

Veterinaria México

Volumen 36
Volume

Número 1
Number

Enero-Marzo 2005
January-March

Artículo:

Disminución de la migración de
linfocitos totales al útero de la coneja
(*Oryctolagus cuniculus*) en los primeros
días de gestación y pseudogestación

Derechos reservados, Copyright © 200:
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

**Otras secciones de
este sitio:**

- 👉 **Índice de este número**
- 👉 **Más revistas**
- 👉 **Búsqueda**

***Others sections in
this web site:***

- 👉 ***Contents of this number***
- 👉 ***More journals***
- 👉 ***Search***



Medigraphic.com

Disminución de la migración de linfocitos totales al útero de la coneja (*Oryctolagus cuniculus*) en los primeros días de la gestación y pseudogestación*

Reduction of total lymphocyte migration to the uterus during the first days of pregnancy and pseudopregnancy of the rabbit (*Oryctolagus cuniculus*)

Verónica X. Zamora Huerta**

Héctor Villaseñor Gaona**

Santiago R. Anzaldúa Arce**

Mario Pérez-Martínez**

Abstract

The initiation of pregnancy is a transitional period during which very important changes in sexual hormone levels are registered. These changes cause multiple morphologic changes in the endometrium that are quite necessary for implantation to occur. The objective of the present study was to evaluate the migration activity of total lymphocytes in the endometrium of New Zealand breed, four months old, white female rabbits maintained in individual cages in laboratory animal conditions with cycles of 12 hours light and 12 hours darkness, with feed and water *ad libitum*. With these animals three different groups were formed: a) pregnant animals on day 1, 2, 3, 4, 5 and 8; b) animals in a pseudo-pregnant state on days 1, 2, 3, 4, 5 and 8 following the administration of 100 IU of human chorionic gonadotropin (hCG); and c) non pregnant animals (NP). The rabbits were slaughtered at different times according to the experimental protocol through a lethal sodium pentobarbital intracardiac injection once the rabbit were anesthetized. After the slaughter, fragments of both uterine horns were excised, and fragments of uterine tissue were obtained, fixed and processed by paraffin inclusion to perform histological cuts that were stained with hematoxylin-eosin (H & E) and Giemsa. Total lymphocytes present in the luminal epithelial layer and lamina propria of the stroma of the endometrium were counted. The number of total lymphocytes present in the rabbit endometrium during days 1 to 5 and 8 of gestation and pseudo-gestation decreased ($P < 0.05$) with respect to the values found in non-pregnant, control females (NG). However, in the pseudo-pregnant animals a decrease in the number of lymphocytes found on days 1 and 2 was more evident than what was observed for these days in the pregnant rabbits. Day 8th was characterized by presenting a smaller quantity of cells than the rest of the evaluated days. It is concluded that during in the first 8 days of gestation the number of lymphocytes present in the rabbit endometrium decreases and that pseudo-pregnant rabbits present a similar condition.

Key words: EARLY PREGNANCY, INDUCED PSEUDOPREGNANCY, LYMPHOCYTES, UTERUS, RABBIT.

Resumen

El inicio de la gestación es un período transicional durante el cual se registran cambios muy importantes en la concentración de hormonas sexuales. Estos cambios causan múltiples cambios morfológicos en el endometrio que son muy necesarios para que se lleve a cabo la implantación. El presente estudio tuvo como objetivo evaluar la actividad migratoria de los linfocitos totales al endometrio de conejas de la raza Nueva Zelanda, blancas, de cuatro meses de edad, mantenidas en condiciones de bioterio en jaulas individuales con ciclos de 12 h de luz y 12 horas de oscuridad, con alimento y agua *ad libitum*. Con estos animales se formaron

Recibido el 19 de abril de 2004 y aceptado el 15 de octubre de 2004.

*Esta investigación forma parte de la tesis de licenciatura del primer autor y se realizó con recursos obtenidos del proyecto PAPIIT IN212101, DGAPA-UNAM.

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

Correspondencia: Mario Pérez Martínez, Departamento de Morfología, Laboratorio de Biología Tisular de la Reproducción, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F. Tel. (0155) 5622-5893, fax (0155) 5616-2342. E-mail: perezmtzmario@yahoo.com.mx

tres grupos diferentes: a) animales gestantes en los días 1, 2, 3, 4, 5 y 8; b) animales pseudogestantes en los días 1, 2, 3, 4, 5 y 8 posteriores a la administración de 100 UI de gonadotropina coriónica humana (hCG); y c) animales no gestantes (NG). Las conejas se sacrificaron en diferentes momentos de acuerdo con el protocolo experimental por medio de una inyección intracardiaca letal de pentobarbital sódico, previa anestesia de los animales. Posteriormente a su sacrificio se obtuvieron fragmentos de ambos cuernos uterinos que se fijaron y procesaron por inclusión en parafina para efectuar cortes histológicos que se tiñeron con hematoxilina-eosina y con Giemsa para realizar el conteo de linfocitos totales presentes en la lámina epitelial-lámina propia de tejido conjuntivo del endometrio. Se encontró un menor número de linfocitos totales en el endometrio de conejas en los días uno al cinco y ocho de la gestación y pseudogestación ($P < 0.05$) con respecto a los valores encontrados en las hembras testigo no gestantes (NG). Sin embargo, en las conejas pseudogestantes, la disminución de linfocitos encontrada los días uno y dos fue más evidente que la observada en esos días en las conejas gestantes. El día ocho las conejas pseudogestantes presentaron menor número de células que el resto de los días evaluados. Se concluye que durante los ocho primeros días de la gestación, el número de linfocitos presentes en la mucosa uterina disminuye y que en la pseudogestación se presenta un patrón de afluencia de linfocitos similar al observado en los animales gestantes.

Palabras clave: GESTACIÓN TEMPRANA, SEUDOGESTACIÓN INDUCIDA, LINFOCITOS, ÚTERO, CONEJA.

Introduction

The domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) is a species where induced ovulation occurs. In this species ovulation happens between 10 to 12 hours after coital stimulation. Ovulation can be induced by vaginal stimulation, by female-female mounting, by vasectomized male mounting, by lumbo-sacral electrical stimulation and by the administration of hormones such as human chorionic gonadotropin (hCG).^{1,2}

The non-pregnant female rabbit (NP) has alternating periods of male acceptance and rejection. Several authors³⁻⁷ have studied the populations of follicles present in the ovaries of females that accept mounting and females that reject mounting. The follicles of females that are not receptive to males are atresic and they are progressively replaced by new small follicles, situation that is associated to a descent in the levels of 17β -estradiol.

