto

de la rata estaría modulado fundamentalmente por efectos combinados de Eg y Rlx. Sin embargo cuando ambas hormonas se suministran por separado en animales castrados no preñados no se observan efectos relevantes conducentes a un ablandamiento cervical (Kroc *et al.*, 1959; Zarrow *et al.*, 1961). Cuando se suministró Rlx sobre ratas tratadas previamente con 17- β estradiol (E_2), se observaron efectos característicos de maduración cervical tales como: aumento del diámetro del canal cervical (Kroc *et al.*, 1959; Zarrow *et al.*, 1961), incremento en la extensibilidad (Cullen *et al.*, 1960) y disminución de las fuerzas de resistencia tensionales (Bradshaw *et al.*, 1981). En este mismo contexto experimental se ha observado que en ratas ovariectomizadas (OVX) tratadas previamente con E_2 , la Rlx tuvo efectos tróficos sobre el cérvix, reportándose un aumento del peso húmedo y seco del cérvix frente a los animales controles, sin embargo no se observaron modificaciones en el contenido total de colágeno de dicho órgano (Vasilenko & Mead, 1987). Cheah y Sherwood (1988), utilizando un interesante diseño experimental, encontraron que en ratas preñadas OVX aproximadamente 30 horas (hs) antes del parto, la restitución con terapia hormonal de reemplazo de los niveles fisiológicos de E_2 y Rlx, permitió obtener los mismos parámetros de parto y sobrevivencia de las crías nacidas vivas que en los animales controles preñados intactos. Si los animales OVX eran tratados solamente con E_2 , dichos parámetros se alteraban significativamente. A través de éste y otros trabajos (Lao Guico-Lamm & Sherwood, 1988a; Hwang *et al.*, 1989) en donde se estudiaron parámetros de

parto específicos tales como duración del trabajo de parto, número de crías traumatizadas y número de crías viables, se pudo demostrar que la Rlx es una hormona esencial para obtener un proceso de parto normal en la rata. Estas alteraciones en los parámetros de parto llevaron a investigar el efecto de dicha hormona sobre el proceso de maduración cervical. Lao Guico-Lamm *et al.* (1988b) lograron obtener y purificar un anticuerpo monoclonal contra Rlx de rata que inhibía su actividad biológica *in vivo*. De esta manera, trabajando sobre ratas preñadas tratadas con dicho anticuerpo durante la segunda mitad de la gestación, observaron que los cérvices de los animales tratados eran mucho menos extensibles y su peso total era significativamente menor al de los controles preñados intactos (Hwang & Sherwood, 1988). Del análisis histológico de estos cérvices se observó un colágeno altamente compactado en fibras gruesas y ordenadas, alta densidad de fibras elásticas y una disminución en el diámetro de las secciones arteriolas comparadas con los animales controles (Lee *et al.*, 1992). Estos mismos autores habían demostrado, utilizando el mismo anticuerpo, que la inhibición de la actividad biológica de la Rlx durante los últimos 2 días de la preñez producía alteraciones en el peso y la extensibilidad del cérvix al momento del parto, como así también alteraciones en los parámetros de parto y en la viabilidad de las crías (Hwang *et al.*, 1989).

explicar la presencia de estas células en el estroma cervical, sin embargo su

Si bien el mecanismo de acción de la Rlx está lejos de ser dilucidado, se han encontrado sitios aceptores de Rlx en células epiteliales del cérvix de ratas

preñadas, postulándose que dichas células podrían desencadenar una serie de eventos que llevarían a las modificaciones de la matriz extracelular del cuello uterino observadas en el parto (Kuenzi & Sherwood, 1995). Con respecto a los eventos celulares que median la acción de la Rlx, se ha observado en cultivos de células del estroma cervical de mujeres (Hwang *et al.*, 1996) y de cobayos (Mushayandebvu *et al.*, 1995) un aumento en la producción de metaloproteinasas incluyendo actividad de collagenasa (Hwang *et al.*, 1996).

Asociados en el tiempo a 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 hacia el tejido subepitelial de útero y cérvix (Basset, 1962; Tchernitchin *et al.*, 1974; Padykula & Tansey, 1979; Zheng *et al.*, 1988, Luque & Montes, 1989). Numerosos tipos de leucocitos se han observado en el útero y cérvix de diferentes especies durante la preñez y el parto. En la rata, utilizando técnicas histoquímicas tradicionales, se ha reportado la presencia de eosinófilos, mastocitos y monocitos (Padykula & Tansey, 1979; Luque & Montes, 1989) mientras que en la mujer se ha demostrado la presencia predominante de leucocitos polimorfonucleares neutrófilos (Junqueira *et al.*, 1980). Se han propuesto numerosas hipótesis para explicar la presencia de estas células en el estroma cervical, sin embargo su función permanece aún hoy desconocida. Una de las primeras hipótesis propuestas establecía que los eosinófilos que infiltran predominantemente el

cérvix y útero de la rata al final de la preñez eran mediadores de determinadas acciones estrogénicas (Tchernitchin *et al.*, 1976). Dicha hipótesis postulaba la presencia de dos sistemas receptores para los Eg en el útero, uno de ellos consistía en la acción del receptor "clásico" nuclear, que implicaba la activación de elementos genómicos; mientras que el otro sistema propuesto, llamado sistema receptor eosinofílico, mediaría las diversas acciones no genómicas de los Eg, tales como la formación del edema uterino de la preñez y las llamadas respuestas estrogénicas tempranas. Más recientemente se ha propuesto que los llamados sitios aceptores para Eg de alta afinidad y baja capacidad tipo II se encontrarían asociados a los eosinófilos infiltrantes y más específicamente a la peroxidasa que compone algunos de sus gránulos (Lyttle *et al.*, 1984; Sheehan *et al.*, 1986). A pesar de estos esfuerzos, trabajos posteriores han demostrado que en cultivos de células provenientes de úteros de ratas sin eosinófilos infiltrantes, se han observado altos niveles de sitios aceptores tipo II, y se ha cuestionado su asociación a la peroxidasa granular debido a que se ha obtenido actividad aceptora tipo II en fracciones de centrifugación muy diferentes a dicha enzima (Markaverich *et al.*, 1986). Por otra parte, trabajando sobre ratones deplecionados de eosinófilos no se ha logrado inhibir las acciones tempranas de los Eg sobre el útero luego de una inyección con E₂ (Pérez *et al.*, 1996).

Sin embargo se conoce desde hace tiempo, que la infiltración de leucocitos eosinófilos en el útero de la rata se encuentra asociada a la acción de los Eg

(Basset, 1962; Tchernitchin *et al.*, 1974). Una serie de experimentos realizados sobre ratas inmaduras tratadas con E₂ han demostrado que este esteroide es capaz de generar actividad quimiotáctica para los eosinófilos en un macerado de células uterinas (Lee *et al.*, 1989). Dicha actividad quimiotáctica parecería tener naturaleza proteica y ser inhibida por la Pg (Howe *et al.*, 1990). A pesar de estos interesantes resultados, todas estas experiencias utilizan modelos experimentales que no se corresponden con la fisiología de un animal preñado, es decir no se trabaja dentro de las condiciones normales de funcionamiento del organismo durante una preñez normal *in vivo*.

Debido al renovado interés por encontrar un nexo funcional entre las modificaciones histomorfológicas de la matriz extracelular del cuello uterino durante la preñez y el parto y la presencia de leucocitos infiltrantes, se han realizado numerosos estudios para conocer los eventos parácrinos que ocurren en el estroma cervical a término, en algunas especies tales como el conejo (El Maradny *et al.*, 1996a; Ito *et al.*, 1994; Ito *et al.*, 1988) el cobayo (Rajabi *et al.*, 1995; Rajabi *et al.*, 1991a,b) el cerdo (Huang *et al.*, 1993) y en la mujer (Osmers *et al.*, 1995; El Maradny *et al.*, 1996b; Kaminski *et al.*, 1994; Yoshida *et al.*, 1993; Rath *et al.*, 1993; Osmers *et al.*, 1991). En estos trabajos se han observado la acción de algunas citoquinas que actuarían como mediadores en el proceso de maduración cervical tales como la interleuquina-1 (IL-1). Su aplicación en forma de supositorios vaginales promovió el aumento de la actividad

colagenasa, el contenido de agua del órgano se vio incrementado, elevó la concentración de interleuquina-8 (IL-8) y produjo una infiltración de neutrófilos sobre el cérvix de conejo (Maradny *et al.*, 1995). Experimentos *in vitro* han mostrado que cuando se tratan fibroblastos de cérvices de conejas preñadas con IL-1, se produce un aumento de IL-8 en el medio de cultivo. Sin embargo el tratamiento de estas células con Pg inhibió el aumento de IL-8 mediado por la IL-1. En un trabajo anterior estos autores habían propuesto un papel modulador de la Pg a través de la supresión de la producción de metaloproteinasas intersticiales y del aumento de la síntesis de sus inhibidores (Ito *et al.*, 1994). Otra de las moléculas que han sido estudiadas como posibles factores mediadores parácrinos han sido las PGE₂ y PGF₂. La aplicación de PGE₂ sobre cérvices de mujeres en el primer trimestre de embarazo, permitió medir un aumento de la actividad colagenasa y elastasa (Rath *et al.*, 1993). Un estudio prospectivo que abarcó a 296 pacientes durante su trabajo de parto mostró que la aplicación intracervical de PGF₂- α produjo un incremento muy significativo de la actividad colagenasa y aumentos moderados de actividad elastasa comparados con los cérvices de pacientes tratadas sólo con oxitocina (Kaminski *et al.*, 1994). Sin embargo ninguno de estos tratamientos logra obtener índices de dilatación cervical iguales a los fisiológicamente aptos, lo que implica que los mecanismos endócrinos y parácrinos que modulan el complejo proceso de maduración cervical no están completamente dislucidados, sino más bien conocidos en parte,

aún no suficientemente engarzados como para obtener un panorama general que permita la aplicación de soluciones clínicas integrales.

II. OBJETIVOS

GENERAL

En 1977 Liggins *et al.* observaron en el útero materno durante el parto algunos fenómenos semejantes al de un proceso inflamatorio. A partir de esta observación surge la hipótesis que la dilatación fisiológica que sufre el cuello uterino durante el parto sería el resultado de este proceso inflamatorio. Basados en este antecedente decidimos investigar la participación y el control hormonal de algunos de los eventos que caracterizan a los procesos inflamatorios, como: la remodelación del colágeno y el reclutamiento de leucocitos en el momento de iniciar el parto. Para ello se estudió en ratas la participación de hormonas como estradiol y progesterona en la remodelación del colágeno y el reclutamiento de leucocitos en el momento de iniciar el parto. Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que el desarrollo de terapias (hormonales) que induzcan o inhiban el parto a voluntad.

ESPECÍFICOS

- 1) Establecer si existe una asociación entre la infiltración de leucocitos y los sucesos de degradación del colágeno que se llevan a cabo en el útero de la ratona durante el parto.

II. OBJETIVOS

Conocer más sobre la participación

GENERAL

En 1977 Liggins *et al.*, encuentran en el cérvix uterino durante el parto algunos fenómenos semejantes al de un proceso inflamatorio. A partir de esta observación surge la hipótesis que la dilatación fisiológica que sufre el cuello uterino durante el parto sería el resultado de este proceso inflamatorio. Basados en este antecedente decidimos investigar la participación y el control hormonal de algunos de los eventos que caracterizan a los procesos inflamatorios (ejemplo: la remodelación del colágeno y el reclutamiento de leucocitos) en el mecanismo de dilatación del cuello uterino durante el parto. Estos conocimientos tienen relevancia en la clínica ya que permitirán orientar el desarrollo de terapias (hormonales) que induzcan o inhiban el parto a voluntad.

ESPECIFICOS

- 1) Establecer si existe una asociación entre la infiltración de eosinófilos y los procesos de degradación del colágeno que se llevan a cabo en el cérvix de la rata durante el parto.
- 2) Conocer cuál es la participación y los mecanismos de acción de la Pg, el E₂ y la Rlx en la regulación de la infiltración de leucocitos y la remodelación del colágeno.

3) Investigar si en el cérvix de la oveja, especie de interes zootécnico y ampliamente utilizada como modelo animal para estudiar los mecanismos de control asociados con el parto, se observan los mismos fenómenos de infiltración leucocitaria y remodelación del colágeno que en especies de laboratorio (ejemplo: la rata).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1- ANIMALES

1.1 Ratas

Se usaron ratas hembras cepa Wistar de 200 gr como mínimo y de edad aproximada a los 90 días. Los animales se mantuvieron en un ambiente con temperatura controlada (22° C) y con fotoperíodo de 14 hs de luz y 10 hs de oscuridad (luces prendidas entre las 06:00-20:00 hs). El alimento fue balanceado y suministrado en forma de pellets (Nutric, Córdoba), el agua fue *ad libitum*.

1.2 Ovejas

Se utilizaron once (11) ovejas de raza Corriedale, entre 3 y 4 años de edad, con un peso de 45 ± 2 kg mantenidas en la Granja Experimental de la UNL. Los animales se alimentaron con fardos *ad libitum* y suplementados con 400 gr/día de concentrado, tuvieron libre acceso al agua. Todas las hembras utilizadas habían presentado un parto normal con anterioridad.

2- OBTENCIÓN DE ANIMALES PREÑADOS.

2.1 Ratas

La preñez de la rata dura 23 días, de acuerdo con el régimen de luz de nuestro bioterio, los partos ocurren entre las 12:30-14:00 hs del día 23 (D23) de preñez. Para preñar los animales se introdujo la hembra en la jaula del macho y se observó su comportamiento. Si la hembra presentaba conducta receptiva positiva

confirmada por el reflejo de lordosis, se la dejaba toda la noche con el macho. A la mañana siguiente se procedía a hacer extendidos vaginales en gota fresca observados al microscopio óptico y la presencia de espermatozoides confirmaba la preñez del animal (Montes & Luque, 1988). Este día se consideraba el D1 de la gestación.

2.2 Ovejas

Siete (7) ovejas fueron preñadas durante el estro en forma natural con machos de fertilidad probada. La duración media de la preñez en el plantel fue de 149 ± 5 días. Otras cuatro (4) ovejas no-preñadas fueron usadas como controles.

3- OBTENCIÓN DE RATAS PSEUDOPREÑADAS (PSP)

La pseudopreñez se indujo en la noche del proestro, mediante la estimulación cervicovaginal artificial con un vástago cilíndrico de 24 mm de longitud durante 15 segundos (Castro-Vazquez & Carreño, 1981; Luque & Castro-Vazquez, 1983). La mañana siguiente se consideró D1 de psp.

4- CIRUGÍAS

4.1 Ovariectomías bilaterales en ratas

Antes de comenzar la cirugía se sumerge el instrumental en alcohol al 70% y se prepara el hilo de sutura. Se anestesia el animal en cámara de éter y se lo coloca en la tabla de cirugía con el abdomen hacia abajo, sujetándolo por sus patas y hocico. Durante el tiempo que dura la cirugía, la anestesia es mantenida por un algodón embebido en éter, colocado sobre el hocico del animal. Se desinfecta con alcohol al 70% el campo de cirugía y se procede a practicar una incisión de 1,5 cm en la línea media de la piel dorsal. Se divulsiona el tejido subcutáneo para separar la piel del tejido muscular subyacente. Para ingresar a la pared abdominal se debe atravesar la pared muscular y el peritoneo, para ello se realizan dos incisiones -una a la izquierda y otra a la derecha- a 0,5 cm de la columna vertebral y a 0,5 cm de la última costilla. Se buscan con pinza anatómica de punta roma los órganos genitales internos. Una vez localizado el ovario se expone exteriormente tomándolo por la grasa circundante, para evitar cualquier tipo de presión.

Se liga a nivel de la unión útero-tubárica y se secciona por arriba de la ligadura, extrayéndose así la bursa ovárica (con ovario y oviducto incluidos). Se introduce el resto del material expuesto en la cavidad abdominal y se procede a suturar el peritoneo junto con el tejido muscular, con sutura continua. Por último se sutura la piel, con puntos discontinuos.

La hembra operada se deja en jaula individual hasta su recuperación de la anestesia y recuperación parcial de la herida.

A los animales sham OVX se los somete a una operación simulada haciendo las mismas incisiones y exponiendo los ovarios pero sin cortarlos. Con este grupo se investiga posibles efectos de la anestesia, cirugía, y vehículos usados durante el tratamiento.

5- DISECCIONES Y OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

5.1 Ratas

Las hembras fueron sacrificadas por decapitación mediante guillotina. Se coloca el animal en la tabla de disección sujetándolo de las cuatro patas, con el abdomen hacia arriba. Se procede a levantar 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 grados 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 separan las asas intestinales y la grasa mesentérica hacia un lado, visualizando el aparato genital interno junto con los

fetos (para ratas preñadas). Con tijera de punta fina se procede a disecar los fetos cortando el amnios a la altura del segundo y tercer feto. Con pinza anatómica de punta roma se extraen los fetos y sus respectivas placentas del interior del saco amniótico. Se observan y registran sus características generales (color, aspecto, tamaño, etc.).

Se diseca la vagina, cérvix y cuernos uterinos, se colocan en una solución de formol al 4% tamponada a pH: 7,5 con PBS. Luego se ligan los extremos de los cuernos uterinos con hilo quirúrgico previa inyección de 1,5 ml de formol al 4% tamponado a pH: 7,5. A las 6 hs se realizan sobre la muestra dos lavados con PBS de 10 minutos cada uno y luego se la lleva a una solución de alcohol al 70% hasta su posterior procesado.

5-2 Ovejas

Las muestras de cérvix fueron obtenidas durante el trabajo de parto, inmediatamente antes del nacimiento de la cría, momento en el cual el proceso de dilatación del cérvix se había producido. Para la obtención del cérvix las ovejas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (65 mg/ml de solución salina, Sigma Chemical Co., St Louis, MO) y colocadas en decúbito dorsal sobre una mesa de cirugía, fijadas por sus 4 miembros. Con un bisturí se efectuó una incisión longitudinal en la línea media del abdomen desde la cicatriz umbilical hasta 2 cm craneal del pubis, atravesando piel, tejido subcutáneo y músculo

cutáneo. Una vez descubierta la aponeurosis ventral, se localizó la línea blanca (lugar de unión de las vainas de los músculos rectos), efectuando un corte longitudinal a través de ella y de la fascia transversal, llegando a la cavidad peritoneal. Posteriormente, se localizaron los ovarios y cuernos uterinos que se fueron separando a través de cortes progresivos en los mesoovarios, mesosálpinx, mesoterio y las porciones adyacentes al ligamento ancho. Una vez separados los cuernos uterinos y ovarios de ambos lados, se procedió a la disección de los ligamentos y fascias que sostienen el cuerpo y cuello uterino, hasta llegar al fondo de saco vaginal, donde se colocaron 2 pinzas Rochester-Péan, efectuándose un corte entre ambas. De esta forma se logró extraer íntegramente todo el útero y ambos ovarios, cérvix y una pequeña porción de la vagina.

El tejido extraído se lava en solución salina fría, se ubica el cérvix y se lo remueve del exceso de fascia y vasos con tijeras finas. Las muestras de cérvix fueron divididas en porción uterina, intermedia y vaginal, tomándose un corte transversal (con relación al canal cervical) de cada sector. Las cuatro (4) ovejas del grupo control fueron sacrificadas en el frigorífico local y las muestras del cérvix se tomaron de la misma manera que para los animales preñados.

6- PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Las muestras fueron procesadas hasta su inclusión en tacos de parafina siguiendo técnicas histológicas de rutina (Junqueira *et al.*, 1979) para, posteriormente, ser cortadas en micrótomos. Dichos cortes de 5 μ m de espesor se montaron sobre portaobjetos previamente tratados con poli-L-lisina como sustancia adherente.

Al menos un corte de cada muestra fue teñido de rutina con Hematoxilina-Eosina para realizar una evaluación microscópica general. El resto de los cortes fueron sometidos a diferentes coloraciones, las que se mencionan en las secciones siguientes.

7- DETERMINACIÓN DEL TIPO Y CANTIDAD DE LEUCOCITOS QUE INFILTRAN EL CUELLO UTERINO

7.1 Eosinófilos

El Sirius rojo alcalino colorea los gránulos de los eosinófilos de rata y la coloración de fondo corresponde a la hematoxilina (Bogomeletz, 1980; Luque & Montes, 1989).

Estas muestras fueron observadas en microscopio óptico (MO) con aumento de 100x. En cada corte de tejido coloreado con Sirius alcalino se observaron 120

campos diferentes, contando el número de células que coincidían con las intersecciones de las líneas de un retículo graduado, ubicado en el objetivo del microscopio de 0.8 x 0.8 mm.

El número de campos que debían ser contados se determinó haciendo una gráfica de número de campos vs desviación estándar. Cuando la desviación estándar permanecía constante, el número de campos que correspondía con ese valor es el mínimo número que se debe contar para cometer el menor error posible. Los eosinófilos que se contaron fueron, solamente, aquellos que se ubicaron en el estroma del cuello uterino.

La variable morfométrica que se calculó en nuestro trabajo fue la densidad de volumen de los eosinófilos sobre cada corte de tejido (Gundersen *et al.*, 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 (ejemplo: volumen de leucocitos/estroma del cérvix).

P_i = número de puntos incidentes sobre el componente en estudio (ejemplo: puntos incidentes sobre leucocitos).

P = total de puntos del retículo (ejemplo: total de puntos incidentes en el estroma del cérvix).

7.2 Neutrófilos y células mononucleares

Además del reconocimiento de sus características morfológicas distintivas apreciadas con Hematoxilina-Eosina, se procedió a caracterizar estas células por la tinción diferencial de sus granulaciones citoplasmáticas utilizando la coloración de Giemsa prolongado, adaptada a 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 60 minutos.

8- 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 *et al.*, 1978).

Por otro lado, dichas moléculas son ricas en aminoácidos básicos, por lo tanto tienen 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. Cuando esta

proteína sufre algún proceso de remodelación o degradación (colagenólisis) dicha birrefringencia disminuye considerablemente mostrando un aspecto desordenado, esto último puede medirse cuantitativamente por el método de Picrosirius-polarización asociado con microespectrofotómetro (Junqueira *et al.*, 1978; Montes, 1996). Los cortes histológicos fueron teñidos en una solución de Sirius rojo al 0,1% saturada de ácido pícrico durante 30 minutos y finalmente montados en resina sintética. La polarización se obtuvo con dos filtros Polaroid ubicados uno por debajo del condensador y otro por encima de la lente objetiva. Se utilizó una objetiva Zeiss aplanática de bajo aumento (2,6x) y la intensidad de luz transmitida fue medida por un microespectrofotómetro Reichert modelo 6AE9/65 a una longitud de onda de 585 nm. Las condiciones del sistema óptico fueron calibradas para que la transmitancia de luz proveniente de la birrefringencia se exprese la relación porcentual de área birrefringente sobre área total.

9- PROCESAMIENTO PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA (ME)

Pequeños fragmentos de biopsias de cérvices de ovejas fueron fijados en glutaraldehído al 2% en buffer fosfato 0,15M a pH 7,2 durante 12-16 hs a 4°C. Luego se efectuó una posfijación con tetróxido de osmio al 1% por 1 h para luego dejar la muestra en acetato de uranilo durante toda una noche. El tejido se incluyó en resina de poliéster (Polilyte), obteniéndose cortes finos en un

ultramicrotomo LKB para ser coloreados con acetato de uranilo y ser observados en un microscopio electrónico de transmisión (Luque & Montes, 1989).

10- TRATAMIENTO HORMONAL Y DISEÑO DE GRUPOS

EXPERIMENTALES

Para establecer con mayor claridad los diversos grupos experimentales utilizados se dividirá la secuencia en 4 etapas.

ETAPA 1: Estudio de la influencia de la Pg y el E₂ en la infiltración de eosinófilos y la colagenólisis del cérvix en ratas preñadas.

Los animales fueron tratados con E₂ (Sigma Chemical Co, St. Louis MO) y/o Pg (4-pregnano, 3-20 diona) de acuerdo al protocolo descrito por Downing y Sherwood (1986). La Pg (Sigma Chemical Co, St. Louis MO) fue suministrada a través de dos implantes subcutáneos (sc) de Silastic (0,15 cm x 5 cm; Dow-Corning, Midland, MI) conteniendo 60 mg de Pg cristalina cada uno, siendo sellados sus extremos con sellador de Silastic (Dow-Corning, Midland, MI). Los implantes fueron preincubados en animales huéspedes durante 24 hs antes de ser colocados en los animales experimentales, de esta manera se permite llegar a una velocidad constante de liberación de la hormona evitando los picos de secreción iniciales. Los implantes fueron colocados en la región dorsal y detrás

del cuello del animal al momento de realizarse la OVX (D9 de preñez). En el mismo momento de la OVX, se contaron los sitios de implantación que cada hembra estaba gestando. Los animales controles recibieron implantes vacíos. Para imitar la caída de los niveles séricos de Pg al final de la preñez, los implantes fueron retirados bajo anestesia con éter alrededor de 30 hs antes del momento del parto esperado (entre las 6:00 y 7:00 hs del D22 de preñez). Los animales controles de nuestra colonia tienen el parto entre las 12:30 hs y las 14:00 hs del D23 de preñez.

El E₂ fue suministrado disuelto en aceite de sésamo en dosis de 0,05 µg a través de inyecciones sc diarias a partir del momento de la OVX (D9 de preñez). Para imitar el aumento de las concentraciones séricas de Eg al final de la preñez las dosis fueron incrementadas a 0,5 µg el D21, 1 µg el D22 y D23 de preñez.

Con el fin de estudiar los posibles efectos de la terapia hormonal de reemplazo sobre el desarrollo fetal se procedió a evaluar algunos parámetros de preñez a saber: el número de sitios de implantación en el D9 de preñez, los tamaños y pesos individuales de cada cría al momento del parto y 48 hs después. A su vez se analizaron parámetros de lactancia utilizando madres adoptivas con el fin de apreciar capacidad de succión y adhesión al pezón por parte de las crías de madres tratadas.

Los grupos experimentales diseñados fueron los siguientes:

Grupo O: ratas no preñadas OVX y sacrificadas 2 semanas después de la OVX.

Grupo Ip: ratas preñadas sacrificadas intraparto, luego de parir 2 crías.

Grupo In: ratas preñadas intactas sacrificadas entre las 11:30 y 12:00 hs del D23.

Grupo Sham1: ratas preñadas, sometidas el D9 a OVX simulada, con implantes vacíos e inyectadas con vehículo de E_2 sacrificadas entre las 11:30 y 12:00 hs del D23.

Grupo OPE: ratas preñadas, OVX el D9, tratadas con Pg y E_2 , sacrificadas entre las 11:30 y 12:00 hs del D23.

Grupo OP: ratas preñadas, OVX el D9, tratadas con Pg y vehículo de E_2 , sacrificadas entre las 11:30 y 12:00 hs del D23.

Para poder estudiar el efecto de los Eg en ausencia de Pg se utilizó un modelo de rata psp. La rata psp nos permitió contar con cuerpos lúteos funcionales y un nivel sérico de Pg similar al de las ratas preñadas hasta el momento en que se realizan las OVX (D9) (Castro-Vazquez & Carreño, 1981; Luque & Castro-Vazquez, 1983). De esta manera los animales psp, OVX y tratados con E_2 , se hacen comparables con el resto de los grupos de animales preñados. Sin embargo, es necesario hacer notar que el tratamiento con E_2 sobre los animales psp no permite la extensión en el tiempo del estado neuroendócrino/endócrino del animal posterior al momento de la OVX. Por lo tanto, las biopsias de cérvix

tomadas el D23 a partir del inicio de la psp, no serían diferentes a las que se hubieran tomado en ratas castradas crónicas tratadas con E_2 .

Grupo pspO: ratas psp, OVX el D9 del inicio de la psp.

Grupo pspOE: ratas psp, OVX el D9 del inicio de la psp y tratadas con E_2 .

Grupo pspOPE: ratas psp, OVX el D9 del inicio de la psp y tratadas con E_2 y Pg.

Todos los animales fueron sacrificados entre las 11.30 y 12.00 hs del D23.

ETAPA 2: Estudio de la influencia de la Rlx en la infiltración de eosinófilos y la colagenólisis del cérvix en ratas preñadas.

Se ha demostrado que la Rlx es producida fundamentalmente por el cuerpo lúteo en la rata (Fields *et al.*, 1992) y que sus niveles séricos son máximos en el periodo de parto (alrededor de 30 hs antes del parto, es decir D22 y D23 de preñez) (Sherwood *et al.*, 1980). Esta serie de experimentos fueron diseñados para estudiar la influencia de los niveles máximos de parto de esta hormona, sobre la infiltración de eosinófilos y la colagenólisis del cérvix durante el parto de la rata. Por otra parte varios autores han sugerido que el efecto de la Rlx es mediado por los Eg (Kroc *et al.*, 1959, Zarrow & Yochim, 1961) por lo tanto, se diseñaron grupos experimentales para conocer las posibles interrelaciones en la acción de la Rlx, la Pg y el E_2 . Los animales fueron OVX el D22 de preñez y tratados con E_2 y/o Rlx porcina de alta pureza (donada por el Dr. O.D. Sherwood, Urbana, Illinois, EEUU) en dosis que simulan las concentraciones

séricas de final de preñez (Downing & Sherwood, 1986). El E₂ se suministró disuelto en aceite de sésamo en dosis de 1 µg a través de una inyección sc diaria a las 8:00 hs de los D22 y D23 de preñez. La Rlx fue suministrada disuelta en benzopurpurina al 1% a través del siguiente esquema (Tabla 3):

Tabla 3: Esquema de administración de Rlx a ratas preñadas.

DÍA DE PREÑEZ	HORA	DOSIS*
D22	7:00 hs	100 µg/0,2 ml
D22	14:00 hs	200 µg/0,2 ml
D22	18:00 hs	200 µg/0,2 ml
D23	7:00 hs	200 µg/0,2 ml

* Las inyecciones fueron vía sc

De acuerdo a estos esquemas de tratamiento los grupos experimentales de animales preñados en esta etapa quedaron conformados como siguen:

Grupo C: ratas OVX a las 6:00 hs del D22 de preñez.

Grupo Sham2: ratas sometidas a una OVX simulada e inyectadas con vehículo de E₂ y vehículo de Rlx.

Grupo OE: ratas OVX a las 6:00 hs del D22 y tratadas con E₂ y vehículo de Rlx.

Grupo OR: ratas OVX a las 6:00 hs del D22 y tratadas con Rlx y vehículo de E₂.

Grupo OER: ratas OVX a las 6:00 hs del D22 y tratadas con E₂ y Rlx.

Todos los animales fueron sacrificados entre las 11.30 y 12.00 hs del D23.

ETAPA 3: Estudiar el mecanismo de acción de los esteroides ováricos Pg y E₂ sobre la regulación de la infiltración de eosinófilos en el cérvix de la rata.

Se utilizaron ratas psp, OVX el D9 del comienzo de psp. Los animales recibieron E₂ y Pg de acuerdo al protocolo de Downing y Sherwood (1986) mencionado anteriormente.

Con el fin de estudiar el efecto de antagonistas de la acción de ambos esteroides ováricos sobre la infiltración de eosinófilos, se inyectaron animales con tamoxifeno (Tx) y RU-486 (Sigma Chemical Co). El Tx se suministró por vía sc utilizando como vehículo aceite de sésamo y 10% de etanol, en dosis de 1mg/0,2 ml, 90 minutos antes de la inyección correspondiente de E₂ durante los D21, D22 y D23 de psp. El RU-486 se suministró a través de inyecciones sc con dosis de 0,04 mg/0,2ml disuelto en aceite de sésamo con 5% de etanol.

Se diseñaron los siguientes grupos experimentales utilizando ratas psp y OVX el D9:

Grupo pspO: ver etapa 1.

Grupo pspOE: ver etapa 1.

Grupo pspOP: ratas psp OVX el D9, tratadas con Pg.

Grupo pspOPE: ver etapa 1.

Grupo pspOETx: ratas psp OVX el D9, inyectadas con E₂ y tratadas con Tx.

Grupo pspOTx: ratas psp OVX el D9, inyectadas con vehículo de E_2 y tratadas con Tx.

Grupo pspOERu: ratas psp OVX el D9, tratadas con E_2 y RU-486.

Grupo pspOPERu: ratas psp OVX el D9, tratadas con Pg, E_2 y RU-486.

Todos los grupos mencionados fueron sacrificados a las 12.00 hs del D23 del comienzo de la psp.

Para conocer si el efecto del E_2 es mediado por la síntesis de proteínas, se utilizaron animales tratados con E_2 de acuerdo al protocolo usual, a los cuales se les inyectó el inhibidor de síntesis de ARNm Actinomicina-D (ACT-D, Cosmegen®, Sidus) en forma intraperitoneal (ip), utilizando una única dosis de 100 $\mu\text{g}/100\text{gr}$ de peso corporal, 30 minutos antes de la correspondiente inyección de E_2 en el D21. Un grupo de animales fue sacrificado a las 7 hs luego de la inyección del inhibidor mientras que otro grupo se sacrificó a las 31 hs. Para conocer el efecto de las dosis crecientes de E_2 sobre la infiltración de eosinófilos, se sacrificaron animales tratados con E_2 durante los D20, D21, D22 y D23.

ETAPA 4: Estudiar la existencia de infiltración leucocitaria y colagenólisis en el cuello uterino de ovejas intraparto.

La infiltración leucocitaria se estudió utilizando las tinciones de Sirius Alcalino y Giemsa prolongado. La colagenólisis se cuantificó utilizando el método de Picrosirius-Polarización. Debido a que se observó una distribución heterogénea de leucocitos, la cuantificación se llevó a cabo en las siguientes áreas:

1- Moco luminal

2- Estroma cervical: en este caso se procedió a dividir el estroma cervical en dos zonas a saber:

2.1) Zona mucosa subepitelial (Zona I): banda de tejido que va desde la lámina basal hasta una línea virtual ubicada a 1.600 μm de profundidad.

2.2) Zona submucosa (Zona II): banda continua a la anterior de 1.600 μm de espesor (Fig 10).

Se diseñaron los siguientes grupos experimentales:

Grupo P: ovejas preñadas cuyas muestras de cérvix fueron tomadas inmediatamente antes del nacimiento de la cría.

Grupo Control: ovejas no preñadas controles sacrificadas a los 150 días de comenzado el experimento cuyas muestras de cérvix fueron tomadas de la misma forma que los animales preñados.

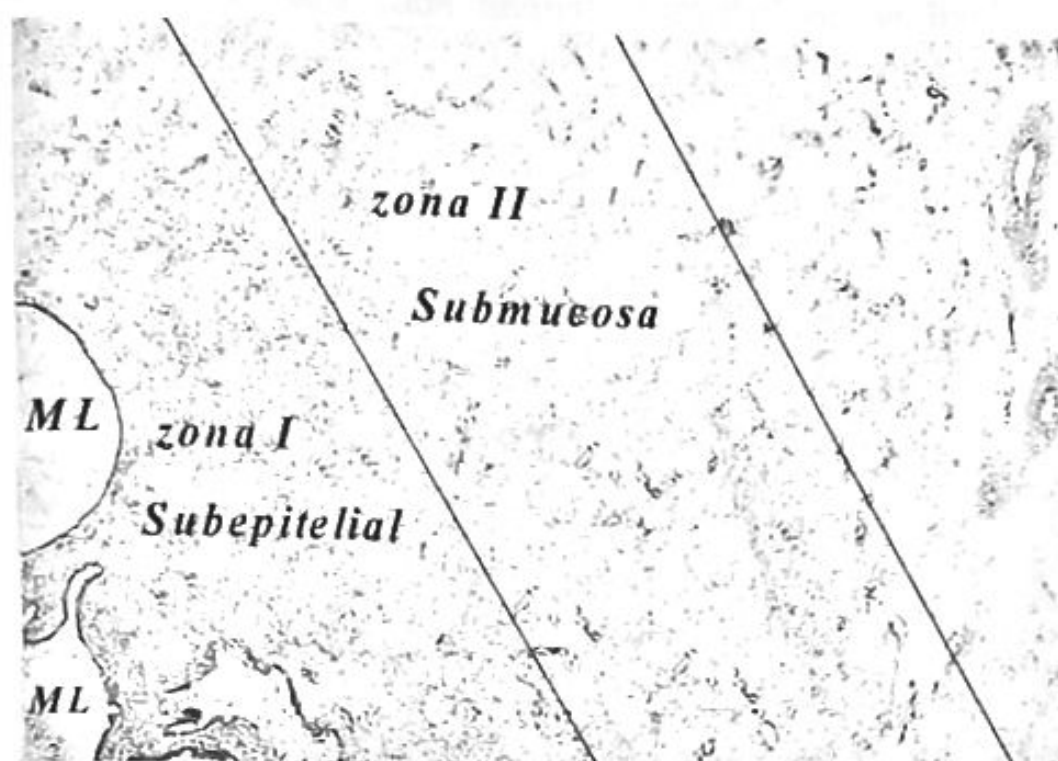


Figura 10: Fotomicrografía de cervix uterino de oveja extraído intraparto y cortado transversalmente. Se muestra el moco luminal (ML) y las diferentes zonas en las que se dividió el estroma. Hematoxilina-Eosina con magnificación 41x. Modificado de: Luque et al. (1997). *J. Vet. Med.* 44, 501-510.

11- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se calcularon los siguientes parámetros:

- a)- densidad de volumen por muestra.
- b)- promedio de las densidades de volumen por grupo.
- c)- promedio del % de área de birrefringencia por grupo.

Se usaron diferentes test estadísticos no-paramétricos, los que fueron seleccionados de acuerdo con las recomendaciones de Siegel (1956). En la

sección Resultados y para cada análisis estadísticos se hará mención al test utilizado.

IV. RESULTADOS

Tabla 1: Influencia de la Pq y el E₂ sobre la infiltración de eosinófilos y la histiocitosis del cérvix en ratas preñadas y psp.

