

# Variación en la distribución de linfocitos epiteliales e intersticiales en tubas uterinas de la coneja al inicio de la gestación

## Variation in distribution of interstitial and epithelial lymphocytes in female uterine tubes of rabbit during early stages of pregnancy

Santiago René Anzaldúa Arce<sup>a</sup>, Héctor Villaseñor Gaona<sup>a</sup>, Mario Pérez-Martínez<sup>a</sup>

### RESUMEN

Las tubas uterinas (TU) son órganos en los que se lleva a cabo el transporte de los gametos y el transporte sincronizado del embrión hacia el útero. El objetivo de este estudio fue determinar la distribución histológica de los linfocitos intraepiteliales (LIE) e intersticiales (LIT) en el endosalpinx de la fimbria, infundíbulo, ampulla e istmo de las tubas uterinas de conejas en los primeros cuatro días de la gestación. A partir de conejas Nueva Zelanda se obtuvieron muestras de tejido de ambas TU, se fijaron y procesaron por inclusión en parafina para efectuar cortes histológicos que se tiñeron con hematoxilina eosina, ácido peryódico de Schiff y Giemsa. Se contaron los linfocitos en la lámina epitelial (LIE) y en la lámina propia de tejido conjuntivo intersticial (LIT). En la fimbria se encontró un mayor número de LIE y LIT los días 1 y 4 ( $P < 0.01$ ) de la gestación. En el infundíbulo hubo un mayor número de LIE y LIT el día 4 de la gestación ( $P < 0.01$ ) y en el ampulla hubo un incremento significativo en el número de LIE y LIT en los días 1 y 2 ( $P < 0.01$ ) de la gestación en relación con el grupo testigo. En el istmo hubo una disminución significativa del número de LIE en relación con el grupo control y de LIT el día 3 de la gestación ( $P < 0.01$ ). Estos resultados demuestran que la distribución de LIE y de LIT en la mucosa de las distintas regiones histológicas de las tubas uterinas registra variaciones en los primeros cuatro días de la gestación y que tienen una distribución regionalizada.

**PALABRAS CLAVE:** Tubas uterinas, Gestación temprana, Linfocitos, Coneja.

### ABSTRACT

Fallopian tubes or uterine tubes (TU) are organs through which gametes transport themselves and also embryos travel through them to the uterus. The objective of the present study was to determine the histologic distribution of epithelial (LIE) and interstitial (LIT) lymphocytes in the endosalpinx of the fimbriae, infundibulum, ampullae and isthmus in the uterine tubes of doe rabbits during the first 4 d of pregnancy. Fragments of TU tissue were obtained from New Zealand white rabbits, set and processed through paraffin inclusion in order to perform histologic cuts which were stained with hematoxylin-eosin (H&E), Schiff's periodic acid (PAS) and Giemsa. Lymphocytes of both the epithelial layer (LIE) and of the *lamina propria* of the stroma (LIT) were counted. A greater number of LIE and LIT was found in the fimbriae on d 1 and 4 of pregnancy ( $P < 0.01$ ). In the infundibulum a greater number of both LIE and LIT was found on d 4 ( $P < 0.01$ ) and a significant increase of both factors in the ampullae was observed on d 1 and 2 ( $P < 0.01$ ) relative to the control group. In isthmus a significant decrease relative to the control group was seen in LIT and LIE on d 3 ( $P < 0.01$ ). These results indicate that LIE and LIT distribution in the different regions of the TU mucosa show variations in the first four days of pregnancy and a regionalized distribution.

**KEY WORDS:** Uterine tube, Early pregnancy, Lymphocytes, Rabbit.

Las tubas uterinas (TU) presentan cuatro regiones anatómicas: las fimbrias, el infundíbulo, el ampulla y el istmo, en las cuales ocurren eventos críticos

Uterine or fallopian tubes (TU) present four distinct anatomic regions: fimbriae, infundibulum, ampullae and isthmus, and critical reproductive events take

Recibido el 16 de agosto de 2007. Aceptado para su publicación el 29 de septiembre de 2007.

<sup>a</sup> Departamento de Morfología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México D.F. Fax: (01555) 6162342. reneanzalduaarce@yahoo.com.mx. Correspondencia al primer autor.

para la función reproductiva<sup>(1)</sup>. Las fimbrias son la porción distal adyacente al ovario que captan los óvulos y permiten comunicación con la cavidad peritoneal, y el infundíbulo es la prolongación tubular de las fimbrias. El ampulla comprende la unión istmo-ampular, que es el sitio en el que se lleva a cabo la fecundación en la mayoría de las especies. El istmo es el tercio proximal de las tubas y se encuentra adyacente al útero; en esta porción ocurre la capacitación espermática y constituye un sitio de almacenamiento temporal de espermatozoides<sup>(2,3)</sup>.

En la coneja, la unión útero-tubárica se abre únicamente en los días 3 y 4 del inicio de la gestación, evento que coincide con el paso del huevo de las TU al útero<sup>(4)</sup>. Las TU proveen de un microambiente favorable a los espermatozoides, ovocitos y el cigoto en sus primeros estadios de desarrollo<sup>(2,3)</sup>.

El tracto reproductor femenino está provisto de un sistema inmune mucosal que involucra a las tubas uterinas, por lo que al tener contacto con los espermatozoides durante su tránsito hacia el sitio de fecundación, constituye todo un reto desde el punto de vista inmunológico para que no reaccione en contra de ellos<sup>(5)</sup>.

La presencia de linfocitos en las tubas uterinas ha sido descrita en distintas especies de mamíferos domésticos, incluyendo a la coneja<sup>(5,6,7,8)</sup>. Se ha demostrado que la actividad funcional de los linfocitos intraepiteliales es regulada, en buena medida, por las variaciones endocrinas que se presentan durante las diversas fases del ciclo ovárico<sup>(9,10,11)</sup>.

Debido a que los embriones expresan antígenos paternos que son extraños a los tejidos maternos, al ser identificados estos por el sistema inmunológico materno, pueden desencadenar una respuesta de tipo humoral<sup>(12,13,14)</sup> y celular<sup>(15)</sup>; sin embargo, en condiciones fisiológicas esto no ocurre gracias a que existe un estado de inmunotolerancia local regulado.