After ovulation the secretory activity of the *corpus luteum* is fundamental to establish and maintain gestation.⁸ The serum concentration of progesterone (P_4) is closely correlated with the weight of the luteum tissue during the seventh and tenth days after coitus,⁹ therefore the changes in the production of progesterone in the ovary constitute the main factor responsible for the variations in the peripheral levels of progesterone during gestation.

In the pseudo-pregnant rabbit the concentration of progesterone gradually increases from day one after ovulation until approximately day 12, when the functional luteolysis of the *corpus luteum* starts. In the

Introducción

La coneja doméstica (*Oryctolagus cuniculus*) es una especie de ovulación inducida. En esta especie la ovulación ocurre entre diez y 12 horas después del estímulo coital. La ovulación puede ser inducida por estimulación vaginal, por la monta hembra-hembra, por monta con macho vasectomizado, por estímulos eléctricos lumbosacros y por la administración de hormonas, como la gonadotropina coriónica humana (hCG).^{1,2}

La coneja no gestante (NG) presenta periodos alternados de aceptación y no aceptación del macho. Diversos autores³⁻⁷ han estudiado las poblaciones de los folículos presentes en los ovarios de las conejas que aceptan la monta y en las hembras que la rechazan. Los folículos de las hembras que no son receptivas al macho se tornan atrésicos y progresivamente son reemplazados por nuevos folículos pequeños, lo que está asociado a un descenso en los niveles de 17β -estradiol.

Después de la ovulación la actividad secretora de los cuerpos lúteos es fundamental para el establecimiento y mantenimiento de la gestación.⁸ La concentración sérica de progesterona (P_4) está estrechamente correlacionada con el peso del tejido luteal durante el séptimo y décimo días poscoito,⁹ por lo que los cambios en la producción de progesterona ovárica constituyen el factor principal responsable de las variaciones en los niveles periféricos de progesterona durante la gestación.

En la coneja pseudogestante la concentración de progesterona se incrementa gradualmente del día uno

pseudo-pregnant state the plasmatic concentration of P_4 markedly increases between days 9 and 13 after the administration of hCG.^{8,9}

The endocrine changes that appear at the start of pregnancy induce important changes in the tissue of the reproductive tract in order to generate the conditions necessary for the implantation of the embryo.¹⁰ It has been reported that within these changes in the uterus of the rabbit there are variations in the cellular proliferation and apoptosis in the uterine and glandular covering epithelium during the days prior to embryo implantation.¹¹

At the beginning of pregnancy a paracrine type molecular "dialogue" is established between the uterine tissue and the embryo; this dialogue is carried out through the secretion of several chemical signals that contribute to the synchronic transport of the product towards the uterus and also favor the initial embryonic development.¹² Among the molecules that carry out this function, the embryonic platelet activating factor (EPAF) is reported, which is necessary to induce the early pregnancy factor (EPF) that itself constitutes the first proper specific maternal response of pregnancy in species such as sheep and rabbit.¹³⁻¹⁶

It has been proposed that progesterone (P_4) regulates many of the immunoendocrine events that happen in the uterine tissue. In sheep, the increase of serum concentration of P_4 , which characterizes the beginning of pregnancy, modifies substantially the local immunological response of the uterus.^{17,18} In the uterus of the ewe the molecule that mediates some of the progesterone inhibiting effects is an endometrial glucoprotein called the uterus milk protein (UTMP).¹⁷

On the other hand, in the uterus of the rabbit a protein called uteroglobin (UTG) or blastocytokine is synthesized, during the first days of pregnancy, which constitutes between 40% and 60% of the total proteins in the uterine fluid, and their synthesis is dependant on the action of progesterone. In the domestic rabbit the implantation of the embryo happens approximately at day seven of pregnancy, when there is a high concentration of UTG.^{19,20}

Due to the fact that the blastocyst expresses paternal antigens that are strange to the maternal organism, some researchers have proposed that the implantation process resembles the inflammatory process. Among the tissular events that occur during implantation, macrophage and leukocyte infiltration, neovascularization and the production of prostaglandins are reported, among others.^{21,22}

The uterus has lymphocyte populations and subpopulations, and it has been reported that these cells in the endometrium are influenced by the

posterior a la ovulación hasta aproximadamente el día 12, cuando se inicia la luteolisis funcional del cuerpo lúteo. En el estado de pseudogestación la concentración plasmática de P_4 se incrementa marcadamente entre los días nueve y 13 posteriores a la administración de hCG.^{8,9}

Los cambios endocrinos que se presentan al inicio de la gestación inducen cambios importantes en las características de los tejidos del aparato reproductor con el fin de propiciar las condiciones necesarias para que se lleve a cabo la implantación del embrión.¹⁰ Dentro de estos cambios se ha informado que en el útero de la coneja se presentan variaciones en los procesos de proliferación celular y apoptosis en el epitelio de revestimiento uterino y glandular durante los días previos a la implantación.¹¹

En el inicio de la gestación se establece un "diálogo" molecular de tipo paracrino entre el tejido uterino y el embrión, este diálogo se lleva a cabo mediante la secreción de diversas señales químicas que contribuyen al transporte sincrónico del producto hacia el útero y favorecen el desarrollo embrionario inicial.¹² Entre las moléculas que cumplen esta función se cita el factor activador de plaquetas, derivado del embrión (EPAF), que es necesario para inducir el factor de gestación temprana (EPF), que constituye la primera respuesta específica materna propia de la gestación en especies como la oveja y la coneja.¹³⁻¹⁶

Se ha planteado que la progesterona (P_4) regula muchos de los eventos inmunoendocrinos que ocurren en el tejido uterino. En la oveja, el aumento en la concentración sérica de P_4 que caracteriza el inicio de la gestación, modifica en forma notoria la respuesta inmunológica local del útero.^{17,18} En el útero de la oveja la molécula que media algunos de los efectos inhibitorios de la progesterona es una glucoproteína endometrial llamada proteína de leche uterina (UTMP).¹⁷

Por otra parte, en el útero de la coneja se sintetiza, en los primeros días de la gestación, una proteína llamada uteroglobina (UTG) o blastocinina, que constituye entre 40% y 60% de las proteínas totales del fluido uterino y su síntesis es dependiente de la acción de la progesterona. En la coneja doméstica la implantación ocurre aproximadamente el día siete de la gestación, cuando se registra alta concentración de UTG.^{19,20}