De acuerdo a lo que se muestra en la Tabla 4 no se observaron diferencias significativas en los parámetros de viabilidad fetal evaluados, entre los grupos control y los tratados con terapia hormonal de reemplazo. Esto nos permite decir que dicho tratamiento no altera el desarrollo fetal ni produce disminución la viabilidad de las crías de esa manera y de acuerdo a numerosos trabajos (Lind et al. 1971, Cough & Sherwood, 1988, Burger & Sherwood, 1989) se puede indicar que los niveles plasmáticos de hormonas esteroides ovulatorias no de rangos fisiológicos.

Tabla 4: Valores obtenidos en los parámetros fetales para los distintos grupos experimentales.

	Grupo Ip	Grupo Ia	Grupo Shunt	Grupo OP	Grupo OPE
Nº de crías	9	9	9	9	9
Viabilidad (%)	90±1	92±2	90±2	89±1	90±3
Longitud (cm) (X ± SD)	9 ± 3	10 ± 2	9 ± 2	9 ± 2	8 ± 3
Peso al nacer (g) (X ± SD)	6.52 ± 1.02	6.35 ± 1.06	6.48 ± 0.95	6.42 ± 0.87	6.75 ± 1.14
Longitud de cuerpo (cm)	6.44 ± 0.10	6.47 ± 0.09	6.45 ± 0.12	6.49 ± 0.16	6.48 ± 0.12

IV. RESULTADOS

(IA) Los parámetros histológicos relacionados con el desarrollo del feto

ETAPA 1: Influencia de la Pg y el E₂ sobre la infiltración de eosinófilos y la colagenólisis del cérvix en ratas preñadas y psp.

De acuerdo a lo que se muestra en la Tabla 4 no se observaron diferencias significativas en los parámetros de viabilidad fetal evaluados, entre los grupos controles y los tratados con terapia hormonal de reemplazo. Esto nos permite inferir que dicho tratamiento no alteró el desarrollo fetal ni produjo disminución en la viabilidad de las crías, de esta manera y de acuerdo a numerosos trabajos (Catalá & Deis, 1973; Cheah & Sherwood, 1988; Burger & Sherwood, 1995) se puede inducir que los niveles plasmáticos de hormonas esteroideas estuvieron dentro de rangos fisiológicos.

Tabla 4: Valores obtenidos en los parámetros fetales para los distintos grupos experimentales

	Grupo Ip	Grupo In	Grupo Sham1	Grupo OP	Grupo OPE
Nº de madres	6	7	5	6	5
Crías vivas/sitios de implantación (%)	90±1	92 ± 2	90 ± 2	89 ± 1	87 ± 3
Nº de crías (X ± SD)	9 ± 3	10 ± 2	8 ± 2	9 ± 2	8 ± 3
Peso de crías al parto o al sacrificio (g)	6,52 ± 1,02	6,59 ± 1,08	6,48 ± 0,98	6,42 ± 0,88	6,55 ± 1,14
Tasa de crecimiento en 48 hs (g)	0,44 ± 0,10	0,47 ± 0,09	0,45 ± 0,18	0,49 ± 0,16	0,48 ± 0,12

* No disponible.

Los animales sacrificados intraparto (Grupo Ip) fueron los que presentaron los niveles más altos de infiltración de eosinófilos en el estroma del cérvix uterino (Fig. 11A). Los animales intactos sacrificados inmediatamente antes del parto

(Grupo In) mostraron niveles más bajos de infiltración aunque no se lograron diferencias. Sin embargo, cuando observamos los resultados obtenidos en los animales preñados tratados con esteroides ováricos (Grupo OP y OPE) los valores de eosinófilos en el cérvix caen muy significativamente al punto de no distinguirse de los valores de los animales OVX crónicos (Grupo O) (Fig. 11A). Si en cambio analizamos los resultados referentes a los niveles de colágeno organizado en el estroma cervical, se observa que los animales que presentaron altos niveles de infiltración de eosinófilos mostraron muy bajas áreas de birrefringencia (la birrefringencia está inversamente relacionada con el porcentaje de colagenólisis que ocurre en el órgano) (Fig. 11B). Por otra parte, los grupos que no presentaron infiltración de eosinófilos tuvieron muy altos niveles de birrefringencia (Figura 11B), lo que implica que el colágeno cervical no mostró significativos signos de degradación en estos grupos.

Debido a que no se pudo diseñar un grupo de animales preñados OVX y tratados sólo con E_2 dado que la preñez es inviable en ausencia de Pg, se utilizó un modelo de rata psp OVX el D9 de iniciada la psp y tratada con E_2 y/o Pg con las mismas dosis que se utilizaron en el protocolo anterior de rata castrada durante la gestación. Aquí los resultados mostraron interesantes diferencias (Fig. 12A): los animales que recibieron E_2 (Grupo pspOE) presentaron muy altos niveles de infiltración, mientras que los animales tratados con $E_2 + Pg$ (Grupo psp OPE)

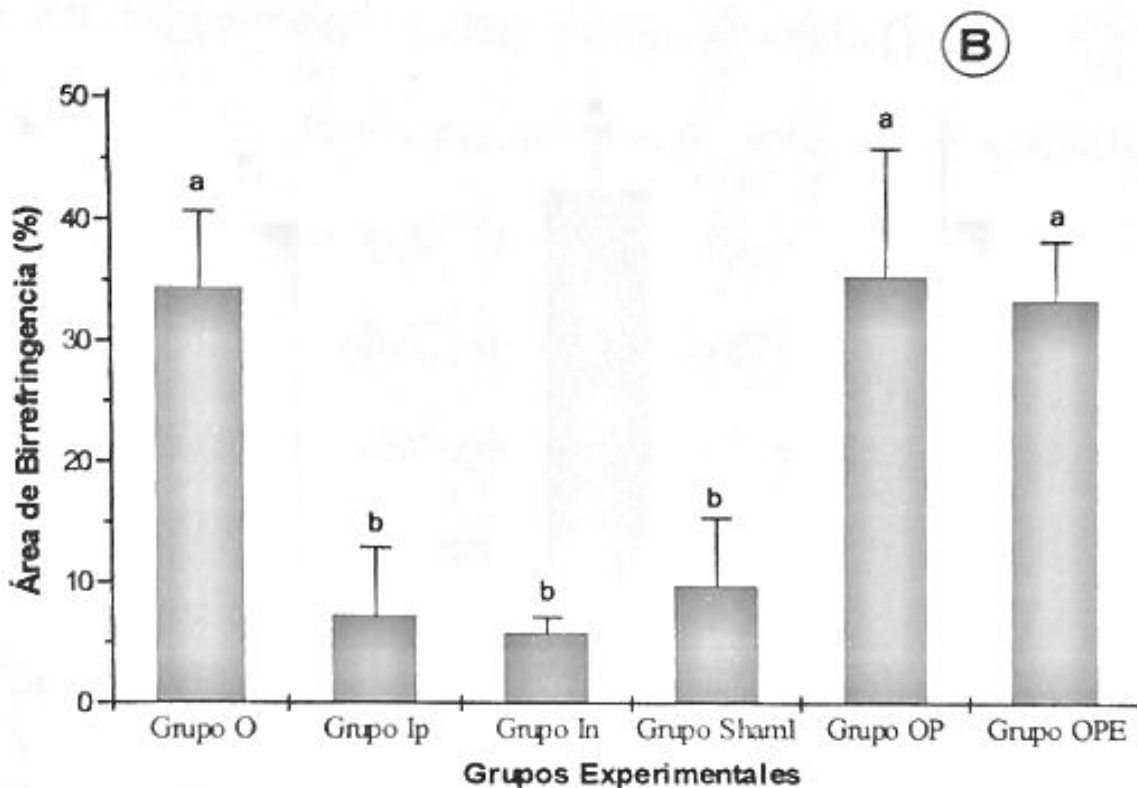
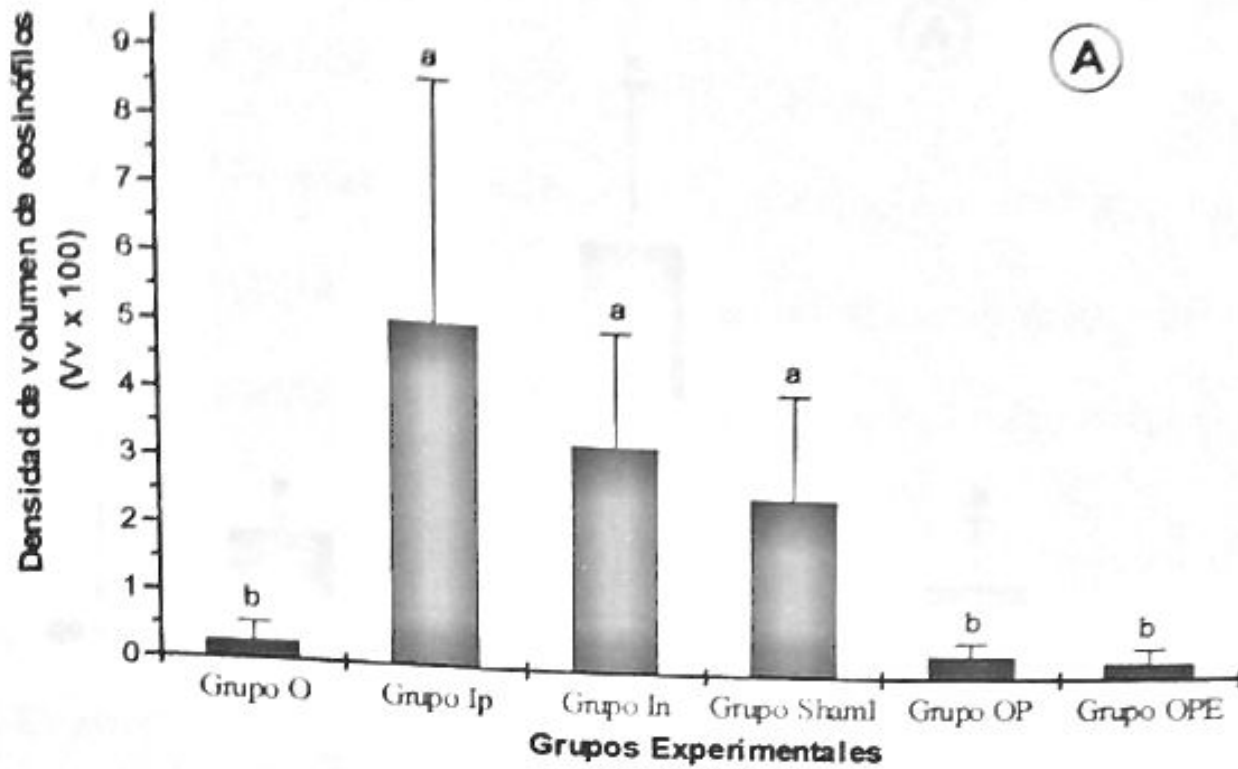


Figura 11: Densidad media de volumen de eosinófilos (A) y áreas de birrefringencia (B) en estroma de cérvix uterino de ratas preñadas y no preñadas. A) Se observa gran infiltración en los controles (Grupos Ip, In y Sham1) vs los valores de animales OVX tratados con Pg (Grupo OP) o Pg+E₂ (Grupo OPE) cuya infiltración fue comparable a la de los castrados crónicos (Grupo O). B) Obsérvese que los animales controles (Grupos Ip, In y Sham1) presentaron una extensa degradación del colágeno mientras que en los OVX tratados con Pg (Grupo OP) o Pg+E₂ (Grupo OPE) dicha macromolécula permaneció intacta, con valores de birrefringencia elevados bajo la luz polarizada. Las diferentes letras en minúsculas arriba de las barras indican diferencias significativas ($p < 0,01$).

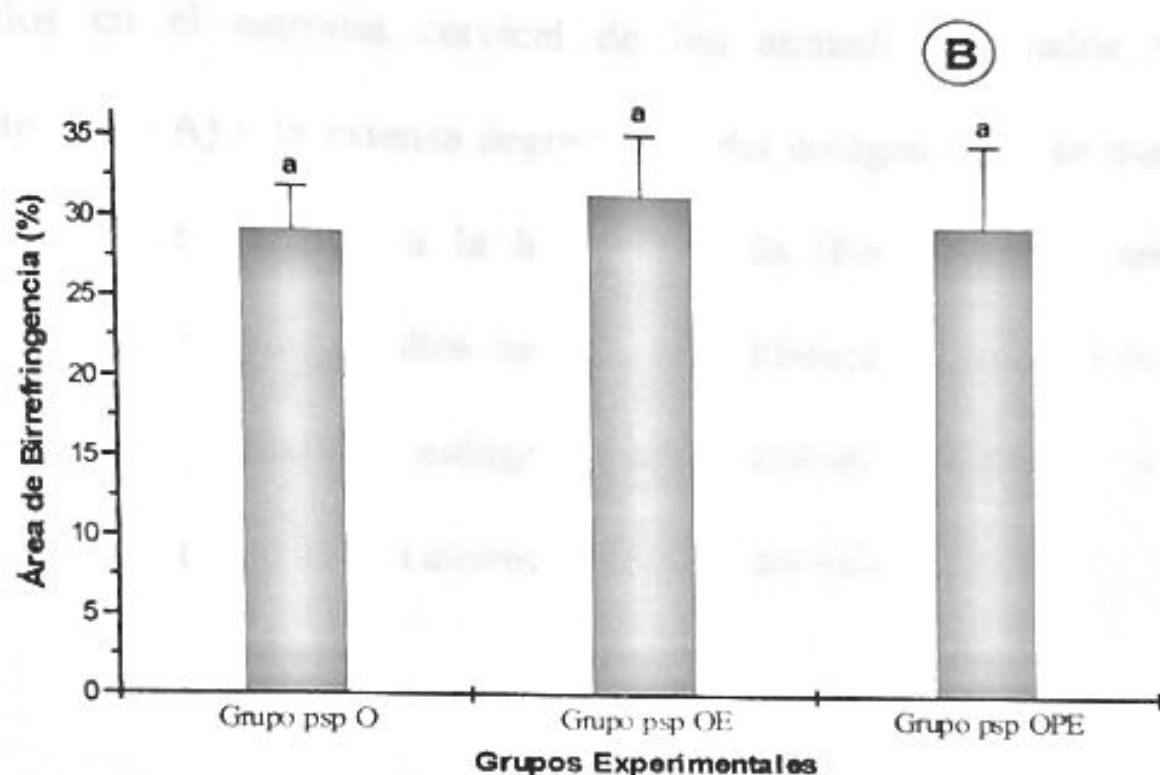
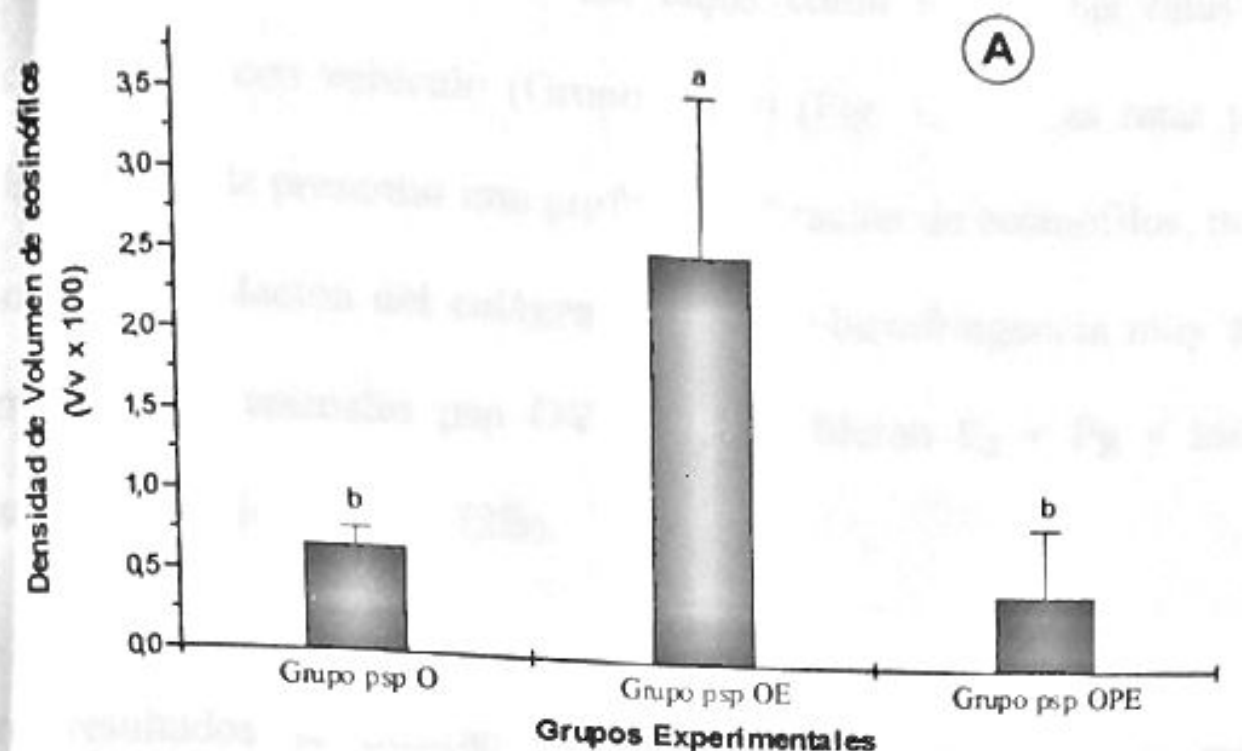


Figura 12: Densidad de volumen media de eosinófilos (A) y áreas de birrefringencia (B) en estroma de cérvix uterino de ratas psp tratadas con Eg. A) Nótese la alta infiltración de eosinófilos presente en el grupo tratado con E_2 (Grupo psp OE) mientras que los inyectados con Pg+ E_2 (Grupo psp OPE) y con vehículo (Grupo psp O) no presentan infiltración. B) Por otra parte no se observaron diferencias en la organización del colágeno, verificándose en todos los grupos de animales psp altos niveles de birrefringencia. Las diferentes letras en minúsculas arriba de las barras indican diferencias significativas ($p < 0,01$).

tuvieron niveles de infiltración tan bajos como los de las ratas psp OVX inyectadas sólo con vehículo (Grupo pspO) (Fig. 12A). Las ratas psp tratadas con E_2 , a pesar de presentar una profusa infiltración de eosinófilos, no mostraron signos de degradación del colágeno (áreas de birrefringencia muy elevadas) lo mismo que los animales psp OVX que recibieron $E_2 + Pg$ y los psp OVX tratados con vehículo (Fig. 12B).

Estos resultados se ilustran en la Figura 13. Obsérvese la presencia de eosinófilos en el estroma cervical de los animales preñados sacrificados intraparto (Foto A) y la extensa degradación del colágeno que se manifiesta por una escasa birrefringencia a la luz polarizada (Foto B). Los animales psp tratados con E_2 presentan altos niveles de infiltración (Foto E) pero a la luz polarizada las fibras de colágeno se muestran ordenadas y altamente birrefringentes, lo que indica ausencia de colagenólisis (Foto F).

ETAPA 2: Influencia de la Rlx sobre la infiltración de eosinófilos y la colagenólisis del cérvix en ratas preñadas.

En forma coincidente con los resultados de la primera etapa, todos aquellos animales preñados OVX el D22 y que su tratamiento incluyó al E_2 presentaron niveles altos de infiltración comparables con los controles de operación simulada (Grupo Sham2). En la Figura 14A se pueden apreciar las altas

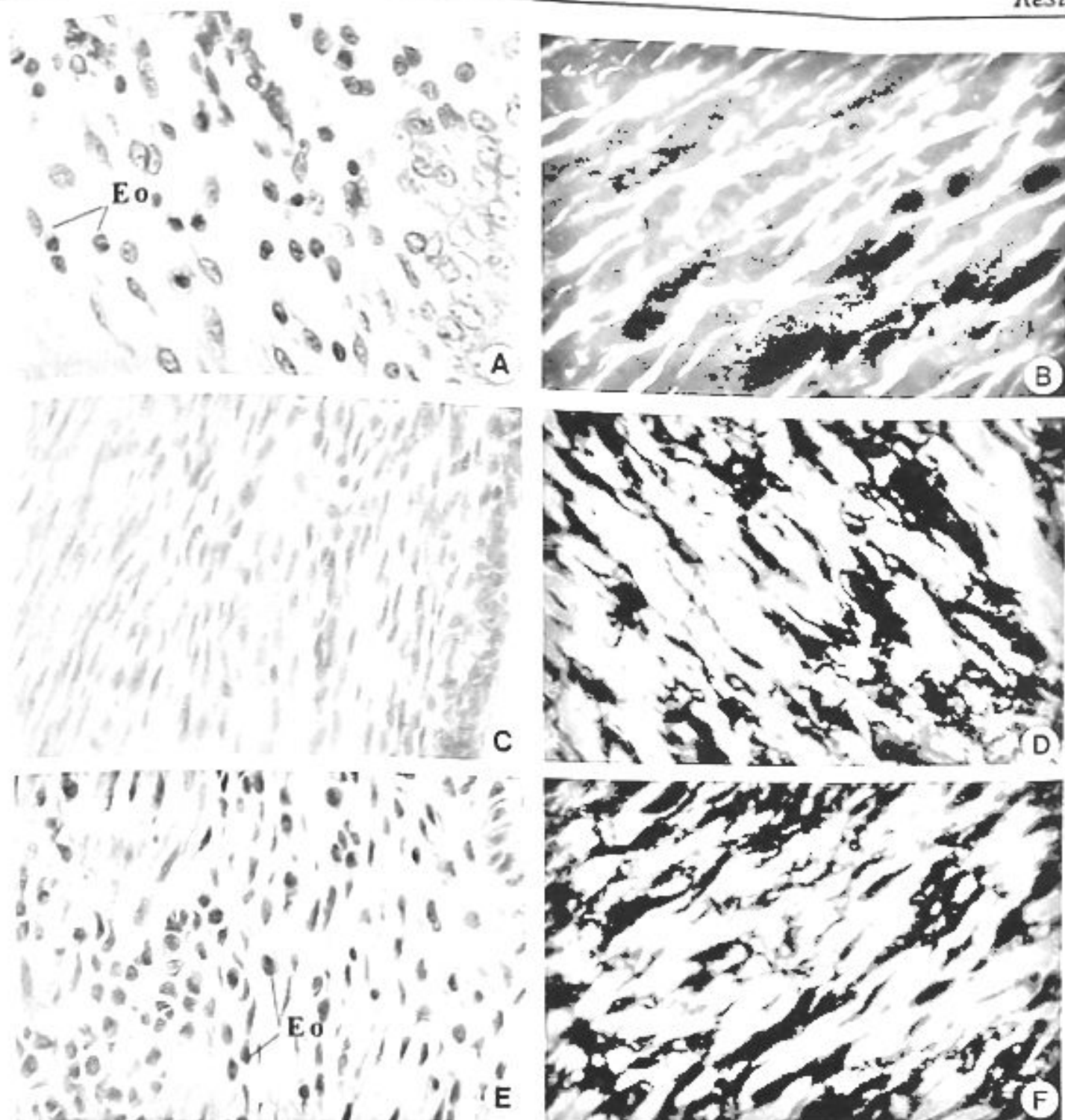


Figura 13: Fotomicrografías de secciones de cérvices uterinos en diferentes condiciones experimentales. A la izquierda las secciones fueron teñidas con sirius alcalino para la detección de eosinófilos (Eo) y a la derecha, secciones teñidas con picosirius-polarización. El cérvix de una rata intraparto (Grupo IP) muestra una importante infiltración de eosinófilos (A), que se corresponde con una imagen de degradación del colágeno (B) verificada por baja birrefringencia. En ratas no preñadas OVX (Grupo O), no se observan eosinófilos en el estroma cervical (C) y el picosirius muestra una alta birrefringencia (D) debida al ordenamiento de gruesas fibras de colágeno. Los cérvices de ratas psp OVX tratadas con E_2 (Grupo pspOE) muestran gran infiltración (E) pero acompañada por alta birrefringencia del colágeno, al igual que los animales OVX no preñados (F), lo que evidencia ausencia de colagenólisis. Magnificación 500x (izquierda) y 870x (derecha). Modificado de Luque et al. (1996). *Biol. Reprod.* 55, 1206-1212.

densidades de volumen que se verificaron en los grupos tratados con E_2 y $E_2 + Rlx$ no presentando diferencias estadísticamente significativas con respecto a los controles sham OVX. Cuando los animales fueron tratados con Rlx , en ausencia de E_2 , los niveles de infiltración fueron significativamente más bajos, no haciéndose distinguibles de los OVX e inyectados con vehículo (Fig. 14A). Dado que no se observaron diferencias en la infiltración de eosinófilos entre las ratas tratadas con E_2 (Grupo OE) y aquellas tratadas con $E_2 + Rlx$ (Grupo OER), esto nos permitiría concluir que la Rlx suministrada 48 hs antes del parto no produce modificaciones en los niveles de eosinofilia cervical.

Consistentemente con los resultados encontrados en la etapa 1, los animales preñados intactos presentaron áreas de baja birrefringencia en el estroma cervical (Grupo Sham2) correlacionadas con una extensa reducción en la densidad y orientación de las fibras de colágeno (Fig. 14B). Cuando las ratas OVX a las 6:00 hs del D22 (Grupo C) no recibieron ningún tipo de terapia hormonal de reemplazo, los niveles de birrefringencia fueron elevados, indicando que la matriz de colágeno permanecía inalterada. Los animales OVX tratados sólo con E_2 (Grupo OE) no presentaron diferencias significativas con respecto a los castrados sin tratamiento hormonal, no encontrándose signos de degradación del colágeno. Sin embargo, los grupos inyectados sólo con Rlx (Grupo OR) o los tratados con $E_2 + Rlx$ (Grupo OER) mostraron un estroma cervical con fibras de colágeno desorganizadas, orientadas al azar, evidenciadas

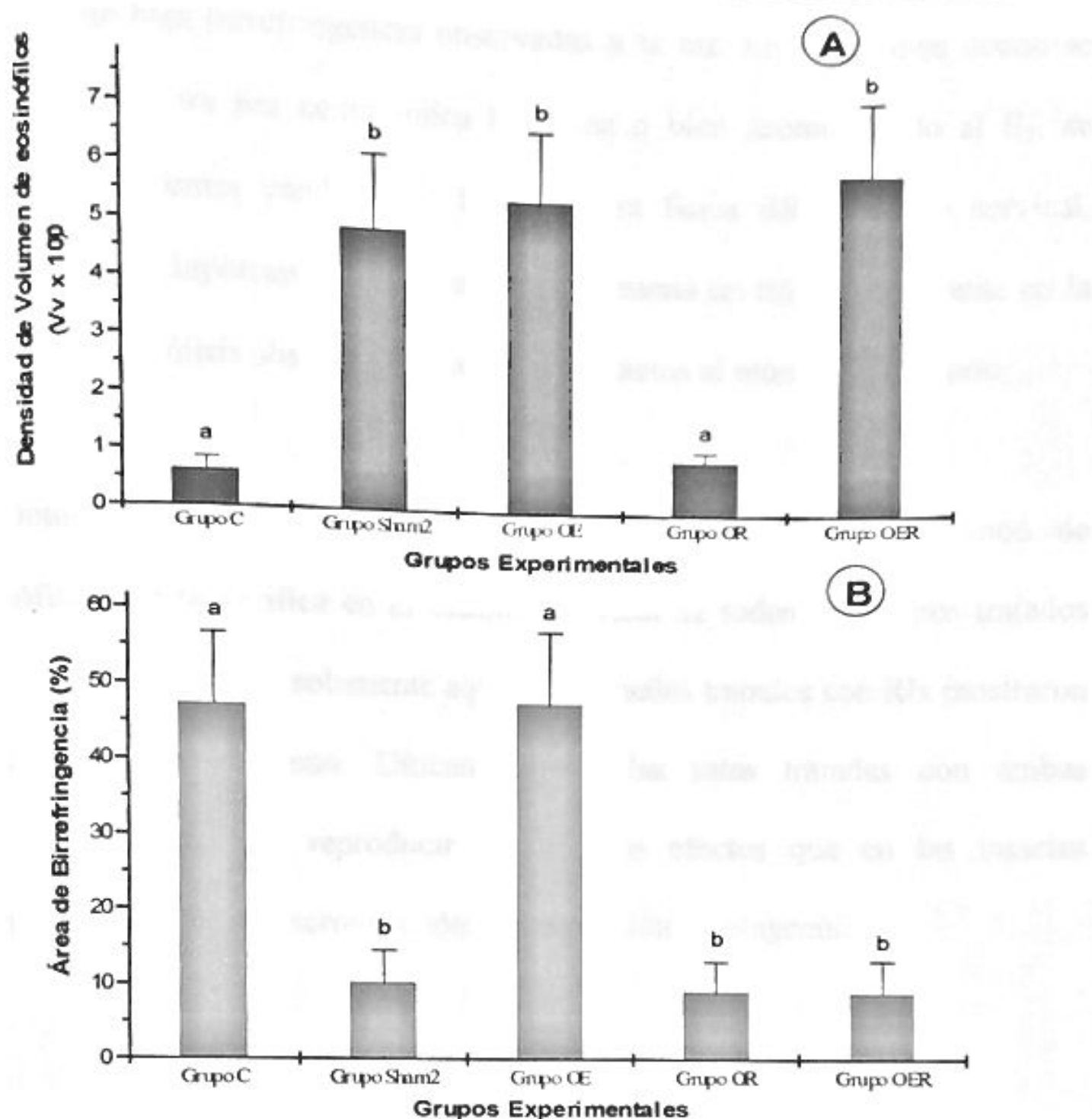


Figura 14: Densidad media de volumen de eosinófilos (A) y área de birrefringencia (B) en el estroma del cérvix uterino de ratas preñadas OVX en D22 tratadas con E_2 y Rlx. A) Los animales tratados con E_2 (Grupo OE) y con E_2 +Rlx (Grupo OER) mostraron niveles de infiltración similares a los controles intactos (Grupo Sham2). Mientras que los tratados sólo con Rlx (Grupo OR) presentaron muy bajos conteos de eosinófilos en el estroma cervical, al igual que los animales OVX no tratados (Grupo C). B) Los cérvices de animales intactos presentaron baja birrefringencia a la luz polarizada indicando la presencia de colágeno desorganizado con fibras orientadas al azar (Grupo Sham2). El mismo resultado se obtuvo en los grupos tratados con Rlx (Grupos OR y OER), no habiéndose registrado diferencias estadísticamente significativas entre estos grupos. Los animales tratados sólo con E_2 (Grupo OE) presentaron alta birrefringencia al igual que el grupo OVX inyectado con vehículo (Grupo C). Las distintas letras en minúscula arriba de las barras indican diferencias significativas ($p < 0,01$).

por áreas de baja birrefringencia observadas a la luz. En los grupos donde se suministró Rlx, ya sea como única hormona o bien acompañando al E₂, se apreciaron evidentes cambios en la estructura física del colágeno cervical, fortaleciendo la hipótesis que asigna a esta hormona un rol preponderante en la extensa colagenólisis observada en animales intactos al momento del parto.

Las fotomicrografías de la Figura 15 muestran la profusa infiltración de eosinófilos que se verifica en el estroma cervical de todos los grupos tratados con E₂, por el contrario, solamente aquellos animales tratados con Rlx mostraron degradación del colágeno. Unicamente en las ratas tratadas con ambas hormonas, se lograron reproducir los mismos efectos que en las intactas intraparto, es decir, la sincronización de infiltración y colagenólisis.

ETAPA 3: Mecanismo de acción de los esteroides ováricos sobre la regulación de la infiltración de eosinófilos en el cérvix de la rata.

Con el fin de determinar la dosis de Tx necesaria para producir un marcado efecto antiestrogénico, se evaluó su capacidad inhibitoria sobre la acción trófica del E₂ en los cuernos uterinos de animales controles. En la Tabla 5 se exponen los valores encontrados de peso húmedo, peso seco y % de agua en cuernos uterinos de animales psp OVX tratados con E₂ y/o Tx en las dosis explicitadas en Materiales y Métodos. Se observa que los animales tratados sólo con E₂

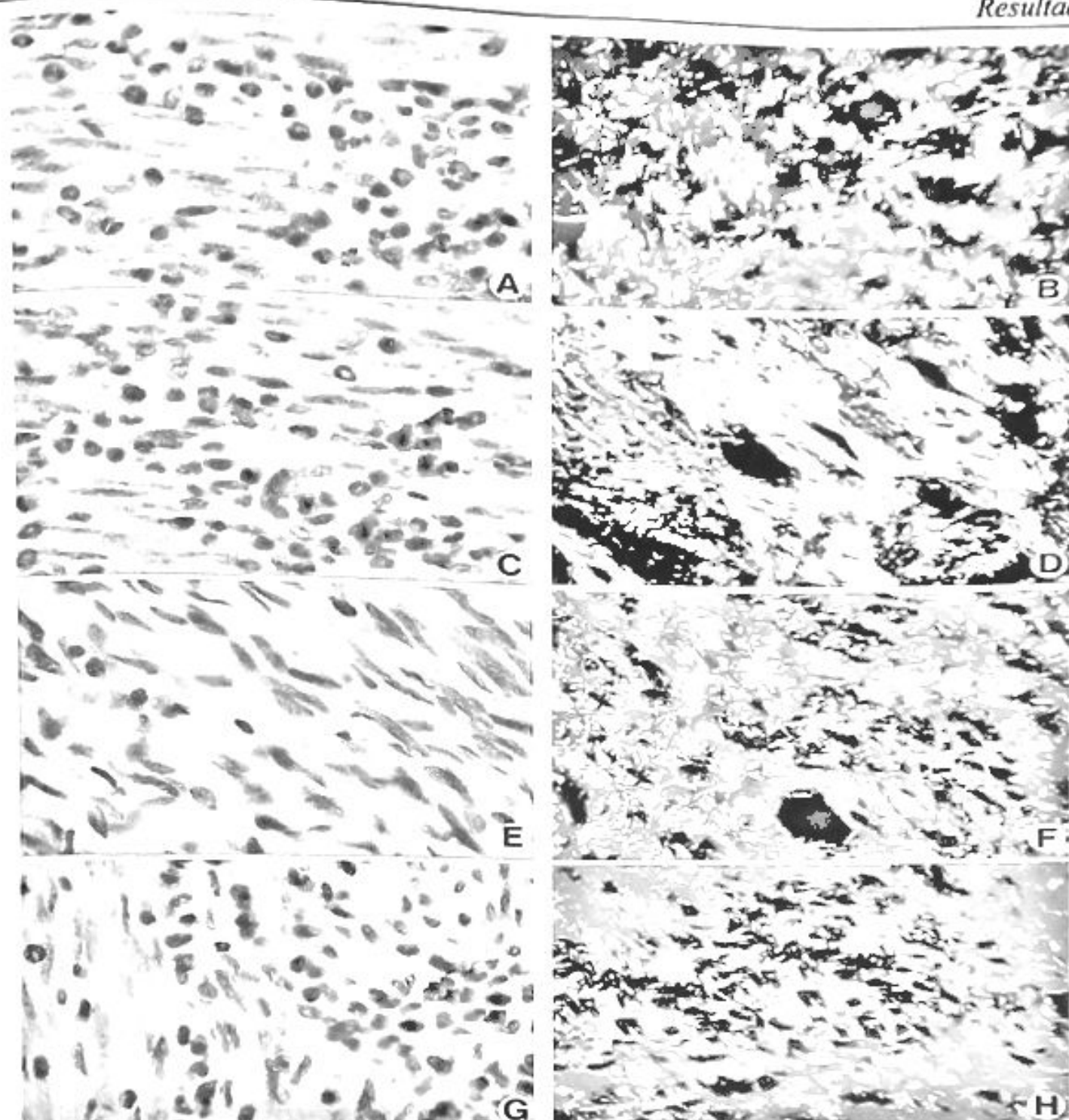


Figura 15: Fotomicrografías de secciones de cérvices uterinos de ratas en diferentes condiciones experimentales. El estroma cervical de las ratas preñadas intactas (Grupo In) muestra una masiva infiltración de eosinófilos (A) y un bajo nivel de organización del colágeno (B). En ratas OVX tratadas con E_2 (Grupo OE) se observa una extensa infiltración (C), sin embargo el colágeno se muestra sin signos de degradación (D). Al contrario, los animales OVX tratados con Rlx (Grupo OR) muestra una baja infiltración de eosinófilos (E) pero una extensa degradación del colágeno (F). En los animales OVX tratados con E_2 y Rlx (Grupo OER) la infiltración de eosinófilos y la degradación del colágenos son similares a los animales preñados intactos (G y H). Magnificación 800x a la izquierda y 450x a la derecha. Modificado de Luque et al. (1998). *Biol. Reprod.* 59, 795-800.

fueron los que presentaron mayores efectos tróficos, demostrado por los altos valores de peso húmedo, peso seco y contenido de agua de sus cuernos uterinos (acciones mejor caracterizadas del efecto estrogénico sobre éste órgano). Las ratas tratadas con $E_2 + Tx$ tuvieron pesos de sus cuernos uterinos significativamente más bajos, tanto húmedos como secos, así como un bajo porcentaje de contenido de agua. Por otra parte es un hecho conocido que el Tx, en determinadas circunstancias, presenta actividad estrogénica; sin embargo, los animales que recibieron sólo Tx no mostraron ese efecto agonista con relación a los parámetros estudiados. Estos resultados nos permitieron concluir que las dosis de Tx elegidas y el momento de su administración fueron efectivas para producir inhibición de actividad estrogénica en el útero.

Tabla 5: Acción del E_2 y el Tx sobre el peso húmedo, seco y contenido de agua en cuernos uterinos de la rata.

