

## Trabajos originales

Instituto Nacional de Endocrinología

### INMUNOMODULACIÓN DE FACTORES PRODUCIDOS POR LAS TROMPAS DE FALOPIO DE RATA SOBRE LA PROLIFERACIÓN LINFOCITARIA *IN VITRO*

Dra. Sanda Yepe Oliveros,<sup>1</sup> Dra. Ada Julia Machado Curbelo,<sup>2</sup> Lic. Maydelín Frontela Noda<sup>3</sup> y Dr. Lorenzo Mallea Sánchez<sup>4</sup>

#### RESUMEN

Se plantea que la inducción de tolerancia inmune parece ser un mecanismo que participa en el normal funcionamiento del aparato genital femenino. Se propuso en este trabajo el estudio de la producción de sustancias inmunomoduladoras por las células epiteliales de las trompas de Falopio de rata en cultivo. Se obtuvieron las muestras de ratas y se cultivaron en medio RPMI 1 640 y en medio MEM D-val. Se colectó el medio y se le determinó la capacidad inmunomoduladora sobre la proliferación de linfocitos estimulados con mitógenos. Se comprobó que los cultivos realizados con RPMI 1 640 crecieron más rápido a predominio de células fusiformes, supuestamente fibroblastos, y brindaron una inhibición de la proliferación linfocitaria dosis dependiente y que aquellos cultivos donde se empleó el medio MEM D-val crecieron lentamente, con predominio de células redondeadas, presumiblemente epiteliales, y se inhibió la proliferación linfocitaria dosis dependiente lo cual permite inferir que las sustancias inmunomoduladoras son producidas fundamentalmente por las células epiteliales del lumen de las trompas, pudiendo ser este un mecanismo de tolerancia inmune que facilita el transporte de espermatozoides y del blastocito a través del oviducto.

*Descriptores DeCs:* GENITALES FEMENINOS/fisiología; TROMPAS DE FALOPIO/inmunología; GONADOTROPINAS EQUINAS/administración & dosificación.

Las trompas de Falopio desempeñan una función crucial en la fertilidad de la mujer. Son un órgano secretor activo que mantienen y modulan un medio ambiente

muy dinámico que propicia condiciones para realizar sus funciones, son algo más que simples conductos para el transporte de gametos y embriones entre el ovario y el

<sup>1</sup> Especialista de I Grado en Inmunología.

<sup>2</sup> Especialista de II Grado en Bioquímica Clínica. Investigadora Auxiliar.

<sup>3</sup> Licenciada en Bioquímica. Aspirante a Investigadora.

<sup>4</sup> Especialista de I Grado en Inmunología. Investigador Agregado.

útero. Entre las células que las conforman se encuentran las células epiteliales ciliadas no secretoras, que participan mediante el movimiento de sus cilios en el transporte de gametos y embriones, y las células epiteliales no ciliadas secretoras que sintetizan macromoléculas que proveen un medio adecuado para la fertilización, la alimentación y la segmentación temprana de los embriones<sup>1</sup>. Al mismo tiempo, participan en el mecanismo de secreción de la IgA como parte del sistema inmune local de defensa y forman una barrera mecánica que separa el medio interno del ambiente de luz tubular.<sup>2</sup> Ha sido descrita también la presencia de sub-poblaciones de células T en los espacios intraepiteliales y el estroma subepitelial de las trompas. Estas pueden iniciar y sostener una respuesta inmune local a sustancias invasoras y funcionar en la inducción del proceso de tolerancia inmune.<sup>3,4</sup>

La inducción de tolerancia periférica por mecanismos locales de inmunosupresión ha sido estudiada en el aparato reproductor masculino<sup>5</sup> y parece ser un aspecto importante de las funciones del aparato reproductor femenino.<sup>6-9</sup>

Todo lo antes expuesto evidencia la importancia que tiene la inducción de tolerancia inmune en el normal funcionamiento del aparato genital femenino por lo que nos propusimos el estudio de la producción de sustancias inmunomoduladoras por las células epiteliales de las trompas de Falopio de rata en cultivo.

## MÉTODOS

### DESCRIPCIÓN GENERAL

Obtuvimos trompas de Falopio de ratas púberes de 80 a 120 g, estimuladas con

gonadotropina de suero de yegua preñada (PMSG) y las cultivamos. Colectamos el medio de cultivo en diferentes tiempos y le estudiamos la capacidad inmunomoduladora sobre la proliferación de linfocitos estimulados con mitógeno.