Debido a que el blastocisto expresa antígenos paternos que resultan extraños al organismo materno, algunos investigadores han propuesto que el proceso de implantación guarda cierta similitud con el proceso inflamatorio. Entre los eventos tisulares que tienen lugar durante la implantación, se citan la infiltración de macrófagos y leucocitos, la neovascularización y la producción de prostaglandinas, entre otros.^{21,22}

stage of the oestrous cycle.²³⁻³⁴ In other studies, it has been shown that during the oestrous cycle, there are variations in the number of plasma cells in the endometrium of cow, sow, goat, rat and mare.^{21,27,31,33,35,36}

Another factor that can modify the number of lymphocytes in the endometrium is the presence of spermatozooids. In a study done on rabbits, it was observed that the destruction of spermatozooids in the uterus happens by the action of leukocytes.³⁷ At present the migration patterns of lymphocytes in the endometrium of pregnant and pseudo-pregnant rabbits are unknown, therefore their study is necessary to evaluate the possible influence of the hormonal environment and the embryos on the affluence of these cells to the uterus.

In light of the aforementioned, this study has the objective of evaluating the migratory pattern of total lymphocytes towards the endometrium in three groups of New Zealand white rabbits: *a*) pregnant rabbits at days 1, 2, 3, 4, 5 and 8; *b*) pseudo-pregnant rabbits at days 1, 2, 3, 4, 5 and 8 after the administration of 100 IU of human chorionic gonadotropin (hCG); and *c*) non-pregnant rabbits (NP).

Material and methods

To carry out this study, 41 sexually mature New Zealand white female rabbits were used (3.5-4.5 Kg body weight), which were maintained under laboratory conditions in individual cages (90 × 60 × 40 cm) with commercial* type feed and water *ad libitum*. These animals were segregated into 12 groups, six of them (three rabbits per group) corresponding to pregnant animals at days 1, 2, 3, 4, 5 and 8 after copulation, and in the rabbits of the remaining six groups (three rabbits per group) ovulation was induced by intramuscular administration of 100 IU of human chorionic gonadotropin (hCG),³⁸ and tissue samples were obtained from them at 1, 2, 3, 4, 5 and 8 days after treatment.

In the pregnant animal group, to each rabbit that presented acceptance behavior towards the male and hyperaemic vulva³⁹ two mounts were given in a single service period using two experienced sires of the same breed. The day of breeding was considered as day "0" of the experiment. There was also a group of nulliparous non-pregnant adult rabbits (NP) which were used as control (n = 5). In order to estimate the physiological state of these animals each female was placed into contact with an non-castrated adult male; females that did not present sexual interest for the male and that had a dry and pale vulva were considered to be in diestrus according to the criteria of Aragona *et al.*³⁹

El útero está provisto de poblaciones y subpoblaciones linfocitarias y se ha informado que la distribución de estas células en el endometrio está influenciada por la etapa del ciclo estral.²³⁻³⁴ En otros estudios se ha encontrado que durante el ciclo estral se presentan variaciones en el número de plasmocitos del endometrio de la vaca, cerda, cabra, rata y yegua.^{21,27,31,33,35,36}

Otro factor que puede modificar el número de linfocitos en el endometrio es la presencia de espermatozoides. En un estudio realizado en conejas se observó que la destrucción de espermatozoides en el útero está dada por la acción de los leucocitos.³⁷ Hasta el momento se desconocen los patrones de migración de los linfocitos en el endometrio de las conejas gestantes y pseudogestantes, por lo que su estudio es necesario para evaluar la posible influencia del ambiente hormonal y de los embriones sobre la afluencia de estas células al útero.

Por lo anterior, el presente estudio tuvo como objetivo evaluar el patrón migratorio de los linfocitos totales al endometrio en tres grupos de conejas Nueva Zelanda blancas: *a*) conejas gestantes en los días 1, 2, 3, 4, 5 y 8; *b*) conejas pseudogestantes en los días 1, 2, 3, 4, 5 y 8 posteriores a la administración de 100 UI de gonadotropina coriónica humana (hCG); y *c*) conejas no gestantes (NG).

Material y métodos

Para la realización del presente estudio se utilizaron 41 conejas Nueva Zelanda blancas sexualmente maduras (3.5-4.5 kg de peso) que se mantuvieron en condiciones de bioterio en jaulas individuales (90 × 60 × 40 cm) con alimento concentrado comercial* y agua *ad libitum*. Con estos animales se formaron 12 grupos, seis de ellos (tres conejas/grupo) correspondientes a animales gestantes en los días 1, 2, 3, 4, 5 y 8 poscoito y en las conejas de los seis grupos restantes (tres conejas/grupo) se indujo la ovulación mediante la administración de 100 UI de gonadotropina coriónica humana (hCG) por vía intramuscular,³⁸ y se obtuvieron de estos animales el muestreo de los tejidos de los días 1, 2, 3, 4, 5, y 8 postratamiento.

Para el grupo de animales gestantes, a cada coneja que presentaba conducta de aceptación al macho y vulva hiperémica,³⁹ se le dieron dos montas en un mismo servicio, utilizando para ello dos sementales experimentados de la misma raza. El día de la cruce se consideró como el día "0" del experimento. También se contó con un grupo de conejas adultas nulíparas no gestantes (NG), que se utilizaron como testigo (n = 5). Para estimar el estado fisiológico de estos animales se

*Purina.

The animals of each group were sacrificed using an overdose (90 mg/kg) of sodium pentobarbital applied through intracardiac injection; they were previously anesthetized.^{40,41}

In order to verify the existence of pregnancy a wash of the oviduct was carried out as well as of the uterine horns with isotonic physiologic saline solution through a sterile catheter connected to a syringe; afterwards, with a stereoscopic microscope, the presence of embryos was determined in the fluid recovered in a Petri dish. Next, fragments of the mid third of both uterine horns were obtained of each animal, these were fixed in a picric acid (15%) and paraformaldehyde (4%) solution in a phosphate buffering solution (PBS) at pH 7.4 during eight hours.

After the fixation period, the tissue fragments were maintained during 24 hours in a PBS solution and processed according to the paraffin inclusion technique for microtome. Then 6 µm semi-serial cuts were done in a microtome, some of these cuts were stained using hematoxylin and eosin for the observation of the general histological structure of the uterus, and others were stained with Giemsa in order to make lymphocytes evident.