Grupo*	Peso Húmedo	Peso Seco	% de Agua
psp O	25,32 mg (a)**	24,95 mg (d)	1,46 % (g)
psp OE	117,01 mg (b)	86,00 mg (e)	26,50 % (h)
psp OETx	76,67 mg (c)	69,33 mg (f)	9,57 % (i)
psp OTx	70,50 mg (c)	65,21 mg (f)	7,50 % (i)

*Todos los animales fueron psp, OVX el D9 y sacrificados el D23 (ver Materiales y Métodos)

**Las distintas letras representan grupos con diferencias significativas.

Los animales tratados con E_2 y sacrificados el D23 luego del inicio de la psp fueron los que presentaron los más altos niveles de infiltración de eosinófilos en el cérvix. En la Figura 16 se observa que los animales tratados con E_2+Tx

(Grupo pspOETx) presentaron bajos valores de infiltración de eosinófilos no distinguiéndose de los tratados sólo con Tx (Grupo pspOTx). Sin embargo, todos los grupos anteriores tuvieron recuentos de eosinófilos cervicales superiores al grupo control inyectado con vehículo (Grupo pspO).

Estos resultados muestran que el Tx bloqueó la estimulación del E_2 sobre la infiltración eosinofílica, permitiendo sugerir que sería un mecanismo mediado por el receptor de E_2 . Sin embargo, los niveles de infiltración alcanzados por los animales tratados sólo con Tx, fueron significativamente superiores a los animales psp OVX controles, lo que se interpreta como una actividad agonista estrogénica que presenta el Tx en esta circunstancia. A pesar de esto, los valores alcanzados fueron muy bajos comparados con los obtenidos en animales tratados con E_2 y no fueron diferentes a los tratados con E_2 +Tx (Figura 16). Por lo tanto, la infiltración eosinofílica sería un fenómeno regulado fundamentalmente por los niveles de E_2 e implicaría, necesariamente, una interacción inicial con el receptor de E_2 .

Al final de la etapa 1 habíamos postulado que, si bien los E_2 son capaces de promover la infiltración eosinofílica en el cérvix, la Pg tendría una acción contraria inhibiendo este efecto. Para poder investigar este fenómeno, se trataron ratas psp OVX el D9 de iniciada la psp con E_2 y Pg reteniendo los implantes de

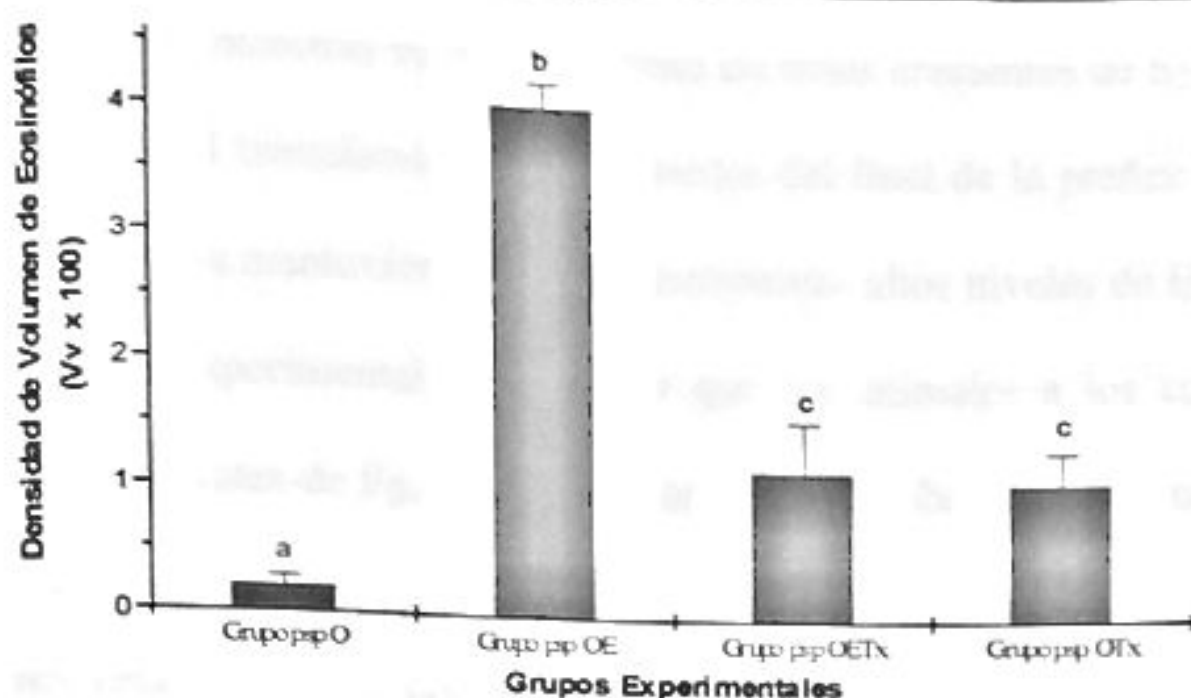


Figura 16: Efecto del Tx y de los Eg sobre la infiltración de eosinófilos en el cérvix uterino de ratas psp y castradas el D9. Las ratas tratadas con E_2 y sacrificadas el D23 (Grupo pspOE) presentaron los valores más altos de eosinofilia cervical. Cuando además de los E_2 se administra Tx durante los D21, D22 y D23 (Grupo pspOETx) la infiltración de eosinófilos desciende significativamente y no presenta diferencias con el grupo que recibió solamente Tx (Grupo pspOTx).

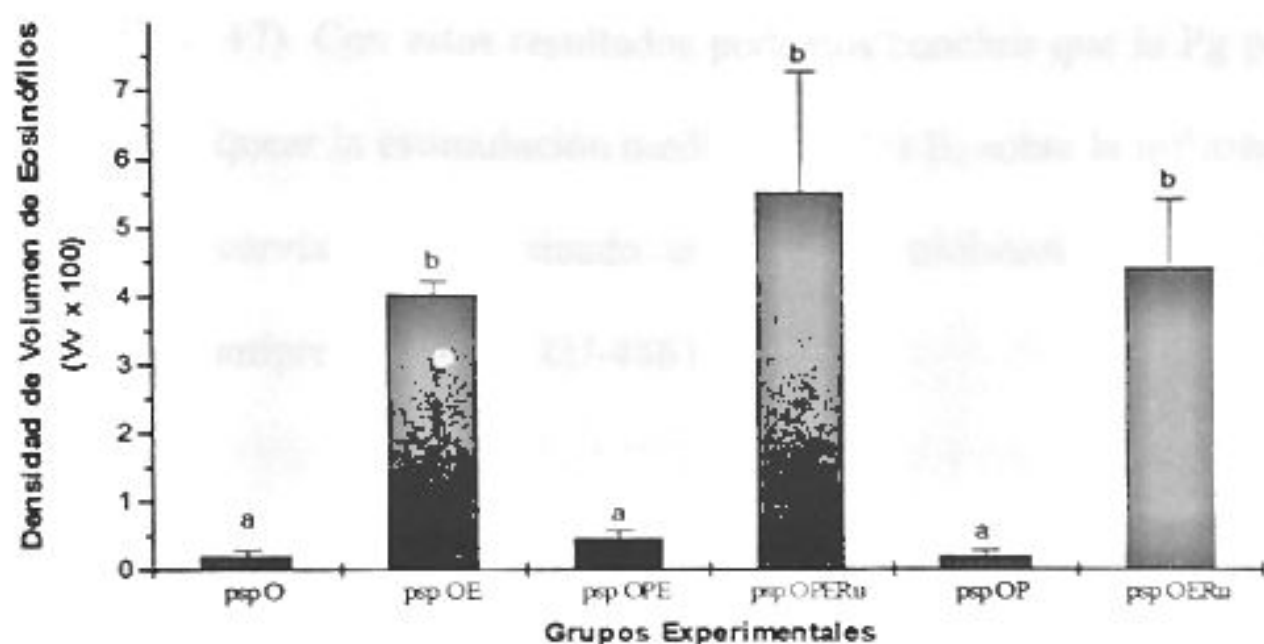


Figura 17: Efecto inhibitorio de la Pg sobre la infiltración de eosinófilos al cérvix uterino en ratas psp OVX el D9. Bajos valores de infiltración se observan en el cérvix de animales tratados con E_2 +Pg en comparación con los tratados solo con Eg. El efecto inhibitorio de la Pg sobre la infiltración se revierte cuando se inyecta RU-486 (Grupo psp OPERu). La administración de RU-486 no produce interferencia con la acción estimulante de los E_2 (Grupo pspOERu). Las distintas letras en minúscula arriba de las barras indican diferencias significativas ($p < 0,01$).

Pg en el animal, mientras se suministraban las dosis crecientes de E_2 durante los D21, D22 y D23 (simulando los incrementos del final de la preñez y el parto), de esta manera se mantuvieron -simultáneamente- altos niveles de E_2 y Pg. Con este esquema experimental se encontró que los animales a los cuales se les retuvo los implantes de Pg, mientras se les suministraba E_2 , presentaron niveles de infiltración muy bajos similares a los inyectados con vehículo (Grupo pspOPE) (Fig. 17). Esta inhibición fue completamente abolida cuando a los animales tratados con E_2 +Pg se les suministró el antiprogestágeno RU-486 (Grupo pspOPERu), apareciendo niveles de eosinofilia cervical tan elevados como los correspondientes a animales tratados sólo con E_2 (Grupo pspOE). Por otra parte las ratas que recibieron solamente Pg no presentaron infiltración de eosinófilos (Fig. 17). Con estos resultados podemos concluir que la Pg posee la capacidad de bloquear la estimulación mediada por los E_2 sobre la infiltración de eosinófilos del cérvix uterino, siendo este efecto inhibitorio completamente revertido por el antiprogestágeno RU-486 (Fig. 17).

Para conocer la cinética de infiltración de eosinófilos en respuesta a las crecientes dosis de E_2 se usaron ratas psp OVX tratadas con E_2 y sacrificadas los D20, D21, D22 y D23. Todos estos grupos de animales que recibieron E_2 presentaron diferencias significativas con respecto a los controles castrados crónicos. En la Figura 18 se observa el aumento gradual de eosinófilos

infiltrantes a medida que se incrementan las dosis de E_2 , siendo los resultados estadísticamente diferentes entre cada uno de los grupos.

Al comprobar la asociación entre el E_2 y la infiltración de eosinófilos al cérvix, nos propusimos como nueva hipótesis estudiar si este efecto promotor observado en los animales tratados con E_2 estaría mediado por la síntesis proteica. Para ello incluimos en nuestro protocolo experimental el tratamiento con un inhibidor de la síntesis de ARNm: la ACT-D. Se diseñaron grupos de animales tratados con E_2 +ACT-D sacrificados los D21 y D22, inyectando el inhibidor el D21 de iniciada la psp, 30 minutos antes de la dosis correspondiente de E_2 . Con este esquema experimental se encontró que la ACT-D inhibía la infiltración de eosinófilos inducida por E_2 en los animales sacrificados los D21 y D22 de iniciada la psp (Fig. 18). Dichos valores de densidad de volumen de eosinófilos fueron estadísticamente diferentes a los de los correspondientes grupos de animales tratados sólo con E_2 (Fig. 18). Estos resultados nos permiten sugerir que el E_2 , además de la necesaria interacción inicial con su receptor específico, necesitaría del mecanismo de síntesis proteica para promover la infiltración de eosinófilos en el cérvix uterino.

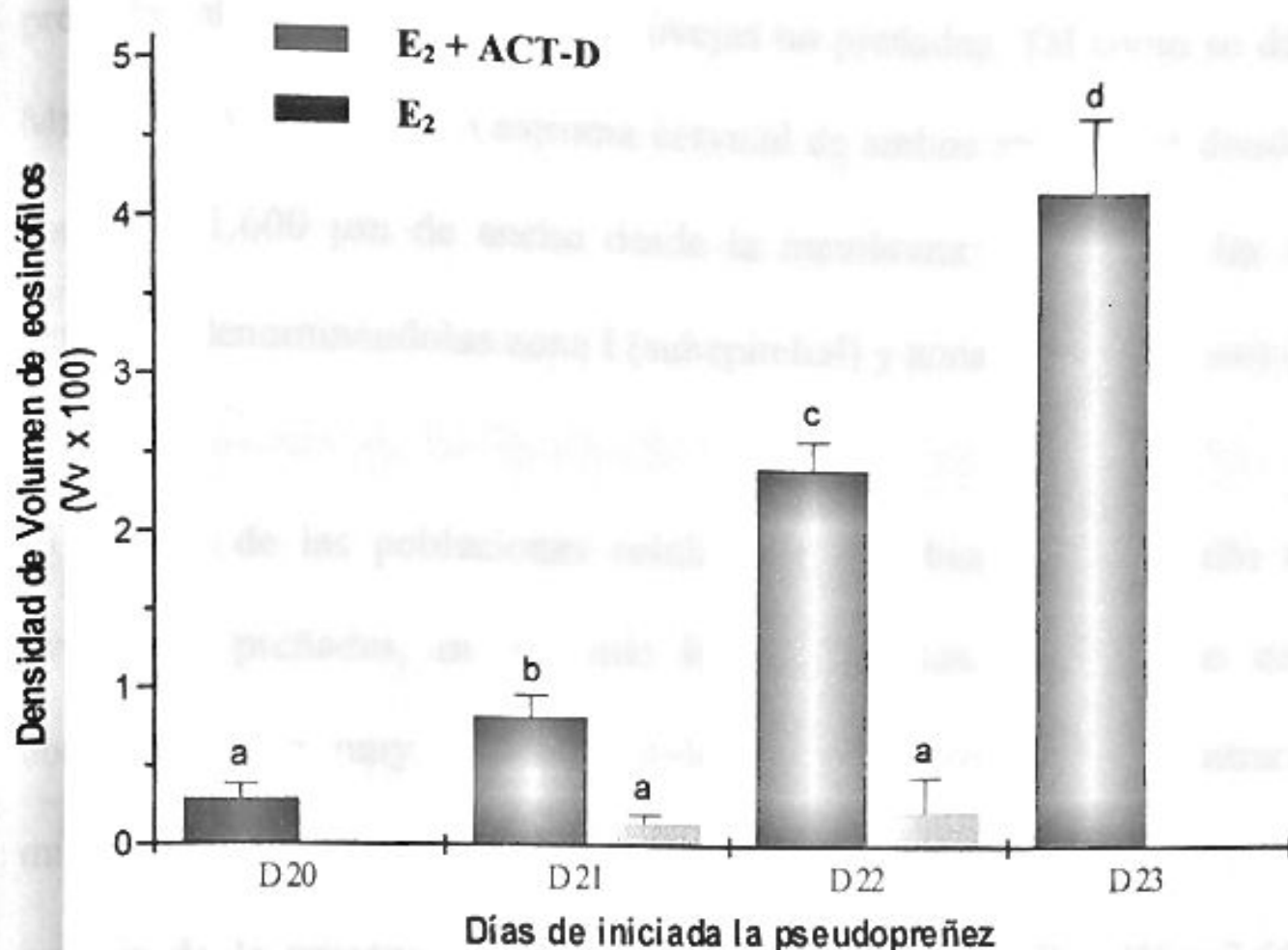


Figura 18: Cinética de infiltración de eosinófilos en el cérvix uterino de ratas psp OVX tratadas con ACT-D y con dosis crecientes de E_2 . Hay un significativo incremento de la infiltración de eosinófilos en paralelo con el incremento de la dosis de E_2 . La administración de ACT-D inhibe el efecto estimulador del E_2 , observándose valores de eosinófilos semejantes a los de los animales que recibieron la dosis mínimas de E_2 (D20). Las diferentes letras sobre cada barra indican diferencias significativas ($p < 0,01$).

Etapas 4: Correlación entre la infiltración de leucocitos y la colagenólisis en el estroma cervical de la oveja durante el parto.

Se evaluaron las diferencias morfológicas del estroma cervical entre ovejas preñadas al momento del parto y ovejas no preñadas. Tal como se describió en Materiales y Métodos, el estroma cervical de ambos grupos fue dividido en dos zonas de 1.600 μm de ancho desde la membrana basal hacia las capas más externas, denominándolas zona I (subepitelial) y zona II (submucosa) (Fig. 10).

El estudio de las poblaciones celulares en las biopsias de cuello uterino de ovejas no preñadas, mostró que los fibroblastos eran el tipo celular más abundante, con muy bajo contenido de leucocitos. Por el contrario, en las muestras intraparto la población leucocitaria fue mayor, con un incremento notorio de la presencia de polimorfonucleares neutrófilos ($V_v: 3,55 \pm 0,83$), acompañados por algunos eosinófilos ($V_v: 0,01 \pm 0,01$) y células mononucleares ($V_v: 0,28 \pm 0,08$) (Fig. 20). La densidad de volumen de leucocitos en la zona subepitelial (zona I) de las biopsias intraparto fue significativamente mayor que en las muestras del grupo control (Grupo P: $3,76 \pm 0,56$, Grupo Control: $0,04 \pm 0,07$; $p < 0,01$). En lo que respecta a la zona submucosa (zona II) también se observó una mayor infiltración de leucocitos en animales preñados con relación a la misma zona del control. Cuando se analizaron ambas zonas pero dentro del mismo grupo, se obtuvieron diferencias significativas entre la zona I y la zona II de los animales intraparto (zona I: $3,76 \pm 0,56$, zona II: $0,39 \pm 0,22$; $p < 0,01$). Sin

embargo, la mayor cantidad de leucocitos se encontró en el moco cervical ($6,72 \pm 0,75$). En el grupo control, por el contrario, no se encontraron diferencias significativas entre las zonas (Fig. 19A).

Se utilizó la técnica de Picrosirius-Polarización, la que permite poner de manifiesto la estructura física del colágeno cervical y sus modificaciones bajo diferentes condiciones experimentales. Los resultados mostraron que los cérvices de ovejas no preñadas están compuestas por tejido conectivo denso que, en su mayor parte, lo constituyen gruesas fibras de colágeno. Estas fibras, a la luz polarizada, presentan gran birrefringencia y se destacan por sus intensos colores rojo y amarillo. Estos indicios nos indicaron que estábamos en presencia de fibras de colágeno tipo I, densamente empaquetadas y que mantenían altos niveles de ordenamiento. Por el contrario, el cérvix de animales preñados intraparto presenta fibras de colágeno finas y dispersas cuya densidad fue mucho menor a las muestras de animales no preñados (Fig. 21). La baja birrefringencia que presentaron a la luz polarizada indicaba un extenso proceso de degradación del colágeno, con estructuras fibrilares laxas, poco brillantes, no encontrándose diferencias significativas entre las porciones uterina, media y vaginal de los cérvices estudiados.

Las muestras de los animales controles no preñados mostraron altos niveles de birrefringencia no verificándose diferencias entre las diversas zonas (zona I:

66,32 $\pm$ 18,48, zona II: 54,61 $\pm$ 19,85). Con relación a las muestras de ovejas intraparto los valores de transmitancia fueron bajos en ambas zonas (zona I: 29,92 $\pm$ 12,52; zona II: 19,43 $\pm$ 12,85; $p < 0,01$). Sin embargo, es importante destacar que cuando se compararon los valores de birrefringencia entre los animales preñados vs no preñados las diferencias fueron altamente significativas (Fig. 19B). Por microscopía electrónica de transmisión se corroboraron las dramáticas diferencias entre las biopsias de ambos grupos estudiados. Las fibras de colágeno de los animales intraparto se observaron fragmentadas longitudinalmente, con contornos irregulares y desiguales, perdiendo gran parte de su estructura organizativa. También se confirmó la presencia de los neutrófilos como la principal célula infiltrante en la oveja intraparto (Fig. 22).

Tomando en conjunto estos resultados se observa que en los animales intraparto aparece una estrecha correlación entre los altos valores de infiltración leucocitaria y la degradación del colágeno en la zona I, sin embargo en la zona II la colagenólisis se produce asociada a muy bajos niveles de infiltración.

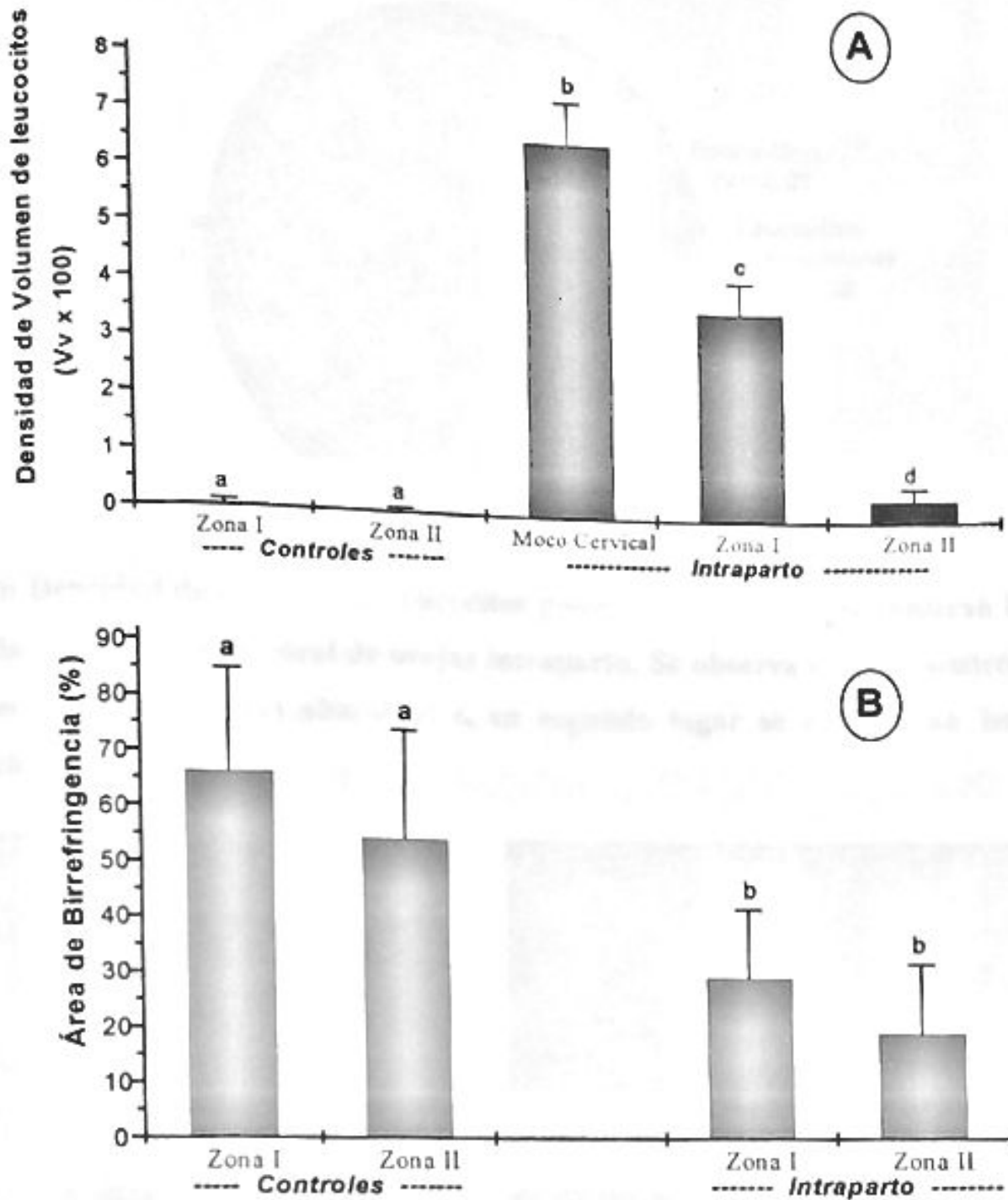


Figura 19: Infiltración de neutrófilos (A) y área de birrefringencia (B) en el cérvix uterino de ovejas controles no preñadas vs hembras intraparto. A) El nivel de infiltración de neutrófilos fue superior en los animales intraparto vs los controles. En los cérvices intraparto se encontraron diferencias en la cantidad de leucocitos que infiltran las distintas zonas, alcanzándose la mayor cantidad en el moco cervical. B) El estroma cervical fue analizado separándolo en Zona I (subepitelial) y Zona II (submucosa). El área de birrefringencia refleja la proporción de colágeno organizado en el estroma cervical. Se aprecia un alto nivel de organización en las fibras de colágeno de los animales controles, no presentando diferencias significativas entre ambas zonas (subepitelial y submucosa). Los animales intraparto, por el contrario, mostraron bajos niveles de birrefringencia lo que indica un extenso proceso de remodelación del colágeno, sin verificarse diferencias entre las zonas ($p < 0,01$).

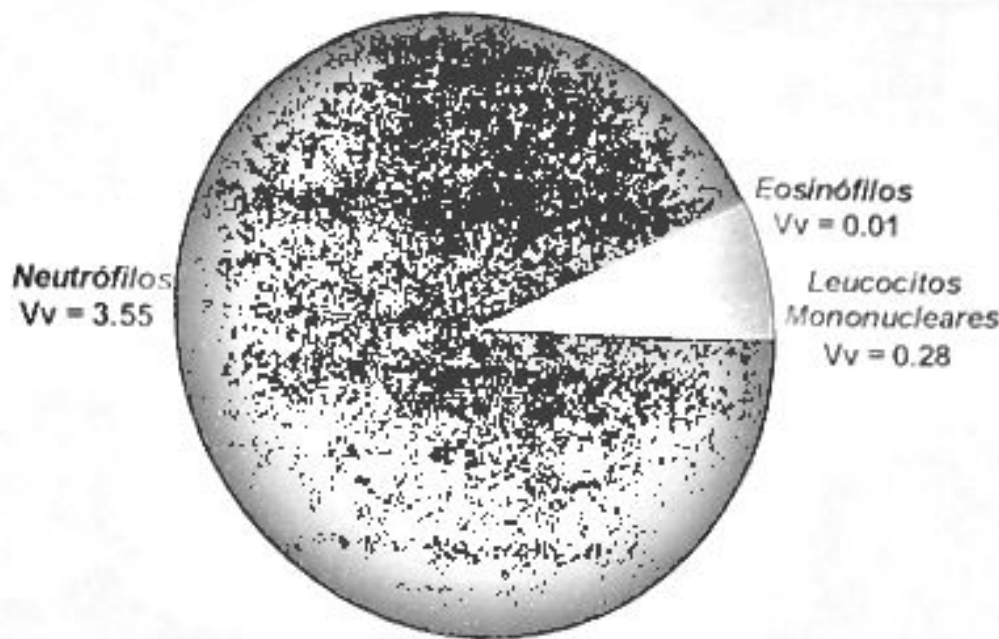


Figura 20: Densidad de volumen de leucocitos polimorfonucleares que infiltran la región subepitelial del estroma cervical de ovejas intraparto. Se observa que los neutrófilos son los polimorfonucleares más abundantes, en segundo lugar se encuentran las células mononucleares.

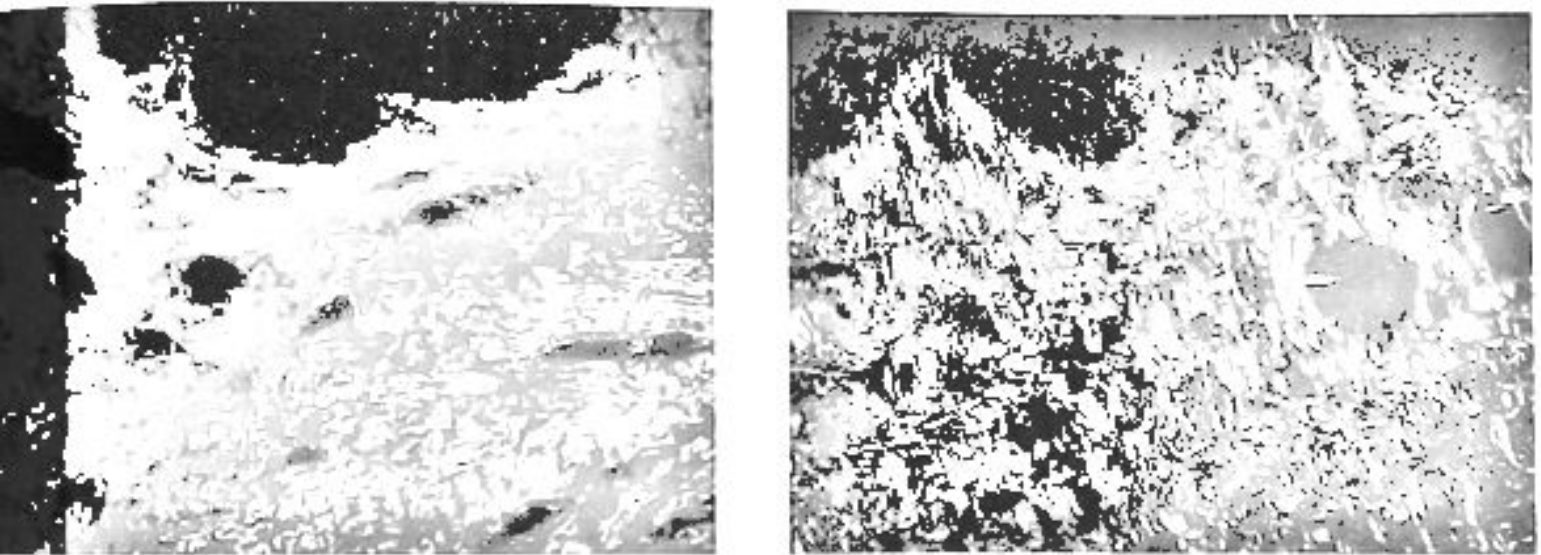


Figura 21: Izquierda: Fotomicrografía que muestra el estroma cervical de una oveja control no preñada observado al microscopio de polarización, luego de ser teñido por la técnica de Picrosirius. Se observa un elevado nivel de birrefringencia de color rojo, denotando la estructura ordenada y empaquetada de las fibras de colágeno intactas. Derecha: Corte transversal de un cérvix de oveja intraparto, nótese la menor birrefringencia, con predominio de tonos verdoso-amarillentos sobre fondo oscuro, lo que denota un fuerte proceso de degradación del colágeno, con pérdida del ordenamiento visto en las ovejas controles. Magnificación: 200 x. *Modificado de Luque et al. (1997). J. Vet. Med. 44, 501-510.*

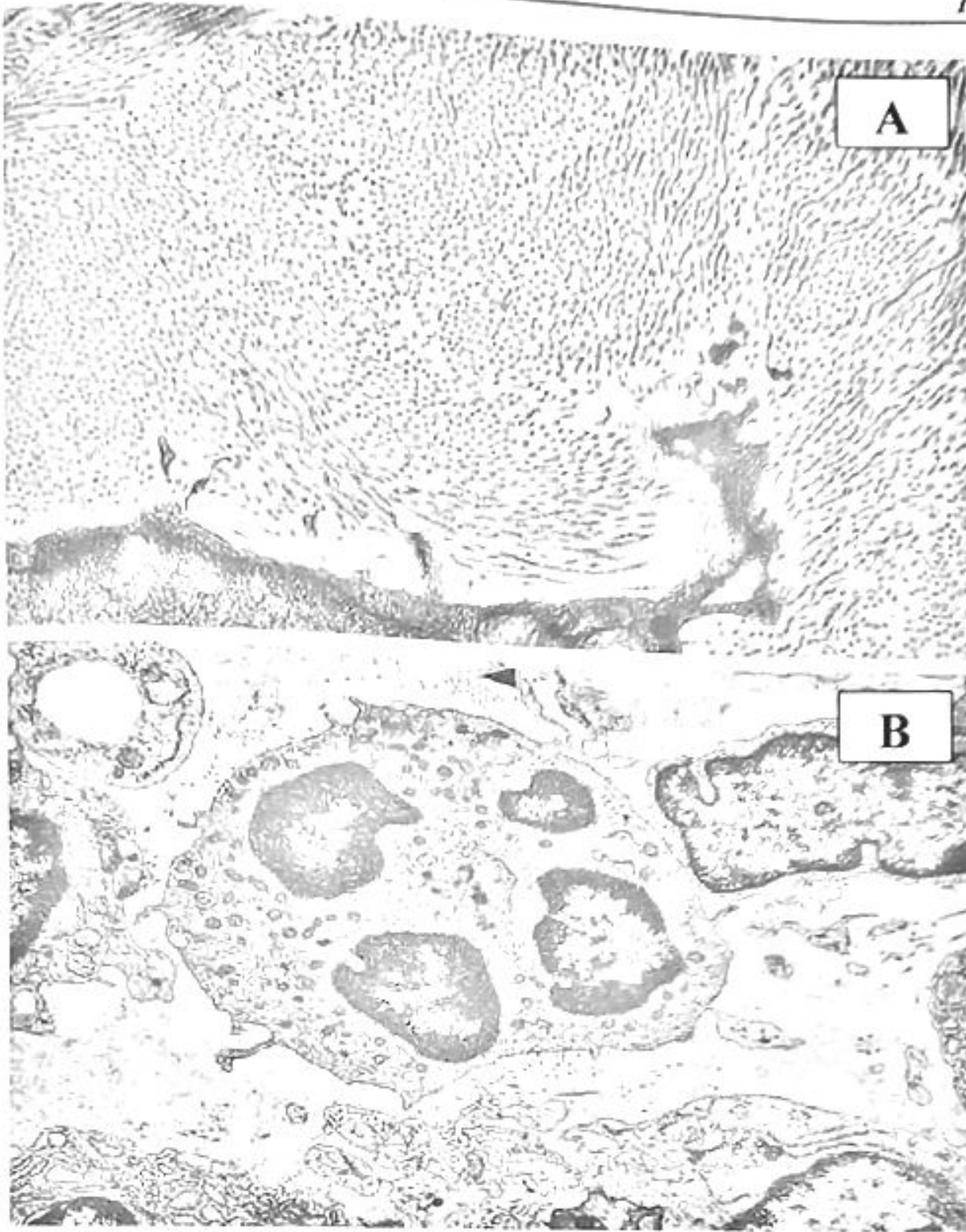


Figura 22: Fotomicrografías electrónicas que muestran un cérvix uterino de oveja control (no preñada) (A) y de una oveja intraparto (B). A) Nótese que el estroma cervical de un animal no preñado está constituido casi exclusivamente por densas fibras de colágeno, acompañadas por procesos citoplasmáticos interdigitados provenientes de fibroblastos. B) En esta micrografía se muestra la ultraestructura de un neutrófilo hallado como leucocito más abundante en el estroma cervical de los animales intraparto. Se puede observar que se ha perdido el arreglo regular y denso de las fibras de colágeno, siendo reemplazado por delgadas fibrillas desorganizadas, consecuencia de la extensa collagenólisis. Magnificación: 8.000 x. Modificado de Luque et al. (1997). *J. Vet. Med.* 44, 501-510.

V. DISCUSIÓN

El fenómeno del parto es una resultante de diversos factores tanto fetales como maternos. Dentro de esta compleja interacción de factores fisiológicos, la dilatación del cuello uterino es uno de los pasos fundamentales para obtener un nacimiento libre de traumatismo fetal y de patología uterina materna (Liggins *et al.*, 1977; Calder, 1981; Huszar & Walsh, 1991; Cabrol, 1991). De acuerdo con los trabajos de la literatura (Danforth 1947, 1954; Bryant *et al.*, 1968; Kleissl *et al.*, 1978; Vasilenko & Mead, 1987; Cheah & Sherwood, 1988; Kuenzi & Sherwood, 1995; Hwang *et al.*, 1996) y de los trabajos que forman parte de esta tesis se observa que en el proceso de dilatación del cérvix se producen profundas transformaciones en la composición física del tejido conectivo cervical. Utilizando la técnica de Picrosirius-polarización que permite la identificación y cuantificación del colágeno, hemos podido dar cuenta que en el momento del parto en ratas intactas se produce una desorganización del colágeno tipo I, ya que se observa una significativa disminución de su poder birrefringente (Luque & Montes, 1989; Luque *et al.*, 1996). Esta situación sería la responsable de permitir que ocurra una disminución en la rigidez tensional que caracteriza a este órgano durante la preñez (Conrad & Ueland, 1983). Este ablandamiento permite que la resistencia al paso de la cría sea menor, llevando a un parto sin traumatismo fetal. La regulación de este fenómeno tan importante es aún desconocida en sus detalles.

Asociados con el proceso de degradación del colágeno en el cérvix uterino durante el parto, numerosos trabajos han demostrado la presencia de células de infiltración provenientes del torrente sanguíneo (Junqueira *et al.*, 1980; Luque & Montes, 1989; Knudsen *et al.*, 1997). Dichos fenómenos han sido asociados causalmente basándose en los siguientes hechos:

- 1) Numerosas células infiltrantes, tales como polimorfonucleares neutrófilos, leucocitos eosinófilos y macrófagos poseen en sus estructuras granulares y lisosómicas enzimas capaces de degradar el colágeno, como colagenasas específicas y proteasas (Hibbs *et al.*, 1982).
- 2) Cronológicamente es coincidente la presencia de leucocitos infiltrantes con el proceso de degradación del colágeno cervical en diferentes especies tales como ratas, ovejas, cobayos, humanos, etc. (Junqueira *et al.*, 1980; Luque & Montes, 1989; Rajabi *et al.*, 1988; Hegele-Hartung *et al.*, 1989; Fosang *et al.*, 1984; Owiny *et al.*, 1995; Luque *et al.*, 1997).
- 3) Se ha demostrado en diferentes situaciones que los leucocitos infiltrantes intervienen en procesos de remodelación y degradación del tejido conectivo (Rajabi *et al.*, 1991a,b).

En trabajos anteriores hemos mostrado que asociado en el tiempo al proceso de degradación del colágeno del cuello uterino durante el parto en la rata, se produce una intensa infiltración de leucocitos eosinófilos (Luque & Montes, 1989). Por otra parte, en animales preñados intactos hemos observado que la infiltración de eosinófilos es un fenómeno que se da en forma aguda en los últimos días de la preñez (Ramos *et al.*, 2000). Con el fin de conocer si existe una regulación hormonal de la infiltración de eosinófilos y de la degradación del colágeno a término y para determinar si hay una relación causal entre ambos fenómenos, se examinaron biopsias de cérvices de animales preñados OVX el D9 de preñez y tratados con terapia sustitutiva de Pg y E₂. Este tratamiento hormonal mantuvo la gestación y la viabilidad fetal, hechos que fueron registrados a través de la medición de algunos parámetros de preñez a saber: el número de sitios de implantación en el D9 de preñez, los tamaños y pesos individuales de cada cría al momento del parto y 48 hs después. No se observaron diferencias significativas en todos estos parámetros con respecto a los controles preñados intactos, de esta manera podemos inferir que los niveles hormonales séricos alcanzados durante la terapia sustitutiva se mantuvieron en rangos fisiológicos. Los animales OVX preñados tratados con Pg o Pg+E₂ no presentaron evidencias de infiltración de eosinófilos ni de degradación del colágeno cervical (Luque *et al.*, 1996). Para poder estudiar el efecto de los E₂ en ausencia de Pg se diseñaron grupos de animales psp, OVX el D9 de psp, a los cuales se les inyectó dosis de E₂ iguales a las usadas en los animales preñados.