En la mucosa del aparato reproductor femenino los linfocitos se pueden encontrar principalmente en

place in each of them<sup>(1)</sup>. Fimbriae are adjacent to the ovaries which capture the ovules and allow communication with the peritoneal cavity; the infundibulum is a tubular prolongation of the fimbriae. The ampulla comprises the ampulla-isthmus junction and in this area where fecundation in most species takes place. The isthmus is the proximal third of the oviducts and is adjacent to the uterus and where spermatozoa capacitation takes place and being also a temporary sperm deposit site<sup>(2,3)</sup>.

In female rabbits, the uterus-tube junction opens only on d 3 and 4 of pregnancy, an event which is in coincidence with the embryos passage into the uterus<sup>(4)</sup>. Uterine tubes provide a favorable microenvironment to spermatozoa, oocytes and also to zygotes in early development stages<sup>(2,3)</sup>.

The female reproductive tract is provided with a mucosal immune system which includes the oviducts, and being in contact with spermatozoa during their passage to the fecundation site, this event represents a challenge from an immunological standpoint, of not setting off a hostile reaction<sup>(5)</sup>.

Lymphocyte presence in uterine tubes has been mentioned in diverse domestic mammals species, including rabbits<sup>(5-8)</sup>. It has been shown that the functional activity of epithelial lymphocytes is regulated by endocrine variations that take place in the phases of the estrous cycle<sup>(9,10,11)</sup>.

Due to the fact that embryos express paternal antigens foreign to maternal tissues, when the former are identified by the mother's immune system, humoral<sup>(12,13,14)</sup> and cellular<sup>(15)</sup> responses can be triggered. However, in normal physiological conditions, this does not happen owing to a locally regulated immunotolerance.

In the mucosa of the female reproductive system, lymphocytes are found mainly in three locations: in the intraepithelial space, in the interstitial tissue and as basal lymphoid aggregates<sup>(16)</sup>.

Estrogenic and progestational hormonal environments influence the immunological capacity of oviducts<sup>(17)</sup>. In anoestrus uterine tubes of cows,

tres sitios: en el espacio intraepitelial, en el tejido intersticial (tejido conjuntivo) y como agregados linfoides basales<sup>(16)</sup>.

El ambiente hormonal estrogénico y progestacional influye sobre la capacidad inmunológica de las tubas uterinas<sup>(17)</sup>. En las tubas uterinas de vacas en diestro, aumenta el número de linfocitos de la mucosa de la región del ámpula en relación con el istmo, lo que indica que el ambiente hormonal influye sobre la migración linfocitaria<sup>(10)</sup>.

En la coneja se ha estudiado la función inmunológica del fluido del oviducto y se considera que algunas de estas proteínas pudieran tener un efecto inhibitorio sobre el complemento, lo que evitaría la acción de los anticuerpos contra los espermatozoides y el embrión<sup>(18)</sup>.

Por otra parte, en el útero de conejas, durante los primeros días de la gestación se presenta una disminución en el número de linfocitos totales; la disminución en la afluencia de linfocitos también ocurre en el útero de conejas en estado de pseudogestación, inducida mediante la administración de hCG<sup>(11)</sup>. Hasta el momento, no se ha estudiado la influencia del inicio de la gestación sobre la distribución de linfocitos en las distintas regiones histológicas del endosalpinx de la coneja, por lo que el objetivo de este estudio fue determinar las características de distribución de los linfocitos intraepiteliales (LIE) e intersticiales (LIT) en la mucosa de la fimbria, infundíbulo, ámpula e istmo de conejas, durante los primeros cuatro días de la gestación.

Se utilizaron 17 conejas Nueva Zelanda blancas nulíparas, sexualmente maduras (3.5 a 4.5 kg de peso), mantenidas en condiciones de bioterio en jaulas individuales (90x60x40 cm) que recibieron alimento concentrado comercial y agua *ad libitum*. Con estas hembras se formaron cinco grupos: cuatro experimentales (n=3 hembras por grupo) y un grupo testigo (n=5). Con el fin de obtener animales gestantes, cada coneja recibió dos montas sucesivas, utilizando sementales experimentados de la misma raza. El día de la cruce se consideró como el día "0" del experimento. El grupo testigo se conformó con conejas adultas nulíparas no gestantes (NG) de

the number of lymphocytes increases in the ampullae mucosa relative to the isthmus, which indicates that the hormonal environment influences in lymphocyte migration<sup>(10)</sup>.

The immunological function of the oviduct's fluids has been studied in rabbits and it is considered that some of these proteins could have an inhibiting effect on the complement, which could forestall antibody actions against spermatozoa and embryos<sup>(18)</sup>.

On the other hand, in the rabbits uterus during the first days of pregnancy a decrease in the number of total lymphocytes can be appreciated. This decrease also takes place in female rabbits in pseudo-pregnancy state, induced by hCG<sup>(11)</sup>.

Up to now, no studies have been carried out on the influence of the beginning of pregnancy on lymphocyte distribution in the different histologic areas of the endosalpinx of rabbit, and therefore, the objective of the present study was to determine intraepithelial (LIE) and interstitial (LIT) lymphocyte distribution in the mucosa of fimbriae, infundibulum, ampullae and isthmus in rabbits in the first four days of pregnancy (early pregnancy).

To this end, 17 New Zealand white rabbits, weighing between 3.5 and 4.5 kg, sexually mature, nulliparous female rabbits were used. They were placed in biotherium conditions in individual 90\*60\*40 cm cages, fed with commercial feed and provided with water *ad libitum*. Four experimental (n=3) and one control group (n=5) were established. To obtain gestating animals, each female was mounted twice by experienced males of the same breed. Coitus day was taken as day "0" of the experiment. The control group was made up by adult, nulliparous non gestating (NG) females of the same breed which were kept without contact from males. Female rabbits of experimental groups were sacrificed on d 1, 2, 3 and 4 postcoitus with an overdose of sodium pentobarbital (90 mg kg<sup>-1</sup>) applied in the heart<sup>(19)</sup>. Females in the control group were sacrificed using the same method and showed at the moment of sacrifice a rose colored vulva which is a characteristic of diestrus<sup>(20)</sup>.

la misma raza y peso que las del grupo experimental, y no recibieron monta. Las conejas de los cuatro grupos experimentales se sacrificaron en los días 1, 2, 3 y 4 poscoito, mediante una sobredosis (90 mg/kg) de pentobarbital sódico aplicado por vía intracardiaca<sup>(19)</sup>. Las hembras del grupo testigo fueron sacrificadas de la misma manera, y al momento del sacrificio presentaban la vulva seca de color rosáceo, lo que es característico de la etapa de diestro<sup>(20)</sup>.