In order to count the lymphocytes, an ocular piece with micrometric* grid was used and a light microscope;* cells from 25 microscopic fields were counted with the 40 X objective. For this the epithelial layer and the lamina propria of the lax connective tissue were taken into consideration. Cell count was done independently by two observers who did not have prior information about the characteristics of the experimental protocol.

The data obtained from the cell count was analyzed through a Tuckey non-parametric statistical test in order to compare between the different groups.⁴²

Results

Lymphocytes were located between the cells of the uterine luminal epithelium, in the sub-epithelial region of the lamina propria of the connective tissue and between the epithelial cells of the endometrial glands in pregnant and pseudo-pregnant animals (Figures 1 and 2).

The number of total lymphocytes present in the endometrium of rabbits during days 1 to 5 and 8 of pregnancy was less ($P < 0.05$) in relation to the values found in the control non-pregnant female group. The number of lymphocytes observed at days 1 and 2 after pregnancy was higher than at days 3, 4, 5 and 8. From day 3 the affluence of lymphocytes towards the endometrium was reduced and there were no significant differences among them (Figure 3).

puso en contacto a cada hembra con un macho adulto entero; las conejas que no presentaron interés sexual por el macho y que presentaban una vulva seca y con tonalidad pálida, se consideraron en etapa de diestro, de acuerdo con el criterio de Aragona *et al.*³⁹

Los animales de cada grupo se sacrificaron mediante una sobredosis (90 mg/kg) con pentobarbital sódico aplicado por vía intracardiaca, previa anestesia.^{40,41}

Para verificar la existencia de gestación se efectuó un lavado del oviducto y cuernos uterinos con solución salina fisiológica isotónica mediante un catéter estéril conectado a una jeringa; posteriormente, con un microscopio estereoscópico se buscó la presencia de embriones en el fluido recuperado en una caja de Petri. A continuación se obtuvieron fragmentos del tercio medio de ambos cuernos uterinos, 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 ocho horas.

Transcurrido el periodo de fijación, los fragmentos de tejido se mantuvieron durante 24 horas 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 µm de grosor en un microtomo, algunos de estos cortes se tiñeron con la tinción de hematoxilina y eosina para la observación de la estructura histológica general del útero y otros con la tinción de Giemsa para evidenciar a los linfocitos.

Para efectuar el conteo de linfocitos se utilizó un ocular con retícula micrométrica* y un microscopio fotónico* y se contaron las células presentes en 25 campos microscópicos con el objetivo 40 X. Para este fin se consideró la lámina epitelial y la lámina propia de tejido conjuntivo laxo. El conteo celular fue realizado de manera independiente por dos observadores, quienes al efectuarlo no tuvieron información sobre las características del protocolo experimental.

Los datos obtenidos del conteo celular se analizaron mediante la prueba estadística no paramétrica de Tuckey para efectuar la comparación entre los diferentes grupos.⁴²

Resultados

Los linfocitos se localizaron entre las células del epitelio luminal uterino, en la región subepitelial de la lámina propia de tejido conjuntivo y entre las células epiteliales de las glándulas endometriales en los animales gestantes y pseudogestantes (Figuras 1 y 2).

*Carl Zeiss.

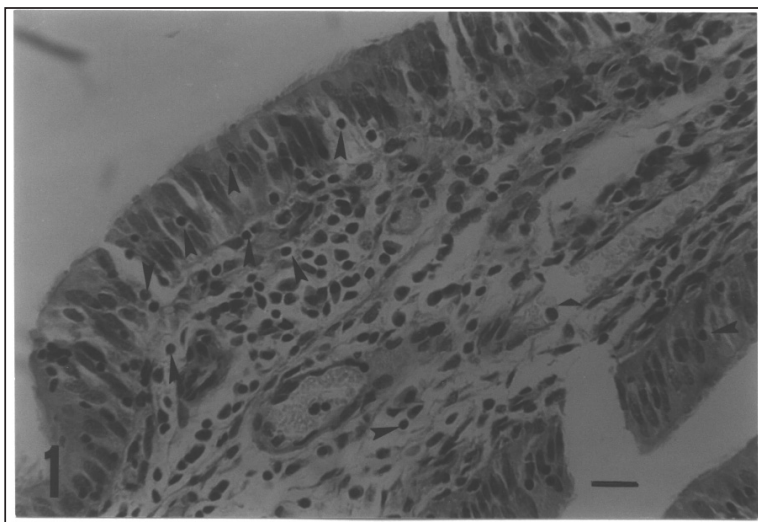


Figura 1. Micrografía de útero de coneja al día dos de gestación. Se observan linfocitos intraepiteliales y subepiteliales (puntas de flecha) en el endometrio. Tinción H & E. Barra = 20 μ m.

Micrograph of the uterus of a rabbit at day two of pregnancy. Intraepithelial and subepithelial lymphocytes are observed (arrows) in the endometrium. Stain: H & E. Bar = 20 μ m.

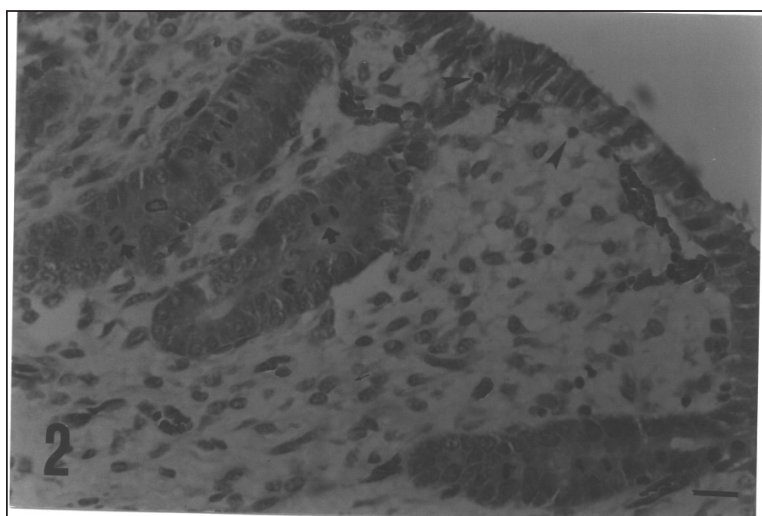


Figura 2. Micrografía de útero de coneja al día dos de pseudogestación. Se observan mitosis en las glándulas endometriales (flechas pequeñas) y linfocitos intraepiteliales y subepiteliales (puntas de flecha) en el endometrio. Tinción: Giemsa. Barra = 20 μ m.