Cuando se estudiaron las biopsias de cérvix de estos animales se observó una gran infiltración de leucocitos eosinófilos, sin embargo, el colágeno cervical no mostró ningún signo de degradación, presentando una estructura organizada y compacta, con altos valores de birrefringencia a la luz polarizada (Luque *et al.*, 1996). Estos resultados nos permiten establecer dos conclusiones:

- a) La infiltración de eosinófilos es un fenómeno influido por los esteroides ováricos Pg y E₂. La administración de E₂ en concentraciones fisiológicas promueve la infiltración de eosinófilos, mientras que cuando se tratan animales con Pg+E₂ o sólo con Pg dicho efecto no se observa; esto último sería explicado por un posible mecanismo inhibitorio que ejerce la Pg sobre la actividad promotora de la infiltración del E₂. Estos resultados son coincidentes con numerosos trabajos en donde se usaron diferentes modelos experimentales que incluían dosis farmacológicas de esteroides y/o ratas inmaduras (Tchernitchin *et al.*, 1974; Lee *et al.*, 1989; Duchesne & Badia, 1992).
- b) La infiltración de eosinófilos en el cérvix uterino de la rata es en sí insuficiente para provocar la degradación del colágeno cervical, que se observa durante el parto. Se puede lograr una intensa infiltración de eosinófilos sin alteración en las propiedades físicas del colágeno del estroma cervical. Estos resultados muestran que los eosinófilos *per se* no son capaces

de producir una significativa degradación del colágeno en el cuello uterino y que ambos fenómenos estarían regulados por hormonas diferentes.

Existen numerosas razones que nos permiten postular a la Rlx como uno de los factores preponderantes en el control de las modificaciones histológicas que sufre el cérvix durante el parto. La Rlx, hormona proteica producida por el cuerpo lúteo y el endometrio de la rata (Fields *et al.*, 1992), se encuentra presente en altos niveles plasmáticos durante la segunda mitad de la preñez (Sherwood *et al.*, 1980). Numerosos trabajos muestran que la Rlx interviene en procesos promovedores del crecimiento y ablandamiento del cuello uterino durante la preñez de la rata (Hwang *et al.*, 1989; Lee *et al.*, 1992; Cheah *et al.*, 1995). El mecanismo usado por esta hormona para producir las extensas modificaciones histológicas del cérvix de la rata es aún desconocido, sin embargo existen evidencias que indican que la restitución de Rlx en los últimos momentos de la preñez, sobre animales preñados OVX, permite obtener los mismos parámetros de parto y de sobrevivencia de crías que en los animales intactos (Cheah & Sherwood, 1988). Si los animales OVX eran tratados solamente con E₂ (sin Rlx), dichos parámetros se alteraban significativamente (Cheah & Sherwood, 1988; Luque *et al.*, 1998).

Con el objeto de conocer la posible influencia de las altas concentraciones de Rlx durante las últimas 30 hs de la preñez sobre los fenómenos de la infiltración

de eosinófilos y colagenólisis del cuello uterino, ratas preñadas se OVX el D22 de preñez y se inyectaron con Rlx y/o E₂. A partir del D22, se produce la caída fisiológica en las concentraciones séricas de Pg en la rata, debido a la luteólisis funcional del final de preñez (Luque *et al.*, 1998), por lo tanto al realizar la OVX el mismo D22, dicha cirugía no modifica significativamente el perfil sérico de Pg. Los animales tratados solamente con E₂ presentaron altos niveles de infiltración de eosinófilos y ausencia total de degradación del colágeno cervical, mientras que los animales tratados sólo con Rlx presentaron altos niveles de colagenólisis en ausencia de infiltración de eosinófilos. Solamente aquellos animales tratados con ambas hormonas mostraron un cuadro de infiltración de eosinófilos y degradación del colágeno similar a los animales preñados intactos. Estos resultados permiten deducir que ambos fenómenos están regulados por hormonas diferentes. La infiltración de eosinófilos en el cérvix uterino de la rata sería fundamentalmente promovida por los E₂, mientras que la Rlx estaría encargada de producir la intensa colagenólisis cervical observada en el momento del parto. De acuerdo a nuestros hallazgos, ambos fenómenos actuarían en forma independiente y no sería necesaria la presencia de leucocitos eosinófilos en el cérvix de la rata a término para que se produzca el proceso de ablandamiento y dilatación (Luque *et al.*, 1998).

La fisiología del parto nos muestra que, mientras la porción caudal del útero (cérvix) se ablanda y dilata para permitir el pasaje de los fetos, la porción

craneal (cuernos uterinos) debe contraerse aumentando su rigidez tensional. Estas funciones, contradictorias y simultáneas llevadas a cabo por el mismo órgano, implican que no necesariamente los resultados obtenidos en cada una de estas porciones del útero pueden ser extrapoladas. Este razonamiento nos llevó a estudiar diferencialmente el efecto de los E_2 y la Pg sobre las distintas regiones del útero. Numerosos trabajos han mostrado diferentes aspectos de la influencia de los esteroides ováricos sobre la infiltración de eosinófilos en los *cuernos uterinos*, utilizando ratas inmaduras como modelo experimental (King *et al.*, 1981; Lee *et al.*, 1989; Howe *et al.*, 1990), sin embargo los resultados de esta tesis pretenden dar cuenta sobre la influencia de dichas hormonas sobre la porción *cervical* del útero, utilizando un modelo más cercano a la fisiología normal de la rata preñada (Downing & Sherwood, 1986; Luque *et al.*, 1996).

Hemos podido comprobar que el fenómeno de infiltración de eosinófilos en el cérvix uterino está finamente regulado por las hormonas esteroideas hacia el final de la preñez. Con el objeto de estudiar los mecanismos de acción de la Pg y el E_2 sobre dicho fenómeno infiltratorio se diseñaron grupos experimentales con animales psp, OVX el D9 de su psp y tratados con Pg y/o E_2 . Es conocido el hecho que las ratas sin una fuente constante de Pg no pueden desarrollar la preñez normalmente, produciendo el aborto de los fetos cuando dicho suministro de Pg es interrumpido. Por lo tanto, para poder estudiar el efecto de los E_2 en ausencia de Pg se utilizó un modelo de rata psp. La rata psp posee cuerpos lúteos

funcionales y un nivel sérico de Pg similar al de las ratas preñadas hasta el momento en que se realizan las OVX (D9) (Castro-Vazquez & Carreño, 1981; Luque & Castro-Vazquez, 1983). De esta manera los animales psp, OVX y tratados con E₂, serían comparables con el resto de los grupos de animales preñados. El tratamiento suministrado con ambos esteroides permite mantener valores plasmáticos similares a los de una rata preñada intacta e inclusive continuar con la gestación en ratas preñadas OVX, manteniendo viables los fetos (Downing & Sherwood, 1986; Luque *et al.*, 1996).

Los resultados obtenidos en animales psp OVX fueron similares a los hallados en animales preñados OVX en el D9 y tratados con Pg o Pg+E₂. Es decir que los animales psp OVX tratados con Pg y los tratados con Pg+E₂ no presentaron infiltración de eosinófilos, sólo lo hicieron aquellos psp OVX tratados únicamente con E₂ y en ausencia total de Pg. Esto nos permitió postular como hipótesis que la Pg, en concentraciones plasmáticas similares a las observadas durante la preñez, produciría un efecto inhibitorio sobre la infiltración de eosinófilos E₂-dependiente. Para comprobar esta idea se diseñaron grupos en los cuales se utilizó el antiprogestágeno RU-486, suministrando dicha droga a ratas tratadas con Pg y E₂. En efecto, cuando a los animales tratados con ambos esteroides se les inyectó RU-486 se observó una intensa infiltración de eosinófilos, similar a la obtenida en animales tratados solamente con E₂. El RU-486 evitó el efecto inhibitorio de la Pg sobre el E₂, permitiendo que este último

ejerciera libremente su efecto promovedor (Ramos *et al.*, 2000). Cuando a animales tratados solamente con E_2 se les suministró el antiestrógeno Tx, el efecto promovedor desapareció. Teniendo en cuenta que tanto el RU-486 como el tamoxifeno bloquean a nivel de los receptores, los resultados obtenidos indican que tanto la Pg como el E_2 realizan sus correspondientes efectos inhibitorio y promovedor respectivamente, a través de un mecanismo en donde la interacción receptor-hormona esteroide es necesaria.

Estos resultados son similares a los publicados en trabajos anteriores en los cuales se investigaron los efectos de la Pg y el E_2 sobre la infiltración de eosinófilos en los cuernos uterinos de ratas inmaduras (Lee *et al.*, 1989; Howe *et al.*, 1990), mostrándose antagónica la Pg sobre la acción estrogénica, característica verificada en numerosas situaciones fisiológicas y patológicas (Piroli *et al.*, 1998). Sin embargo nuestros hallazgos implican un acercamiento a lo que serían las condiciones fisiológicas de la preñez y el parto y, por otro lado, permiten mostrar que, a pesar de las diferencias funcionales de las porciones caudal y craneal del útero al momento del parto, la infiltración de eosinófilos es regulada de forma similar en ambas regiones (Ramos *et al.*, 2000).

Es conocido el hecho que el E_2 es capaz de promover la síntesis de numerosas proteínas en el útero de la rata, tales como el receptor de Pg, la enzima fosfoquinasa BB, insulin-like growth factor-I, etc (Lee *et al.*, 1989). Por otra

parte se ha demostrado que la infiltración de eosinófilos en el útero de ratas inmaduras es mediada por la síntesis de proteínas (Lee *et al.*, 1989). Con el objeto de estudiar si, en concentraciones plasmáticas similares a las encontradas en la preñez de la rata, el efecto promovedor del E_2 en la infiltración de eosinófilos al cérvix uterino es mediado por la síntesis de proteínas, se diseñaron diversos grupos experimentales. Los animales fueron tratados con las dosis habituales de E_2 a las que se les sumó el inhibidor de síntesis de ARNm, ACT-D. Los animales fueron inyectados con ACT-D en el D21 de comenzada la psp y sacrificados a las 7 hs o 31 hs de post-inyección. En las ratas tratadas con E_2 y ACT-D no se observó infiltración alguna, mientras que en los animales tratados sólo con E_2 se constató una extensa infiltración de eosinófilos. Los resultados nos permiten deducir que el E_2 ejercería su efecto promovedor de la infiltración a través de su propio receptor y mediado por la síntesis de algún factor proteico (Ramos *et al.*, 2000). Dicho factor podría tener un efecto quimiotáctico para los eosinófilos, tal como lo proponen los trabajos realizados con ratas inmaduras en las cuales se estudió la infiltración en los cuernos uterinos (Lee *et al.*, 1989; Howe *et al.*, 1990).

El complejo mecanismo de la dilatación del cérvix uterino es objeto de estudio debido a las profundas implicancias que tienen los partos distócicos tanto en el humano como en las especies de interés zootécnico. Teniendo en cuenta esta problemática también se procedió a estudiar los fenómenos de infiltración

leucocitaria y de remodelación del colágeno en cérvices de ovejas durante el parto. Los animales no preñados presentaron un estroma cervical compuesto por tejido conectivo denso, constituido por gruesas fibras de colágeno tipo I densamente empaquetadas y ordenadas. Los animales intraparto mostraron un intenso proceso de colagenólisis, detectada a partir de los bajos valores de birrefringencia obtenidos a la luz polarizada (Luque *et al.*, 1997). Las fibras de colágeno en las muestras intraparto se mostraron finas y dispersas formando un entramado laxo y poco denso que abarcó todo el cérvix uterino, sin observarse diferencias entre su porción uterina, media y vaginal. De la misma manera, cuando se compararon los valores de birrefringencia evaluados en dos zonas (zona I y zona II), divididas arbitrariamente en sentido luminal-serosal no se presentaron diferencias significativas. Estos resultados nos permitieron concluir que el proceso de colagenólisis en el cérvix uterino de la oveja intraparto, es un fenómeno homogéneo y que alcanza a todo el entramado de colágeno del estroma del cérvix uterino (Luque *et al.*, 1997).

Cuando se estudió la población de leucocitos en el cérvix uterino de ovejas intraparto se observó que la mayoría de las células infiltrantes eran polimorfonucleares neutrófilos, acompañados por algunos eosinófilos y células mononucleares. Nuestros resultados en relación al tipo celular infiltrante, son coincidentes con lo descrito por Owiny *et al.* (1995), pero difieren de lo observado por Fosang *et al.* (1984). Estos últimos autores describen una

infiltración preferentemente de leucocitos eosinófilos en el cérvix uterino de ovejas intraparto. El estudio diferencial por zonas luminal-serosal reveló que la zona subepitelial (zona I) era más abundante en leucocitos que la zona submucosa (zona II), obteniéndose diferencias estadísticamente significativas. En las ovejas controles no preñadas, la presencia de leucocitos siempre fue significativamente mucho menor que en los animales intraparto, independientemente de la zona evaluada. Estos resultados muestran que no existió una correlación entre la distribución de leucocitos infiltrantes y el proceso de colagenólisis en el estroma del cérvix uterino de ovejas intraparto. Si bien ambos sucesos aparecen solamente en la oveja intraparto y no en los animales controles, no hemos podido detectar ningún signo de causalidad, apareciendo de acuerdo a nuestros resultados y en similitud con los encontrados en la rata, como fenómenos coincidentes en el tiempo aunque independientes en sus mecanismos de acción (Luque *et al.*, 1997).

Quizás el proceso de dilatación cervical podría visualizarse como un epifenómeno, en el cual diferentes factores actúan conjuntamente para lograr llevarlo adelante con éxito. La infiltración de leucocitos polimorfonucleares podría relacionarse con un proceso inmunológico (Kelly, 1994), que ofrecería alguna protección frente a infecciones provocadas durante la apertura del canal cervical durante el trabajo de parto. A su vez, es un hecho conocido que el útero de ratas y ratones es invadido por diferentes leucocitos infiltrantes durante el

periodo de implantación del huevo, sugiriendo para estas células, un rol regulatorio que evite reacciones inflamatorias de rechazo durante la reacción decidual (De & Wood, 1991; Mc Master *et al.*, 1992). Por otra parte, tal como han mostrado algunos estudios (Hibbs *et al.*, 1982; Milks *et al.*, 1986) la infiltración de leucocitos aumenta la permeabilidad de ciertos tejidos. Teniendo en cuenta estas observaciones, otro posible rol que se podría asignar a los leucocitos polimorfonucleares infiltrantes en la preñez tardía y en el parto, es la formación de canales intercomunicantes a través de la matriz extracelular cervical. Estos canales permitirían una rápida difusión de hormonas u otros factores activadores de colagenasa, que actuarían sobre las colagenasas preexistentes al final de la preñez (Luque *et al.*, 1998).

VI. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en esta tesis nos permiten elaborar las siguientes conclusiones:

- 1) Los fenómenos de infiltración de eosinófilos y la colagenólisis en el cérvix uterino de la rata intraparto son fenómenos sincrónicos pero regulados por hormonas diferentes e independientes entre sí.
- 2) La colagenólisis en el cérvix uterino de la rata intraparto es promovida fundamentalmente por la Rlx, aunque trabajos previos indican la necesidad de priming por parte del E_2 , para que la Rlx sea biológicamente activa.
- 3) La infiltración de eosinófilos en el cérvix de la rata es un fenómeno promovido por el E_2 e inhibido por la Pg.
- 4) El efecto promovedor del E_2 e inhibitorio de la Pg implicaría la interacción receptor-hormona esteroidea.
- 5) El efecto promovedor del E_2 sería mediado por la síntesis de proteínas.
- 6) El cérvix uterino de la oveja intraparto presenta altos niveles de infiltración de polimorfonucleares neutrófilos y una extensa colagenólisis.

- 7) La infiltración leucocitaria y la colagenólisis del cérvix uterino de la oveja intraparto son fenómenos que no guardan correlación en su distribución morfológica, comportándose como eventos.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Br. Jerry, G.; Lewis, J., et al. (1964) Molecular Biology of the cell. 2^a Ed. Garland Publishing Inc., New York, USA.
- Br. (1962) Induction of osteophils into the modified connective tissue of and pregnant animals. Nature 194, 1259-1261.
- Br. (1977) Characterization of the aminoterminal propeptide chain from dermatopapillary sheep. FEBS Lett. 100, 1-5.
- Br. (1960) Avances de la coloración por la tinción de hematoxilina y de eosinófilos. Arch. Anat. Cytol. Paris. 25, 252-259.
- Br. (1977) The Chemistry and Biology of Collagen. The Chemistry of Collagen. Eds. Neurath and HRC, Academic Press, New York.
- Br. (1981) Demonstration of the physiological properties of rat relaxin. J. Reprod. Fert. 63, 145-150.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; et al. (1994) Molecular Biology of the cell. 3^{ra} edición. Eds: Garland Publishing Inc., New York, USA.

Basset, E. (1962) Infiltration of eosinophils into the modified connective tissue of oestrus and pregnant animals. *Nature* 194, 1259-1261.

Becker, U.; Helle, O.; Timpl, R. (1977) Characterization of the aminoterminal segment in procollagen palpha2 chain from dermastosparactic sheep. *FEBS Lett.* 73, 197-200.

Bogomoletz W. (1980) Avantages de la coloration par le rouge Sirius de L'Amyloide et des eosinophiles. *Arch. Anat. Cytol. Path.* 28, 252-253.

Bornstein, P.; Traub, W. (1979) The Chemistry and Biology of Collagen: The Proteins. 411-420 Eds Neurath and Hill, Academic Press, New York.

Bradshaw, J.M.; Downing, S.J.; Moffatt, A.; et al. (1981) Demonstration of some of the physiological properties of rat relaxin. *J. Reprod. Fertil.* 63, 145-153.

- Brandt, K.D. (1981) Glycosaminoglycans. In: Textbook of rheumatology. 239-254. Eds. Kelley, W.N.; Harris, E.D.; Ruddy S. and Sledge C.B. Saunders, Philadelphia, USA.
- Brodsky, B. and Elkenberry, E. (1982) Characterizations of fibrous forms of collagen. In: Methods in Enzimology. 127-134. Eds Cunningham L., Fredericksen W. Academic Press, Orlando, Florida, USA.
- Bryant, W.M. and Weeks, P.M. (1968) Alterations in collagen organization during dilation of the cervix uteri. Surg. Gynecol. Obstet. 126, 27-39.
- Burger, L.L. and Sherwood O.D. (1995) Evidence that cellular proliferation contributes to relaxin-induced growth of both the vagina and the cervix in the pregnant rat. Endocrinology 136, 4820-4826.
- Cabrol, D. (1991) Cervical distensibility changes in pregnancy, term and preterm labor. Semin. Perinatol. 15, 133-139.
- Calder, A.A. (1981) The Cervix in Pregnancy and Labour, 104-122. Ed. Ellwood, D.A. and Anderson A.B.M., Churchill-Livingstone, Edinburgh.
- Catala, S. and Deis, R.P. (1973) Effect of preparturition, maternal behavior and

lactation in ovariectomized pregnant rats. *J. Endocrinol.* 56, 219-225.

Castro-Vazquez, A.C. and Carreño, N.B. (1981) A study of the sensory requirements for eliciting the pseudopregnancy response. *Brain Res.* 230, 205-220.

Cheah, S. and Sherwood, O.D. (1988) Effect of 17- β -estradiol and relaxin on parturition and pup survival in the rat. *Endocrinology* 122, 1958-1963.

Cheah, S.H.; Neg, K.H.; Johgalingam, V.T.; et al. (1995) The effects of oestradiol and relaxin on extensibility and collagen organization of the pregnant rat cervix. *J. Endocrinol.* 146, 331-337.

Conrad, J.T. and Ueland, K. (1983) Physical characteristics of the cervix. *Clin. Obstet. Gynecol.* 26, 27-32.

Cotta-Pereira, G.; Rodrigo, F.G.; Bittencourt-Sampaio, S. (1976). Oxytalan, elaunin and elastic fibers in the human skin. *J. Invest. Dermatol.* 66, 143-148.

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

Da Costa Ferreira Junior, J. (1995) Estudo morfológico da modulação das fibras do sistema elástico induzida por esteróides ováricos na lâmina própria da cérvix uterina da rata. Tese apresentada ao USP para obtenção do título do Doutor em Ciências.

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. (1954) The distribution and functional activity of the cervical musculature. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 68, 1261-1269.

Danforth, D.N. (1983) The morphology of the human cervix. *Clin. Obstet. Gynecol.* 26, 7-13.

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

De, M. & Wood, G. (1991) Analysis of the number and distribution of macrophages, lymphocytes, and granulocytes in the mouse uterus from implantation through parturition. *J Leukoc. Biol.* 50, 381-392.

Downing, S.J. and 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.

Garnier, R.; Huc, A.; Junqua, S. (1975) Fine structure and physico-chemical

Duchesne, M.J. and Badia, E. (1992) Immunohistochemical localization of the eosinophil major basic protein in the uterus horn and cervix of the rat at term and after parturition. *Cell Tissue Res.* 270, 79-86.

Garrison, L.P. & Hall, J.L. (1997) *Histologia*. Eds Mc Graw-Hill Interamericana.

El Maradny, E.; Kanayama, N.; Kobayashi H., et al. (1997) The role of hialuronic acid as a mediator and regulator of cervical ripening. *Hum. Reprod.* 12, 1080-1088.

El-King, S.R.; Masato, K. (1980) Pregnancy-related changes in rat cervical glycosaminoglycans. *Biochem J.* 192, 1-8.

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

V. (1988) Effect of prostaglandins on the production of collagenase by rabbit uterine cervical fibroblasts. *Prostaglandins*

Fields, P.; Lee, A.; Haab, L.; et al. (1992) Evidence for a dual source of relaxin on the pregnant rat: immunolocalization in the corpora lutea and endometrium. *Endocrinology* 130, 2985-2990.

Rock, NY, USA.

Fosang, A.J.; Handley, C.J.; Santer, V. (1984) Pregnancy related changes in the connective tissue of the ovine cervix. *Biol. Reprod.* 30, 1223-1235.

and efficient sacrological methods and their use in pathological research and

Fullmer, H.M.; Sheetz, J.H.; Narkates, A.J. (1974) Oxytalan connective tissues fibres: a review. *J. Oral. Pathol.* 3, 291-316.

Garrone, R.; Huc, A.; Junqua, S. (1975) Fine structure and physicochemical studies on the collagen of the marine sponge *Chondrosia reniformis*. *Nardo. J. Ultrastruct. Res.* 52, 261-275.

Gartner, L.P. & Hiatt, J.L. (1997) *Histología*. Eds Mc Graw-Hill Interamericana, México.

Golichowski, A.M.; King, S.R.; Mascaro, K. (1980) Pregnancy-related changes in rat cervical glycosaminoglycans. *Biochem. J.* 192, 1-8.

Goshwaki, H.; Ito, A.; Mori, Y. (1988) Effects of prostaglandins on the production of collagenase by rabbit uterine cervical fibroblasts. *Prostaglandins* 36, 107-114.

Gross, J. (1981) *Cell biology of extracellular matrix*. Eds: Hay, E.D., Plenum Press, NY, USA.

Gundersen, H.J.G.; Bendtsen, T.F.; Korbo, L.; et al. (1988) Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and

diagnosis. APMIS 96, 379-394.

Gunja-Smith, Z. and Woessner, Jr. (1985) Content of the collagen and elastin cross-links pyridinoline and the desmosines in the human uterus in various reproductive states. Am. J. Obstet. Gynecol. 153, 92-95.

Hafez, E.S.E. (1970) Female reproductive organs. Bennett, J.P. & Vickery, B.H. In: Reproduction and breeding techniques for laboratory animals. 74-106. Hafez, E.S.E. Ed. Lea and Febiger, Philadelphia, USA.

Harkness M.L.R. and Harkness R.D. (1954) The collagen content of the reproductive tract of the rat during pregnancy and lactation. J. Physiol. 123, 492-500.

Harkness, M.L.R. and Harkness, R.D. (1959) Changes in the physical properties of the uterine cervix of the rat during pregnancy. J. Physiol. 148, 524-547.

Hascall, V.C. and Hascall G.K. (1981) Proteoglycans. In: Cell biology of extracellular matrix. 39-63. Ed. Hay, E.D., Plenum Press, New York, USA.

Hegele-Hartung, C.; Chwalisz, K.; Beier, H.M.; *et al.* (1989) Ripening of the uterine cervix of the guinea-pig after treatment with the progesterone antagonist

onapristone (ZK 98 299): an electron microscopy study. *Human. Reprod.* 4, 369-377.

Hibbs, M.S.; Mainardi, C.L.; Kang, A.H. (1982) Type-specific collagen degradation by eosinophils. *Biochem. J.* 207, 621-624.

Howe, R.; Lee, Y.; Fischkoff, S.; et al. (1990) Glucocorticoid and progestin regulation of eosinophil chemotactic factor and complement C3 in the estrogen treated rat uterus. *Endocrinology* 126, 3193-3199.

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

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

Hwang, J. and Sherwood O. D. (1988) Monoclonal antibodies specific for rat relaxin III. Passive immunization with monoclonal antibodies throughout the second half of pregnancy reduces cervical growth and extensibility in intact rats. *Endocrinology* 123, 2486-2490.

Hwang, J.; Shanks, R.; Sherwood, O.D. (1989) Monoclonal antibodies specific

for rat relaxin IV. Passive immunization with monoclonal antibodies during the antepartum period reduces cervical growth and extensibility, disrupts birth, and reduces pup survival in intact rats. *Endocrinology* 125, 260-266.

Hwang, J.J.; Rorke, E.A.; Macinga, D. (1996) Relaxin modulates human cervical stromal cell activity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81, 3379-3384.

Ikuta, Y.; Matsuura, K.; Okamura, H.; et al (1991) Effects of RU-486 on the interstitial collagenase in the process of cervical ripening in the pregnant rat. *Endocrinol. Japon.* 38, 491-496.

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

Ito, A.; Mori, Y.; Ojima, Y.; et al. (1988) Spontaneous production of interleukin-1-like factors from pregnant rabbit uterine cervix. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 159, 261-270.

Ito, A.; Nagane, K.; Mori, Y. (1977) PZ-peptidase activity in human uterine cervix in pregnancy at term. *Clin. Chim. Acta* 78, 267-270.

Jeffrey, J.J. and Koob, T.J. (1980) Endocrine control of collagen degradation in the uterus. In: Dilatation of the uterine cervix: connective tissue biology and clinical management. 135-151 Eds. Naftolin, F. and Stubblefield, P.G. New York Raven Press, New York, USA.

King, W.J.; Allen, T.C.; DeSomma, E.R. (1981) Localization of collagen

Jeffrey, J.J. (1991) Collagen and collagenase: pregnancy and parturition. *Semin. Perinatol.* 15, 118-126.

Klehel, H.P.; Van Der Rest, M.; Naftolin, F.; et al. (1978) Collagen changes in

Junqueira, L.C.U.; 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.

of cervix uteri in nonpregnant, pregnant and antigenogen (ZK 98 299) treated

Junqueira, L.C.U.; Zugaib, M.; Montes G.S. (1980) Morphological and histochemical evidence for the occurrence of collagenolysis and for the role of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes during cervical dilatation. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 138, 273-281

Kaminski, K.; Oleszczuk, J.; Jakowicki, J.; et al. (1994) Biochemical and clinical evaluation of the efficiency of intracervical extraamniotic prostaglandin F2 alpha and intravenous oxytocin infusion to induce labour at term. *Aust. N. Z. J. Obstet. Gynaecol.* 34, 409-413.

Kelly, R.W. (1994) Pregnancy maintenance and parturition: the role of prostaglandin in manipulating the immune and inflammatory response. *Endocr. Rev.* 15, 684-706.

King, W.J.; Allen, T.C.; DeSombre, E.R. (1981). Localization of uterine peroxidase activity in estrogen-treated rats. *Biol. Reprod.* 25, 859-870.

Kleissl, H.P.; Van Der Rest, M.; Naftolin, F.; et al. (1978) Collagen changes in the human uterine cervix at parturition. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 130, 748-753.

Knudsen, U.; Spangaard, H.; Uldbjerg, N.; et al. (1994) Biomechanical analysis of cervix uteri in nonpregnant, pregnant and antigestagen (ZK 98 299) treated pregnant rats. *Connect Tissue Research* 31, 67-74.

Knudsen, U.; Uldbjerg, N.; Rechberger, T.; et al. (1997) Eosinophils in human cervical ripening. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 72, 165-168.

Kokenyesi, R. and Woessner, J. (1990) Relationship between dilatation of the rat uterine cervix and a small dermatan sulfate proteoglycan. *Biol. Reprod.* 42, 87-97.

Koob, T.J.; Stubblefield, P.E.; Eyre, D.R.; et al. (1981) Connective tissue alterations associated with parturition in the rabbit. In Dilatation in the uterine cervix 203-215. Eds Naftolin, F. and Stubblefield, P.G. New York Raven Press, New York, USA.

Kroc, R.; Steinetz, B.; Beach, B. (1959) The effects of estrogens, progestagens and relaxin in pregnant and non-pregnant laboratory rodents. Ann. N.Y. Acad. Sci. 75, 942-980.

Kuenzi, M.J. and Sherwood, O.D. (1995) Immunohistochemical localization of specific relaxin binding cells in the cervix, mammary glands and nipples of pregnant rats. Endocrinology 136, 1367-1373.

Lao Guico-Lamm, M. and Sherwood, O.D. (1988a) Monoclonal antibodies specific for rat relaxin II. Passive immunization with monoclonal antibodies throughout the second half of pregnancy disrupts birth in intact rats. Endocrinology 123, 2479-2485.

Lao Guico-Lamm, M. and Sherwood, O.D. (1988b) Monoclonal antibodies specific for rat relaxin I. Production and characterization of monoclonal antibodies that neutralize rat relaxin's bioactivity in vivo. Endocrinology 123, 2472-2478.

Lee, A.; Hwang, J.; Haab, L.; et al. (1992) Monoclonal antibodies specific for rat relaxin VI. Passive immunization with monoclonal antibodies throughout the second half of pregnancy disrupts histological changes associated with cervical softening at parturition in rats. *Endocrinology* 130, 2386-2391.

Lee, Y.; Howe, R.; Sha, S.; et al. (1989) Estrogen regulation of an eosinophil chemotactic factor in the immature rat uterus. *Endocrinology* 125, 3022-3028.

Leppert, P. and Yu, S. (1991) Three-dimensional structures of uterine elastic fibers: scanning electron microscopic studies. *Connect. Tissue. Res.* 27, 15-31.

Leppert, P.; Keller, S.; Cerreta, J; et al. (1982) Conclusive evidence for the presence of elastin in human and monkey cervix. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 142, 179-182.

Liggins, G.C.; Forster, C.S.; Grieves, S.A.; et al. (1977) Control of parturition in man. *Biol. Reprod.* 16, 39-56.

Luque, E. H. and 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.; Bassani, M.M.; Ramos, J.G.; et al. (1997). Leukocyte infiltration and collagenolysis in cervical tissue from intrapartum sheep. *J. Vet. Med.* 44, 501-510.
- Luque, E.H.; Castro-Vazquez, A.C. (1983). Sensory mechanisms involved in the induction of pseudopregnancy by progesterone: increased sensitivity to stimulation of the pudendal sensory field. *Endocrinology* 113, 385-390.
- Luque, E.H.; Muñoz de Toro, M.M.; Ramos, J.G.; et al. (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.
- Luque, E.H.; Ramos, J.G.; Rodriguez, H.A.; et al. (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.
- Lyttle, C.; Medlock, K.; Sheehan, D. (1984) Eosinophils as the source of uterine nuclear type II estrogen binding sites. *J. Biol. Chem.* 259, 2697-2700.

Maradny, E.; Terao, T.; Kobayashi, T.; et al (1996a). Dehydroepiandrosterone sulfate potentiates the effect of interleukin-8 on the cervix. *Gynecol. Obstet. Invest.* 42, 191-195.

Maradny, E.; Terao, T.; Sumimoto, K.; et al. (1996b) Biochemical changes in the cervical tissue of rabbit induced by interleukin-8, interleukin-1beta, dehydroepiandrosterone sulphate and prostaglandin E2: a comparative study. *Hum. Reprod.* 11, 1099-1104.

Markaverich, B.; Roberts, R.; Alejandro, M.; et al. (1986) Uterine type II estrogen-binding sites are not of eosinophil origin. *J. Biol. Chem.* 261, 142-146.

McMaster, M.T.; Newton, R.C.; Dey, S.K.; et al. (1992) Activation and distribution of inflammatory cells in the mouse uterus during the preimplantation period. *J. Immunol.* 148, 1699-1705.

Milks, L.C.; Conyers, G.P.; Cramer, E.B. (1986) The effect of neutrophil migration on epithelial permeability. *J. Cell. Biol.* 103, 2729-2738

Minamoto, T.; Arai, K.; Hirakawa, S.; et al. (1987) Immunohistochemical studies on collagen types in the uterine cervix in pregnant and nonpregnant states. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 156, 138-144.

Nalbandov, A.V. (1969) La estructura de los sistemas reproductores. En: Fisiología de la Reproducción. 26-62. Ed. Nalbandov, A.V., Acribia-Zaragoza, España.

Owiny, J.; Gilbert, R.; Wahl, C.; et al. (1995) Leukocytic invasion of the ovine cervix at parturition. J. Soc. Gynecol. Invest. 2, 593-596.

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

Perez, M.; Furth, E.; Matzumura, P.; et al. (1996) Role of eosinophils in uterine responses to estrogen. Biol. Reprod. 54, 249-254.

Pirolì, G.; Torres, A.; Grillo, C.; et al. (1998) Mechanisms in progestin antagonism of pituitary tumorigenesis. J. Steroid. Biochem. Mol. Biol. 64, 59-67.

Rajabi, M.R.; Poole, A.R.; Solomon, S. (1991a) Hormonal regulation of interstitial collagenase in the uterine cervix of the pregnant guinea pig.

Endocrinology 128, 863-871

- Rajabi, M.R.; Poole, A.R.; Solomon, S.; et al. (1991b) Immunochemical and immunohistochemical evidence of oestrogen-mediated collagenolysis as a mechanism of cervical dilatation in the guinea pig at parturition. *Endocrinology* 128, 371-378.
- Rajabi, M.R. and 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.; Dean, D.D.; Beydoun, S.N.; et al. (1988) Elevated tissue levels of collagenase during dilatation of uterine cervix in human parturition. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 159, 971-976.
- Ramos, J.G.; Varayoud, J.; Kass, L.; et al. (2000) Estrogen and progesterone modulation of eosinophilic infiltration of the rat uterine cervix. *Steroids* 65 (7), 0000-0000.
- Rath, W.; Kuhn, W.; Szevereny, M.; et al. (1993) Biochemical changes in human cervical connective tissue after intracervical application of prostaglandin E2. *Prostaglandins* 45, 375-384.

Rorie, D.K. and Newton, M. (1967) Histologic and chemical studies of the smooth muscle in the human cervix and uterus. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 99, 466-469.

Ross, M.H.; Reith, E.J.; Romrell, L.J. (1992) *Histología*, 2^{da} edición. Editorial Panamericana, Bs. As., Argentina.

Rotten, D.; Gavignet, C.; Colin, M.; et al. (1988) Evolution of the elastic fiber network of the human uterine cervix before, during and after pregnancy. *Clin. Physiol. Biochem.* 6, 285-292.

Sakyo, K.; Ito, A.; Mori, Y. (1986) Effects of DHAS on the production of collagenase and gelatinolytic metalloproteinase by rabbit uterine cervical cells in primary cultures. *J. Pharmacobio. Dyn.* 9, 276-286.

Siegel, S. (1956) *Nonparametric statistics for the behavioral sciences*. 143-215
Ed. McGraw-Hill Book Company, New York, USA.

Sheehan, D.; Medlock, K.; Lyttle, C. (1986) Identification of uterine nuclear type II estrogen binding sites in estrogen treated rats. *J. Steroid. Biochem.* 25, 37-43.

Sherwood, O.D.; Crnekovic, V.; Gordon, W.; et al. (1980) Radioimmunoassay of relaxin throughout pregnancy and during parturition in the rat. *Endocrinology* 107, 691-698.

Silver, F. (1982) A molecular model for lineal and lateral growth of type I collagen fibrils. *Collagen Res.* 2, 219-229.

Smith, C.A. & Wood, E.J. (1997) *Biología Celular*. Eds: Addison Wesley Iberoamericana, Wilmington, Delaware, USA.

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

Tchernitchin, A.; Tchernitchin, X.; Galand, P. (1976) New concepts on the action of oestrogens in the uterus and the role of the eosinophil receptor system. *Differentiation* 5, 145-150.

Uldberj N.; Ulmsten, U.; Ekman, G. (1983a) The ripening of the human uterine cervix in terms of connective tissue biochemistry. *Clin. Obstet. Gynecol.* 26, 14-26.

Uldbjerg, N. and Malmstrom, A. (1991) The role of proteoglycans in cervical dilatation. *Semin. Perinatol.* 15, 127-132.

Uldbjerg, N.; Ekman, G.; Malmstrom, A. (1983b) Ripening of the human uterine cervix related to changes in collagen, glycosaminoglycans, and collagenolytic activity. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 147, 662-666.

Vasilenko, P. and Mead, J. (1987) Growth-promoting effects of relaxin and related compositional changes in the uterus, cervix and vagina of the rat. *Endocrinology* 120, 1370-1376.