### CULTIVO DE TROMPAS DE FALOPIO DE RATAS

Estimulamos las ratas con 10 UI de PMSG, a las 48 h sacrificamos por dislocación cervical y disecamos las trompas. Los órganos se cortaron en fragmentos pequeños (aproximadamente 2 mm). Lavamos los fragmentos 2 veces y los colocamos sobre una rejilla metálica que fue previamente colocada en una placa de cultivo de pozo central (Falcon No. 3037). Realizamos 2 series de experimentos. El medio de cultivo empleado en la primera serie de experimentos (n=4) fue RPMI 1 640 (Gibco) suplementado con suero fetal bovino al 10 % y antibióticos. En la segunda serie de experimentos (n=4) empleamos medio esencial mínimo (MEM D-val) con los mismos suplementos.<sup>10</sup> Mantuvimos los cultivos durante 10 d a 37 °C, en atmósfera húmeda y CO<sub>2</sub> 5 %. Colectamos el medio condicionado a los 2,5 y 9 d lo conservamos a -20 °C hasta su posterior utilización.

### OBTENCIÓN DE LOS LINFOCITOS DEL BAZO DE RATAS

Sacrificamos ratas adultas y les extrajimos el bazo en condiciones de asepsia, perfundimos con medio suficiente como para liberar todas las células sanguíneas y luego, este medio con las células en suspensión lo filtramos por una gasa para eliminar los fragmentos de tejido. Obtuvimos las células

mononucleares por centrifugación en gradiente de Ficoll-Hypaque.

## ENSAYO DE INHIBICIÓN DE LA PROLIFERACIÓN LINFOCITARIA

Realizamos los cultivos en placas de 96 pocillos de fondo en U y los experimentos de la manera siguiente:

Suspensión celular	RPMI+ 10 % SF	Mitógeno	Medio* <sup>o</sup> condicionado
Control negativo* 100 µL	150µL	-	-
Control positivo* 100 µL	50µL	100µL	-
Muestras* 100 µL	-	100 µL	50 µL

\* Por triplicado.

\*\*El medio condicionado por el cultivo de células epiteliales de trompas de Falopio colectado indicados en cada experimento de cultivo y a diferentes diluciones.

Incubamos las placas durante 72 h a 37 °C en atmósfera húmeda con 5 % de CO<sub>2</sub>. Seis horas antes de la terminación del cultivo añadimos timidina tritiada (1µCi/pozo). Colectamos las células en un cosechador semiautomático de células sobre papel de filtro de fibra de vidrio y lo incubamos durante 24 h en viales con 5 mL de líquido de centelleo (Scistran) y lo contamos en un espectrómetro β (LKB-Wallac).

## CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

Calculamos la media de los triplicados de los controles negativos, positivos y de las muestras. Para calcular el efecto del

medio condicionado sobre la proliferación linfocitaria empleamos la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = 1 - \frac{X \text{ cpm de la muestra} - X \text{ cpm control negativo}}{X \text{ cpm control positivo} - X \text{ cpm control negativo}}$$

Para comparar el efecto de la dilución y del tiempo en los resultados experimentales utilizamos un análisis de varianza de 2 vías y para definir si las diferencias encontradas eran producto de la interacción entre las 2 variables empleamos un análisis de varianza de una sola vía utilizando en cada caso como variable independiente las diluciones o el tiempo y el *test* de Schaffe.

## RESULTADOS

La observación microscópica de los cultivos mostró que un buen número de células se desprenden de los fragmentos de órganos y que éstas comienzan a proliferar en el fondo de la placa. Dos tipos celulares fueron observados: células de aspecto redondeado y células de aspecto fusiforme. En los cultivos realizados con medio RPMI 1 640 la proliferación celular fue más rápida y ya al noveno día podíamos observar una confluencia de, aproximadamente, el 90 %, a predominio de células de aspecto fusiforme. Sin embargo, en los cultivos realizados con MEM D-Val la proliferación fue marcadamente más lenta y la confluencia fue sólo aproximadamente del 50 % al noveno día, predominando células de aspecto redondeado.

Las figuras 1 y 2 muestran curvas típicas de inhibición dosis dependiente de la proliferación linfocitaria. En la primera, las muestras fueron de medio condicionado de los cultivos donde se utilizó medio RPMI 1 640, y en la segunda de los cultivos donde se utilizó MEM D-Val.