Micrograph of a rabbit uterus at day two of pseudopregnant. Mitosis in the endometrial glands is observed (small arrows) as well as intraepithelial and subepithelial lymphocytes (arrows) in the endometrium. Stain: Giemsa. Bar= 20 μ m.

In the pseudo-pregnant group, similarly to what was observed in the pregnant rabbits, there was a reduction in the number of total lymphocytes in relation to the non-pregnant females. Nevertheless, this reduction observed at days 1 and 2 in the pseudo-pregnant animals was greater than that observed for these days in the pregnant rabbits. It is interesting that day eight was characterized by the least number of lymphocytes present in relation to the rest of the days evaluated (Figure 4).

When comparing the result of the cell count among the groups of pregnant and pseudo-pregnant rabbits differences were only found between day two of pregnancy and days one ($P < 0.05$), five ($P < 0.01$) and eight ($P < 0.001$) of the pseudo-pregnant rabbits.

Discussion

The results that were obtained indicate that the migration of lymphocytes towards the endometrium of rab-

El número de linfocitos totales presentes en el endometrio de las conejas durante los días 1 al 5 y 8 de la gestación fue menor ($P < 0.05$) con respecto a los valores encontrados en el grupo de hembras testigo no gestantes. El número de linfocitos observado los días 1 y 2 posteriores a la gestación fue mayor los días 3, 4, 5 y 8. A partir del día 3, la afluencia de linfocitos al endometrio se mantuvo disminuida y no hubo diferencias significativas entre ellos (Figura 3).

En el grupo de animales pseudogestantes, de manera similar a lo observado en las conejas gestantes, se encontró una disminución en el número de linfocitos totales con respecto a las conejas no gestantes. Sin embargo, esta disminución observada los días 1 y 2 en los animales pseudogestantes fue mayor que la observada para estos mismos días en las conejas gestantes. Resulta interesante que el día ocho se caracterizó por presentar el menor número de linfocitos que el resto de los días evaluados (Figura 4).

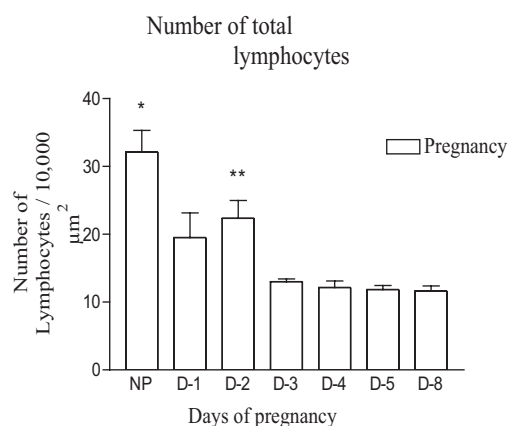


Figura 3. Linfocitos totales en el endometrio de conejas gestantes (D-1 a D-8) y no gestantes (NP). Los valores son expresados como promedios $\pm$ error estándar * $P < 0.05$ vs todos los demás grupos. ** $P < 0.05$ vs D-3, D-5, D-8.

Total lymphocytes in the endometrium of pregnant (D-1 to D-8) and non-pregnant (NP) rabbits. The values are expressed as average $\pm$ standard error. * $P < 0.05$ vs. the rest of the groups. ** $P < 0.05$ vs D-3, D-5, D-8.

bits at days 1 to 5 and 8 of pregnancy decreases significantly ($P < 0.05$) in relation to the number of lymphocytes present in the uterus of non-pregnant rabbits. From day three of pregnancy the decrease in the number of endometrial lymphocytes was more noticeably appreciated, precisely when the embryo enters the uterus; this migratory pattern of lymphocytes was maintained at days 3, 4, 5 and 8.

The embryo implantation in the rabbit is carried out at day seven of pregnancy,⁴³ this event is characterized by an increase in tissue interaction between trophoblast and endometrium. From the days prior to implantation on, a local immunological condition is required which is favorable to the embryo which is accompanied by an hormonal environment with high concentrations of progesterone.^{10,44} The reduction of lymphocytes that was observed in the endometrium of the rabbit from day one and that was more notorious from day three constitutes evidence of the need for an immunotolerant local environment.

It is very interesting that the group of pseudo-pregnant rabbits treated with hCG also showed a reduction in the number of endometrial lymphocytes from day one of pseudopregnancy in relation to the values present in non-pregnant rabbits. Based on the experimental protocol of this study, this finding suggests that the environment induced by progesterone present in pregnant and pseudo-pregnant rabbits is the condition that caused the decrease in the migration of lymphocytes towards the uterus, and not only the presence of the embryo. Nevertheless, in order to confirm this approach more studies that evaluate the spe-

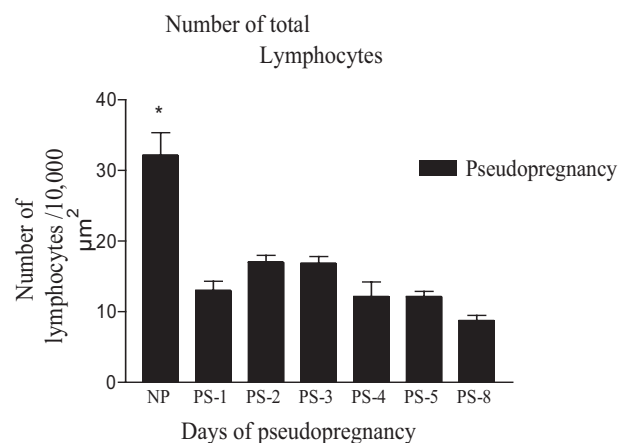


Figura 4. Linfocitos totales en el endometrio de conejas seudogestantes (PS-1 a PS-8) y no gestantes (NP). Los valores son expresados como promedios $\pm$ error estándar * $P < 0.05$ vs todos los demás grupos.

Total lymphocytes in the endometrium of pseudo-pregnant (PS-1 to PS-8) and non-pregnant (NP) rabbits. The values are expressed as average $\pm$ standard error * $P < 0.05$ vs. the rest of the groups.

Al comparar el resultado del conteo de células entre los grupos de conejas gestantes y seudogestantes, se encontraron diferencias únicamente entre el día dos de la gestación con los días uno ($P < 0.05$), cinco ($P < 0.01$) y ocho ($P < 0.001$) de conejas seudogestantes.