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

Wooley, D.E. (1984) Mammalian collagenases. In: *Extracellular matrix accumulation*. 119-129. Eds. Piez, K.A. and Reddi, A.H.; Elsevier, New York, USA.

Yoshida, K.; Yanaihara, T.; Nakayama, T.; et al. (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.

Zambrano, N.Z.; Montes G.S.; Shigihara, K.M.; et al. (1982) Collagen arrangement in cartilages. *Acta Anat.* 113, 26-38.

Zarrow, M. and Yochim, J. (1961) Dilation of the uterine cervix of the rat and accompanying changes during the estrous cycle, pregnancy and following treatment with estradiol, progesterone and relaxin. *Endocrinology* 69, 292-304

Zheng, Y.; Zhou, Z.; Lytle, C.; et al. (1988) Immunohistochemical characterization of the estrogen-stimulated leukocyte influx in the immature rat uterus. *J. Leukoc. Biol.* 44, 27-32.

VIII. PUBLICACIONES

Dissociation in the Control of Cervical Eosinophilic Infiltration and Collagenolysis at the End of Pregnancy or after Pseudopregnancy in Ovariectomized Steroid-Treated Rats¹

Enrique H. Luque,² Jorge G. Ramos, Horacio A. Rodriguez, and Monica M. Muñoz de Toro

Department of Human Physiology, Faculty of Biochemistry and Biological Sciences, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina

ABSTRACT
Previous studies have demonstrated that during parturition the physiological ripening that permits dilation of the cervical canal is due to a widespread collagenolysis that follows a heavy polymorphonuclear leukocyte invasion of the uterine cervix. The aim of this study was to investigate whether there is any association between the ovarian steroid hormones involved in rat parturition and this phenomenon. Pregnant or pseudopregnant rats were ovariectomized (OVX) at Day 9 and then given a hormonal treatment (sufficient to maintain fetal viability) until Day 22. Cervical biopsies, taken from animals killed intrapartum or 1 h before expected parturition, were studied for eosinophilic infiltration and collagen birefringence. Intrapartum or sham-OVX pregnant rats showed a massive eosinophilic infiltration and a widespread collagenolysis as indicated by a loss of collagen birefringence. Ovariectomized pregnant rats treated with estrogen plus progesterone or with progesterone alone showed neither infiltration nor collagenolysis. In rats OVX during pseudopregnancy, estrogen given alone induced a significant infiltration of eosinophils in the cervical stroma; however, treatment with the combination of estrogen and progesterone was not able to promote eosinophilic infiltration. Collagenolysis was absent in all pseudopregnant animals. These results show that estrogen induced a cervical eosinophilic infiltration in rats but that when progesterone was added to the estrogen treatment the infiltration was not present; in addition, none of the steroid hormones assessed were responsible for the collagenolysis found in the cervical tissue at term.

INTRODUCTION

The dilation and effacement (ripening) of the cervix is a necessary prerequisite for normal labor [1]. The process that permits cervical dilation is accompanied by a disruption of the ordered collagen bundles that follows polymorphonuclear leukocyte invasion [2–5]. The physiological mechanisms involved in the onset of this ripening process at term are still uncertain, although collagenase is implicated in the process. There is good evidence that the activity of both collagenase and proteolytic enzymes increases at term [6, 7], and one of the sources of these enzymes might be infiltrating neutrophils in women [2, 5] and infiltrating eosinophils in rats [4].

Because parturition is under precise endocrine control [8], it is assumed that the mechanisms mentioned above may be associated with the same hormonal control. It was thus of interest to study the effect of ovarian steroids on

the control of cervical eosinophilic infiltration and stromal collagenolysis. This task was undertaken, and rats ovariectomized (OVX) during pregnancy were treated with sex steroids, in doses designed to mimic normal pregnancy serum levels, to study the eosinophilic infiltration and collagenolysis of the cervical stroma.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Female adult Wistar rats (over 200 g) were used. Animals were maintained under controlled environment ($22 \pm 2^\circ\text{C}$; lights-on from 0600 to 2000 h). They had free access to pellet laboratory chow and tap water. Either bilateral OVX or sham operations were performed under ether anesthesia on intact cycling rats [9], on pregnant rats on Day 9 (Day 1 = the day sperm was found in the vaginal smear), and on pseudopregnant rats on Day 9 (Day 1 = the day after a 100% effective cervicovaginal stimulation was applied in the evening of proestrus [10, 11]).

After OVX or sham operation, the animals were assigned to different experimental groups to receive various regimes of hormone or vehicle treatment.

Hormone Treatments and Experimental Groups

Animals were treated with estradiol-17 β (E_2) and/or progesterone (Pg) according to the protocol described by Downing and Sherwood [12]. Progesterone was given in the form of implants made from Silastic tubing (i.d. 0.15×5 cm; Dow-Corning, Midland, MI), each containing 60 mg crystalline Pg (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Both ends of the implants were sealed with Silastic glue (Dow-Corning). Implants were preincubated in host rats for at least 24 h before use to minimize the transitory relatively high rate of Pg release that occurs after s.c. placement. Two Silastic implants were inserted s.c. in the back of the neck at the time of OVX. Empty implants were inserted in controls. To mimic the fall of Pg at the end of pregnancy, both implants were removed under ether anesthesia between 0600 and 0700 h of Day 22. In our colony, delivery in untreated control rats occurs on Day 23 between 1230 and 1400 h.

Daily s.c. administration of either $0.05 \mu\text{g}$ E_2 (Sigma) or its vehicle (0.1 ml sesame oil) was given from the time of OVX until Day 20. To mimic the increase of E_2 levels before the onset of rat parturition, the doses were increased to $0.5 \mu\text{g}$ on Day 21 and to $1.0 \mu\text{g}$ on Days 22 and 23.

Animals were allocated to groups as follows (summarized in Table 1), and tissues (whole cervixes, with adjacent parts of both horns and vagina) were collected at the time animals were killed.

Group I, nonpregnant OVX rats ($n = 5$). Rats were killed 2 wk after OVX.

Accepted July 18, 1996.
Received April 8, 1996.

This study was supported by the Argentine National Research Council (CONICET, PID 3157500/88 and 3752/92) and Universidad Nacional del Litoral (CAI+D 468/89). E.H.L. is a Career Investigator of the CONICET.

Correspondence: Enrique H. Luque, Department of Human Physiology, Faculty of Biochemistry and Biological Sciences, C.C. 530, (3000) Santa Fe, Argentina. FAX: 5442550944; e-mail: eluque@fbcb.unl.edu.ar

TABLE 1. Experimental protocol.

Group	Pregnancy	PSP*	Non-pregnant	OVX	Sham OVX	E ₂	Vehicle	Pg	Vehicle	Day, time killed
I										
II	Yes		Yes	Yes						15 days after OVX
III	Yes									D23, 1p*
IV	Yes			Yes	Yes		Yes		Yes	D23, Noon
V	Yes			Yes		Yes		Yes		D23, Noon
VI	Yes			Yes			Yes			D23, Noon
VII		Yes								D23, Noon
VIII		Yes		Yes			Yes		Yes	D23, Noon
IX		Yes		Yes		Yes			Yes	D23, Noon
				Yes		Yes		Yes		D23, Noon

* Intrapartum.

Group II, pregnant-intrapartum rats ($n = 6$). Animals were killed during labor, when they had already delivered two pups each.

Group III, pregnant-sham OVX rats ($n = 5$). On Day 9, rats were subjected to sham OVX, equipped with empty implants, and injected with E₂ vehicle (0.1 ml sesame oil s.c.) once daily until Day 23. Animals were killed at 1130–1200 h of Day 23.

Group IV, pregnant OVX-Pg+E₂ rats ($n = 5$). Animals received Pg+E₂, and were killed at 1130–1200 h of Day 23.

Group V, pregnant OVX-Pg rats ($n = 6$). Animals received Pg implants and E₂ vehicle, and were killed at 1130–1200 h of Day 23.

Group VI, pregnant-intact rats ($n = 7$). Animals were killed at 1130–1200 h of Day 23.

To evaluate the effect of steroid replacement therapy on fetal development, the number of implantation sites was recorded at Day 9 of pregnancy. Litter size and individual pup weight were recorded at term and after 48 h. When mothers were killed, healthy lactating mothers (1–5 days of lactation) were used for fostering. Suckling ability and nipple attachment were evaluated for lactational performance.

Tissues from pregnant OVX rats treated with E₂ could not be collected, because estrogen alone is not able to maintain gestation and abortion occurred soon after OVX. Thus a pseudopregnant OVX rat model was chosen to test the effect of E₂. In pseudopregnant rats a functional corpus luteum is formed [13], and serum Pg levels, until the moment when OVX was performed in this experiment (Day 9), are equivalent to those of pregnant rats [14]. Thus, at the moment of OVX (Day 9), a correspondence can be established among the different groups. However, in OVX pseudopregnant rats, E₂ treatment during a fortnight will not prolong the neuroendocrine/endocrine state present at the moment of OVX, and the cervix obtained in this group on Day 23 is equivalent to that of an estrogen-treated, long-term-spayed rat.

Group VII pseudopregnant OVX rats ($n = 4$). Animals equipped with empty implants and injected with E₂ vehicle (sesame oil) were killed at 1130–1200 h of Day 23.

Group VIII pseudopregnant OVX-E₂ rats ($n = 7$). Animals were equipped with empty implants and received E₂, and were killed at 1130–1200 h of Day 23.

Group IX pseudopregnant OVX-Pg+E₂ rats ($n = 5$). Animals received Pg+E₂ and were killed at 1130–1200 h of Day 23.

Tissue Preparation and Light Microscopy

Tissue samples were fixed by immersion in 10% buffered formalin for 24 h, dehydrated in graded concentra-

tions of alcohol, embedded in paraffin, and sectioned at 5 μ m. Serial sections were stained with either picosirius-hematoxylin or Sirius red in alkaline solution.

Picosirius-hematoxylin. Sections were stained for 30 min in a 0.1% Sirius red solution (Sirius red P₁B₂TM, Mobay Chemical Corporation, Union, NJ) in saturated picric acid; this was followed by rapid washing in tap water and counterstaining with Harris' hematoxylin for 15 min, and dehydration and mounting in synthetic resin. Picosirius-hematoxylin-stained sections were evaluated by polarization microscopy. This method is specific for orientated collagen molecules in the sense that only these structures present a bright birefringence [15]. Measurements of the intensity of birefringence were performed in specimens from the various experimental groups. Polarization was obtained with two Polaroid filters, one of them located below the condenser and the other above the objective lens. Light intensity was measured with a Reichert model 6 A E 9/65 microspectrophotometer (Reichert Jung, Nossloch, Germany), at a 585-nm wavelength. A low-power ($\times 2.6$) Zeiss (Carl Zeiss, Thornwood, NY) aplanatic objective was used in these measurements. The light intensity of the whole cervical stroma (more than 40 fields) from one section of each specimen was measured. Optical conditions were regulated so that the transmittance light intensity of sections was expressed as percentage area of birefringence.

Sirius red in alkaline solution. Sections were stained for 60 min in 0.5% of Sirius red dissolved in alkaline solution (NaOH, pH 10.5) and then counterstained with Harris' hematoxylin for 10 min. This method permits a distinct characterization of eosinophils in tissue sections: their specific granules were deeply stained in red, which strongly contrasted against a pale background [4, 16]. Taking into account that eosinophilic infiltration assumes a heterogeneous pattern, the quantification in each section was performed in the fibrous layer of the whole cervical wall.

Statistics

The point counting procedure [17] was used to obtain data concerning the morphometric parameters of eosinophils invading the cervical tissue. Eosinophils were estimated in the chosen fields using a glass disk with a squared grid inserted in a focusing eyepiece and an immersion objective of $\times 100$ [18]. The fraction of points occurring within the structure of eosinophils (stained in red) was determined and then compared to the total number of points lying within the cervical stroma. The volume fraction was calculated by applying the formula given by Weibel [17]:

$$V_v = \frac{P_i}{P}$$

TABLE 2. Effect of steroid replacement therapy on fetal development.*

	Group II	Group III	Group IV	Group V	Group VI
No. of mothers per group	6	5	5	6	7
Live pups/implantation sites (%)	ND [†]	90 ± 2	87 ± 3	89 ± 1	ND [†]
Litter size (pups/mother)	9 ± 3	8 ± 2	8 ± 3	9 ± 2	10 ± 2
Pup weight at term (g)	6.52 ± 1.02	6.48 ± 0.98	6.55 ± 1.14	6.42 ± 0.88	6.59 ± 1.08
Pup growth rate (g/48 h)	0.44 ± 0.10	0.45 ± 0.18	0.48 ± 0.12	0.49 ± 0.16	0.47 ± 0.09

* Mean ± SD values of fetus parameters from pregnant rats assigned to different experimental groups (see Materials and Methods); nonsignificant differences between groups.

[†] ND = not done.

where Vv is the estimated volume fraction of the object (eosinophils); Pi is the number of incident points over the eosinophils; and P is the total number of incident points over the volume unit (stroma of the uterine cervix).

Kruskal-Wallis one-way analysis of variance was used to analyze the differences in eosinophilic infiltrates and collagenolysis of the cervical stroma between groups as well as the differences in pup parameters. Probabilities were assigned using the Mann-Whitney U test. Correlation analysis among eosinophilic infiltration and collagenolysis of the cervical stroma was accomplished by the Spearman rank test [19].

RESULTS

As shown in Table 2 there were nonsignificant differences in percentage of live pups born, litter size, pup weight at term, and pup growth rate between control and pregnant OVX steroid-treated groups; these results are similar to those published previously by other researchers [20–22]. Pups from experimental groups also showed a high lactational performance as evaluated by nipple attachment, suckling ability, and growth rate. These results demonstrate that hormone replacement did not affect fetal development or viability and closely mimicked normal levels of steroid serum during pregnancy.

Pregnant rats killed during delivery showed the highest eosinophilic infiltrate in the cervical stroma, which was in a direct association with a widespread collagenolysis (Fig. 1, A and B); these results contrast with those obtained in nonpregnant chronic OVX rats, in which neither eosinophilic invasion nor collagenolysis was observed (Fig. 1, C and D). When pregnant-intact (group VI) or pregnant sham-OVX (group III) rats were killed (at 1130–1200 h of Day 23) immediately before the time of expected parturition, a lower but nonsignificantly different infiltration was found in comparison to the intrapartum group (group II) (Fig. 2A). The massive tissue invasion by eosinophils found in these control groups (II, III, and VI) was closely associated with a considerable reduction in the intensity of birefringence of collagen fibers (Fig. 2B). This reduction in collagen birefringence speaks strongly in favor of a massive decrease in oriented collagen molecules associated with cervical dilation.

When pregnant OVX rats were treated with Pg+E₂ (group IV) or Pg (group V), the eosinophilic infiltration found in pregnant sham-OVX (group III) animals was not reproduced (Fig. 2A). Even though OVX was performed on Day 9 of pregnancy, the hormonal replacement treatment chosen maintained fetal viability until the day of parturition (see Table 2). As observed in chronic OVX rats, the absence of eosinophilic infiltration was associated with no collagen degradation in the groups treated with Pg or Pg+E₂ (Fig. 2).

A significant eosinophilic infiltration was found in ani-

mals treated with E₂ alone (group VIII), but a direct correspondence between these high levels of eosinophilic infiltration and collagen degradation was not seen (Fig. 1, E and F, and Fig. 3). When rats OVX during pseudopregnancy were treated with E₂+Pg (group IX), eosinophilic infiltration was not observed; these results agree with those obtained in pregnant OVX rats treated with E₂+Pg (group IV). The picrosirius-polarization method showed no collagen degradation in the cervical stroma of either of these treated groups (Fig. 3B); the same results were obtained in chronic OVX rats (group I) (Fig. 1C).

As shown in Figure 4, a negative correlation (Spearman r_s : -0.684; $p < 0.01$) between eosinophilic infiltration and collagen degradation was observed in both the pregnant (groups II, III, IV, V, and VI) and the chronically OVX rats (group I). On the other hand, rats OVX during pseudopregnancy and treated with E₂ (group VIII) showed an important level of eosinophilic infiltration together with an intact collagen framework (Figs. 1 and 3); this is the reason the latter group could not be included in the correlation analysis.

DISCUSSION

Parturition results from a complex interplay of maternal and fetal factors [8]. For a normal labor, dilation and effacement (ripening) of the cervix is a necessary prerequisite, and the process is accompanied by a disruption of the ordered collagen bundles [2, 23]. The physiological mechanisms involved in starting the ripening process at term are still uncertain. But there is good evidence that both collagenase and proteolytic enzymes increase at term [6, 7] in association with a widespread collagenolysis, and at the same time a massive polymorphonuclear leukocyte infiltration is observed in the cervical stroma of humans, sheep, rabbits, and rats [2, 4, 24, 25]. In this study we have confirmed previous findings [4] showing a very close association between the eosinophilic infiltration and collagenolysis (see Fig. 4) in the cervical stroma during rat parturition. It may be pertinent to note that the presence of polymorphonuclear leukocytes in periparturient tissues has been reported in electron microscopic studies [2, 4, 26] and immunohistochemical studies using specific antibodies against neutrophil enzymes or against eosinophil major basic protein [5, 27]. However, the physiological role of this infiltration is not fully resolved.

Earlier attempts were made to correlate changes in the uterine cervix with the endocrine events around parturition [28, 29]. It is noteworthy that in rat serum, Pg levels are high during pregnancy and gradually decrease 48–72 h before parturition [30]. On the other hand, plasma concentrations of estrogen, which are low during pregnancy, increase 24–48 h before delivery [31], and this increase coincides with the antepartum elevation of serum relaxin [32]. As suggested in previous work, ovarian steroid hormones may

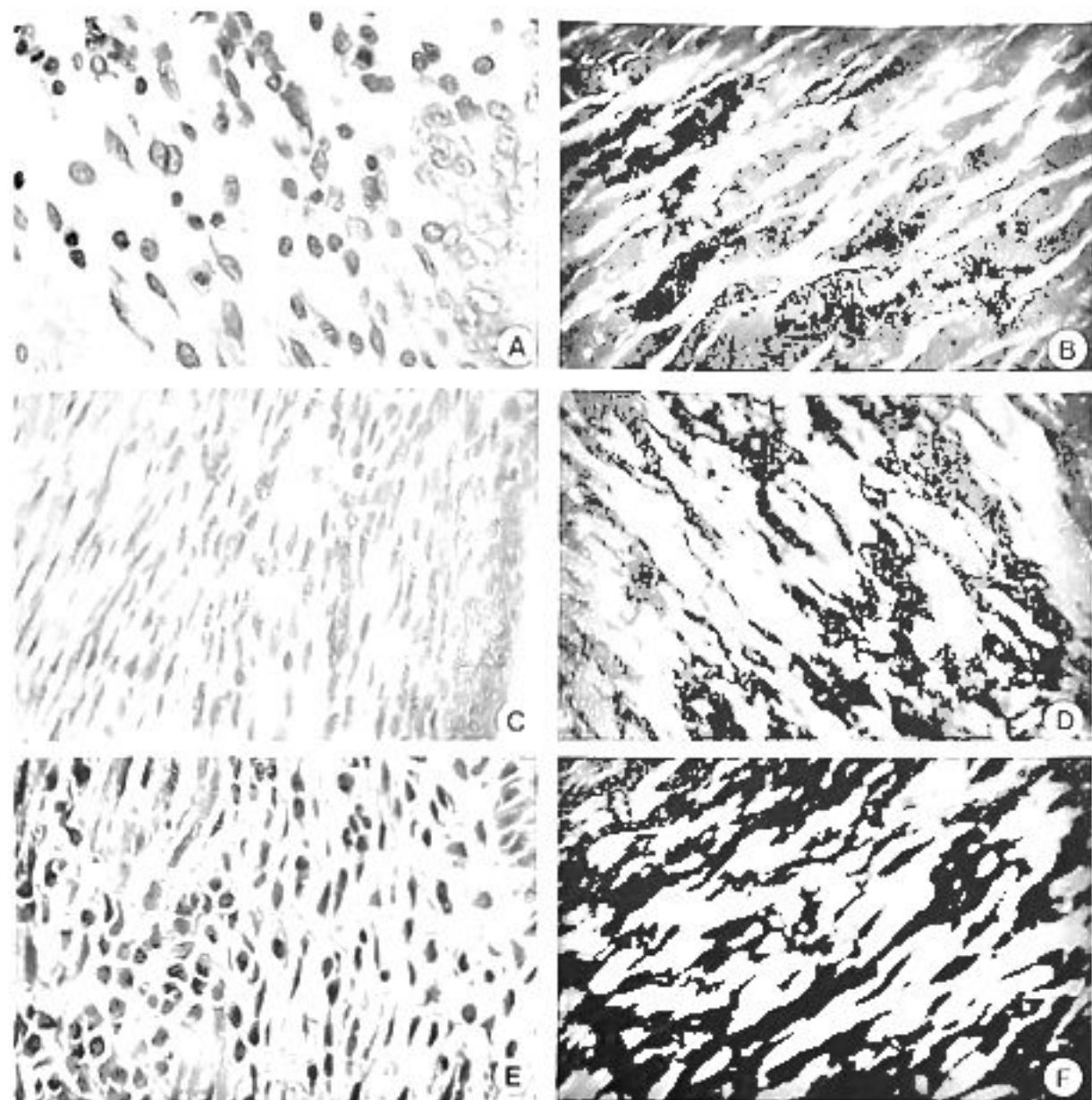


FIG. 1. Photomicrographs of sections across the uterine cervixes from rats in various experimental conditions. At left, sections were stained by Sirius red in alkaline solution in order to detect eosinophils. At right, sections from the same rats were studied by the picrosirius-polarization method (a specific procedure for the detection of oriented collagenous structures in tissue sections); all brightly birefringent structures, which shine against a dark background, are of collagenous nature. The connective tissue of an intrapartum rat (group II) shows a heavy eosinophilic infiltration (A) that corresponds with fragmentary and irregularly separated collagenous fibers with a loss of birefringence (B). In the nonpregnant chronic OVX rats (group I), no eosinophils could be recognized in the cervical stroma (C), and the picrosirius-polarization method shows a high birefringence (D) with collagen appearing as thick bundles of continuous and densely packed fibers. The cervical connective tissue from rats OVX during pseudopregnancy and treated with E_2 (group VIII) shows a significant eosinophilic infiltration (E), but the collagen birefringence (F), not different from that of the chronic OVX rats, shows a regular arrangement without degradation. Magnification: $\times 500$ (left); $\times 870$ (right).

have an effect on cervical ripening. Progesterone is essential for the maintenance of pregnancy, and its actions have been interpreted as blocking myometrium stimulants and inhibiting cervical tissue breakdown [8]. In the present study, Pg was not able to promote eosinophilic infiltration in the cervical stroma of either pregnant rats or those OVX during pseudopregnancy. These results contrast with findings from our previous work in which Pg promoted a significant infiltration [4]; the discrepancy may be explained if one takes into account that a pharmacological scheme was applied to chronically spayed rats in our earlier study.

Recently, Duchesne and Badia [27] showed that Pg was not able to promote rat uterine eosinophilic invasion. Although an early degranulation promoted by Pg [33] cannot be ruled out in order to explain a decreased number of eosinophils in both the results of Duchesne and Badia [27] and our present results, there are many reasons to suspect that in a physiologic state Pg has an inhibitory effect on leukocyte infiltration. After administration of the Pg antagonist onapristone to pregnant guinea pigs, a cervical infiltration by polymorphonuclear leukocytes associated with the morphological signs characteristic of cervical ripening was ob-

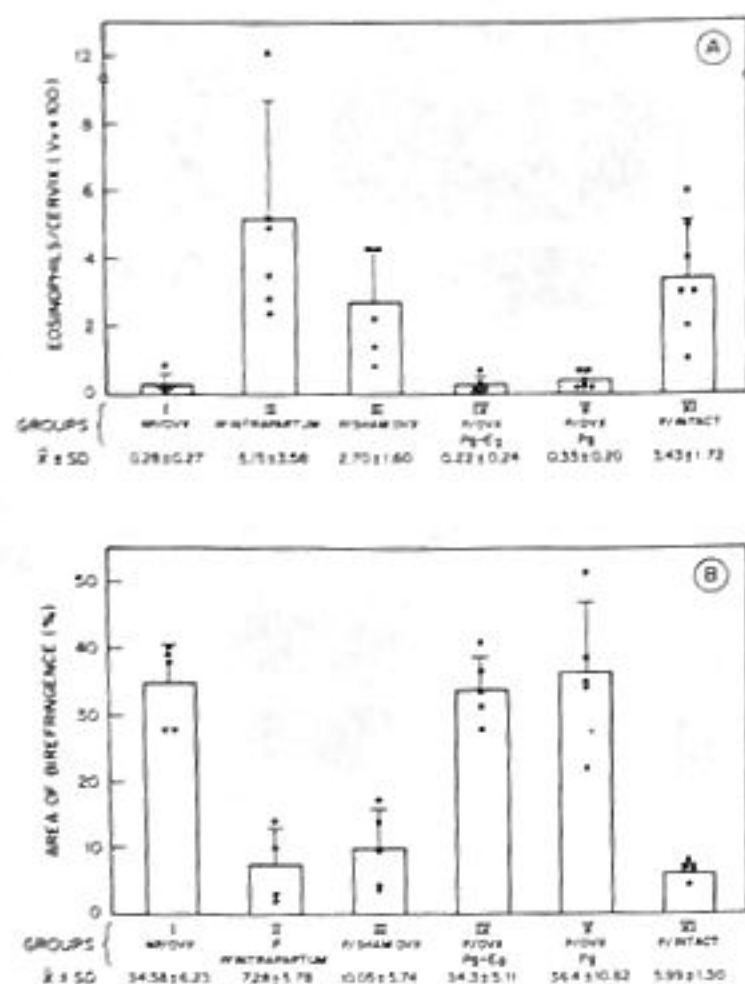


FIG. 2. Eosinophilic infiltration (A) and intensity of birefringence values (B), reflecting the quantity of orientated collagen, in cervical connective tissue from pregnant (P) and nonpregnant (NP) rats assigned to different experimental protocols. A) Bars represent mean values of volume density (areal fraction occupied by eosinophils: Vv), and dots are individual data from each animal. Mean Vv of eosinophils were significantly higher ($p < 0.01$) in intrapartum (group II), sham-OVX (group III), and intact-pregnant (group VI) rats compared to other groups. Between these control groups there were nonsignificant differences. Rats treated with Pg, those treated with Pg+E₂, and chronic OVX animals showed very low Vv levels of eosinophils, with no differences among these groups. B) Bars represent mean intensity of birefringence values, and dots are individual values in each experimental group. A perfect correlation between eosinophilic infiltration and loss of collagen birefringence was found (groups II, III, and VI), whereas in the groups without infiltration the intensity of birefringence was high (groups I, IV, and V).

served [26]. The possibility that Pg withdrawal might be associated with eosinophil influx is a very important issue. Further studies along this line are currently underway in order to determine whether Pg withdrawal may cause the eosinophilic infiltration of the rat cervix. Findings on the responses effected by Pg withdrawal as well as the influence of relaxin on cervical ripening at term will be published elsewhere.

On the other hand, many reports (for a review see Kelly [34]) have suggested that Pg and its agonists have an immunosuppressive or antiinflammatory effect; these observations are in agreement with the absence of infiltration response. It has been shown that Pg prevents graft rejection [35], and this may be largely due to a direct inhibition of leukocyte infiltration. The antiinflammatory nature of Pg controlling the influx of leukocytes to surrounding tissue may depend on its action on the blood vessels or on its ability to block chemoattractant protein synthesis [34].

In contrast, in E₂-treated rats OVX during pseudopreg-

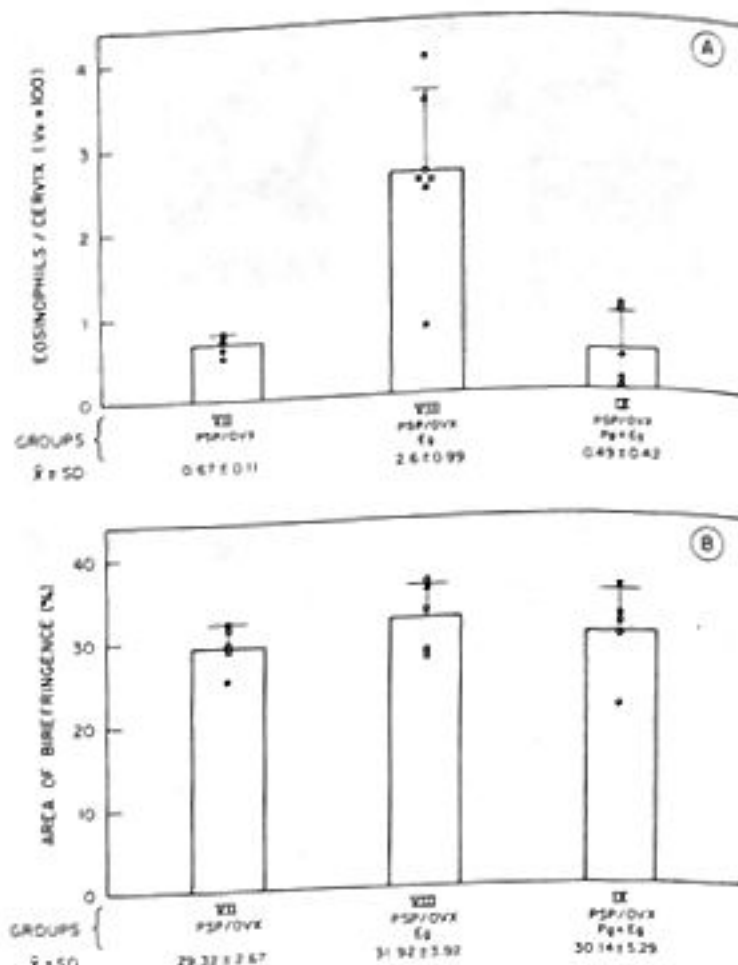


FIG. 3. Eosinophilic infiltration (A) and intensity of birefringence (B) in cervical stroma from rats OVX during pseudopregnancy and assigned to different experimental protocols. A) Bars represent mean values of volume density (areal fraction occupied by eosinophils: Vv), and dots are individual data from each animal. Mean Vv of eosinophils in OVX-E₂ rats (group VIII) were significantly higher ($p < 0.01$) than in control OVX (group VII) or OVX-E₂+Pg rats (group IX). B) Bars represent mean intensity of birefringence values, and dots are individual values. In all groups, including the one with heavy eosinophilic infiltration, collagen birefringence was high.

nancy, there was a striking eosinophilic cervical infiltration reaching levels similar to those of intrapartum animals. Previous studies established that eosinophils appear in the uterine horn of rats after estrogen administration [36, 37]; this effect appears to be mediated by the production and/or re-

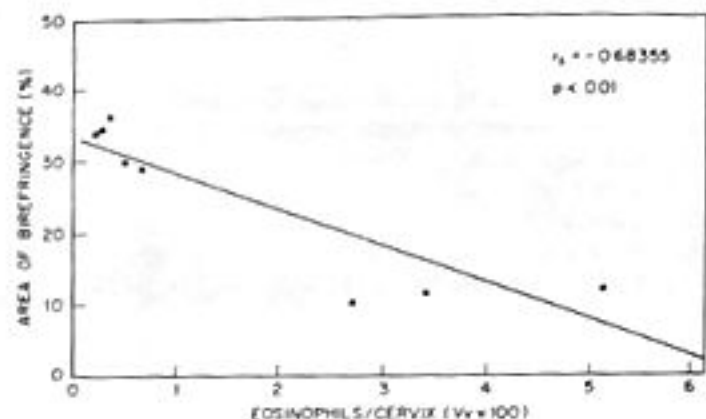


FIG. 4. Correlation between eosinophilic infiltration and intensity of birefringence in cervical stroma of all experimental groups except the rats OVX during pseudopregnancy and treated with E₂ alone (group VIII). For details of the experimental groups see Materials and Methods.

lease of an eosinophil chemotactic factor whose synthesis is estradiol-receptor mediated [38]. Recruitment of eosinophils into the cervical tissue during parturition or following E_2 treatment may resemble the process of leukocyte emigration from the blood to sites of inflammatory response. The distinct phases of leukocyte emigration—rolling, activation, firm adhesion, transendothelial migration—are mediated by a combined action of multiple families of adhesion molecules, cytokines, and chemoattractants [39]. The potential of the cervical tissue at term or after estrogen treatment to synthesize powerful chemoattractants to induce the eosinophil influx should be strongly considered. Chemotactic activity at the end of pregnancy has been observed in the rabbit cervix, and interleukin-8 production has been shown in the human cervix [25, 40]. As was previously suggested [4], it is interesting to note that regionally specific changes occur in the genital tract of the female rat in response to a given ovarian steroid. Duschene and Badia [27] supported and extended this observation after studying the distribution of eosinophils in the rat uterus horn and cervix in various endocrine contexts: pre- and postparturition, during the estrous cycle, and after ovariectomy followed by E_2 and Pg administration. They found remarkable differences in eosinophil infiltration in the uterus horn and the corresponding cervix depending on the hormonal environment.

The effect of ovarian steroids on the extracellular matrix of the cervical tissue has been previously investigated [28, 41]. In mice, treatment with estradiol induces loosening and scattering of the collagen fibrils [23]. In women, there is indirect evidence to suggest a relationship between estrogen and cervical softening. Prelabor cervical changes normally occur at a time when plasma estradiol is rising to maximal levels [42]. Our results showed that in the rat, neither E_2 nor Pg alone is responsible for the collagenolysis seen at term. An increase in the estrogen-progesterone ratio and an interaction of both steroids with relaxin may modulate myometrial contractility and cervical ripening. Whether these are direct actions or whether they are mediated via changes in local factors (i.e., prostaglandin) is not fully resolved. As a matter of fact, an important role of relaxin in the growth and softening of the cervix has been observed [15, 43, 44]. By injecting a monoclonal antibody for rat relaxin that neutralized the endogenous relaxin of pregnant rats, Sherwood's group [44] studied the histological changes in the cervical tissue and identified relaxin-dependent changes in the extracellular matrix. The mechanism(s) by which relaxin modifies the rat cervix remains to be determined, and studies underway in our laboratory are designed to investigate the influence of relaxin on the relationships between collagenolysis and eosinophilic infiltration.

An understanding of the regulation of labor at term would be of great benefit to the diagnosis, management, and outcome of dystocic parturition, a major problem in human health care and in animal production. Considering the similarities in polymorphonuclear leukocyte cervical infiltration at term between women and rats, the rat uterine cervix could be a useful model through which to perform studies related to the physiological role, if any, of this infiltration in the mechanism of labor. Several other features support the rat uterine cervix as a useful model for studies related to tumor biology, tissue invasion, and metastases-related processes (see Luque and Montes [4]). In cervical carcinomas of women, a positive correlation was found between the degree of eosinophilic infiltration and a better

prognosis of the disease [45]. Moreover, another interesting observation was made in experimentally induced cervical carcinomas in mice. If during induction the mice were treated with E_2 , the incidence of carcinomas decreased to half [46]; one could postulate that the lower incidence in cervical tumors is due to an increased eosinophilic infiltration promoted by estrogen and to a protective action of that infiltration.

In conclusion, this study indicates that eosinophilic infiltration and collagen degradation may be under different hormonal controls. It seems that E_2 stimulates and Pg inhibits eosinophilic infiltration of the cervix but that other factors are responsible for triggering the collagenolysis found in the cervical tissue at term. The fact that steroid replacement in OVX pregnant rats has not fully mimicked the intrapartum cervical changes is under investigation. We postulate that the E_2 -promoting effect on eosinophilic infiltration acts when Pg levels are low or absent and that minor changes in the declining levels of serum Pg may be sufficient to block the E_2 effect.

Even though it appears that eosinophilic infiltration and collagen degradation may be involved in the physiological process of cervical dilation, more information is needed to establish their precise roles. As proposed earlier by Liggins et al. [1], the onset of labor may be truly controlled by a "complex multifactorial system" in which no factor is dominant and more than one factor acts over the same processes to warrant the success of cervical dilation.

ACKNOWLEDGMENTS

We are very grateful to Professor G.S. Montes (School of Medicine, Sao Paulo, Brazil) and Professor A. Castro-Vazquez (School of Medicine, Mendoza, Argentina) for their comments during the writing process of this manuscript, to Dr. Elia G. Caldini (School of Medicine, Sao Paulo, Brazil) for collagen measurement advice, and to Mr. Juan C. Villarreal for indispensable assistance in animal care.