Para verificar el estado de gestación en las conejas se realizó la recuperación de embriones mediante un lavado con solución salina fisiológica isotónica, mediante un catéter estéril conectado a una jeringa<sup>(21)</sup>. Este lavado se realizó, previa ligadura, en tres sitios anatómicos: al tercio medio de las tubas uterinas (TU) que comprende el ánfula y la unión istmo-ampular; el segundo sitio correspondió al tercio proximal de las TU (adyacente al ovario) y el tercero correspondió a los cuernos uterinos. Posteriormente, con un microscopio estereoscópico se buscó la presencia de embriones en el fluido recuperado en una caja de Petri.

Para el estudio histológico, se obtuvieron fragmentos de cada una de las regiones anatómicas de las TU: fimbrias, infundíbulo, ánfula e istmo, de cada uno de los animales, y se fijaron en una solución de ácido pícrico (15 %) y paraformaldehído (4 %) en un amortiguador de fosfatos (PBS), pH 7.4, durante 8 h. Transcurrido el período de fijación, los fragmentos de tejido se mantuvieron durante 24 h en una solución de PBS y se procesaron conforme a la técnica de inclusión en parafina en un histoquinete automático. A continuación se efectuaron cortes semiseriados de 6  $\mu$ m de grosor con un microtomo; que se obtienen al dejar pasar cuando menos tres rebanadas de tejido entre cada corte que se empleó para el estudio. Algunos de estos cortes se tiñeron con hematoxilina y eosina y con ácido peryódico de Schiff (PAS), para observar la estructura histológica general del útero, y otros cortes con la tinción de Giemsa para identificar a los linfocitos.

Se realizó el conteo de linfocitos presentes entre las células del epitelio luminal a los que se le denominaron linfocitos intraepiteliales (LIE);

To verify the pregnancy stage, embryos were recuperated by a flushing carried out with an isotonic physiological saline solution pumped through a catheter<sup>(21)</sup>. This flushing was carried out, previous ligature, in three anatomical regions, the middle third of the oviducts (TU) which includes ampullae and ampullae-isthmus junction, the proximal third of the TU (adjacent to ovaries) and third site corresponded to the uterine horns. The presence of embryos was searched for in fluids recovered in a Petri dish with the aid of a stereoscopic microscope.

To carry out histologic studies, samples were taken of the different anatomic regions of the TU - fimbriae, infundibulum, ampullae and isthmus - of each animal and set in a solution of 15 % picric acid and 4 % paraformaldehyde in a phosphate buffer (PBS), pH 7.4 for 8 h and then placed for 24 h in a PBS solution and processed in accordance with the paraffin embedding technique in an automatic histokinette. Afterwards, 6  $\mu$ m thick semi-serialized cuts were performed with a microtome, obtained after letting pass three slices between each slice used in the study. Some of these slices were tinted with hematoxylin and eosin and Schiff's periodic acid (PAS), to observe the general histological structure of the TU and other slices were tinted with Giemsa to identify lymphocytes.

Lymphocytes present between the cells of the luminal epithelium, which were named intraepithelial lymphocytes (LIE), were counted. Also, lymphocytes present in the sub-epithelial area of the connective tissue layer were quantified and were named interstitial lymphocytes (LIT). Lymphocyte count was carried out in 25 microscopic fields with an ocular provided with a micrometric reticule connected to a photonic microscope with a 40X objective. Cell count was carried out by two independent observers, which did not have access to the experiment protocol characteristics.

Data obtained in the cell count were analyzed through a one tail variance test, and later a non parametric Tukey test on a means comparison between groups<sup>(22)</sup> was applied.

On days 1 and 2 of pregnancy, embryos were obtained by flushing the ampullae-isthmus junction and ampullae



Figura 1. Infundíbulo de coneja al día 4 de gestación. Se observan linfocitos intraepiteliales (flechas) y linfocitos intersticiales (puntas de flecha) en el endosalpinx. Tinción PAS. Barra= 20  $\mu$ m.

Figure 1. Rabbit infundibulum on d 4 of pregnancy. Intraepithelial (arrows) and interstitial lymphocytes (arrow points) can be seen in the endosalpinx. PAS stain. Bar 0 20  $\mu$ m.

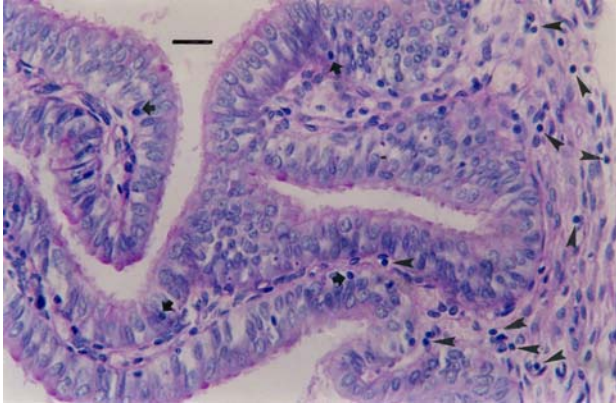
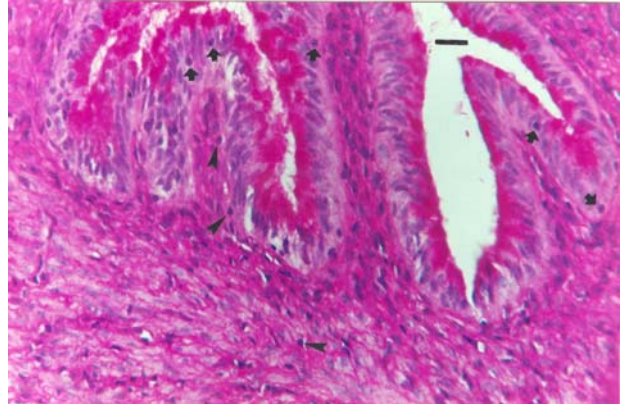


Figura 2. Isthmo de coneja al día 3 de gestación. Se observan linfocitos intraepiteliales (flechas) y linfocitos intersticiales (puntas de flecha) en el endosalpinx. Tinción PAS. Barra= 20  $\mu$ m.