Discusión

Los resultados obtenidos indican que la migración de linfocitos al endometrio de la coneja, en los días 1 al 5 y 8 de la gestación disminuye significativamente ($P < 0.05$) con respecto al número de linfocitos presentes en el útero de conejas no gestantes. A partir del día tres de gestación se apreció, más notoriamente, la disminución en el número de linfocitos endometriales, cuando precisamente ocurre el ingreso del embrión al útero; este patrón migratorio de los linfocitos se mantuvo disminuido los días tres, cuatro, cinco y ocho.

La implantación embrionaria en la coneja se lleva a cabo en el día siete de la gestación,⁴³ este evento se caracteriza por un aumento en la interacción tisular, trofoblasto-endometrio. Desde los días previos a la implantación se requiere de una condición inmunológica local que sea favorable al embrión, situación que está acompañada de un ambiente hormonal con concentraciones elevadas de progesterona;^{10,44} la disminución de linfocitos que se observó en el endometrio de la coneja desde el día uno y se tornó más notoria a partir del día tres constituye una evidencia de la necesidad de un ambiente local de inmunotolerancia.

cific role of the embryo in this physiological state are required.

There is experimental evidence that supports the concept that progesterone is an immunomodulating molecule.⁴⁵ To this extend it has been reported that an elevated concentration of progesterone prolongs the survival of xenogeneic tumoral cells implanted in the uterus of the hamster.⁴⁶

Also, the existence of RNAm has been shown for the progesterone receptor in lymphocytes of different species;^{47,48} although this has not been shown in the rabbit. The results obtained in this study suggest the existence of a functional interaction between the progestational environment and the immunological behavior of the uterus during the first days of pregnancy and pseudopregnancy of the rabbit.

A functional interaction has been suggested in the expression of the progesterone receptor in lymphocytes of pregnant women.^{49,50} Furthermore it is important to point out that besides what is known in classical endocrine tissues, in human lymphocytes, estrogens do not induce the expression of progesterone receptors.^{45,50} Therefore it is necessary to carry out more studies that clear up this characteristic in species such as the rabbit in order to know if progesterone participates as a modulating molecule in the function of lymphoid tissue associated to the endometrium during pregnancy and pseudopregnancy.

Also, it is important to evaluate the influence of the uteroglobin (UTG) in lymphocyte migration towards the uterus in pregnant animals because it is a protein whose synthesis is dependant on progesterone. The secretion of UTG begins its increase at day two of pregnancy and reaches a maximum concentration at day five; in pseudo-pregnancy the increase in the expression of RNAm of the UTG and the time at which it is detected is similar to what is observed in pregnancy,⁵¹ therefore the secretion pattern of this protein and its role as an immunosuppressant molecule in the uterus⁵² could partially explain the similar lymphocyte migration pattern observed in pregnant and pseudo-pregnant rabbits in this study. Together with this it is also known that the UTG has a powerful anti-inflammatory effect, which is preserved in compounds derived from the UTG such as the antinflammin that has, among other properties, the capacity to avoid the movement of leukocytes towards the site of a lesion.^{53,54}

It is important to mention that notwithstanding the sample size used in this study (n=3), based on a previous study done on this species by us,⁵⁵ relevant information was obtained on the migratory pattern of lymphocytes towards the uterus in consecutive days during the initial pregnancy and pseudo-pregnancy period.

Resulta muy interesante que en el grupo de conejasseudogestantes tratadas con hCG también se presentó una reducción en el número de linfocitos endometriales desde el primer día deseudogestación, en relación con los valores existentes en las conejas no gestantes. Con base en el planteamiento experimental de este estudio, este hallazgo sugiere que fue el ambiente progestacional presente en las conejas gestantes yseudogestantes la condición que propició la disminución en la migración de linfocitos al útero, y no sólo la presencia del embrión; sin embargo, para confirmar este planteamiento se requieren más estudios que evalúen el papel específico del embrión en este estado fisiológico.

Existen evidencias experimentales que apoyan el concepto que la progesterona es una molécula inmunomoduladora,⁴⁵ al respecto se ha informado que la concentración elevada de progesterona prolonga la sobrevivencia de células tumorales xenogéneas implantadas en el útero de hámster.⁴⁶

Asimismo, se ha demostrado la existencia de RNAm para el receptor de progesterona en linfocitos de diferentes especies,^{47,48} a pesar de que esto no se ha demostrado en la coneja, los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren la existencia de una interacción funcional entre el ambiente progestacional y el comportamiento inmunológico del útero durante los primeros días de la gestación yseudogestación en la coneja.

Se ha sugerido una interacción funcional en la expresión del receptor a progesterona en linfocitos de mujeres gestantes.^{49,50} Asimismo, es de llamar la atención que a diferencia de lo conocido en los tejidos endocrinos clásicos, en los linfocitos de humano, los estrógenos no inducen la expresión de receptores a progesterona.^{45,50} Por ello es necesario llevar a cabo más estudios que aclaren esta característica en especies como el conejo, para saber si la progesterona participa como molécula moduladora del funcionamiento del tejido linfoide asociado al endometrio durante la gestación yseudogestación.

Asimismo, es importante evaluar la influencia de la uteroglobina (UTG) en la migración de linfocitos al útero de animales gestantes, debido a que es una proteína cuya síntesis es dependiente de progesterona. La secreción de la UTG inicia su incremento en el día dos de la gestación y registra una máxima concentración el día cinco; en laseudogestación el incremento en la expresión del RNAm de la UTG y el tiempo al que se detecta es similar al observado en la gestación,⁵¹ por lo que el patrón de secreción de esta proteína y su papel como molécula inmunosupresora en el útero⁵² podría explicar en parte el comportamiento migratorio similar de los linfocitos en las conejas gestantes yseudogestantes

Based on the results obtained in this study, we conclude that during the first eight days of pregnancy the number of lymphocytes in the uterine mucosa of the rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) decreases significantly. Nevertheless, the most important decrease is observed from day 3 on, when the product enters the uterus. In pseudo-pregnant animals a pattern of affluence of lymphocytes appeared that is similar to what is observed in pregnant animals. These results, as a group, indicate the importance of continuing the study of the effect on the uterine lymphoid tissue that some synthetic progesterone type drugs have that are widely used in animal production for ovarian function synchronization.