REFERENCES

1. Liggins GC, Forster CS, Grieves SA, Schwartz AL. Control of parturition in man. *Biol Reprod* 1977; 16:39-56.
2. Junqueira LCU, Zugaib M, Montes GS, Toledo OMS, Krizian RM, Shigihara KM. Morphologic and histochemical evidence for the occurrence of collagenolysis and for the role of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes during cervical dilation. *Am J Obstet Gynecol* 1980; 138:273-281.
3. Minamoto T, Arai K, Hirakawa S, Nagai Y. Immunohistochemical studies on collagen types in the uterine cervix in pregnant and non-pregnant states. *Am J Obstet Gynecol* 1987; 156:138-144.
4. Luque EH, Montes GS. Progesterone promotes a massive infiltration of the rat uterine cervix by the eosinophilic polymorphonuclear leukocytes. *Anat Rec* 1989; 223:257-265.
5. Osmer R, Rath W, Adelman-Grill BC, Fittkow C, Kuloczik M, Szeverenyi M, Tschesche H, Kuhn W. Origin of cervical collagenase during parturition. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 166:1455-1460.
6. Kitamura K, Ito A, Mori Y, Hirakawa S. Changes in uterine cervical collagenase with specific reference to cervical ripening. *Biochem Med* 1979; 22:332-337.
7. Rajabi MR, Dean DD, Beydoun SN, Woessner JE. Elevated tissue levels of collagenase during dilation of uterine cervix in human parturition. *Am J Obstet Gynecol* 1988; 159:971-976.
8. Challis JRG, Lye SJ. Parturition. In: Knobil E, Neill JD (eds.). *The Physiology of Reproduction*, 2nd Edition. New York: Raven Press; 1994; 985-1031.
9. Montes GS, Luque EH. Effects of ovarian steroids on vaginal smears in the rat. *Acta Anat* 1988; 133:192-199.
10. Castro-Vazquez AC, Carreño NB. A study of the sensory requirements for eliciting the pseudopregnancy response. *Brain Res* 1981; 230:205-220.
11. Luque EH, Castro-Vazquez AC. Sensory mechanisms involved in the induction of pseudopregnancy by progesterone: increased sensitivity

- to stimulation of the pudendal sensory field. *Endocrinology* 1983; 113:385-390.
12. Downing SJ, Sherwood OD. The physiological role of relaxin in the pregnant rat. IV. The influence of relaxin on cervical collagen and glycosaminoglycans. *Endocrinology* 1986; 118:471-479.
13. Smith MS, Freeman ME, Neill JD. The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology* 1975; 96:219-226.
14. Rothchild I. Role of progesterone in initiating and maintaining pregnancy. In: Bardin CW, Milgrom E, Mauvais-Jarvis P (eds.), *Progesterone and Progestins*. New York: Raven Press; 1983: 219-229.
15. Montes GS. Structural biology of the fibers of the collagenous and elastic systems. *Cell Biol Int* 1996; 20:15-27.
16. Bogomoletz W. Avantages de la coloration par le rouge Sirius de l'amyloïde et des éosinophiles. *Arch Anat Cytol Pathol* 1980; 28:252-253.
17. Weibel ER. Stereological principles for morphometry in electron microscopic cytology. *Int Rev Cytol* 1969; 26:235-302.
18. Anderson JM. Histometry. In: Bancroft JD, Stevens A (eds.), *Theory and Practice of Histological Techniques*, 2nd ed. London: Churchill Livingstone; 1982: 428-457.
19. Siegel S. *Nonparametric statistics for the behavioral sciences*. New York: McGraw-Hill; 1956.
20. Catala S, Deis RP. Effect of oestrogen upon parturition, maternal behavior and lactation in ovariectomized pregnant rats. *J Endocrinol* 1973; 56:219-225.
21. Cheah SH, Sherwood OD. Effect of preparturient 17β -estradiol and relaxin on parturition and pup survival in the rat. *Endocrinology* 1988; 122:1558-1563.
22. Burger LL, Sherwood OD. Evidence that cellular proliferation contributes to relaxin-induced growth of both the vagina and the cervix in the pregnant rat. *Endocrinology* 1995; 136:4820-4826.
23. Leppi TJ, Kinnison PA. The connective tissue ground substance in the mouse uterine cervix: an electron microscopic histochemical study. *Anat Rec* 1971; 170:97-117.
24. Fosang AJ, Handley CJ, Santer V, Lowther DA, Thorburn GD. Pregnancy-related changes in the connective tissue of the ovine cervix. *Biol Reprod* 1984; 30:1223-1235.
25. Uchiyama T, Ito A, Ikesue A, Nakagawa H, Mori Y. Chemotactic factor in the pregnant rabbit uterine cervix. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 167:1417-1422.
26. Hegele-Hartung C, Chwalisz K, Beier HM, Elger W. 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* 1989; 4:369-377.
27. Duchesne MJ, Badia E. Immunohistochemical localization of the eosinophil major basic protein in the uterus horn and cervix of the rat at term and after parturition. *Cell Tissue Res* 1992; 270:79-86.
28. Kroc RL, Steinetz BG, Beach VL. The effects of estrogen's, progestagens, and relaxin in pregnant and nonpregnant laboratory rodents. *Ann NY Acad Sci* 1959; 75:942-980.
29. Cullen BM, Harkness RD. The effect of hormones on the physical properties and collagen content of the rat's uterine cervix. *J Physiol* 1960; 152:419-436.
30. Morishige WK, Pepe GJ, Rothchild I. Serum luteinizing hormone, prolactin and progesterone levels during pregnancy in the rat. *Endocrinology* 1973; 92:1527-1530.
31. Yoshinaga K, Hawkins RA, Stocker JF. Estrogen secretion by the rat ovary in vivo during the estrous cycle and pregnancy. *Endocrinology* 1969; 85:103-112.
32. Sherwood OD, Crnekovic VE, Gordon WL, Rutherford JE. Radioimmunoassay of relaxin throughout pregnancy and during parturition in the rat. *Endocrinology* 1980; 107:691-698.
33. Grunert G, Porcia M, Neumann G, Sepulveda S, Tchernitchin AN. Progesterone interaction with eosinophils and with responses already induced by oestrogen in the rat. *J Endocrinol* 1984; 102:295-303.
34. Kelly RW. Pregnancy maintenance and parturition: the role of prostaglandin in manipulating the immune and inflammatory response. *Endocr Rev* 1994; 15:684-706.
35. Moriyama I, Sugawa T. Progesterone facilitates implantation of xenogeneic cultures cells in hamster uterus. *Nature* 1972; 236:150-153.
36. Ross R, Klebanoff SY. The eosinophilic leukocyte: fine structure studies of changes in the uterus during the estrous cycle. *J Exp Med* 1966; 124:653-659.
37. Tchernitchin A, Rooijck J, Tchernitchin N, Vandenheide J, Galand P. Dramatic early increase in uterine eosinophils after oestrogen administration. *Nature* 1974; 248:142-143.
38. Lee YH, Howe RS, Sha SJ, Teuscher C, Sheehan DM, Lytle R. Estrogen regulation of an eosinophil chemotactic factor in the immature rat uterus. *Endocrinology* 1989; 125:3022-3028.
39. Muller WA. Migration of leukocytes across the vascular intima: molecules and mechanisms. *Trends Cardiovasc Med* 1995; 5:15-20.
40. Barclay CG, Brennan JE, Kelly RW, Clader AA. Interleukin-8 production by the human cervix. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 169:625-632.
41. Cabrol D, Huszar G, Romero R, Naftolin F. Gestational changes in the rat uterine cervix: protein, collagen, and glycosaminoglycan content. In: Ellwood DA, Anderson ABM (eds.), *The Cervix in Pregnancy and Labour*. New York: Churchill Livingstone; 1981: 34-39.
42. Turnbull AC, Patten PT, Flint APF, Keirse MJNC, Jeremy JY, Anderson ABM. Significant fall in progesterone and rise in oestradiol levels in human peripheral plasma before onset of labor. *Lancet* 1974; 1:101-104.
43. Hwang J-J, Shanks RD, Sherwood OD. Monoclonal antibodies specific for rat relaxin. IV. Passive immunization with monoclonal antibodies during the antepartum period reduces cervical growth and extensibility, disrupts birth, and reduces pup survival in intact rats. *Endocrinology* 1989; 125:260-266.
44. Lee AB, Hwang J-J, Haab LM, Fields PA, Sherwood OD. Monoclonal antibodies specific for rat relaxin. VI. Passive immunization with monoclonal antibodies throughout the second half of pregnancy disrupts histological changes associated with cervical softening at parturition in rats. *Endocrinology* 1992; 130:2386-2391.
45. Lowe DG. Carcinoma of the cervix with massive eosinophilia. *Br J Obstet Gynaecol* 1988; 95:393-401.
46. Manoharan K, Rao AR. Influences of exogenous hormones on experimental cervical carcinogenesis in mice. *Indian J Exp Biol* 1985; 23:566-568.

Department of Human Physiology, Faculty of Biochemistry and Biological Sciences, C. C. 530 (3000) Santa Fe, Argentina

Leukocyte Infiltration and Collagenolysis in Cervical Tissue from Intrapartum Sheep

E. H. LUQUE¹*, M. M. BASSANI¹, J. G. RAMOS¹, M. MAFFINI¹, A. CANAL¹, L. KASS¹,
E. G. CALDINI², J. M. C. FERREIRA JR², M. MUÑOZ DE TORO¹ and G. S. MONTES²

Addresses of authors: ¹Department of Human Physiology, Faculty of Biochemistry and Biological Sciences, C. C. 530, Universidad Nacional del Litoral, 3000 Santa Fe, Argentina, *Corresponding author: Fax: 54 42 550944; E-mail: eluque@fbcb.unl.edu.ar; ²Laboratory for Cell Biology, The University of São Paulo School of Medicine, Av. Dr Arnaldo 455, São Paulo 01246-903, Brazil

With 5 figures

(Received for publication January 9, 1997)

Summary

Sheep uterine cervixes and cervical mucus were heavily infiltrated by neutrophils during labour, whereas samples of cervixes obtained from non-pregnant controls had no infiltrate. The neutrophilic infiltrate of the sheep uterine cervix at term was not homogeneously distributed throughout the organ: luminal mucus contained more neutrophils than tissues which, in turn, displayed a differential distribution, the superficial subepithelial layer being more heavily infiltrated than the deeper submucous layers. A widespread collagenolysis was observed in the sheep uterine cervix at term. The homogeneous morphological aspect of degradation of collagen fibres throughout the whole cervical stroma contrasted with the above-mentioned differential distribution of neutrophils. On the basis of previous reports showing that collagenolysis follows the leukocytic invasion of human and rat cervixes at term, a possible role for the neutrophilic infiltrate of the sheep uterine cervix is discussed.

Introduction

An understanding of the physiological mechanisms involved in regulation of labour would be of great benefit to the diagnosis, management, and outcome of dystocic parturition, a main problem in human health care and in animal production. The rate and degree at which the cervix must dilate and efface to allow expulsion of the foetus(es) varies among species. At one end of the spectrum, the cervix is practically no barrier in multiparous species such as rodents and swine; at the other extreme is the primate cervix, which presents a major barrier to the delivery of the foetus and frequently contributes to considerable obstetric problems (CHALLIS and OLSON, 1988). In this context, the ewe cervix has been considered close to the primate cervix.

As is the case in other mammalian species, the cervix of the ewe uterus is composed of fibroblasts, smooth muscle cells, and an extracellular matrix in which large bundles of collagen fibrils, elastic fibres, and proteoglycans are the main constituents (FITZPATRICK and DOBSON, 1979; FOSANG et al., 1984). Previous studies have demonstrated that cervical dilation during parturition is due to a widespread collagenolysis which follows a heavy polymorphonuclear leukocyte invasion of the uterine cervix. In women, it was found that the polymorphonuclear leukocytes that invade cervical tissue are neutrophils (JUNQUEIRA et al., 1980) and in rats are eosinophils (LUQUE and MONTES, 1989; DUCHESNE and BADIA, 1992; LUQUE et al., 1996).

Also, it was observed that the polymorphonuclear leukocytes degranulate in the cervical stroma at term, and this event coincides with the widespread collagenolysis seen in the extracellular matrix (JUNQUEIRA *et al.*, 1980; LEQUEL and MONTES, 1989).

In intrapartum sheep, both an eosinophilic infiltration and a decreased concentration of hydroxyproline (an indicator of collagen content) in cervical tissue have been reported (TOSANG *et al.*, 1984), but the authors did not suggest any relationships between both phenomena and cervical dilation. Using a myeloperoxidase assay to quantify leukocytic invasion, OWINY *et al.* (1995) described a significant increase in sheep cervical myeloperoxidase activity during labour. On the other hand, there is good evidence that both collagenase and proteolytic enzymes do increase at term in humans and rats (KITAMURA *et al.*, 1979; RAJABI *et al.*, 1988) and one of the sources of these enzymes are the infiltrating polymorphonuclear leukocytes (OSMER *et al.*, 1992). Taking in consideration that previous studies suggest that the polymorphonuclear leukocytes found in cervical tissue at term may perform a critical role in the physiological process of cervical dilation (JUNQUEIRA *et al.*, 1980; HEGELE-HARTUNG *et al.*, 1989; LEQUEL and MONTES, 1989), it appeared expedient to investigate whether there is any association between collagenolysis and leukocyte infiltration in the ewe's cervical stroma during parturition, using specific histochemical techniques. This task was undertaken and its objective was to study collagenolysis and polymorphonuclear leukocyte invasion in the ewe's cervical stroma at term by means of the Picrosirius-polarisation method and transmission electron microscopy.

Materials and Methods

Animals

Eleven ewes of corriedale breed, 3–4 years of age, average 45 ± 2 kg body weight (mean $\pm$ SEM), were maintained in the countryside at the University Teaching Farm. Animals were fed hay *ad libitum* and ≈ 400 g concentrates per day and given free access to water. All females used in the study had previously had a normal delivery.

Seven ewes were naturally mated at oestrus (day = 0). The average duration of gestation in this flock is 149 ± 5 days. Cervical samples were obtained from pregnant ewes at the onset of labour immediately prior to delivery of the foetus (when most of the softening of cervical tissue had already taken place) under anaesthesia with sodium pentobarbital (65 mg/ml of saline; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Before the traumatic stretching of the cervix by passage of the foetus, the cervix of the ewe is delineated from the uterus by the presence of 4–6 annular rings which project into the luminal space. Furthermore, this tissue has a distinct striated appearance. After removal from the animal, the cervix was removed (by gentle dissection with minimum traction) from the uterus immediately above the annular ring located on the uterine side, and separated from the vagina by cutting below the annular ring located on the vaginal side. The tissue was washed in cold saline and trimmed of excess fascia and vasculature with fine scissors. Each cervix was divided into uterine, intermediate and vaginal thirds, and samples were obtained across the full thickness of the cervical wall, cut transversely from a longitudinally open cervix. The other four ewes (non-pregnant controls) were killed in the local slaughter house and their cervixes were obtained following the same procedure described for pregnant females. Immediately after collection, the tissue was submerged in the appropriate fixative.

Tissue preparation and light microscopy

Tissue samples were fixed in 10% buffered formalin during 24 h at 5°C, dehydrated in graded concentrations of alcohol, embedded in paraffin, and sectioned at 5 μ m. Serial sections were alternately stained with either haematoxylin-eosin, picrosirius-haematoxylin, Sirius red in alkaline solution or by Giemsa.

Sections from all segments were examined for the presence of leukocytes using Sirius red in alkaline solution and Giemsa. Collagenolysis was studied by the picrosirius-polarization method (MONTES, 1996). Since a heterogeneous leukocyte distribution was observed, cell counts were made in luminal mucus and in two different areas of cervical stroma. Cervical stroma was divided into two zones (I and II), each 1600 μ m wide in pregnant animals, from basal membrane towards the outer layers (Fig. 1).

Sirius Red in alkaline solution. Sections were stained during 60 min in 0.5% Sirius Red dissolved in alkaline solution (NaOH, pH 10.5) followed by counterstaining with Harris' haematoxylin for 10 min. This

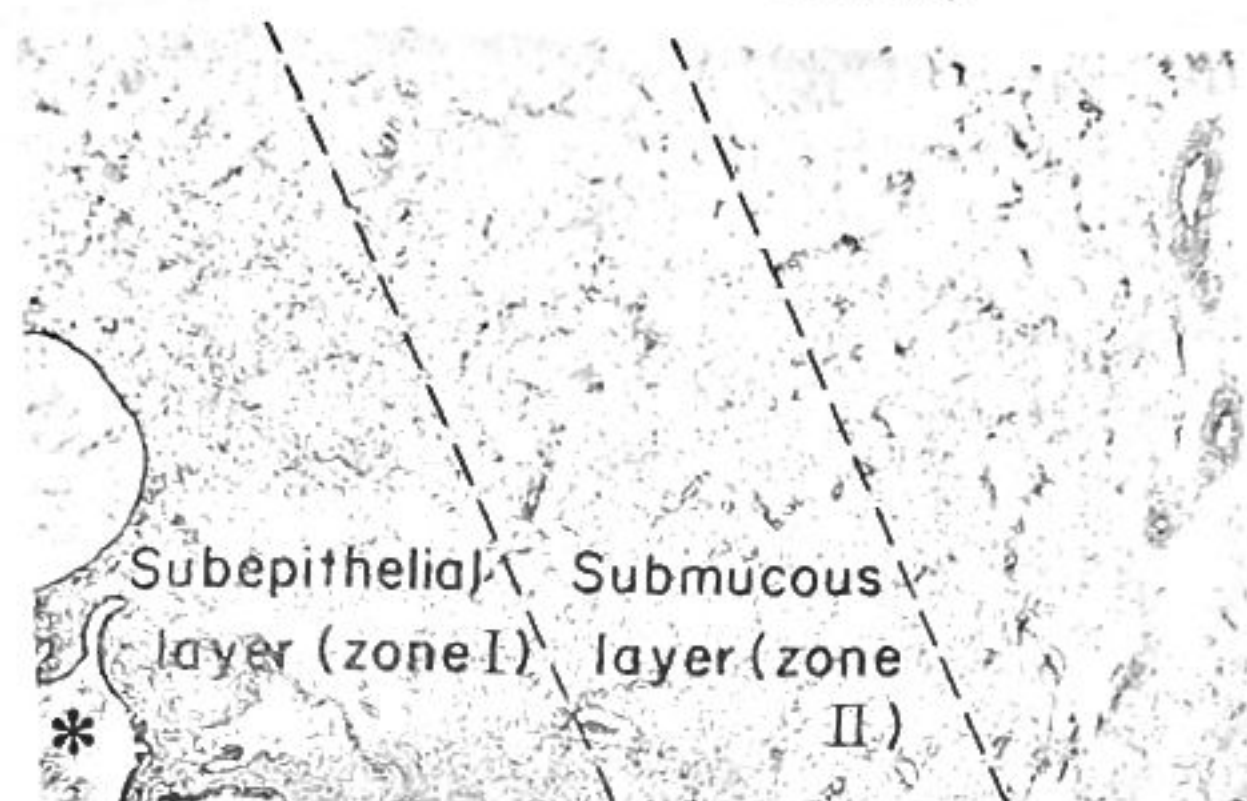


Fig. 1. Photomicrograph of a section across the uterine cervix of an intrapartum ewe showing the luminal mucus (*) and the different zones of the stromal tissue used to perform morphometric studies. Zone I corresponds to the adluminal subepithelial layer (lamina propria), whereas Zone II corresponds to the deeper submucous layer. It should be stressed that the layers defined in the present paper do not correspond to those of MORE (1984). Magnification: $41\times$.

method permits a distinct characterization of eosinophils in rat tissue sections: their specific granules were deeply stained in red, which strongly contrasted against a pale background (LUQUE and MONTES, 1989).

Giemsa. Sections were stained for 60 min in 1:10 Giemsa stain (Aldrich, Milwaukee, USA). This procedure permitted to study the leukocytes that invaded the cervical stroma, all the eosinophil granules are marked in red and neutrophil granules are not stained (though their nuclei were stained blue with haematoxylin).

Picrosirius-haematoxylin. Sections were stained for 30 min in a 0.1% Sirius Red solution (Direct Red 80, Aldrich) in saturated picric acid followed by rapid washing in running tap water and counterstaining with Harris' haematoxylin for 15 min, dehydration and mounting in synthetic resin. Picrosirius-stained sections were evaluated by polarization microscopy. This method is specific for orientated collagen molecules, in the sense that only these structures present a bright birefringence (MONTES, 1996). Collagen fibres normally appear regularly arranged, forming thick bundles of continuous and densely packed fibres (and thus correspond to brightly birefringent structures throughout the whole microscopic field). The disturbed appearance of the corroded collagenous framework (characteristic of collagenolysis) corresponds to fragmentary and irregularly separated collagenous structures, that are weakly birefringent. Thus, measurements of the intensity of birefringence were performed in specimens from both experimental groups. Polarization was obtained with two Polaroid filters; one of them located below the condenser and the other one above the objective lens. Light intensity was measured with a Reichert model 6 A E 9/65 microspectrophotometer, at a 585 nm wavelength. A low-power ($2.6\times$) Zeiss aplanatic objective was used in these measurements. The light intensity of the whole cervical stroma (more than 40 fields) from one section of each specimen was measured. Optical conditions were regulated so that the transmittance light intensity of sections was expressed as percentage area of birefringence.

Electron microscopy

Small fragments of samples of the uterine cervix were fixed in 2% glutaraldehyde dissolved in 0.15 M phosphate buffer at pH 7.2 for 2 h, followed by postfixation in 1% osmium tetroxide for 1 h, and overnight block staining in 0.5% aqueous uranyl acetate. The tissues were embedded in a polyester resin (Polilyte), thin-sectioned in an LKB ultratome, double-stained by uranyl acetate and lead citrate, and studied with a Philips 400 electron microscope (LUQUE and MONTES, 1989).

Statistical analyses

The point counting procedure (GUNDERSEN et al., 1988) was used to obtain the volume fraction of the neutrophils that invaded the cervical tissue. Neutrophils were estimated in the chosen fields using a

glass disc with a squared grid inserted in a focusing eyepiece and a $\times 100$ immersion objective (ANDERSON, 1982). The fraction of points occurring within the structure of neutrophils was determined and then compared to the total number of points lying within the cervical stroma. The volume fraction (V_v) of the object (neutrophils) was calculated by applying the formula given by WEIBEL (1969), as described by LUQUE et al. (1996).

The Mann-Whitney U-test was used to analyse the differences in neutrophilic infiltrates and collagenolysis of the cervical stroma between groups. The Kruskal-Wallis one-way analysis was used to analyse the differences of this variable between the uterine, intermediate and vaginal thirds of the cervix in each group (SIEGEL, 1956).

Results

Under the light microscope, the most prominent feature of the non-pregnant cervix was that it is comprised almost exclusively of dense connective tissue formed of thick collagen fibres that were stained dark red in the Picrosirius-stained sections. The study of intrapartum cervixes disclosed the dramatic changes in collagen morphology reported earlier in human (JUNQUEIRA et al., 1980) and rat (LUQUE and MONTES, 1989) cervixes. In fact the morphological evidence for collagenolysis could not be seen in the cervical stroma of non-pregnant controls whose collagen fibres were very well preserved (Fig. 2). In the intrapartum material, the collagen fibres appeared to be much thinner and more spread out, and the amount of collagen fibres per area was drastically reduced. No significant morphological difference was observed between the uterine, intermediate and vaginal thirds of the cervix with any of the stains used.

Electron microscopic examination of sheep cervical stroma during labour disclosed dramatic changes in collagen fine structure, described earlier in human (JUNQUEIRA et al., 1980) and rat (LUQUE and MONTES, 1989) cervixes. The regular arrangement of collagen fibrils, which is typical of non-pregnant controls (Fig. 3a), is markedly disturbed in the intrapartum cervical biopsy specimens. The electron microscopic picture of collagen degradation showed a corroded aspect: in longitudinal sections collagen fibrils appeared fragmentary; cross-sectioned fibrils showed a ragged and irregular outline (Fig. 3b).

The study of the cell populations in biopsy specimens of non-pregnant cervixes showed that fibroblasts were the main constituent. In the intrapartum material the cellular population increased, with the appearance of a few mast cells and macrophages in addition to the fibroblasts. The most common cells, however, were the polymorphonuclear leukocytes, which heavily infiltrated the stroma. The study of our material in the light and electron microscopes revealed a series of characteristics in regard to the appearance and distribution of these polymorphonuclear leukocytes. In sheep tissues, Sirius red in alkaline solution marked most of the polymorphonuclear leukocytes (i.e.: neutrophils, eosinophils), thus it was not useful for distinguishing among the different types of leukocytes.

Leukocyte infiltration in the subepithelial layer (zone I) of the intrapartum cervix was significantly higher (V_v : 3.76) than in the material obtained from non-pregnant ewes (V_v : 0.04), and mostly corresponded to neutrophils (V_v : 3.55) vs. eosinophils (V_v : 0.01) and mononuclear leukocytes (V_v : 0.28) (Fig. 4). The identity of neutrophils as the most numerous polymorphonuclear leukocyte type was confirmed by electron microscopy (Fig. 3b). As the distribution of the neutrophils was uneven throughout the extracellular matrix, this allowed us to perform morphometric analysis in two different zones (as described in M and M) of the cervical stroma. The intrapartum tissue showed higher infiltration in zone I (V_v : 3.55 ± 0.83) than in zone II (V_v : 0.39 ± 0.22); however, the greatest amount was found in cervical mucus (V_v : 6.72 ± 0.75) (Fig. 5a).

Collagenolysis could not be detected by the methods used in the non-pregnant group (Figs 2b, 3a and 5b), whereas the intrapartum cervical tissue displayed a widespread collagenolysis, as measured by the considerable reduction in the intensity of birefringence of collagen fibres when observed by polarization microscopy (Fig. 5b). The quantitation of collagen fibrous material by the picrosirius-polarization method showed the intense reduction in birefringence observed in histologic sections of intrapartum cervical stroma of both zone I (29.92 ± 12.52) and zone II (19.43 ± 12.85). While a significant association in the intrapartum cervical stroma

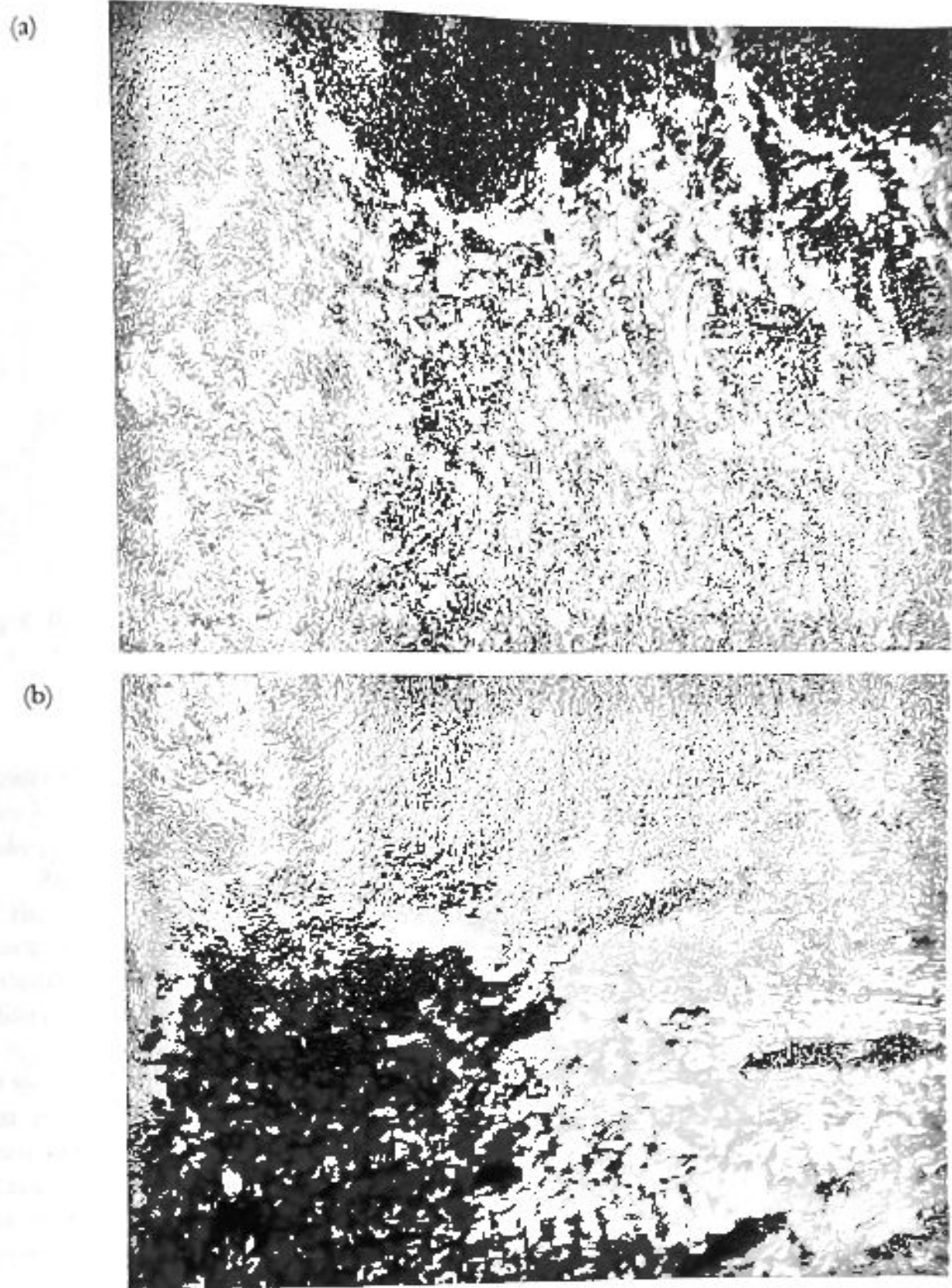


Fig. 2. (a) Photomicrograph of an intrapartum ewe cervix studied with the aid of the Picrosirius-polarization method (a specific procedure for the detection of orientated collagenous structures in tissue sections). All brightly birefringent structures, which shine against a dark background, are of a collagenous nature. Observe that collagenous fibres appear fragmentary and irregularly separated in intrapartum cervixes. (b) Section of a non-pregnant control cervix studied with the aid of the Picrosirius-polarization method. Observe that collagen appears as thick bundles of continuous and densely packed fibres; compare the regular arrangement of collagen fibres in this section with the disturbed appearance of the corroded collagenous framework depicted in section (a). Magnification: (a) 360 $\times$; (b) 140 $\times$.

was found in zone I between neutrophilic infiltration and collagen degradation, this phenomenon was not observed in zone II. It is interesting to observe that the widespread collagenolysis found in zone II was correlated with the absence of neutrophilic infiltration.

Neutrophils migrated preferentially towards the cervical lumen and they reached the higher amount in the luminal mucus.

Discussion

The foregoing results strongly suggest that: (a) leukocyte infiltration of the uterine cervix in intrapartum sheep at term corresponded mainly to neutrophils; (b) leukocytes were found in



Fig. 3. Electron micrographs of the cervix of a control (non-pregnant) ewe (a) and of a cervix sample obtained during parturition (b). (a) The non-pregnant cervix is composed almost exclusively of densely packed blocks of collagen fibrils. Few fibroblasts and their slender cytoplasmic processes intermingle among the fibrils. (b) This electron micrograph contains the ultrastructural equivalent of the neutrophils detected under the light microscope in the cervixes obtained during labour; observe that this cell displays the fine structural pattern typical of neutrophilic leukocytes and contains conspicuous specific granules. The regular arrangement of collagen fibrils, which is typical of non-pregnant controls – compare with the electron micrograph in (a) – is markedly disturbed in this picture. An evident halo surrounding the neutrophil occupies most of the area normally filled by collagen fibrils. Note the varying diameters of the transversely sectioned fibrils that are being degraded: the electron microscopic picture of collagen degradation shows a corroded aspect, particularly obvious in cross sections, where fibrils show a ragged and irregular outline (arrowhead). Magnification: (a) and (b) $\times 8,000$.

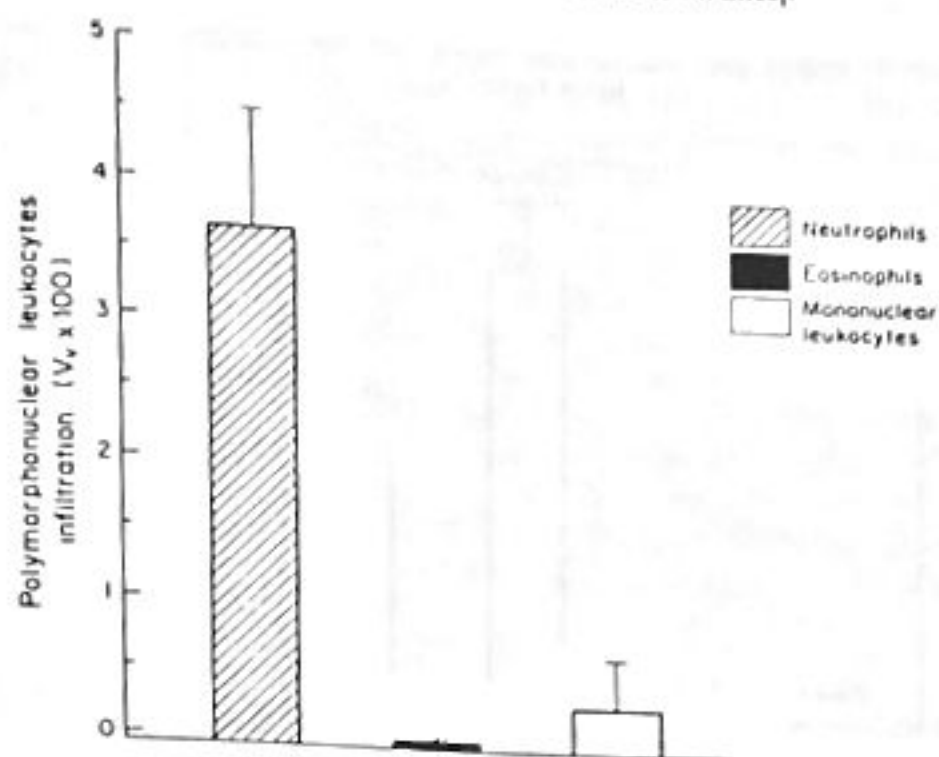


Fig. 4. Polymorphonuclear leukocyte infiltration in the subepithelial layer (Zone I) of the cervical stroma of an intrapartum ewe. Neutrophils are the main type of polymorphonuclear leukocyte found in the cervical stroma during parturition.

greater amounts in cervical luminal mucus than in the stroma; (c) there was a polarized neutrophil distribution but a widespread cervical collagenolysis; (d) there was a lack of association between leukocyte distribution and collagenolysis in the submucous layer (zone II).

Previous studies have demonstrated that the physiological ripening that permits dilation of the cervical canal during parturition is due to a widespread collagenolysis that follows a heavy polymorphonuclear leukocyte invasion of the uterine cervix (JUNQUEIRA *et al.*, 1980; MINAMOTO *et al.*, 1987; LUQUE and MONTES, 1989; OSMER *et al.*, 1992). The cells that infiltrate human cervical tissue at term are neutrophils (JUNQUEIRA *et al.*, 1980; MINAMOTO *et al.*, 1987) while eosinophils are responsible for the infiltration of the rat cervix (LUQUE and MONTES, 1989; DUCHESNE and BADIA, 1992; LUQUE *et al.*, 1996). The current study for the first time, to our knowledge, indicates that the leukocytic infiltration of the ewe cervix is neutrophilic. OWINY *et al.* (1995), measuring myeloperoxidase activity, have found a significant increase of this enzyme in ewe cervical tissue during labour; since it is well known that this enzyme is found in neutrophils and, at much lower concentrations, in monocytes and macrophages; thus, OWINY's observation supports the present findings.

The significance of cervical neutrophilia at term is subject to speculation. However, since the foregoing observations present morphologic evidence for a widespread collagenolysis at term and previous studies have shown that neutrophils contain collagenase (HORWITZ *et al.*, 1977; OSMER *et al.*, 1992), it may be suggested that these polymorphonuclear leukocytes are involved, at least in part, in the loosening of the collagenous framework that follows the neutrophilic invasion of the uterine cervix. However, other authors described a leukocytic infiltration of the ovine cervix in association with established labour, but they do not suggest a role for these cells before the onset of labour (OWINY *et al.*, 1995). Based on their observations, they suggest that leukocytes could participate in cervical connective-tissue reorganization during dilatation (OWINY *et al.*, 1995). Studying the changes in softening of the ovine cervix during pregnancy, it was found that most of the softening takes place immediately prior to the onset of labour and delivery of the foetus (OWINY *et al.*, 1991). This observation supports the idea that cervical dilation is an acute process.

Another possible role for the neutrophilic invasion of the cervix in late pregnancy may be the formation of intercommunicating canals through the cervical extracellular matrix. These channels would permit a rapid diffusion of hormones or other collagenase-activating factors that would act on pre-existing collagenases (such as collagen-bound collagenases) at term,

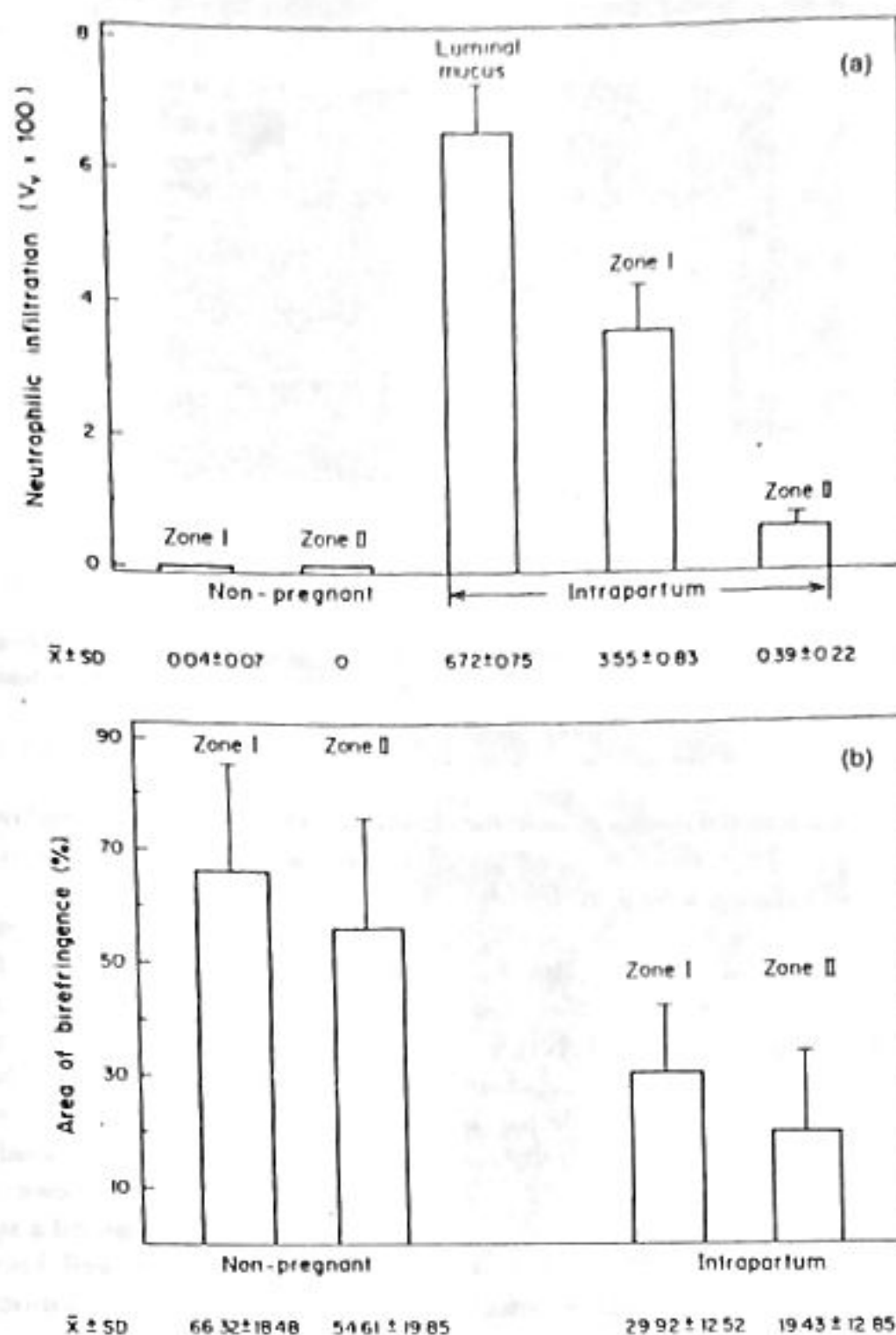


Fig. 5. Neutrophilic infiltration (a) and intensity of birefringence values (b), the latter reflects the amount of orientated collagen in cervical connective tissue from intrapartum and non-pregnant ewes. (a) Bars represent mean values of volume density (areal fraction occupied by neutrophils: V_v) $\pm$ SD. Mean V_v of neutrophils were significantly higher ($P < 0.01$) in intrapartum ewes compared to the non-pregnant control group. When comparing the neutrophilic invasion in different areas of intrapartum cervixes significant differences were also found; the largest amount was found in luminal mucus, whereas zone I has a moderate neutrophilic invasion and zone II has very low levels of polymorphonuclear leukocyte infiltration. (b) Bars represent mean intensity of birefringence values in each group. A perfect correlation was found between the absence of neutrophilic infiltration with a high collagen birefringence (no collagen degradation) in non-pregnant control animals. In intrapartum cervical stroma (zone I) an association was found between neutrophilic infiltration and low intensity of birefringence (loss of collagen orientation), but in zone II the low intensity of birefringence was correlated with absence of neutrophilic infiltration.

because it has been shown that the migration of neutrophils increases the permeability of certain tissues (MILKS et al., 1986). In addition, it has been postulated that the polymorphonuclear leukocyte invasion of the cervix at parturition might be involved in an immunological process, constituting a barrier to infections through the opening of the cervical canal (KELLY, 1994).