Figure 2. Rabbit isthmus on d 3 of pregnancy. Intraepithelial (arrows) and interstitial lymphocytes (arrow points) can be seen in the endosalpinx. PAS stain. Bar 0 20  $\mu$ m.



también se cuantificaron los linfocitos presentes en la región subepitelial de la lámina propia del tejido conjuntivo, a los que se les denominó linfocitos intersticiales (LIT). El conteo de linfocitos se efectuó en 25 campos microscópicos con un ocular con retícula micrométrica conectado a un microscopio fotónico y el objetivo 40X. El conteo celular fue realizado de manera independiente por dos observadores, quienes no tuvieron información sobre las características del protocolo experimental.

Para el análisis de los datos obtenidos del conteo celular se empleó una prueba de análisis de varianza de una sola cola, y posteriormente se efectuó una prueba no paramétrica de Tuckey en la comparación de medias entre grupos<sup>(22)</sup>.

En los días 1 y 2 de la gestación se obtuvieron embriones a partir de la solución de lavado que se recuperó del ámpula y de la unión istmo-ampular, sin embargo en los días 3 y 4 no fue posible recuperar ningún embrión en esta región anatómica. En la región del istmo, los días 1, 2 y 3 de la gestación se recuperaron embriones, mientras que el día 4 no fue posible recuperar ningún embrión.

areas. However, no embryos were recovered from these anatomic areas on d 3 and 4. Embryos were recovered from isthmus on d 1, 2 and 3, and none on d 4. Embryos were recovered from uterine fluid on d 3 and 4, but none on d 1 and 2 of pregnancy.

When histologic samples were examined through the microscope, lymphocytes were found consistently between cells of the superficial luminal epithelium (LIE) and in the sub-epithelial layer of the connective tissue of the endosalpinx (LIT) of pregnant and non pregnant (NG) female rabbits (Figures 1, 2).

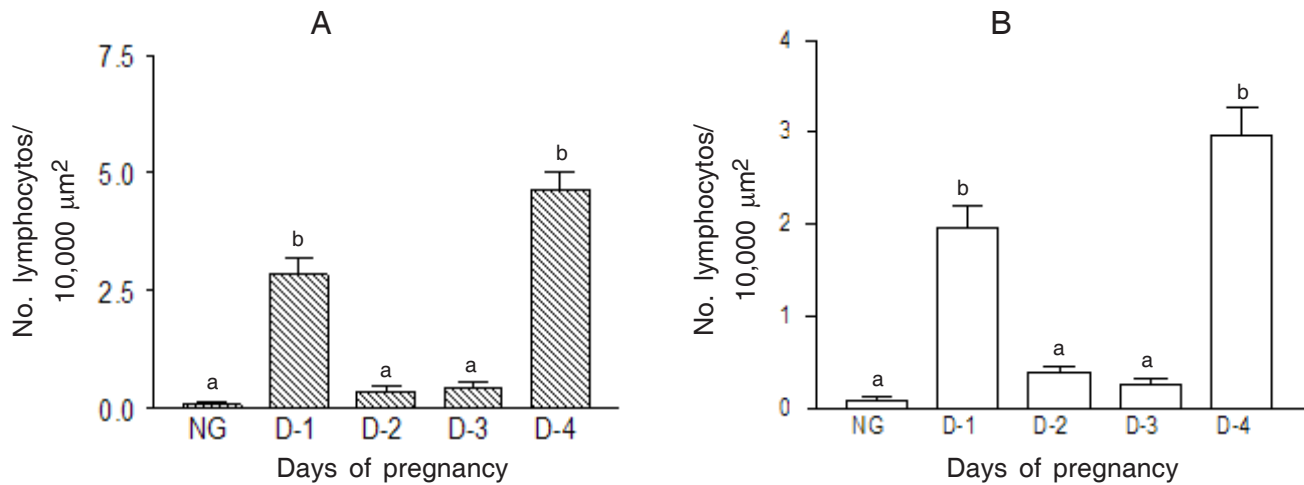
The number of intraepithelial (LIE) and interstitial (LIT) lymphocytes found in the fimbriae on d 1 and 4 of pregnancy was significantly greater than those found on d 2 and 3 and in the control group ( $P < 0.01$ ) (Figures 3A, 3B).

In the infundibulum a significant increase in both LIE and LIT was seen on d 4 of pregnancy ( $P < 0.01$ ) relative to control (NG) and to d 1, 2 and 3 of pregnancy ( $P < 0.01$ ) (Figures 4A, 4B).

In ampullae a significant increase of both LIE and LIT was observed on d 1 ( $P < 0.01$ ) and 2 ( $P < 0.05$ )

Figura 3. Linfocitos epiteliales (A) e intersticiales (B) presentes en la fimbria de conejas no gestantes (NG) y de gestantes durante los cuatro primeros días de gestación. a,b ( $P < 0.01$ ).

Figure 3. Epithelial lymphocytes (A) and interstitial lymphocytes (B) present in non pregnant (NG) rabbit fimbriae and in female rabbits fimbriae during the first 4 d of pregnancy, a,b ( $P < 0.01$ )



En el fluido uterino no se recuperaron embriones en los dos primeros días de la gestación, lo que si fue posible en los días 3 y 4 de la gestación.

Al examen microscópico de los cortes histológicos, los linfocitos se localizaron de manera consistente entre las células del epitelio superficial luminal (LIE) y en la lámina propia de tejido conjuntivo subepitelial (LIT) del endosálpinx de las conejas gestantes y no gestantes (NG) (Figuras 1,2).

El número de linfocitos intraepiteliales (LIE) y linfocitos intersticiales (LIT) localizados en la región de la fimbria en los días 1 y 4 de la gestación fue significativamente mayor con respecto a los días 2, 3 y al grupo testigo ( $P < 0.01$ ) (Figuras 3A, 3B).

En el infundíbulo únicamente se observó un incremento significativo ( $P < 0.01$ ) en el número de LIE y LIT el día 4 de la gestación con respecto al grupo testigo (NG) y a los grupos de los días 1, 2 y 3 de animales gestantes ( $P < 0.01$ ) (Figuras 4A, 4B).

En el ampulla se presentó un incremento significativo en el número de LIE y LIT durante los días 1

of pregnancy relative to control (NG) and d 3 and 4 of pregnancy (Figures 5A, 5B).