Acknowledgements

This work was supported by the Support Program for Research and Innovation Projects in Technology of DGAPA (IN212101) UNAM. We thank Emilio Francisco Lopez for his help in the histology process.

Referencias

1. Hafez ES. Reproducción e inseminación artificial en animales. 6a ed. México: McGraw-Hill-Interamericana, 1996.
2. Alvarino MR. Control de la Reproducción en el conejo. Madrid, España: Mundi- Prensa, 1993.
3. Lefevre B, Caillou M. Relationship of oestrous behaviour with follicular growth and sex steroid concentration in the follicular fluid in the domestic rabbit. *Ann Biol Anim Bioch Biophys* 1978;18:1435-1441.
4. García X F. Fisiología de la reproducción en la coneja (Capítulo 2). En: Biología de la reproducción en la hembra del conejo doméstico. Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España 1991: 13-25.
5. Enkhuizen PJM, Van M. Distribution in size and number of ovarian follicles in the pregnant rabbit before and after revulation with hCG. Twelfth annual Conference of Australian Society for Reproductive Biology;1980; University of New England,1980.
6. Pla H, Baselga M, García F, Deltoro J. Categorías foliculares asociadas al comportamiento de monta en el conejo de carne: efectos sobre las estructuras uterinas. III Congreso Mundial de Cunicultura; 1984; Roma, Italia: Actas Vol. II 1984: 446-452.
7. Molina I, Pla M, García F. Poblaciones de folículos en función del comportamiento de monta en conejas: Utilización de un método simple para la medición de los folículos. *ITEA* 1986; 66: 21-26.
8. Holt JA. Regulation of progesterone production in the rabbit *corpus luteum*. *Biol Reprod* 1989;40:201-208.
9. Miller JB, Keyes PL. A mechanism for regression of the rabbit *corpus luteum*: uterine induced loss of luteal responsiveness to 17 β -estradiol. *Biol Reprod* 1976;15:511-518.

observado en este estudio. Aunado a esto se sabe que la UTG posee un potente efecto antiinflamatorio, propiedad que se conserva en compuestos derivados de la UTG, como las antilaminas que tiene, entre otras propiedades, la de evitar el tráfico de leucocitos al sitio de una lesión.^{53,54}

Es importante mencionar que no obstante el tamaño de muestra utilizado en el presente estudio (n = 3), basado en un estudio previo que hemos efectuado en esta especie,⁵⁵ se obtuvo información relevante sobre el patrón migratorio de los linfocitos al útero en días consecutivos del periodo inicial de la gestación y pseudogestación.

Con base en los resultados obtenidos en el presente estudio, se concluye que durante los primeros ocho días de la gestación el número de linfocitos de la mucosa uterina de la coneja (*Oryctolagus cuniculus*) disminuye significativamente; sin embargo, la disminución más marcada se observa a partir del día tres, cuando el producto ingresa al útero. En el grupo de animales pseudogestantes se presentó un patrón de afluencia de linfocitos similar al observado en los animales gestantes. Estos resultados en conjunto indican la importancia de continuar el estudio del efecto que pueden tener sobre el tejido linfoide uterino, algunos de los progestágenos sintéticos que son ampliamente utilizadas en producción animal para sincronizar la función ovárica.

Agradecimientos

Se agradece a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM el financiamiento recibido para la realización de esta investigación, por medio del programa PAPIIT, proyecto IN212101, así como al técnico Emilio Francisco López, por su ayuda en el procesamiento histológico.

10. Browning J, Keyes FL, Wolfe R. Comparison of serum progesterone, 20 α -dihydroprogesterone and estradiol-17 β in pregnant and pseudo-pregnant rabbit: evidence for post implantation recognition of pregnancy. *Biol Reprod* 1980;23:1014-1019.
11. Anzaldúa ASR, Pérez MM, Castro RJI. Variación en los índices de mitosis y apoptosis del epitelio uterino de la coneja durante los días previos a la implantación. *Téc Pecu Méx* 2001;39:59-68.
12. Lessey BA, Arnold JT. Paracrine signaling in the endometrium integrins and the establishment of uterine receptivity. *J Reprod Immunol* 1998;39:105-116.
13. Yang YQ, Kudolo GB, Harper MJK. Binding of platelet activating factor to oviductal membranes during early pregnancy in the rabbit. *J Lipid Med* 1992;5:77-96.
14. Spinks NR, Ryan JP, O'Neill C. Antagonists of embryo-