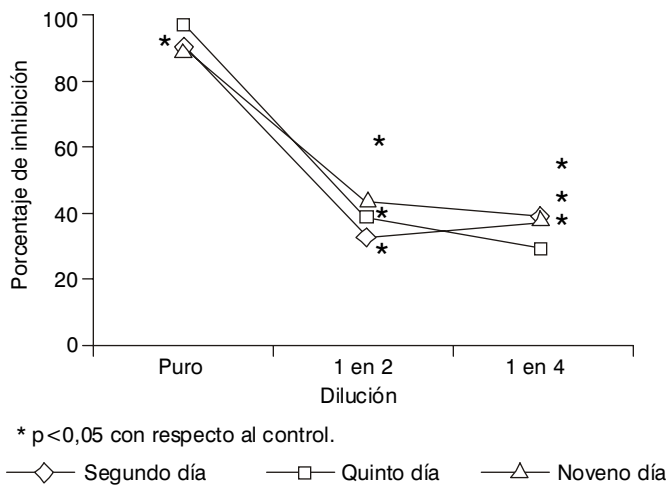


FIG. 1. Resultados del estudio de la capacidad inmunomoduladora del medio condicionado obtenido de los cultivos de trompa de Falopio de rata en medio RPMI, los días 2,5 y 9.

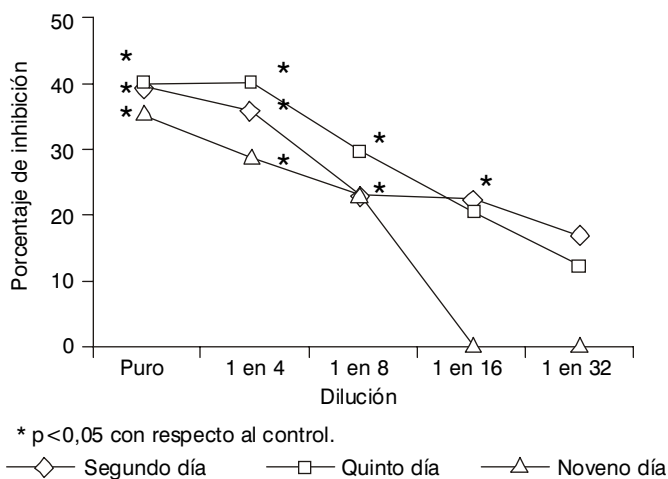


FIG. 2. Resultados del estudio de la capacidad inmunomoduladora del medio condicionado de los cultivos de trompa de Falopio de rata con medio DVal, los días 2,5 y 9.

## DISCUSIÓN

El hecho de que la proliferación celular en medio MEM D-Val fuera más lenta y la proporción de las células con aspecto redondeado aumentara, nos permite inferir que las células fusiformes presentes en los

cultivos con medio RPMI 1 640 fueran fibroblastos cuyo crecimiento logramos inhibir utilizando un medio de cultivo específico para células epiteliales.

El medio condicionado obtenido de los cultivos de trompas de Falopio produce una inhibición dosisdependiente de la proliferación

linfocitaria en todos los tiempos en que se colectó y con los 2 tipos de medio de cultivo empleados.

Este aumento marcado en la cantidad del factor/factores que provocan esta inhibición en un medio en el cual está inhibida la proliferación de fibroblastos nos hace pensar que son las células epiteliales las responsables de dicha producción.

Uno de los mecanismos que pudiera probablemente explicar la inhibición de la proliferación linfocitaria que hemos observado en nuestro trabajo es la inducción de muerte celular programada o apoptosis; esta última es un importante mecanismo de control de la respuesta inmune, entre otros, al controlar la expansión de las células T, a través de la interacción Fas-FasL.<sup>11</sup> La mayoría de las células T en cultivo expresan Fas y cuando son activadas crónicamente, esta expresión aumenta.<sup>12</sup> Al mismo tiempo se ha demostrado recientemente que las células epiteliales son capaces de expresar Fas-L.<sup>13</sup> En el testículo, las células de Sertoli expresan constitutivamente FasL,<sup>14,15</sup> lo que confiere a este órgano privilegio inmune. Podríamos hipotetizar que la interacción entre el Fas-L, liberado de la membrana de las células epiteliales en algún momento del cultivo, con el Fas expresado por las células mononucleares activadas por PHA, pudiera iniciar la apoptosis cuyo resultado final sería una inhibición de la proliferación linfocitaria en nuestros experimentos. Tampoco es

posible descartar que se produzcan otros factores, con mecanismos de acción diferentes al anteriormente explicado capaces de inducir apoptosis.