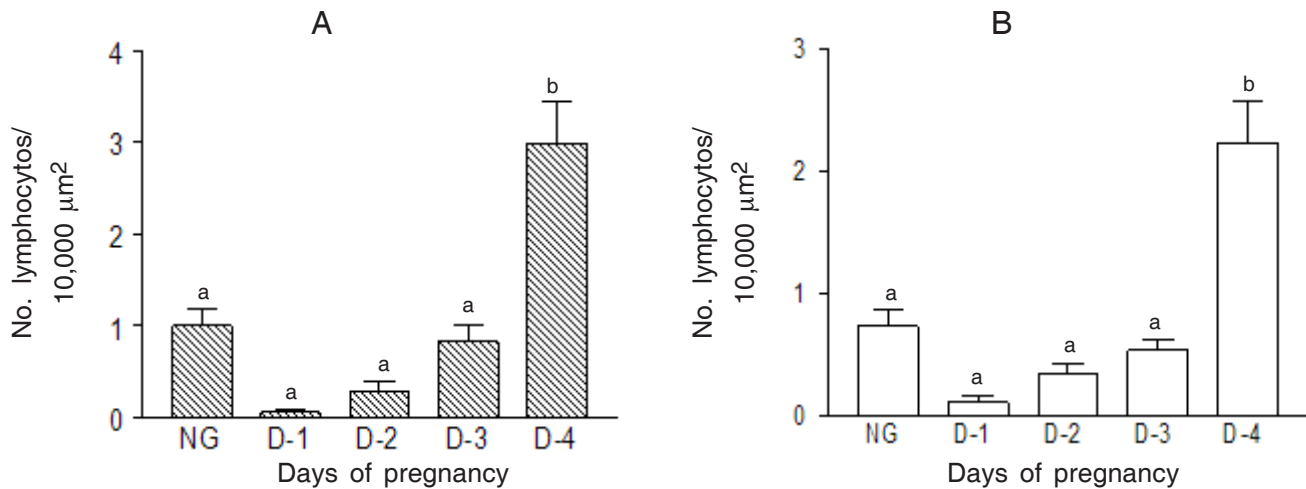
In isthmus a significant drop in LIE was seen when compared to control (NG) in the first 4 d of pregnancy ( $P < 0.01$ ), being more evident on d 3 (Figures 6A, 6B).

The increases in LIE and LIT observed in fimbriae on d 1 of pregnancy could be related to ovulation. Most probably, ovulation induces temporary lymphocyte affluence to fimbriae through mechanisms which cannot be yet explained. However, this finding does not concur with what is reported in a recent study, where it is mentioned that the number of T CD43+ cells in female rabbit's oviducts did not change after inducing ovulation<sup>(6)</sup>. On the other hand, the significant increase in LIE and LIT observed on d 4 of pregnancy in fimbriae suggests that on that day lymphocytes most probably migrate to reinforce the immunological barrier (Figures 3A, 3B).

The significant increases seen in both LIE and LIT in infundibulum on d 4 of pregnancy, stand out against the low cell density observed on d 1 and 3. This finding is relevant from a functional

Figura 4. Linfocitos epiteliales (A) e intersticiales (B) presentes en el infundíbulo de conejas no gestantes (NG) y de gestantes durante los cuatro primeros días de gestación (D-1 a D-4). a, b ( $P < 0.01$ ).

Figure 4. Epithelial lymphocytes (A) and interstitial lymphocytes (B) present in non pregnant (NG) rabbit infundibulum and in female rabbits infundibulum during the first 4 d of pregnancy (D-1 to D-4), a, b ( $P < 0.01$ ).



( $P < 0.01$ ) y 2 ( $P < 0.05$ ) de la gestación en relación con el grupo testigo (NG) y los días 3 y 4 (Figura 5A, 5B).

En el istmo se encontró una disminución significativa en el número de linfocitos intraepiteliales (LIE) con respecto al grupo NG, durante los primeros 4 días de la gestación ( $P < 0.01$ ); esta disminución fue más evidente el día 3 que los demás días de la gestación (Figura 6A, 6B).

El aumento observado en el número de LIE y de LIT en la fimbria el día 1 de la gestación, puede estar relacionado con el evento de la ovulación. Posiblemente la ovulación induce una afluencia temporal de linfocitos a la fimbria mediante mecanismos que aun no podemos explicar. Sin embargo este hallazgo no coincide con lo informado en un estudio reciente, en el que se menciona que el número de células T CD43+ en el oviducto de la coneja no cambió después de inducir la ovulación<sup>(6)</sup>. Por otra parte, el aumento significativo de LIE y de LIT observado el día 4 de la gestación en la fimbria sugiere que en ese día, los linfocitos migran posiblemente para reforzar la barrera inmunológica (Figuras 3A, 3B).

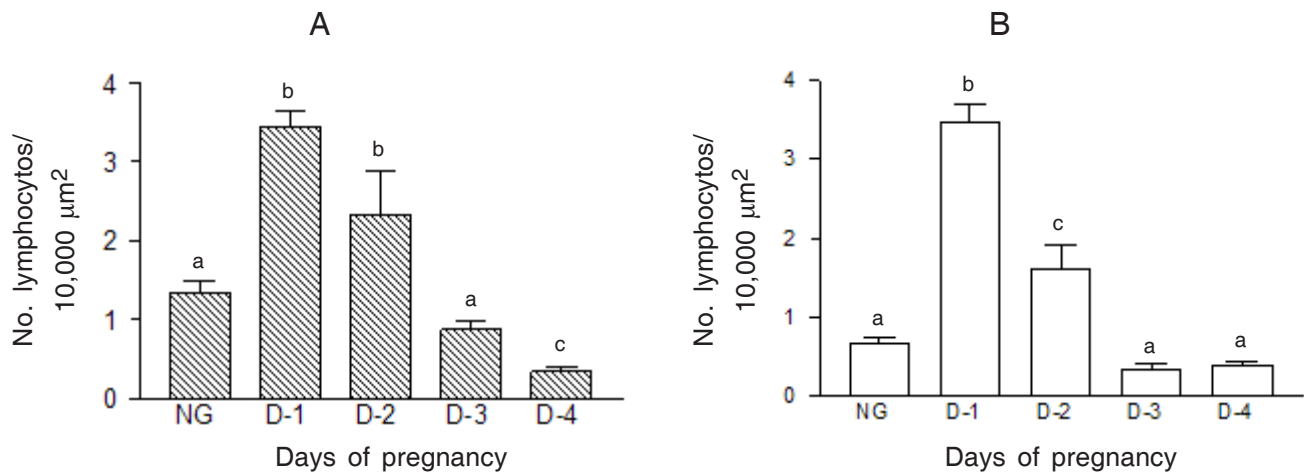
standpoint due to the fact that on d 4 the embryo enters the uterus, and therefore, the same as in fimbriae immunologic vigilance should be reinforced to counter any risks of ascending infections. It is a known fact that epithelial cells of oviducts secrete molecules which favor early embryo development, being one of these uteroglobin (UG), a protein similar to cytokine, which is synthesized in the TU, which has been proposed as an immunomodulator and which takes part in some local cell proliferation processes<sup>(23)</sup>.