- derived platelet-activating factor act by inhibiting the ability of the mouse embryo to implant. *J Reprod Fertil* 1990;88:241-248.
15. Orozco C, Perkins T, Clarke FM. Platelet-activating factor induces the expression of early pregnancy factor in the female mice. *J Reprod Fertil* 1986;78:549-555.
 16. Sueoka K, Dharmarajan AM, Myazaki T, Atlas SJ, Wallach EE. Platelet activating factor induced early pregnancy factor activity from the perfused rabbit ovary and oviduct. *Am J Obstet Gynecol* 1988;159:1580-1584.
 17. Hansen PJ, Skopets B. Temporal relationship between progesterone and uterine lymphocyte-inhibitory activity in ewes. *Vet Rec* 1992;131:371-372.
 18. Stephenson DJ, Hensen PJ. Induction by progesterone of immunosuppressive activity in utero secretions of ovariectomized ewes. *Endocrinology* 1999;129:3168-3178.
 19. Bailly A, Atger M, Atger P, Cerbón MA, Alison M, Vu Hai MT, *et al.* The rabbit uteroglobin gene. Structure and interaction with the progesterone receptor. *J Biol Chem* 1983;258:10384-10389.
 20. Gutierrez-Sagal R, Perez-Palacios G, Langley E, Pasapera AM, Castro I, Cerbon MA. Endometrial expression of progesterone receptor and uteroglobin genes during early pregnancy in the rabbit. *Mol Reprod Dev* 1993;34:244-249.
 21. Wira CR, Sandoe CP. Sex steroid hormone regulation of IgA and IgG in rat uterine secretions. *Nature* 1977;268:534-536.
 22. Díaz-Flores M, Baiza-Gutman LA, Hicks JJ. Los nuevos moduladores endometriales en el embarazo temprano. *Gac Med Mex* 1996;132:519-528.
 23. Perez MM, Luna J, Mena R, Romano MC. Lymphocytes and T lymphocyte subsets are regionally distributed in the female goat reproductive tract: Influence of the stage of the oestrous cycle. *Res Vet Sci* 2002;72:115-121.
 24. Kaushic C, Murdin AD, Under down BJ, Wira CR. *Chlamydia trachomatis* infection in the female reproductive tract of the rat: influence of progesterone on infectivity and immune response. *Infect Immun* 1998;66:893-895.
 25. Parr MB, Parr EL. Mucosal immunity in the female and male reproductive tracts. In: Ogra J, Mestecky ME, Lamm W, Strober JR, Mc Ghee J B, editors. *Handbook of Mucosal Immunology*. New York: Academic Press. 1999:677-689.
 26. Lee CS, Gogolin-Ewens K, Brandon MR. Identification of a unique lymphocyte subpopulation in the sheep uterus. *Immunology* 1998;63:157-164.
 27. Watson ED, Thompson RM. Lymphocyte subsets in the endometrium of genitally normal mares and mares susceptible to endometritis. *Equine Vet J* 1996;28:106-110.
 28. Segerson E, Matterson P, Gunsett F. Endometrial T lymphocyte subset infiltration during the ovine estrous cycle and early pregnancy. *J Reprod Immunol* 1991;20:221-236.
 29. Hussain AM. Bovine uterine defense mechanisms: a review *J Vet Med B* 1989; 36:641-651.
 30. Cobb SP, Watson ED. Immunohistochemical study of immune cell in the bovine endometrium at different stages of oestrous cycle. *Res Vet Sci* 1995; 59:238-241.
 31. Vander-Wielen AL, King GJ. Intraepithelial lymphocytes in the bovine uterus during the oestrous cycle and early pregnancy. *J Reprod Fertil* 1984;70: 457-462.
 32. Hussein AM, Newby TJ, Bourne FJ. Immunohistochemical studies of the local immune system in the reproductive tract of the sow. *J Reprod Immunol* 1983;5:1-15.
 33. Lavielle RE, Pérez MM, Hernández GR, Martínez MJJ. Cuantificación de células plasmáticas en cuello uterino de cerda, en fase folicular y lútea del ciclo estral. *Vet Méx* 1994;25:29-31.
 34. Bischof R, Brandon MR, Lee CS. Studies on the distribution of immune cell in the uteri of prepubertal and cycling gilts. *J Reprod Immunol* 1994;26:1111-1129.
 35. Lander-Chacin MF, Jansen PJ, Drost M. Effects of stage of the oestrus cycle and steroids treatment of uterine immunoglobulin content and polymorphonuclear leukocytes in cattle. *Theriogenology* 1990; 34:1169-1184.
 36. Pérez MM, Mendoza GM, Mena LR, Romano PM. Linfocitos del útero de la cabra: Un estudio histológico e inmunohistoquímico por microscopía confocal. *Memorias de la XI Reunión Nacional sobre Caprinocultura*; 1996 octubre 16-18; Chapingo, México: octubre 16-18; México: Universidad Autónoma de Chapingo. 1996: 71-76.
 37. Howe GR. Leukocytic response to spermatozoa in ligated segments of the rabbit vagina, uterus and oviduct. *J Reprod Fertil* 1967;13:563-566.
 38. Dharmarajan AM, Yoshimura Y, Sueoka K, Atlas SJ, Dubin NH, Ewing- Zirkin BR, *et al.* Progesterone secretion by *corpora lutea* of the isolated perfused rabbit ovary during pseudopregnancy. *Biol Reprod* 1998;381:137-143.
 39. Aragona P, Puzzolo D, Micali A, Ferreri G, Britti D. Morphological and Morphometric analysis on the rabbit connective goblet cells in different hormonal conditions. *Exp. Eye Res* 1998; 66: 81-88.
 40. Aluja, A.S. de. 2002. Consideraciones Éticas en la Experimentación Científica con animales y la Norma Oficial NOM-062-Z00-1999: "Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio". *Memorias V Congreso Nacional Latinoamericano y del Caribe de Bioética*, 21-24 de Noviembre 2001. Academia Nacional Mexicana de Bioética, Comisión Nacional de Bioética, México D.F., México.
 41. Aluja, A.S. de. *Animales de Laboratorio y la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999)*. Gaceta Médica de México 2002;138:295-298.
 42. Steel SR, Torrie HJ. *Bioestadística, principios y procedimientos. Estadísticas no Paramétrica*. 2ª ed. México: Mc Graw-Hill, 1988.

43. Hafez ESE. Reproducción e inseminación artificial en animales. 5a ed. México: Interamericana-Mc Graw-Hill; 1989.
44. Challis JRG, Davies IJ, Ryan KJ. The concentration of progesterone, estrone and 17 β estradiol in the plasma of pregnant rabbit. *Endocrinology* 1974;93:971-976.
45. Szekere-Bartho J, Barakonyi A, Par G, Polgar B, Palkovics T, Szereday L. Progesterone as an immunomodulatory molecule. *Int Immunopharmacol* 2001; 1:1037-1048.
46. Moriyama I, Sugawa T. Progesterone facilitates implantation of xenogenic cultured cells in hamster uterus. *Endocrinology* 1972;236:150-152.
47. 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.
48. Pasanen S, Ylikomi T, Palojoki E, Syvala H, Pelto-Huikko M, Touhimaa P. Progesterone receptor in chicken bursa of Fabricius and thymus: evidence for expression in B-lymphocytes. *Mol Cell Endocrinol* 1998;141:119-128.
49. 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.
50. Szekeres-Bartho J, Szekeres GY, Debre P, Autran B, Chaouat G. Reactivity of lymphocytes to a progesterone receptor-specific monoclonal antibody. *Cell Immunol* 1990;125:273-283.
51. Shen XZ, Tsai MJ, Bullock DW, Woo SLC. Hormonal regulation of rabbit uteroglobin gene transcription. *Endocrinology* 1983;112:871-876.
52. Beato M, Beier R. Binding of progesterone to the proteins of uterine luminal fluid. Identification of uteroglobins as the binding protein. *Biochem Biophys Acta* 1975;392:346-356.
53. Miele L. Antiflammins, bioactive peptides derived from uteroglobin. *Ann N Y Acad Sci* 2000;923:128-140.
54. Moreno JJ. Antiflammin peptides in the regulation of inflammatory response. *Ann NY Acad Sci* 2000; 923:147-153.
55. Anzaldúa SR, Camacho-Arroyo I, Cerbon MA. Histomorphological changes in the oviduct epithelium of the rabbit during early pregnancy. *Anat Histol Embryol* 2002;31:308-312.