It seems probable that neutrophilic invasion in sheep cervical tissue at term should be under hormonal control. Progesterone is essential for the maintenance of pregnancy in most,

if not all, eutherian mammals (SHORT, 1969) and reduces the ability of the female to combat intrauterine bacterial infections (ROWSON et al., 1953; HAWK et al., 1960; KELLY, 1994). This latter effect is thought to result, at least in part, from the progesterone-dependent reduction of uterine leukocyte infiltration (BROOME et al., 1960; STAPLES et al., 1983; HEGELE-HARTUNG et al., 1989). Parturition in sheep is preceded by a fall in plasma progesterone and increase of estradiol, and both steroids have been implicated in regulation of cervical softening in sheep (LEDGER et al., 1985; OWINY et al., 1987). Studying the ovarian steroid control of the infiltration while estradiol stimulates, progesterone inhibits eosinophilic infiltration, and that other factors are responsible for triggering collagenolysis (LUQUH et al., 1996). An understanding of the regulation of labour at term would be of great benefit to the diagnosis, management, and outcome of dystocic parturition, a major problem in human health care and in animal production. Further studies addressing the physiological role, if any, of the polymorphonuclear infiltration and its controls in the cervical tissue at the time of parturition, will hopefully improve the knowledge about this subject.

Acknowledgements

This study was supported by the Argentine National Research Council (CONICET, PID 3157500/88 and 3752/92), Universidad Nacional del Litoral (CAI + D 468/89) and the Brazilian National Research Council (CNPq). We are very grateful to Mr J. C. VILLARREAL for indispensable assistance in animal care. E.H.L. and G.S.M. are Career Investigators of the CONICET and CNPq, respectively. J.M.C.F. Jr is a Researcher at the Butantan Institute (São Paulo, Brazil).

References

- ANDERSON, J. M., 1982: Histometry. In: BANCROFT, J. D. and A. STEVENS (eds.) *Theory and practice of histological techniques*, 2nd edn., pp. 428–457. Churchill Livingstone, London.
- BROOME, A. W., A. J. WINTER, S. H. MCNUFF, and L. E. CASIDA, 1960: Variations in uterine response to experimental infection due to the hormonal state of the ovaries. II. The mobilization of leukocytes and their importance in uterine bactericidal activity. *Amer. J. Vet. Res.* **21**, 675–682.
- CHALLIS, J. R. G., and D. M. OLSON, 1988: Parturition. In: KNOBIL, E. and J. D. NEILL (eds.) *The physiology of reproduction*, 1st edn., pp. 2177–2216. Raven Press, New York.
- DUCHESNE, M. J., and E. BADIA, 1992: Immunohistochemical localization of the eosinophil major basic protein in the uterus horn and cervix of the rat at term and after parturition. *Cell Tissue Res.* **270**, 79–86.
- FITZPATRICK, R. J., and H. DOBSON, 1979: The cervix of the sheep and goat during parturition. *Anim. Reprod. Sci.* **2**, 209–224.
- FOSANG, A. J., C. J. HANDLEY, V. SANTER, D. A. LOWTHER, and G. D. THORBURN, 1984: Pregnancy-related changes in the connective tissue of the ovine cervix. *Biol. Reprod.* **30**, 1223–1235.
- GUNDERSEN, H. J. G., T. F. BENDTSEN, L. KORBO, N. MARCUSSEN, A. MOLLER, K. NIELSEN, J. R. NYENGAARD, B. PAKKENBERG, F. B. SØRENSEN, A. VESTERBY, and M. J. WEST, 1988: Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* **96**, 379–394.
- HAWK, H. W., G. D. TURNER, and J. F. SYKES, 1960: The effect of ovarian hormones on the uterine defence mechanism during the early stages of induced infection. *Amer. J. Vet. Res.* **21**, 644–648.
- HEGELE-HARTUNG, C., K. CHWALISZ, H. M. BEIER, and W. ELGER, 1989: Ripening of the uterine cervix of the guinea-pig after treatment with the progesterone antagonist onapristone (ZK 98, 299): an electron microscopic study. *Human Reprod.* **4**, 369–377.
- HORWITZ, A. L., A. J. HANCE, and R. G. CRYSTAL, 1977: Granulocyte collagenase: selective digestion of type I relative to type III collagen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 897–901.
- JUNQUEIRA, L. C. U., M. ZUGAIB, G. S. MONTES, O. M. S. TOLEDO, R. M. KRISZIAN, and K. M. SHIGIHARA, 1980: Morphologic and histochemical evidence for the occurrence of collagenolysis and for the role of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes during cervical dilation. *Amer. J. Obstet. Gynecol.* **138**, 273–281.

- KELLY, R. W., 1994: Pregnancy maintenance and parturition: the role of prostaglandin in manipulating the immune and inflammatory response. *Endocr. Rev.* **15**, 684-706.
- KITAMURA, K., A. ITO, Y. MORI, and S. HIRAKAWA, 1979: Changes in uterine cervical collagenase with specific reference to cervical ripening. *Biochem. Med.* **22**, 332-337.
- LEDGER, W. L., M. A. WEBSTER, A. B. M. ANDERSON, and A. C. TURNBULL, 1985: Effect of inhibition of prostaglandin synthesis on cervical softening and uterine activity during ovine parturition resulting from progesterone withdrawal induced by epostane. *J. Endocrinol.* **105**, 227-233.
- LUQUE, E. H., and G. S. MONTES, 1989: Progesterone promotes a massive infiltration of the rat uterine cervix by the eosinophilic polymorphonuclear leukocytes. *Anat. Record* **223**, 257-265.
- LUQUE, E. H., J. G. RAMOS, H. RODRIGUEZ, and M. M. MUÑOZ DE TORO, 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.
- MILKS, L. C., G. P. CONYERS, and E. B. CRAMER, 1986: The effect of neutrophil migration on epithelial permeability. *J. Cell Biol.* **103**, 2729-2738.
- MINAMOTO, T., K. ARAI, S. HIRAKAWA, and Y. NAGAI, 1987: Immunohistochemical studies on collagen types in the uterine cervix in pregnant and nonpregnant states. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **156**, 138-144.
- MONTES, G. S., 1996: Structural biology of the fibres of the collagenous and elastic systems. *Cell Biol. Int.* **20**, 15-27.
- MORI, J., 1984: Anatomy and histology of the cervix uteri of the ewe: New insights. *Acta Anat.* **120**, 156-159.
- OSMER, R., W. RATH, B. C. ADELMANN-GRILL, C. FETIKOW, M. KUTLOCIK, M. SZEVEZENYI, H. TSCHESCHE, and W. KUHN, 1992: Origin of cervical collagenase during parturition. *Amer. J. Obstet. Gynecol.* **166**, 1455-1460.
- OWINY, J. R., R. J. FITZPATRICK, D. G. SPILLER, and J. APPLETON, 1987: Scanning electron microscopy of the wall of the ovine cervix uteri in relation to tensile strength at parturition. *Res. Vet. Sci.* **43**, 36-43.
- OWINY, J. R., R. J. FITZPATRICK, D. G. SPILLER, and H. DOBSON, 1991: Mechanical properties of the ovine cervix during pregnancy, labour and immediately after parturition. *Br. Vet. J.* **147**, 432-436.
- OWINY, J. R., R. O. GILBERT, C. H. WAHL, and P. W. NATHANIELSZ, 1995: Leukocytic invasion of the ovine cervix at parturition. *J. Soc. Gynecol. Invest.* **2**, 593-596.
- RAJABI, M. R., D. D. DEAN, S. N. BEYDOON, and J. F. WOESSNER, 1988: Elevated tissue levels of collagenase during dilatation of uterine cervix in human parturition. *Amer. J. Obstet. Gynecol.* **159**, 971-976.
- ROWSON, L. E. A., G. E. LAMMING, and R. M. FRY, 1953: The influence of ovarian hormones on uterine infection. *Nature* **171**, 749-750.
- SHORT, R. V., 1969: Implantation and the maternal recognition of pregnancy. In: WOLSTENHOLME, G. E. W., and M. O'CONNOR (eds). *Giba Foundation Symposium on Foetal Autonomy*, pp. 2-26. Churchill Livingstone, London.
- SIEGEL, S., 1956: *Nonparametric statistics for the behavioral sciences*. McGraw-Hill, New York.
- STAPLES, L. D., R. B. HEA, F. B. P. WOODING, and G. J. KING, 1983: Migration of leukocytes into the uterus after acute removal of ovarian progesterone during early pregnancy in the sheep. *Placenta* **4**, 339-349.
- WEIBEL, E. R., 1969: Stereological principles for morphometry in electron microscopic cytology. *Int. Rev. Cytol.* **26**, 235-302.

Role of Relaxin and Estrogen in the Control of Eosinophilic Invasion and Collagen Remodeling in Rat Cervical Tissue at Term¹

Enrique H. Luque,^{2,3} Mónica M. Muñoz de Toro,¹ Jorge G. Ramos,³ Horacio A. Rodríguez,³ and O. David Sherwood⁴

Department of Human Physiology,¹ Faculty of Biochemistry and Biological Sciences, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina

Department of Molecular and Integrative Physiology and the College of Medicine,⁴ University of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana, Illinois 61801

ABSTRACT

Ripening and dilation of the rat cervix at term involves a widespread reduction in the density and organization of collagen fibers following a polymorphonuclear eosinophilic invasion. These are hormonally regulated events; however, the correlation between hormonal milieu and these morphological changes is not well understood. To investigate the role of preparturient relaxin and estradiol-17 β (E₂) in cervical collagen remodeling and eosinophilic infiltration, pregnant rats were either sham-ovariectomized (group C) or ovariectomized in the morning of Day 22. Ovariectomized rats were treated with E₂ (group OE), relaxin (group OR), E₂ plus relaxin (group OER), or hormone vehicles (group O). There were 4 or 5 animals per group. Cervices were taken from animals killed approximately 1 h before expected parturition. Five-micrometer serial sections of paraffin-embedded cervixes were stained with either Sirius Red in alkaline solution to measure eosinophil infiltration or in Picrosirius to measure collagen birefringence. Ovariectomized rats treated with E₂ (group OE or OER) showed high levels of eosinophilic infiltration that did not differ from those in group C intact controls. However, the values of eosinophilic infiltration in ovariectomized rats treated with relaxin or hormone vehicles (groups OR and O) were low and far below ($p < 0.01$) those of groups OE and OER. In ovariectomized rats treated with E₂ alone (group OE), the widespread reduction in collagen organization that occurred in group C controls was not observed. It was only in ovariectomized rats treated with relaxin or E₂ + relaxin (groups OR and OER) that the values of birefringence were low, and they were as low as in control group C. In conclusion, this study indicates that eosinophilic infiltration and collagen remodeling in the rat cervix at term are under the control of different hormones: E₂ stimulates eosinophilic invasion, and relaxin promotes a widespread reorganization of collagen fibers.

INTRODUCTION

In mammals, including humans, rats, and pigs, cervical ripening is essential for vaginal delivery [1-3]. Cervical ripening is thought to be largely attributable to disruption of ordered collagen bundles [1-5] following a polymorphonuclear leukocyte invasion of cervical tissue in humans, rats, sheep, and guinea-pigs [6-13].

The mechanisms that control polymorphonuclear leu-

kocyte invasion to cervical tissue and the role, if any, of polymorphonuclear leukocytes in subsequent disruption of collagen bundles are poorly understood for all mammalian species. Nevertheless, some progress has been made with studies on the rat. We reported that, in the rat, the eosinophilic infiltration and collagen disruption that normally occur at the time of delivery may be under control of different hormones [14]. We found that estradiol-17 β (E₂) stimulates eosinophilic infiltration of the rat cervix [14], and this finding is supported by the demonstration of estrogen regulation of an eosinophil chemotactic factor in the immature rat uterus [15]. In contrast, progesterone was found to inhibit eosinophilic infiltration of the cervix [14]. Neither estrogen nor progesterone alone were found to be responsible for the collagen remodeling seen at term [14].

There is reason to suspect that relaxin plays a key role in regulating the modifications that occur in the rat cervix during pregnancy. Relaxin, which is produced in the corpus luteum and endometrium of the female rat [16], is present at high levels in the peripheral circulation throughout the second half of pregnancy [17]. It is well established that relaxin plays a major role in promoting growth and softening of the rat cervix [18-20]. Whereas the mechanism(s) whereby relaxin modifies the rat cervix remains to be determined, there is limited qualitative evidence that it does so by reducing the density and organization of collagen bundles [19, 20].

The hypothesis tested in this report is that relaxin brings about its effects on rat cervical collagen remodeling, at least in part, by promoting eosinophilic invasion and degranulation. In the study reported in this paper, relaxin-induced changes in the organization of cervical collagen fibers were quantified for the first time. The Picrosirius-polarization method, a histochemical procedure that allows morphometric analysis of collagen fiber organization, was used [21, 22]. Employing this procedure, Junqueira et al. [6] observed a greater reduction in collagen fiber density than was found by measuring the amount of collagen by means of its hydroxyproline content.

MATERIAL AND METHODS

Animals

Female adult rats (approximately 90 days of age and 200-250 g of body weight) of a Wistar-derived strain bred in the Department of Human Physiology (Santa Fe, Argentina) were used. Animals were maintained in a controlled environment (22 $\pm$ 2°C; lights-on from 0600-2000 h), and they had free access to pellet laboratory chow (Nutric, Córdoba, Argentina) and tap water. Either bilateral ovariectomy or sham ovariectomy was performed under ether anesthesia

Accepted May 11, 1998.

Received February 24, 1998.

¹This study was supported by grants from the Argentine National Research Council (CONICET, PID 3752/92 & BID 802/OCAR PCIT442) and the Universidad Nacional del Litoral (CAI+D 468/89). E.H.L. is a Career Investigator of the CONICET.

²Correspondence: Enrique H. Luque, Department of Human Physiology, Faculty of Biochemistry and Biological Sciences, Casilla de Correo 530, Santa Fe, Argentina. FAX: 54 42 550944; e-mail: efluque@fbc.unl.edu.ar

on primiparous pregnant rats at 0600 h on Day 22 (Day 1 = the day sperm were found in the vaginal smear). In our colony, delivery in untreated control rats normally occurs on Day 23 between 1230 and 1400 h. After ovariectomy or sham operation, the animals were assigned to two sets of 5 different experimental groups.

Hormone Treatments

Both sham-ovariectomized (group C, $n = 5$) and ovariectomized (group O, $n = 5$) controls received s.c. injections of E_2 vehicle (0.1 ml sesame oil) at 0800 h on Day 22 and Day 23, and of relaxin vehicle (0.2 ml of 1% benzopurpurin [Sigma Chemical Co., St. Louis, MO] in sterile saline) at 0700 h, 1400 h, and 1800 h on Day 22 and at 0700 h on Day 23. The remaining ovariectomized rats received hormones. Group OE ($n = 5$) received 1.0 μg E_2 (Sigma Chemical Co.) and relaxin vehicle as described for groups C and O. Group OR ($n = 5$) received highly purified porcine relaxin [23] (100 μg at 0700 h on Day 22, 200 μg at 1400 h and 1800 h on Day 22, and at 0700 h on Day 23) and E_2 vehicle as described for groups C and O. Group OER ($n = 4$) received both E_2 and relaxin as described for groups OE and OR. The protocol for E_2 administration was chosen because it maintains serum E_2 levels comparable to those in late pregnancy [24]. The regimen of relaxin administration was chosen with the intention of reproducing the second antepartum elevation of plasma relaxin levels [25]. All rats were killed at 1200 h on Day 23.

In order to determine whether hormone replacement with E_2 and relaxin had effects that were similar to those of endogenous hormones during pregnancy, a second set of rats, treated as above, delivered pups. Birth parameters were determined in groups C ($n = 8$), OE ($n = 5$), OR ($n = 4$), and OER ($n = 4$) as previously described [26]. The birth parameters were as follows: 1) length of gestation—number of hours between the estimated time of ovulation (0200 h on Day 1) and the initiation of active labor; 2) duration of straining—time interval between the start of active labor and the appearance of first pup; 3) duration of delivery—time interval between the appearance of the first pup and the expulsion of the last pup and its placenta; 4) percentage of pups born alive—the number of pups born alive/total number of pups born $\times 100$; 5) percentage of pups surviving 48 h postpartum—the number of pups alive after 48 h/number of pups born alive $\times 100$.

Preparation of Cervical Tissue for Light Microscopy

Uterine cervixes were fixed by immersion in 10% buffered formalin for 24 h, dehydrated in graded concentrations of alcohol, embedded in paraffin, and sectioned at 5 μm . Serial sections of whole cervixes were taken along a cervical canal and stained with either Picrosirius-hematoxylin or Sirius Red in alkaline solution.

Measurement of Eosinophil Invasion

Cervical sections were stained for 60 min in 0.5% Sirius Red (Direct Red 80; Aldrich, Milwaukee, WI) dissolved in alkaline solution (NaOH, pH 10.5) and then counterstained with Harris' hematoxylin (Biopur, Rosario, Argentina) for 10 min. This method permits the identification of eosinophils in tissue sections: their specific granules are deeply stained in red, which strongly contrasts against a pale background [7, 27]. Because eosinophilic infiltration does not occur uniformly throughout the cervical stroma, the quan-

tification in each section was performed in the whole cervical stroma. For each cervical specimen, three sections were evaluated, and at least 40 fields were counted in each section [14, 28]. Means for each rat were calculated and used for statistical analysis.

Measurement of Organization of Collagen Fiber Bundles

Cervical sections were stained for 30 min in a 0.1% Sirius Red solution in saturated picric acid, washed rapidly in tap water, counterstained with Harris' hematoxylin for 15 min, dehydrated, and mounted in synthetic resin. Picrosirius-hematoxylin-stained sections were evaluated by polarization microscopy. This method is specific for orientated collagen molecules, in the sense that only these structures present a bright birefringence [22]. Collagen fibers normally form thick bundles of densely packed and regularly arranged fibers, and they appear as brightly birefringent structures throughout the whole microscopic field. When collagen fibers are not dense and/or not regularly arranged, they are weakly birefringent. In order to quantify the influence of hormone treatment on collagen fiber organization, measurement of the intensity of birefringence was performed in specimens from the different experimental groups. Polarization was obtained with two Polaroid filters, one located below the condenser and the other, above the objective lens. Light intensity was measured with a Reichert (Reichert Jung, Nossloch, Germany) model 6 A E 9/65 microspectrophotometer at a 585-nm wavelength. A low-power ($\times 2.6$) Zeiss aplanatic objective (Carl Zeiss, Inc., Thornwood, NJ) was used in these measurements. The light intensity of the whole cervical stroma (more than 40 fields) from one section of each specimen was measured. Optical conditions were regulated so that the transmittance light intensity of each cervix was expressed as the percentage area of birefringence. This technique has been used previously to measure the extent of change in collagen fiber organization [6, 14, 22].

Statistics

The point-counting procedure [28] was used to obtain the data used for morphometric analysis of the number of eosinophils invading the cervical tissue. Eosinophils were counted using a glass disc with a squared grid inserted in a focusing eyepiece and a $\times 100$ immersion objective [29]. The fraction of points occurring within the structure of eosinophils (stained in red) was determined and then compared to the total number of points lying within the cervical stroma. The volume fraction was calculated by applying the formula given by Weibel [30]: $V_v = P_i/P$, where V_v is the estimated volume fraction of the object; P_i is the number of incident points over the eosinophils; and P is the total number of incident points over the volume unit.

In order to investigate the differences in eosinophilic infiltration of the cervical stroma among experimental groups, values were subjected to the Kruskal-Wallis one-way ANOVA [31]. To assign probabilities of the difference between two groups, the Mann-Whitney U test was used [31].

RESULTS

Effect of Hormone Treatments on Birth Parameters

Table I contains data clearly indicating that administering relaxin restored normal birth parameters. Treatment with estrogen alone (group OE) resulted in a significant increase in duration of straining, a decrease in the percent-

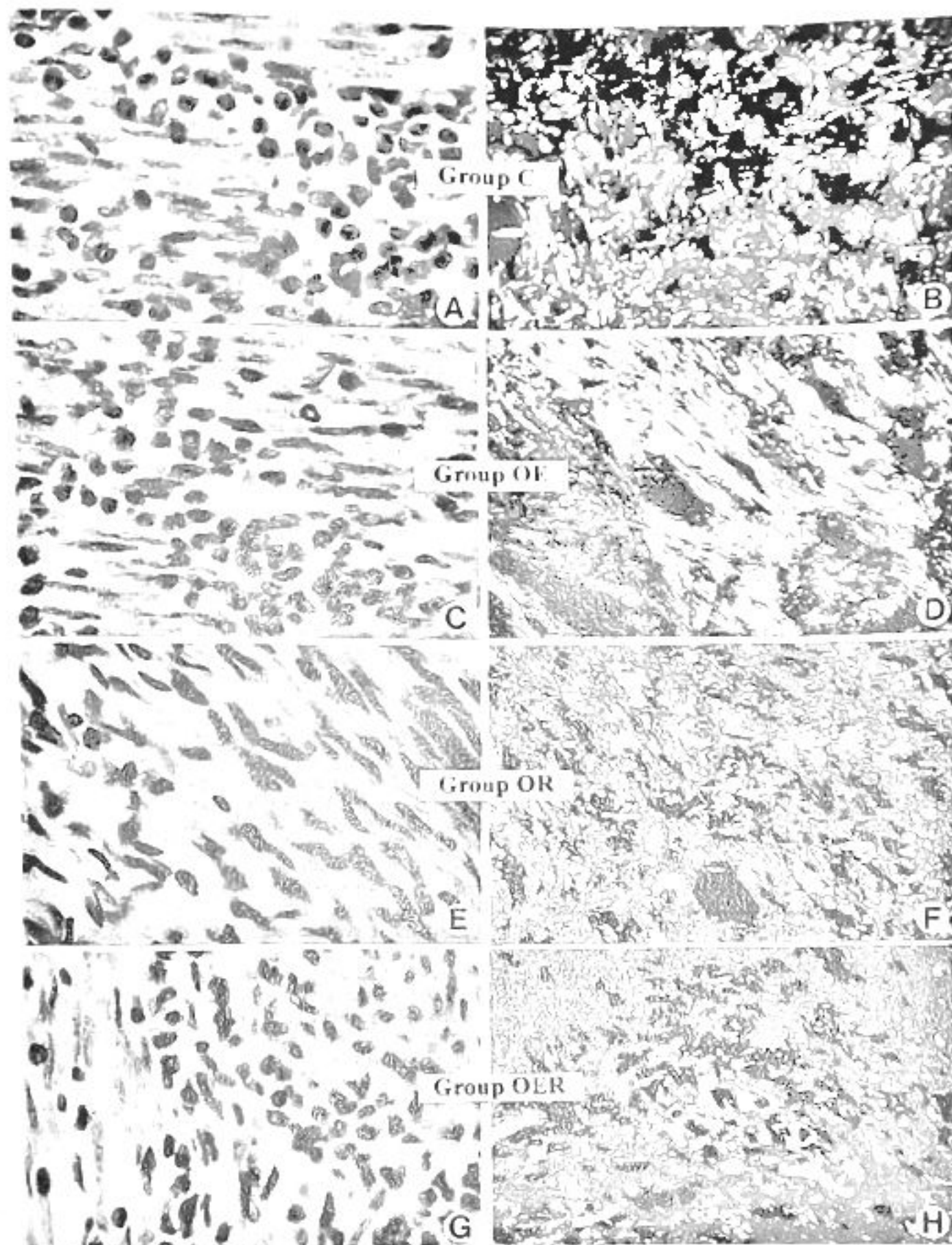


FIG. 1 Photomicrographs of sections across the uterine cervixes of rats in different experimental conditions. At left, sections were stained by Sirius Red in alkaline solution and counterstained with hematoxylin for the detection of eosinophils. At right, sections from the same rats were studied by the Picrosirius-polarization method, which detects the degree of orientation of collagen fibers in tissue sections. All brightly birefringent structures, which shine against a dark background, are collagenous. The cervical stroma of an intact pregnant control (group C) shows a massive eosinophilic infiltration (A) and a low level of organization of collagen (low birefringence) (B). In ovariectomized estrogen-treated rats (group OE), eosinophilic invasion occurred (C), but the collagen framework showed a highly oriented arrangement (high birefringence) (D). In contrast to group OE animals, the ovariectomized relaxin-treated animals (group OR) show a lack of eosinophil invasion (E) and low birefringence (F). In ovariectomized estrogen- and relaxin-treated rats (group OER), cervical eosinophilic infiltration (G) and collagen degradation (H) appeared similar to those in the pregnant intact controls (group C). $\times 800$ (left); $\times 450$ (right).

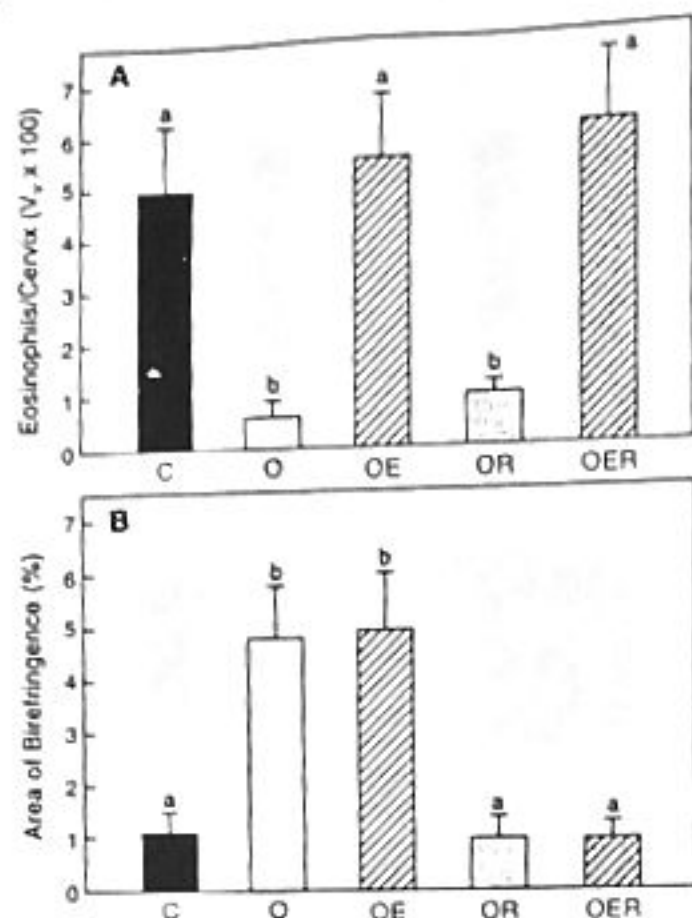


FIG. 2. Mean ($\pm$ SE) eosinophilic infiltration (A) and area of birefringence (B). Means with different letters differ significantly ($p < 0.01$). $n = 4$ or 5.

age of pups born alive, and a decrease in pup survival rate. In contrast, when rats were treated with relaxin (group OR or OER), birth parameters did not differ from those in intact controls (group C).

Measurement of Eosinophilic Invasion

Consistent with previous studies [7, 14] in which pregnant intact rats were killed during delivery, pregnant sham-ovariectomized rats (group C) that were killed at 1200 h on Day 23 (immediately before the time of expected parturition) showed high eosinophilic infiltration in the cervical stroma (see Figs. 1A and 2A). When pregnant rats were ovariectomized at 0600 h on Day 22 and given no subsequent hormone replacement therapy (group O), cervical eosinophilic infiltration was extremely low (Fig. 2A). When ovariectomized rats were treated with estrogen alone (group OE), a massive eosinophilic infiltration was found (Figs. 1C and 2A). Levels of eosinophils in cervixes from group OE rats were as great as those in group C rats (Fig. 2A). Treatment with relaxin did not increase cervical eosinophil levels. In ovariectomized rats treated with relaxin alone (group OR), the eosinophilic infiltration did not exceed that

found in group O (Figs. 1E and 2A). Moreover, when ovariectomized rats were treated with estrogen plus relaxin (group OER; Fig. 1G), eosinophilic infiltration in the cervical stroma did not differ from that of group OE (Fig. 2A).

Measurement of Organization of Collagen Fiber Bundles

In pregnant intact rats (group C), low birefringence was observed in the cervical stroma (Figs. 1B and 2B), correlating with the widespread reduction in density and orientation of collagen fiber bundles that occurs during late pregnancy. When pregnant rats were ovariectomized at 0600 h on Day 22 and given no subsequent hormone therapy (group O), collagen birefringence was high (Fig. 2B), which is indicative of a dense and highly organized collagen framework. When ovariectomized rats were treated with estrogen alone (group OE), birefringence was high. There was no indication that either collagen density or orientation in the cervical stroma was lower than in group O (Figs. 1D and 2B). In ovariectomized rats treated with relaxin alone (group OR) or estrogen plus relaxin (group OER), collagen birefringence was low and not different from that in the sham-ovariectomized (group C) controls (Figs. 1, F and H, and 2B).

DISCUSSION

The current study indicates that eosinophilic infiltration and remodeling of the collagen within the rat cervix at term are under control of different hormones. Estrogen stimulates eosinophilic invasion but not remodeling of collagen. Relaxin promotes remodeling of the collagen but not eosinophilic invasion.

The present study not only confirms our previous finding that estrogen promotes infiltration of eosinophils into the cervix in pregnant rats [14] but also extends our understanding by demonstrating that eosinophilic infiltration is dependent upon the continued presence of elevated blood estrogen levels during late pregnancy. In rats that were ovariectomized on Day 22 and not given hormone replacement therapy with estrogen (groups O and OR), cervical eosinophil levels were low by Day 23. The present study is consistent with previous observations that treatment with estrogen alone does not reduce the density and organization of collagen fibers [20], and that it results in prolonged delivery with reduced fetal survival [26].

The present study also extends our understanding of the hormonal regulation of eosinophil infiltration by providing evidence that relaxin does not increase the level of eosinophil infiltration in the cervix beyond that promoted by estrogen alone. Thus, relaxin does not appear to play a role in cervical eosinophil infiltration during the second half of rat pregnancy. The widespread disruption of collagen fibers and the absence of eosinophilic invasion found in pregnant

TABLE 1. Effect of E₂ and R replacement therapy on birth parameters.

Parameter	Treatment group*			
	C	OE	OR	OER
No. of mothers/group	8	5	4	4
Gestation length (h)	537.2 $\pm$ 0.8	535.5 $\pm$ 3.0	536.3 $\pm$ 1.2	537.4 $\pm$ 0.9
Duration of straining (h)	1.45 $\pm$ 0.8	10.8 $\pm$ 3.9*	1.49 $\pm$ 0.5	1.35 $\pm$ 0.4
Duration of delivery (h)	1.51 $\pm$ 0.41	1.84 $\pm$ 0.7	1.60 $\pm$ 0.32	1.50 $\pm$ 0.61
Born alive (%)	100	65*	94	100
Alive 48 h post partum (%)	100	50*	100	100

* Results are the mean $\pm$ SE or the mean percentage of pups.

* $p < 0.01$ vs. control.

ovariectomized rats treated only with relaxin (group OR) indicates that relaxin's actions on the rat cervix are not mediated by the promotion of eosinophil invasion. The absence of eosinophils in rats treated with relaxin alone could be attributable to either the lack of estrogen stimulation [14] or relaxin-induced eosinophilic degranulation. Since remodeling of collagen occurred in ovariectomized rats treated with estrogen plus relaxin (group OER) in the presence of eosinophils, it appears that degranulation of eosinophils is not the correct explanation.

Relaxin's effects on the cervix in pregnant rats are estrogen-dependent [32]. It seems likely that the ability of relaxin alone in this study to reduce collagen organization is due to the fact that the rats were ovariectomized near the expected time of delivery (approximately 30 h before delivery), when the animals were essentially primed with the endogenous estrogen that rises in the peripheral blood during late pregnancy [32].

The results of this study are consistent with earlier findings that relaxin is required for rapid and safe delivery in the rat [26, 33-37]. Neither induction of early delivery nor abortion occurred after ovariectomy. There was no need for progesterone replacement because the ovariectomy was performed about 32 h before delivery. This is the time relative to delivery when functional luteolysis occurs, and serum levels of progesterone fall precipitously [25]. Previous work showed that rats ovariectomized 30 h before parturition and treated with either estrogen plus relaxin or relaxin alone restored pup survival and all parturition parameters to values not different from those of intact controls [26]. In the present study, we also found no differences in pup survival and delivery trauma in either ovariectomized rats treated with relaxin alone or estrogen plus relaxin.

Perhaps the process of cervical dilation should be visualized as an epiphenomenon, in which several factors act to bring about its success. Polymorphonuclear leukocyte infiltration may be related to an immunological process [38] that offers some protection from infections that could be provoked during the opening of cervical canal at parturition. A link between the immune system and induction of labor is supported by evidence of an association of preterm labor with infection [38]. Another possible role for the polymorphonuclear leukocyte invasion of the cervix in late pregnancy may be the formation of intercommunicating canals through the cervical extracellular matrix. These channels would permit a rapid diffusion of hormones or other collagenase-activating factors that would act on pre-existing collagenases (such as collagen-bound collagenases) at term, since it has been shown that the migration of polymorphonuclear leukocytes increases the permeability of certain tissues [39, 40].

In conclusion, this investigation does not support the hypothesis that relaxin brings about its effects on rat cervical collagen remodeling through eosinophilic invasion and degranulation. Eosinophilic infiltration and collagen remodeling in the rat cervix at term are under control of different hormones; it appears that estrogen stimulates eosinophilic invasion and relaxin promotes collagen remodeling.

ACKNOWLEDGMENTS

We are very grateful to Professor G.S. Montes (School of Medicine, Sao Paulo, Brazil) for helpful discussion, to Dr. Elia Caldini for expertise and assistance in photomicrography, and to Mr. Juan C. Villarreal for indispensable assistance in animal care.