On d 1 of pregnancy a greater percentage of embryos was recovered in the ampullae-isthmus junction, due to the fact that embryos remain in that area 24 h before passing forward to isthmus<sup>(3,21)</sup>. Same as in infundibulum, no differences were found when comparing LIE and LIT readings between NG and d 4 of pregnant animals (Figures 5A, 5B), which suggests a continued migration of lymphocytes.

Due to morphologic peculiarities of oviduct epithelium as: proportion of secreting and non secreting cells, infundibulum and ampullae are sometimes considered as a single morphofunctional

Figura 5. Linfocitos epiteliales (A) e intersticiales (B) presentes en el ámpula de conejas no gestantes (NG) y de gestantes durante los cuatro primeros días de gestación. abc ( $P<0.05$ )

Figure 5. Epithelial lymphocytes (A) and interstitial lymphocytes (B) present in non gestating (NG) rabbit ampullae and in female rabbits ampullae during the first 4 d of pregnancy. abc ( $P<0.05$ )



El aumento significativo que se presentó en el número de LIE y de LIT en la región del infundíbulo el día cuatro de la gestación, contrasta con la escasa densidad celular observada en los días 1 al 3. Este hallazgo es relevante desde el punto de vista funcional debido a que en el día cuatro el embrión ingresa al útero, por lo que al igual que en la fimbria se requiere fortalecer la vigilancia inmunológica para evitar cualquier riesgo de infección ascendente.

Se sabe que las células epiteliales de las tubas uterinas secretan moléculas que favorecen el desarrollo embrionario temprano; dentro de estas moléculas destaca la uteroglobina (UG); una proteína semejante a citocina, que es sintetizada de manera constitutiva en las tubas uterinas, que se ha postulado que puede actuar como un inmunomodulador, y que participa en algunos procesos de proliferación celular local<sup>(23)</sup>.

En la región de la unión istmo-ampular, se recuperó el mayor porcentaje de embriones el día 1 de la gestación, lo que se debe a que en este sitio permanecen 24 h antes de pasar al istmo<sup>(3,21)</sup>. Al igual que en el infundíbulo, en el ámpula no se

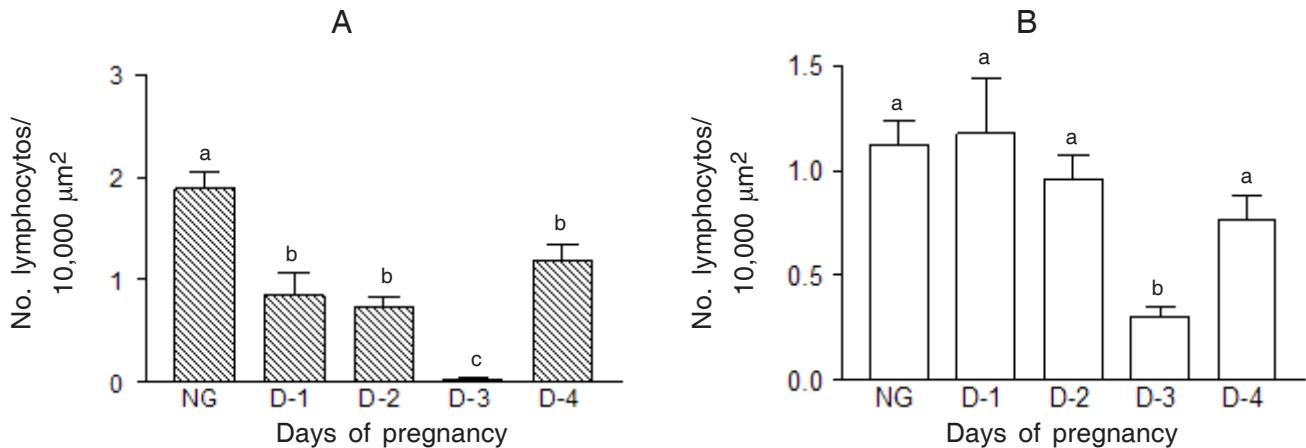
unit<sup>(24)</sup>, however, in reference to lymphocyte migration, it seems to behave differently, because in infundibulum increases in both LIE and LIT were observed only on d 4 of pregnancy (Figures 4A, 4B, 4C), while in ampullae, this increase was seen only on d 1 and 2 of pregnancy (Figures 5A, 5B). So, to understand the functional meaning of this lymphocyte migration pattern, in future studies lymphocyte T CD4+ and TCD8+ sub-populations present in this anatomic area should be determined. Knowing the migration dynamics of both lymphocyte sub-populations could help explain its participation in local mechanisms which modulate the immunological behavior in the isthmus-ampullae region towards spermatozoa and embryos in its early development stages. The very low number of LIE observed in the first 3 d of pregnancy in isthmus could be related to the fact that in this region a high number of embryos were recovered on d 1 and 2. It is most possible that the drastic drop in number of embryos recovered on d 3 could be due to sharp increase in serum progesterone concentration beginning on d 3 of pregnancy<sup>(25)</sup>. In this respect it has been shown that the progesterone receptor plays an important anti-



DISTRIBUCIÓN DE LINFOCITOS EN TUBAS UTERINAS DE CONEJA

Figura 6. Linfocitos epiteliales (A) e intersticiales (B) presentes en el istmo de conejas no gestantes (NG) y de gestantes durante los cuatro primeros días de gestación. abc ( $P<0.01$ )

Figure 6. Epithelial lymphocytes (A) and interstitial lymphocytes (B) present in non pregnant (NG) rabbit isthmus and in female rabbits isthmus during the first a d of pregnancy. abc ( $P<0.01$ )



observaron diferencias cuando se comparó entre sí el número de LIE y de LIT de los animales NG y de los animales en el día 4 de la gestación (Figuras 5A, 5B), lo que sugiere que la migración linfocitaria a este órgano es continua.

Debido a las particularidades morfológicas del epitelio del oviducto de la coneja gestante como son: la proporción de células secretoras y no secretoras, el infundíbulo y el ámpula suelen considerarse como una unidad morfofuncional<sup>(24)</sup>; sin embargo, en cuanto a la migración de linfocitos, parece comportarse de una manera distinta, pues en el infundíbulo se observó un incremento en el número de LIE y LIT únicamente el día cuatro de la gestación (Figuras 4A, 4B, 4 C), mientras que en el ámpula, este incremento se observó en los dos primeros días de la gestación (Figuras 5A, 5B), por lo que para poder comprender el significado funcional de dicho patrón migratorio linfocitario a la región del ámpula, es necesario determinar en futuros estudios las subpoblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+ presentes en dicho segmento anatómico. El conocer la dinámica migratoria de ambas subpoblaciones linfocitarias, puede explicar su participación en los mecanismos locales que modulan el comportamiento inmuno-

inflammatory function in the uterus when progesterone is applied together with estrogens, which results in a decrease in neutrophils and macrophages count, due to migration to the uterus<sup>(26)</sup>.

Results obtained in the present study show the presence of a functional interactivity between the progestational environment and the immunologic behavior of the endosalpinx in the first four days of pregnancy of rabbits, which concurs with reports of other researchers on expression to lymphocytic progesterone receptors in pregnant women<sup>(27,28)</sup> and also relative to the presence of mRNA for the progesterone receptor in immunologic cells in other species<sup>(29,30)</sup>. This has functional relevance as intraepithelial lymphocytes participate in spermatozoa antigen recognition and show lytic activity<sup>(31,32)</sup>.

Recently, in a study carried out in oviduct of sow the number of lymphocytes present in both early and late diestrus was determined in the epithelial layer and in the sub-epithelial connective tissue. No significant differences were found between the three stages, so it is safe to assume that in this specie the progestational environment of the luteal

lógico del segmento istmo-ampular, a la presencia de espermatozoides, y al embrión en sus etapas muy tempranas de desarrollo. El escaso número de LIE observado los primeros tres días de la gestación en el istmo, puede relacionarse con el hecho de que en esta porción se recuperó un porcentaje elevado de embriones los días 1 y 2. Es probable que la disminución más drástica de linfocitos encontrada en el día 3 se deba a que precisamente la concentración plasmática de progesterona en la coneja aumenta considerablemente a partir del día 3<sup>(25)</sup>. Al respecto se ha demostrado que el receptor a progesterona desempeña un papel anti-inflamatorio importante en el útero del ratón cuando la progesterona es administrada junto con estrógenos, lo que resulta en la disminución del número de neutrófilos y macrófagos que migran hacia el útero<sup>(26)</sup>.

Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran la existencia de una interacción funcional entre el ambiente progestacional y el comportamiento inmunológico del endosálpinx durante los primeros cuatro días de la gestación en la coneja, lo que se relaciona con lo informado por otros investigadores sobre la expresión de receptores a progesterona en linfocitos de mujeres gestantes<sup>(27,28)</sup> y respecto a la existencia de RNAm para el receptor de progesterona en células inmunológicas de otras especies<sup>(29,30)</sup>. Lo anterior tiene relevancia funcional debido a que los linfocitos intraepiteliales participan en el reconocimiento de antígenos propios de los espermatozoides y tienen actividad lítica<sup>(31,32)</sup>.

Recientemente, en un estudio efectuado en el oviducto de la cerda se determinó el número de linfocitos presentes en las etapas de diestro temprano, diestro y diestro tardío en la lámina epitelial y en el tejido conjuntivo subepitelial, y no se encontraron diferencias significativas entre las tres etapas, por lo que en esta especie el ambiente progestacional de la fase lútea no modificó el comportamiento migratorio de los linfocitos intraepiteliales e intersticiales. En contraste, en la etapa de estro ocurrió una disminución significativa en el número de linfocitos pero sólo en el tejido conjuntivo subepitelial<sup>(9)</sup>.

phase did not modify LIE and LIT migratory behavior. Contrariwise, in estrus lymphocyte count dropped dramatically, but only in the sub-epithelial connective tissue<sup>(9)</sup>.

Being rabbits an induced ovulation specie and not having a regular estrous cycle as other species do<sup>(2)</sup>, estrogens are the predominant ovarian hormones until mating, with the consequent formation of *corpora lutea* and of an increase in progesterone synthesis. Due to this, the female rabbit is a suitable model to study the effect of pregnant progestational environment on the affluence of lymphocytes to different anatomic areas of the oviducts, because the beginning of pregnancy can be defined with precision.

Results obtained in this study indicate that LIE and LIT distribution in the mucosa of different anatomic regions of the TU show variations in the first 4 d of pregnancy, which demonstrates the existence of a regionalized distribution of these cells in TU mucosa. On the other hand, anatomic segments of uterine tubes respond differently at the beginning of pregnancy, depending on the moment embryos are present in different areas while displacing themselves in oviduct mucosa, which suggests that this organs present a space and temporal synchrony.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors are most grateful to DGAPA-UNAM (Project PAPIIT IN212101) for funding this study. They also wish to thank most especially Emilio Francisco López-López for processing tissues.

*End of english version*

---

Al ser la coneja una especie de ovulación inducida y no presentar un ciclo estral regular como el de otras especies<sup>(2)</sup>, los estrógenos son las hormonas ováricas que predominan hasta que ocurre el apareamiento, con la consecuente formación de los cuerpos lúteos y la síntesis creciente de

progesterona. Por lo anterior, la coneja es un buen modelo para estudiar el efecto que tiene el ambiente gestacional de la gestación, sobre la afluencia de linfocitos a las diferentes regiones anatómicas de las tubas uterinas, dado que se puede saber con precisión el inicio de la gestación.

Los resultados indican que la distribución de LIE y de LIT en la mucosa de las distintas regiones anatómicas de las tubas uterinas registra variaciones en los primeros cuatro días de la gestación, lo que demuestra la existencia de una distribución regionalizada de estas células en la mucosa tubárica. Por otra parte, los segmentos anatómicos de las tubas uterinas responden de diferente manera al inicio de la gestación dependiendo del momento en que se encuentre el embrión en su trayecto por la mucosa tubárica, lo que sugiere que este órgano tubular experimenta una sincronía espacio temporal.

## AGRADECIMIENTOS

Se agradece el financiamiento otorgado por la DGAPA-UNAM (Proyecto PAPIIT IN212101), para la realización de este estudio; asimismo, se agradece al técnico Emilio Francisco López López el apoyo brindado en el procesamiento de los tejidos.