REFERENCES

- Liggins GC, Forster CS, Grieves SA, Schwartz AL. Control of parturition in man. *Biol Reprod* 1977; 16:39-56.
- Calder AA. Control of parturition: scientific and clinical aspects. In: Garfield RE (ed.). *Uterine Contractility*. Norwell, MA: Serono Symposia; 1990: 283-293.
- Sherwood OD, Downing SJ, Lao Guico-Lamm M, Hwang J-J, O'Day-Bowman MB, Fields PA. The physiological effects of relaxin during pregnancy: studies in rats and pigs. In: Milligen SR (ed.). *Oxford Reviews of Reproductive Biology*, vol. 15. Oxford: Oxford Press; 1993: 143-189.
- Kitamura K, Ito A, Mori Y, Hirakawa S. Changes in uterine cervical collagenase with specific reference to cervical ripening. *Biochem Med* 1979; 22:332-337.
- Rajabi MR, Dean DD, Beydoun SN, Woessner JF. Elevated tissue levels of collagenase during dilation of uterine cervix in human parturition. *Am J Obstet Gynecol* 1988; 159:971-976.
- Junqueira LCU, Zugaib M, Montes GS, Toledo OMS, Krisztán RM, Shighihara KM. Morphologic and histochemical evidence for the occurrence of collagenolysis and for the role of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes during cervical dilation. *Am J Obstet Gynecol* 1980; 138:273-281.
- Luque EH, Montes GS. Progesterone promotes a massive infiltration of the rat uterine cervix by the eosinophilic polymorphonuclear leukocytes. *Anat Rec* 1989; 223:257-265.
- Osmer R, Rath W, Adelman-Grill BC, Fittkow C, Kuloczik M, Szeverényi M, Tschesche H, Kuhn W. Origin of cervical collagenase during parturition. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 166:1455-1460.
- Fosang AJ, Handley CJ, Santer V, Lowther DA, Thorburn GD. Pregnancy-related changes in the connective tissue of the ovine cervix. *Biol Reprod* 1984; 30:1223-1235.
- Hegele-Hartung C, Chwalisz K, Beier HM, Elger W. 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* 1989; 4:369-377.
- Duchesne M-J, Badia E. Immunohistochemical localization of the eosinophil major basic protein in the uterus horn and cervix of the rat at term and after parturition. *Cell Tissue Res* 1992; 270:79-86.
- Owiny JR, Gilbert RO, Wahl CH, Nathanielsz PW. Leukocytic invasion of the ovine cervix at parturition. *J Soc Gynecol Invest* 1995; 2: 593-596.
- Luque EH, Bassani MM, Ramos JG, Maffini M, Canal A, Kass L, Caldini EG, Ferreira JMC, Muñoz de Toro MM, Montes GS. Leukocyte infiltration and collagenolysis in cervical tissue from intrapartum sheep. *J Vet Med A* 1997; 44:501-510.
- Luque EH, Ramos JG, Rodríguez HA, Muñoz de Toro MM. 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* 1996; 55:1206-1212.
- Lee YH, Howe RS, Sha S-J, Teuscher C, Sheehan DM, Lytle R. Estrogen regulation of an eosinophil chemotactic factor in the immature rat uterus. *Endocrinology* 1989; 125:3022-3028.
- Fields PA, Lee AB, Haab LM, Hwang J-J, Sherwood OD. Evidence for a dual source of relaxin in the pregnant rat: immunolocalization in the corpora lutea and endometrium. *Endocrinology* 1992; 130: 2985-2990.
- Sherwood OD, Crnekovic VE, Gordon WL, Rutherford JE. Radioimmunoassay of relaxin throughout pregnancy and during parturition in the rat. *Endocrinology* 1980; 107:691-698.
- Hwang J-J, Shanks RD, Sherwood OD. Monoclonal antibodies specific for rat relaxin. IV. Passive immunization with monoclonal antibodies during the antepartum period reduces cervical growth and extensibility, disrupts birth, and reduces pup survival in intact rats. *Endocrinology* 1989; 125:260-266.
- Lee AB, Hwang J-J, Haab LM, Fields PA, Sherwood OD. Monoclonal antibodies specific for rat relaxin. VI. Passive immunization with monoclonal antibodies throughout the second half of pregnancy disrupts histological changes associated with cervical softening at parturition in rats. *Endocrinology* 1992; 130:2386-2391.
- Cheah SH, Ng KH, Johngalingam VT, Ragavan M. The effects of oestradiol and relaxin on extensibility and collagen organisation of the pregnant rat cervix. *J Endocrinol* 1995; 146:331-337.
- Junqueira LCU, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J* 1979; 11:447-455.

22. Montes GS. Structural biology of the fibres of the collagenous and elastic systems. *Cell Biol Int* 1996; 20:15-27.
23. Sherwood OD, O'Byrne EM. Purification and characterization of porcine relaxin. *Arch Biochem Biophys* 1974; 160:185-190.
24. Downing SJ, Sherwood OD. The physiological role of relaxin in the pregnant rat. IV. The influence of relaxin on cervical collagen and glycosaminoglycans. *Endocrinology* 1986; 118:471-479.
25. Sherwood OD, Downing SJ, Golos TG, Gordon WL, Tarbell MK. Influence of light-dark cycle on antepartum serum relaxin and progesterone immunoactivity levels and on birth in the rat. *Endocrinology* 1983; 113:997-1003.
26. Cheah SH, Sherwood OD. Effect of preparturient 17 β -estradiol and relaxin on parturition and pup survival in the rat. *Endocrinology* 1988; 122:1958-1963.
27. Bogomoletz W. Avantages de la coloration par le rouge Sirius de l'amyloïde et des éosinophiles. *Arch Anat Cytol Pathol* 1980; 28:252-253.
28. Gundersen HJG, Bendtsen TE, Korbo L, Marcussen N, Møller A, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B, Sørensen FB, Vesterby A, West MJ. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 1988; 96:379-394.
29. Anderson JM. Histometry. In: Bancroft JD, Stevens A (eds.), *Theory and Practice of Histological Technique*, 2nd ed. London: Churchill Livingstone; 1982: 428-457.
30. Weibel ER. Stereological principles for morphometry in electron microscopic cytology. *Int Rev Cytol* 1969; 26:235-302.
31. Siegel S. *Nonparametric statistics for the behavioral sciences*. New York: McGraw-Hill; 1956.
32. Sherwood OD. Relaxin. In: Knobil E, Neill JD (eds.), *The Physiology of Reproduction*, vol 1, 2nd ed. New York: Raven Press Ltd, 1994: 861-1009.
33. Steinetz BG, O'Byrne EM. Speculations on the probable role of relaxin in cervical dilation and parturition in rats. *Semin Reprod Endocrinol* 1983; 1:335-342.
34. Downing SJ, Sherwood OD. The physiological role of relaxin in the pregnant rat I. The influence of relaxin on parturition. *Endocrinology* 1985; 116:1200-1205.
35. Lao Guico-Lamin M, Sherwood OD. Monoclonal antibodies specific for rat relaxin. II. Passive immunization with monoclonal antibodies throughout the second half of pregnancy disrupts birth in intact rats. *Endocrinology* 1988; 123:2479-2485.
36. Hwang J-J, Sherwood OD. Monoclonal antibodies specific for rat relaxin. III. Passive immunization with monoclonal antibodies throughout the second half of pregnancy reduces cervical growth and extensibility in intact rats. *Endocrinology* 1988; 123:2486-2490.
37. Burger LL, Sherwood OD. Evidence that cellular proliferation contributes to relaxin-induced growth of both the vagina and the cervix in the pregnant rat. *Endocrinology* 1995; 136:4820-4826.
38. Kelly RW. Pregnancy maintenance and parturition: the role of prostaglandin in manipulating the immune and inflammatory response. *Endocr Rev* 1994; 15:684-706.
39. Hibbs MS, Mainardi CL, Kang AH. Type-specific collagen degradation by eosinophils. *Biochem J* 1982; 207:621-624.
40. Milks LC, Conyers GP, Cramer EB. The effect of neutrophil migration on epithelial permeability. *J Cell Biol* 1986; 103:2729-2738.

Estrogen and progesterone modulation of eosinophilic infiltration of the rat uterine cervix☆

Jorge G. Ramos^a, Jorgelina Varayoud^a, Laura Kass^a, Horacio Rodriguez^a,
Mónica Muñoz de Toro^a, Gregorio S. Montes^b, Enrique H. Luque^{a,*}

^aDepartment of Human Physiology, Faculty of Biochemistry and Biological Sciences, Universidad Nacional del Litoral, C. C. 530, Paraje El Pozo, Ciudad Universitaria, 3000 Santa Fe, Argentina

^bLaboratory for Cell Biology, The University of São Paulo School of Medicine, São Paulo, Brasil

Received 22 December 1999; received in revised form 15 February 2000; accepted 22 February 2000

Abstract

Ripening of the rat cervix involves widespread collagenolysis that follows an eosinophilic leukocyte infiltration. The hormonal control of these events is not well understood. The aims of this study were to investigate the mechanism through which progesterone (P) and 17 β -estradiol (E₂) modulate eosinophilic invasion and to determine if this event is protein synthesis mediated. Cervical eosinophilic invasion was measured in intact rats during the second half of pregnancy and compared with values from ovariectomized (O) pseudopregnant (PSP) rats treated with P and E₂ in doses that mimicked the levels of pregnancy. Other O-PSP rats were treated with an E₂ antagonist (tamoxifen) and the antiprogesterin RU-486. To study the role of protein synthesis in eosinophilic invasion of the cervix, rats were treated with actinomycin-D (an inhibitor of mRNA synthesis), and animals were sacrificed on D21 or D22 to evaluate eosinophilic invasion. Rats treated with E₂ showed high levels of infiltration and tamoxifen blocked this E₂ effect. On the other hand, P antagonized the stimulatory effects of E₂ on eosinophilic invasion, however when the P and E₂ treated rats were injected with RU-486 the inhibitory effect of P was reversed. In intact pregnant rats a sharp rise in eosinophilic infiltration was detected on D23, 20 h after the fall of serum P. Finally, E₂ treated rats injected with actinomycin-D had no invasion of eosinophils. In conclusion, the estrogen-triggered eosinophil invasion is affected by the classic estrogen receptor antagonist tamoxifen and by the mRNA synthesis blocker actinomycin-D suggesting a genomic action of E₂. Furthermore, the estrogen effect is blocked by P and this inhibition is reversed by RU-486. © 2000 Elsevier Science Inc. All rights reserved.

Keywords: Parturition; Estrogen; Progesterone; Eosinophils; Cervix; Tamoxifen; RU-486

1. Introduction

During ripening, marked biochemical changes take place in the uterine cervix, causing it to become soft and dilatable at the time of parturition [1]. The physiological mechanism involved in the ripening process at term is still uncertain [2]. This process involves a disruption of the ordered collagen bundles that occurs after polymorphonuclear leukocyte invasion [3–5]. Neither the process of polymorphonuclear leukocyte infiltration, nor the physiological role of this invasion, is clearly defined. Though some authors suggest

that polymorphonuclear leukocyte infiltration of the cervix at term may be incidental [6], it is generally accepted that this infiltration may be an important aspect of the parturition process.

In previous studies we found that eosinophilic infiltration and collagen remodeling of the rat cervix at term are under differential hormonal control [5,7]. When studying the eosinophilic invasion, it was found that 17 β -estradiol (E₂) stimulated (whereas P blocked) infiltration of the cervix [7,8]. Thus, if E₂ and P modulate eosinophilic infiltration of the cervix by acting through their classic receptors, pretreatment with antiprogesterin (RU-486), or antiestrogen (tamoxifen) should reverse the above-mentioned events. On the other hand, previous studies using an in vitro chemotactic assay on immature rat uterus demonstrated that the promotion effect of E₂ on eosinophilic infiltration depends on the synthesis of a specific chemotactic protein factor [9].

* This study was supported by grants from CONICET (PIP 528/98), CONICET/CNPq (N° 1786), SECYT-CAPE (BR04/99/OG), and Universidad Nacional del Litoral (CAI+D 027-195).

* Corresponding author. fax: +54-342-4550944.

E-mail address: eluque@fbc.unl.edu.ar (E.H. Luque).

Table 1
Experimental protocol designed to study the kinetics of eosinophilic invasion of the uterine cervix at the end of pregnancy and in pseudopregnancy (PSP)-ovariectomized 17 β -estradiol (E₂)-treated rats

Group	D9	D20	D21	D22	D23
PSP-D20 ^a	E ₂ (0.05 μ g) ^c	E ₂ (0.05 μ g)	—	—	—
PSP-D21	E ₂ (0.05 μ g)	E ₂ (0.05 μ g)	E ₂ (0.5 μ g)	—	—
PSP-D22	E ₂ (0.05 μ g)	E ₂ (0.05 μ g)	E ₂ (0.5 μ g)	E ₂ (1 μ g)	—
PSP-D23	E ₂ (0.05 μ g)	E ₂ (0.05 μ g)	E ₂ (0.5 μ g)	E ₂ (1 μ g)	E ₂ (1 μ g)
Pregnant ^d	—	Sacrifice	—	—	—
Pregnant	—	—	Sacrifice	—	—
Pregnant	—	—	—	Sacrifice	—
Pregnant	—	—	—	—	Sacrifice

^a All PSP rats were ovariectomized on day 9; D1 of pseudopregnancy is the day after cervicovaginal stimulation

^b Indicates the day when experimental animals were sacrificed

^c From D9 to D20 the same dose of E₂ was administered daily

^d D1 of pregnancy is the day when sperm was present in vaginal smears

The fact that, at term, the caudal portion of the uterus (the cervix) softens while its cranial regions (uterine horns) strongly contract, suggests that the same hormones at identical concentrations, may have different effects on these distinct segments of the uterus [10,11]. In fact, regionally specific changes might be expected, because the different parts of the uterus in term pregnancy should serve the dual but conflicting functions of acting as a barrier to retain the conceptus and opening the cervix at the time of delivery [4]. Thus, though the effect of E₂ [12] and P [13,14] on eosinophilic infiltration of the uterine horn have already been reported, it appeared expedient to investigate whether the same results would be demonstrated in the uterine cervix.

It should also be remarked that, whereas the studies by King et al. [12] and Howe et al. [13] used immature rat uterus to evaluate the steroid regulation of eosinophilic migration, the present paper reports our observations on this process using the cervix of adult rats, that were ovariectomized (O) during pregnancy or pseudopregnancy (PSP). The widely used experimental model of the O-PSP rat [7] is particularly useful for these determinations. To investigate whether our observations in the present studies were a result of pharmacological effects or due to physiological levels of the hormones administered, O pregnant rats treated with the same protocol were allowed to complete pregnancy, indicating that exogenous hormonal levels were physiological.

To study the effect of P on the O-PSP rat model, an anti-progesterone (RU-486) was administered to O rats treated with E₂ and P. To evaluate E₂ action on the eosinophilic infiltration of the uterine cervix, an anti-estrogen (tamoxifen) was administered to O rats treated with E₂. To study the estrogenic effect on protein synthesis, O rats treated with E₂ received an inhibitor of mRNA synthesis, Actinomycin D (ACT-D).

The aim of this study was to achieve better insight into the mechanism through which E₂ and P modulate eosinophilic invasion of the uterine cervix and to determine whether the eosinophilic invasion of the cervix is depen-

dent, as is the case in the uterine horn [9], on protein synthesis.

2. Experimental

2.1. Animals

Female adult rats (over 200 g of body weight) of a Wistar-derived strain bred at the Department of Human Physiology (Santa Fe, Argentina) were used. Animals were maintained in a controlled environment (22 $\pm$ 2°C; lights on from 6:00 a.m.-8:00 p.m.). Animals had free access to pellet laboratory chow (Nutric, Argentina) and tap water.

Vaginal smears were used to confirm normal cycling [15]. To obtain pregnancy, proestrous females were caged overnight with males of proven fertility. The presence of sperm in the vaginal smear taken on the following morning was the criterion for designating day 1 (d1) of pregnancy.

To obtained pseudopregnancy, virgin cycling rats received artificial cervicovaginal stimulation on the evening of proestrous [16], and the following day was considered as d1 of PSP. On d9 of PSP, bilateral O was performed under ether anesthesia. In PSP rats, a functional corpus luteum is formed [17] and serum P levels are equivalent to those of pregnant rats until the moment that O is performed (d9) [18]. After O, PSP animals were assigned to different experimental groups to receive various hormone treatment regimens (see Table 1)

2.2. Tissue preparation and light microscopy

Cervical tissue was obtained on d23, unless otherwise specified. Tissue samples were fixed by immersion in 10% buffered formalin for 6 h, dehydrated in graded concentrations of alcohol, embedded in paraffin, and sectioned at 5 μ m. Serial sections were stained for 60 min in 0.5% Sirius Red (Direct Red 80, Aldrich, Milwaukee, WI, USA) dissolved in alkaline solution (NaOH, pH 10.5) followed by

counterstaining with Harris' hematoxylin (Biopur, Argentina) for 10 min. This method permitted distinct characterization of rat eosinophils in tissue sections: their specific granules were deeply stained red, which strongly contrasted against a pale background [4]. Taking into account that, in the stroma of the cervix, eosinophilic infiltration assumes a heterogeneous pattern, quantification in each section, was performed on the mucosal lamina propria and on the fibrous submucosal layer of the whole cervical wall.

2.3. Kinetics of eosinophilic invasion of the uterine cervix at the end of pregnancy and in O-PSP estrogen-treated rats (Table 1)

The pattern of eosinophilic infiltration in the uterine cervix of intact pregnant rats at the end of pregnancy was compared with that of O-PSP steroid-treated rats. Pregnant rats were sacrificed at 5:00 p.m. on d20, d21, and d22 and at 1:00 p.m. on d23. O-PSP animals were treated with E_2 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) after a protocol previously described [7,19]. Daily subcutaneous (s.c.) injections of 0.05 μ g of either E_2 or its vehicle (0.1 ml sesame oil) were administered at 10:00 a.m. from the time of O (d9) until d20. To mimic the increase of E_2 levels before the onset of rat parturition, the doses were increased to 0.5 μ g on d21, and to 1.0 μ g on d22 and d23. O-PSP animals were sacrificed after the same schedule used for the intact, pregnant rats. Uterine cervixes were collected at sacrifice and processed as mentioned above.

2.4. Evaluation of the effect of estrogen antagonist (tamoxifen) on eosinophilic invasion

To examine the effect of tamoxifen (Tx) on E_2 -stimulated eosinophilic infiltration of the rat cervix, a group of O-PSP rats treated with E_2 , as mentioned above, received 1 mg/0.2 ml s.c. of Tx, 90 min before each E_2 dose on d21, 22, and 23. The corresponding control groups were conducted: one group was injected with E_2 and vehicle of Tx, another with Tx and vehicle of E_2 , and the third with both vehicles.

2.5. Evaluation of the effect of progestin antagonist (RU-486) on eosinophilic invasion

To study the effect of P on E_2 -induced eosinophilic infiltration, we used the synthetic anticorticoid/antiprogesterin RU-486 [20]. E_2 was administered as described above, and P was given in the form of implants made from Silastic tubing (internal diameter, 0.15 $\times$ 5 cm; Dow-Corning, Midland, MI, USA), each containing 60 mg crystalline P (4-pregnene-3,20-dione; Sigma Chemical Co.) [7]. Two Silastic implants were inserted s.c. in the back of the neck at the time of O. Both implants were removed at the time of sacrifice (1:00 p.m. of d23). RU-486 was dissolved in sesame oil + 5% ethanol, and 0.04 mg RU-486/0.2 ml was

given s.c. at 10:00 a.m. on d20, 21, 22, and 23. Control groups received empty implants and/or RU-486 vehicles.

2.6. Evaluation of the role of protein synthesis in eosinophilic invasion

To determine if the cervical eosinophilic infiltration induced by E_2 requires mRNA synthesis, we evaluated the effect of Actinomycin-D (ACT-D, Cosmegen[®], Sidus, Argentina) administration on E_2 -treated O-PSP rats. A single injection of 100 μ g/100 g body weight of ACT-D was administered intraperitoneally (i.p.) 30 min before E_2 administration on d21. Animals were sacrificed either on d21 (7 h after inhibitor injection) or on d22 (31 h after injection). Another group was treated with ACT-D and E_2 vehicle. Animals were sacrificed at 5:00 p.m. on d20, d21, and d22.

2.7. Stereology

The point counting procedure [21] was used to obtain data concerning the morphometric analysis of the number of eosinophils invading the cervix. Eosinophils were counted using a glass disc with a squared grid inserted in a focusing eyepiece and a 100 $\times$ immersion objective [22]. The fraction of points occurring within the structure of eosinophils (stained in red) was determined and then compared to the total number of points lying within the cervical stroma. The volume fraction was calculated by applying the formula given by Weibel [23]:

$$V_v = \frac{P_i}{P}$$

where V_v is the estimated volume fraction of the object (eosinophils); P_i is the number of incident points over the eosinophils; and P is the total number of incident points over the volume unit (stroma of the uterine cervix).

To investigate the differences in eosinophilic infiltration of the cervical stroma among experimental groups, values were subjected to the Kruskal-Wallis one-way ANOVA. Probabilities were assigned using the Mann-Whitney U -test [24].

3. Results

3.1. Kinetics of eosinophilic invasion of the uterine cervix at the end of pregnancy and in O-PSP estrogen-treated rats

Consistent with previous studies [7] measurement of estrogen-induced eosinophilic invasion in O-PSP E_2 -treated rats showed very high values of volume density compared with O-PSP controls on D23 (4.06 ± 0.19 versus 0.2 ± 0.09 ; $P < 0.05$).

As shown in Fig. 1 O-PSP animals injected with E_2 (7 h F1

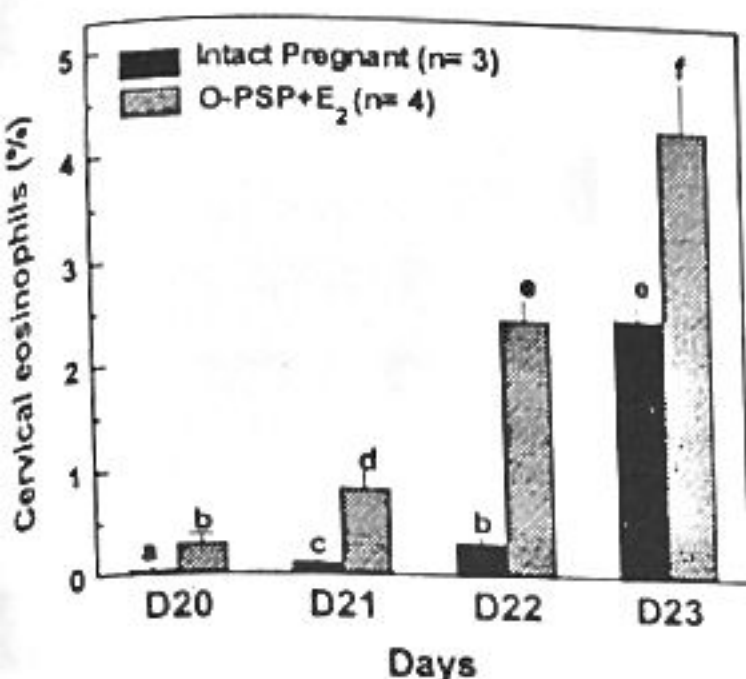


Fig. 1. Kinetics of eosinophilic invasion of the uterine cervix in intact rats at the end of pregnancy and in ovariectomized pseudopregnant 17 β -estradiol-treated (O-PSP+E₂) animals treated with increasing doses of E₂ (as detailed in Section 2). Means with different letters differ significantly ($P < 0.01$).

before sacrifice) demonstrated an increased effect on eosinophilic infiltration from D21 onwards. The time course of eosinophilic infiltration in the intact pregnant control group gradually increased from d20 to d22 and showing an acute eosinophilic invasion on d23.

3.2. Evaluation of the effect of estrogen antagonist (tamoxifen) on eosinophilic invasion

Because most E₂-induced events are regulated by an initial interaction with classic estrogen receptors, we examined the effect of an antiestrogen on eosinophilic infiltration of the uterine cervix. As shown in Fig. 2, in animals treated with E₂ + Tx a drastic fall of cervical eosinophil levels was observed as compared with rats treated only with E₂. On the other hand, animals injected only with Tx showed a small but significant eosinophilic invasion compared with vehicle-injected control rats.

3.3. Evaluation of the effect of progestin antagonist (RU-486) on eosinophilic invasion

When O-PSP rats were treated with E₂ plus P they showed a very poor eosinophilic infiltration similar to that found in control O group (Fig. 3). To further understand the hormonal regulation of this event, the P antagonist RU-486 was administered simultaneously with E₂ and P. This coadministration reversed the P inhibition of eosinophilic infiltration.

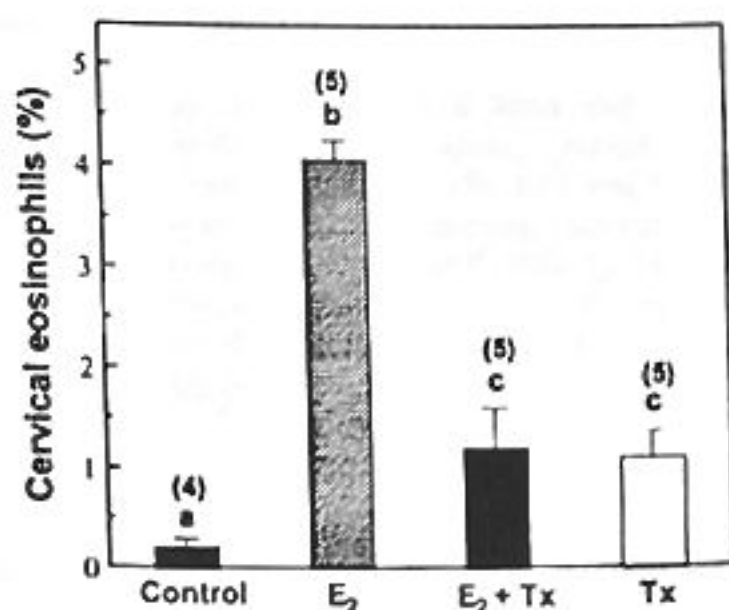


Fig. 2. Effect of tamoxifen (Tx) on eosinophilic infiltration of the rat uterine cervix. Ovariectomized pseudopregnant rats treated with E₂ showed a dramatic eosinophilic invasion that was blocked by the antiestrogen Tx. Tx alone induced a slight, but significant, eosinophilic invasion. Control: vehicle-injected. Animals were sacrificed on D23. Number of animals per group is indicated in brackets. Means with different letters differ significantly ($P < 0.01$).

3.4. Evaluation of the role of protein synthesis in eosinophilic invasion

As shown in Fig. 1, O-PSP animals treated on d20 to d23 with increasing doses of E₂ demonstrated an increased in eosinophilic infiltration with increasing days of treatment. Thus, the number of eosinophils observed on d23 was significantly higher than those found on d20, d21, and d22. To

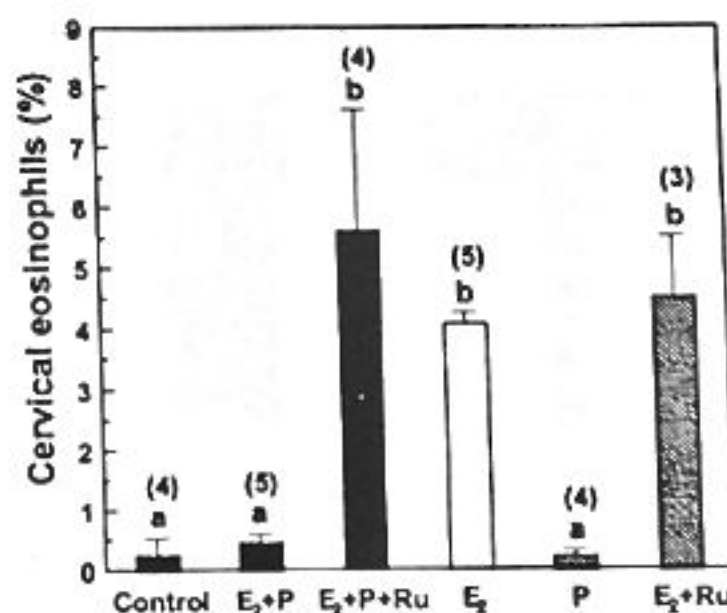


Fig. 3. Effect of the progestin antagonist RU-486 on eosinophilic invasion of the rat uterine cervix. In ovariectomized (O) pseudopregnant rats progesterone (P) blocked estradiol (E₂)-induced eosinophilic infiltration and this effect was completely reversed with RU-486 (Ru). The control group contained empty implants and was injected with vehicles of E₂ and RU-486. Animals were sacrificed on D23. Number of animals per group is indicated in brackets. Means with different letters differ significantly ($P < 0.01$).

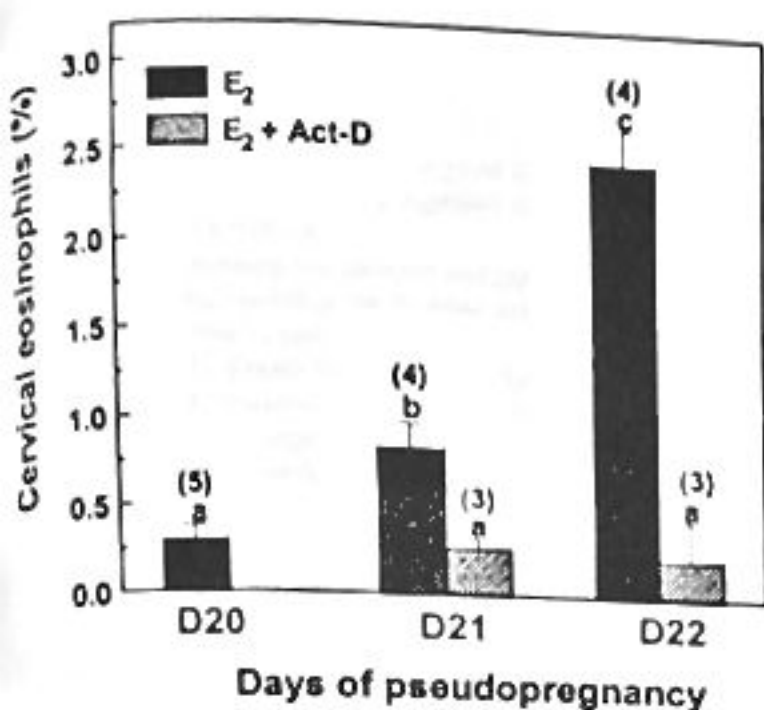


Fig. 4. Effect of actinomycin-D on eosinophilic invasion of the rat uterine cervix. Ovariectomized pseudopregnant rats received increasing doses of E₂ (that mimicked plasma levels at term) that induced a dose-response effect on the eosinophilic invasion of the cervix. The stimulatory effect of E₂ is clearly inhibited by actinomycin-D (ACT-D). Number of animals per group is indicated in brackets. Means with different letters differ significantly ($P < 0.01$).

understand if this response pattern was protein-synthesis mediated, the E₂ doses were coadministered with ACT-D on d21. Animals treated with ACT-D showed a dramatic inhibition of the estrogen-stimulated leukocyte invasion of cervical tissues on both d21 and d22 (Fig. 4).

4. Discussion

A variety of early responses to E₂ administration were reported in the rat uterus and cervix, such as changes in vascular permeability [25], water imbibition's [26] and eosinophilic infiltration [7,9]. The rat cervical stroma at parturition is an excellent model to study P and E₂ interaction. However, because the majority of the above-mentioned results were obtained using the immature rat uterus and/or pharmacological doses of steroid hormones [4,9,13], little is known regarding the physiological conditions of this interaction in the pregnant intact rat. Previous works have shown that rat cervix at term is invaded by eosinophilic leukocytes and a similar pattern of infiltration is obtained in O-PSP E₂-treated rats [5,7]. The E₂ therapy used in these studies maintained physiological plasma levels similar to those of pregnant intact control rats [19]. In the present work we used the same model of O-PSP steroid treated rats; therefore, we can postulate that the results obtained here are in close correlation with those found in pregnant intact animals at the time of parturition. In this work we show that the capacity of E₂ to promote eosinophilic infiltration of the cervix is blocked by the anti-E₂ Tx. The small but significant Tx-induced effect on eosinophil invasion was inter-

preted as an estrogenic activity of Tx at the given doses [20]. Taken together, these results show that eosinophilic infiltration is an estrogen-regulated event that seems to require an initial interaction with estrogen receptors.

Eosinophilic invasion found on d21, d22, and d23 in the cervical stroma of O-PSP E₂-treated rats, showed a direct correlation with increasing doses of E₂ (Fig. 1). This mechanism did not demonstrate saturation within the range of the doses utilized and the infiltration pattern differed from that observed in pregnant animals. In the latter, an acute eosinophilic invasion of the cervix was observed on d23, coincident with P declination [27]. The data presented here show that P antagonizes the effect of E₂ on eosinophilic infiltration. The animals treated with P + E₂ did not show significant infiltration, however, when these rats were injected with RU-486 the eosinophilic invasion was evident. The finding that RU-486 blocks the inhibitory action of P on eosinophilic infiltration of the cervix suggests that the P effect is mediated through the progesterone receptor. These experiments confirm the negative modulation that P exerts on E₂-stimulated eosinophilic infiltration of rat cervical stroma [7,8]. The antagonistic actions of both steroids explains the time course of the leukocyte invasion in the intact pregnant rat during the last days of pregnancy (Fig. 1). When the P decrease takes place during the last 36 h of pregnancy [27], increased E₂ levels act through the E₂ receptor promoting the massive infiltration observed on d23 of pregnancy (Fig. 1).

The effect of estradiol on cervical eosinophilic invasion was blocked by ACT-D, an inhibitor of mRNA synthesis. These results strongly suggest that the E₂-stimulated eosinophilic infiltration could be protein-synthesis mediated. This finding is in agreement with the results found in the immature rat uterine horn [9]. These authors demonstrated the existence of an eosinophil chemotactic protein that mediates the E₂ stimulation of eosinophilic infiltration.

In summary, the physiological conditions used in our work permit an interesting approach to the real events that occur in the cervix of pregnant rats at term. Our results demonstrate that the eosinophilic infiltration of the uterine cervix at the time of parturition is under complex hormonal control. This physiological control has similarities with the results found in the uterine horns of immature rats, showing that in both regions (cervix and uterine horns) the estrogen-triggered eosinophilic infiltration is P inhibited and receptor-ligand and protein-synthesis mediated.

Acknowledgments

G.S.M. is Career Investigator of the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and E.H.L. is Career Investigator of the Argentine National Council for Science and Technology (CONICET). We are very grateful to SIDUS (Argentina) for providing actinomycin-D used in this study.

References

- [1] El Maradny E, Kanayama N, Kobayashi H, et al. The role of hyaluronic acid as a mediator and regulator of cervical ripening. *Hum Reprod* 1997;12:1080–8.
- [2] Kelly RW. Pregnancy maintenance and parturition: the role of prostaglandin in manipulating the immune and inflammatory response. *Endocr Rev* 1994;15:684–706.
- [3] Junqueira LCU, Zugaib M, Montes GS, Toledo OMS, Kriszian RM, Shighara KM. Morphologic and histochemical evidence for the occurrence of collagenolysis and for the role of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes during cervical dilation. *Am J Obstet Gynecol* 1980;138:273–81.
- [4] Luque EH, Montes GS. Progesterone promotes a massive infiltration of the rat uterine cervix by the eosinophilic polymorphonuclear leukocytes. *Anat Rec* 1989;223:257–65.
- [5] Luque EH, Muñoz de Toro M, Ramos JG, Rodríguez HA, Sherwood OD. Role of relaxin and estrogen in the control of eosinophilic invasion and collagen remodeling in rat cervical tissue at term. *Biol Reprod* 1998;59:795–800.
- [6] Leppert PC. Cervical softening, effacement, and dilatation: a complex biochemical cascade. *J Matern Fetal Med* 1992;1:213–23.
- [7] Luque EH, Ramos J, Rodríguez H, 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. *Biol Reprod* 1996;55:1206–12.
- [8] Duchesne MJ, Badia E. Immunohistochemical localization of the eosinophil major basic protein in the uterus horn and cervix of the rat at term and after parturition. *Cell Tiss Res* 1992;270:79–86.
- [9] Lee YH, Howe RS, Sha SJ, Teuscher C, Sheehan DM, Lytle R. Estrogen regulation of an eosinophil chemotactic factor in the immature rat uterus. *Endocrinology* 1989;125:3022–8.
- [10] Huszar GB, Walsh MP. Relationship between myometrial and cervical functions in pregnancy and labor. *Semin Perinatol* 1991;15:97–181.
- [11] Buhimschi I, Ali M, Jain V, Chwalisz K, Garfield RE. Differential regulation of nitric oxide in the rat uterus and cervix during pregnancy and labor. *Hum Reprod* 1996;11:1755–66.
- [12] King WJ, Allen TC, DeSombre ER. Localization of uterine peroxidase activity in estrogen-treated rats. *Biol Reprod* 1981;25:859–70.
- [13] Howe R, Lee Y, Fischkoff S, Teuscher C, Lytle C. Glucocorticoid and progestin regulation of eosinophil chemotactic factor and complement C3 in the estrogen treated rat uterus. *Endocrinology* 1990;126:3193–9.
- [14] Hasty LA, Lytle CR. Progesterone and RU486 regulation of uterine complement C3 after prior induction with estradiol. *Biol Reprod* 1992;47:285–90.
- [15] Montes GS, Luque EH. Effects of ovarian steroids on vaginal smears in the rat. *Acta Anat* 1988;133:192–199.
- [16] Luque EH, Castro-Vazquez AC. Sensory mechanisms involved in the induction of pseudopregnancy by progesterone: increased sensitivity to stimulation of the pudendal sensory field. *Endocrinology* 1983;113:385–90.
- [17] Smith MS, Freeman ME, Neill JD. The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin, and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology* 1975;96:219–26.
- [18] Rothchild I. Role of progesterone in initiating and maintaining pregnancy. In: Bardin CW, Milgrom E, Mauvais-Jarvis P, editors. *Progesterone and progestins*. New York: Raven Press, 1983. p. 219–29.
- [19] Downing SJ, Sherwood OD. The physiological role of relaxin in the pregnant rat. IV. The influence of relaxin on cervical collagen and glycosaminoglycans. *Endocrinology* 1986;118:471–9.
- [20] Fuhrmann U, Parczyk K, Klotzbücher M, Klocker H, Cato ACB. Recent developments in molecular action of antihormones. *J Mol Med* 1998;76:512–24.
- [21] Gundersen HJG, Bendtsen TP, Korbo L, et al. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 1988;96:379–94.
- [22] Anderson JM. Histometry. In: Bancroft JD, Stevens A, editors. *Theory and practice of histological techniques*, 2nd ed. London: Churchill Livingstone, 1982. p. 428–57.
- [23] Weibel ER. Stereological principles for morphometry in electron microscopic cytology. *Int Rev Cytol* 1969;26:235–302.
- [24] Siegel S. *Nonparametric statistics for the behavioral sciences*. New York: McGraw-Hill, 1956.
- [25] McRae A, Kennedy TG. Estrogen, progesterone, and the blood-uterine lumen permeability barrier in rats. *Biol Reprod* 1981;25:314–8.
- [26] Tchernitchin A. The role of eosinophil receptors in the non-genomic response to estrogen in the uterus. *J Steroid Biochem* 1979;11:417–24.
- [27] Morishige WK, Pepe OJ, Rothchild I. Serum luteinizing hormone, prolactin, and progesterone levels during pregnancy in the rat. *Endocrinology* 1973;92:1527–30.