## LITERATURA CITADA

- Banks WJ. Histología veterinaria aplicada. 2ª ed. México DF: El manual moderno; 1994.
- Hafez ES. Reproducción e inseminación artificial en animales. 6ª ed. México DF: McGraw-Hill-Interamericana; 1996.
- García XF. Fisiología de la reproducción en la coneja. En: Biología de la reproducción en la hembra del conejo doméstico. Valencia, España: Universidad Politécnica de Valencia; 1991:13-25.
- Hafez ES, Tsutsumi T. Changes in the endometrial vascularity during implantation and pregnancy in the rabbit. *Am J Anat* 1966;(118):249-282.
- Brinsko SP, Ball BA. Characterisation of lymphocyte subsets in the equine oviduct. *Equine Vet J* 2006;(38):214-218.
- Gu W, Janssens P, Holland M, Seamark R, Kerr P. Lymphocytes and MHC class II positive cells in the female rabbit reproductive tract before and after ovulation. *Immunol Cell Biol* 2005;(83):596-606.
- Jiwakanon J, Persson E, Kaeoket K, Dalin A. The sow endosalpinx at different stages of the oestrous cycle and at anoestrus: Studies on morphological changes and infiltration by cells of the immune system. *Reprod Dom Anim* 2005;(40):28-39.
- Abughrien BM, Dore MA, McGeedy TA, Fitzpatrick E. Intraepithelial leucocytes in the bovine uterine tube. *Cell Tissue Organs* 2000;(166):20-30.
- Jiwakanon J, Persson E, Kaeoket K, Dalin A-M. The sow endosalpinx at different stages of the oestrous cycle and at anoestrus: studies on morphological changes and infiltration by cells of the immune system. *Reprod Dom Anim* 2005;(40):28-39.
- DuBois JA, Wordinger RJ, Dickey JF. Tissue concentrations of mast cells and lymphocytes of the bovine uterine tube (oviduct) during the estrous cycle. *Am J Vet Res* 1980;(41):806-808.
- Zamora HV, Villaseñor H, Anzaldúa AS, Pérez-Martínez M. Disminución de la migración de linfocitos totales al útero de la coneja (*Oryctolagus cuniculus*) en los primeros días de la gestación. *Vet Méx* 2005;(36):63-73.
- Shulman S. Immunologic barriers to fertility. *Obstet Gynecol Surv* 1972;(27):553-606.
- Guidry AJ, Kiddy CA. Effect of anti-semen antibodies on embryonic survival in rabbits. *J Anim Sci* 1973;(37):118-122.
- Oliphant G, Cabot CL, Ross P, Marta J. Control of the humoral immune system within the rabbit oviduct. *Biol Reprod* 1984;(31):205-212.
- Otsuki Y, Maeda Y, Magari S, Sugimoto O. Lymphatics and lymphoid tissue of the fallopian tube: immunoelectronmicroscopic study. *Anat Rec* 1989;(225):288-296.
- Morris H, Edwards J, Tiltman A, Emms M. Endometrial lymphoid tissue: an immunohistological study. *J Clin Pathol* 1985;(38):644-652.
- Wira CR, Kaushic CH, Richardson J. Role of sex hormones and cytokines in regulating the mucosal immune system in the female reproductive tract. In: *Mucosal Immunology*. 2nd ed. Ogra PL, et al editors. London, New York: Academic Press; 1999:1449-1461.
- Oliphant G, Randall P, Cabot CL. Immunological components of rabbit fallopian tube fluid. *Biol Reprod* 1977;(16):463-469.
- Aluja AS. Animales de Laboratorio y la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999). *Gaceta Médica de México* 2002;(138):295-298.
- Aragona P, Puzzolo D, Micali A, Ferreri G, Britti D. Morphological and morphometric analysis on the rabbit connective globet cells in different hormonal conditions. *Exp Eye Res* 1998;(66):81-88.
- Tsutsumi Y, Hafez ES. Distribution patterns of rabbit embryos during preimplantation stage. *J Morphol* 1974;(144):323-336.
- Steel SR, HJ Torrie. Bioestadística, principios y procedimientos. Estadística no paramétrica. 2ª ed. México, DF: Mc Graw-Hill; 1988.
- Riffo M, Díaz GK, Nieto A. Uteroglobin induces the development and cellular proliferation of the mouse early embryo. *J Exp Zool* 2007;(307A):28-34.
- Anzaldúa SR, Camacho-Arroyo I, Cerbón MA. Histomorphological changes in the oviduct epithelium of rabbit during early pregnancy. *Anat Histol Embryol* 2002;(31):308-312.

25. Browning J, Keyes FL, Wolfe R. Comparison of serum progesterone, 20 $\alpha$ -dihydroprogesterone and estradiol 17 $\beta$  in pregnant and pseudo-pregnant rabbit: evidence for post implantation recognition of pregnant. *Biol Reprod* 1980;(23):1014-1019.
26. Tibbettz TA, Conneely OM, O Malley BW. Progesterone via its receptor antagonizes the pro-inflammatory activity of estrogen in the mouse uterus. *Biol Reprod* 1999;(69):1158-1165.
27. Szekeres-Bartho J, Reznikoff-Etievant MF, Varga P, Varga Z, Chaouat G. Lymphocytic progesterone receptors in human pregnancy. *J Reprod Immunol* 1989;(16):239-247.
28. Szekeres-Bartho J, Szekeres-Bartho GY, Debre P, Autran B, Chaouat G. Reactivity of lymphocytes to a progesterone receptor-specific monoclonal antibody. *Cell Immunol* 1990;(125):273-283.
29. Kimoto Y. A single human cell expresses all messenger ribonucleic acids: the arrow of time in a cell. *Mol Gen Genet* 1998;(258):233-239.
30. Pasanen S, Ylikomi T, Palojoki E, Syvala H, Peltto-Huikko M, Touhima P. Progesterone receptor in chicken bursa of Fabricius and thymus: evidence for expression in B-lymphocytes. *Mol Cell Endocrinol* 1998;(141):119-128.
31. Whitelaw PF, Croy BA. Granulated lymphocytes of pregnancy. *Placenta* 1996;(18):473-474.
32. Fox A, Lee CS, Brandon MR, Meeusen EN. Effects of pregnancy on lymphocytes within sheep uterine interplacentomal epithelium. *Am J Reprod Immunol* 1998;(40):295-302.