Otro mecanismo sería la producción de algún factor capaz de interferir con el mecanismo de inducción de la proliferación celular que se produce cuando los linfocitos en cultivo son estimulados con un mitógeno o con un antígeno específico. Dicha inducción es consecuencia del efecto de citocinas promotoras de la proliferación celular como es el caso de la IL-2. En un trabajo previo de nuestro grupo [Rodríguez A. Efecto de factores epididimarios sobre la producción de interleukina-2 e interferón gamma. Tesis de terminación de Residencia en Inmunología. Instituto Nacional de Endocrinología, Ciudad de La Habana, Cuba, 1997.] se comprobó que los homogeneizados de epidídimo humano producían una fuerte inhibición de la producción de IL-2 y que este podría ser uno de los mecanismos de inhibición de la proliferación linfocitaria estimulada por PHA que se observó en estos experimentos.

Nuestros resultados nos permiten postular que factores producidos por las trompas de Falopio pudieran estar involucrados en un proceso de tolerancia inmune que facilita el transporte de espermatozoides y del blastocito a través del oviducto, sin la consiguiente activación de mecanismos inmunes locales.

## SUMMARY

---

It is stated that the induction of immune tolerance seems to be a mechanism that participates in the normal functioning of the female reproductive tract. The study of the production of immunomodulatory substances by the epithelial cells of rat Fallopian tubes in culture was proposed. Rat samples were obtained and cultured in RPMI 1 640 medium and in MEM D-val medium. The medium was collected and the immunomodulatory capacity on the proliferation of mitogen-stimulated lymphocytes was determined. It was proved that the cultures carried out with RPMI 1 640 grew faster with a predominance of fusiform cells,

supposedly fibroblasts, causing an inhibition of the dose-dependent lymphocytic proliferation, and that those cultures where the MEM D-val medium was used grew slowly with a predominance of round cells, presumably epithelial, and that the dose-dependent lymphocytic proliferation was inhibited, which allowed to consider that the immunomodulatory substances are mainly produced by the epithelial cells from the lumen of the Fallopian tubes. This may be a mechanism of immune tolerance that facilitates the transportation of spermatozoa and of the blastocyst through the oviduct.

*Subject headings:* GENITALIA FEMALE/physiology; FALLOPIAN TUBES/immunology; GONADOTROPINS; EQUINE/administration and dosage.

---

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Novak ER, Woodruff JD. Histology of Fallopian tubes. En: Gynecologic and Obstetric Pathology. Cap. 14. Saunders Company;1979:
2. Kutteh WH, Hatch KD, Blackweell RE, Mestecky J. Secretory immune system of the female reproductive tract: I. Immunoglobulin and secretory component-containing cells. *Obstet Gynecol* 1988;71:56-60.
3. Boehme M, Donat H. Identification of lymphocyte subsets in the human Fallopian tube. *Am J Reprod Immunol* 1992;28:81-4.
4. Kutthe WH, Blackwell RE. Secretory immune system of the female reproductive tract II. Local immune system in normal and infected Fallopian tube. *Fertil Steril* 1990;54:51-5.
5. Pudney J, Anderson DJ. Immunity in the human male reproductive tract. *Serono Symposia, USA*. 1994.
6. Castilla JA, Molina R, López-Nevot MA. Immunosuppressive properties of human follicular fluid. *Fertil Steril* 1990;53:271-5.
7. Bütsow R. The human Fallopian tube contains placental protein 5. *Human Reprod* 1989;4:17-9.
8. King A, Loke YW, Chaouat G. NK cells and reproduction. *Immunol Today* 1997;18:64-6.
9. Overstreet JW, Mahi-Brown CA. Sperm processing in the female reproductive tract. En: Griffin PD, Johnson PM. *Local immunity in reproductive tissues*. Oxford: University Press, 1993.
10. Gilbert SF, Migeon BR. D-valine as a selective agent for normal human and rodent epithelial cells in culture. *Cell* 1975;5:357-63.
11. Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science* 1995;267:1449-56.
12. Lynch DH, Ramsdell F, Alderson MR. Fas and FasL in the homeostatic regulation of immune responses. *Immunology Today* 1995;16:569-74.
13. Giordano C, Stassi G, De Maria R. Potential involvement of Fas and its ligend in the pathogenesis of Hashimoto's Thyroiditis. *Science* 1997;275:960-3.
14. Bellgrau D, Gold D, Selawry H. Apoptosis in the male reproductive tract. *Nature* 1995;377:630-4.
15. Griffith TS, Ferguson TA. The role of FasL induced apoptosis in immune privilege. *Immunology Today* 1997;18:240-4.

Recibido: 23 de agosto de 1999. Aprobado: 25 de octubre de 1999.

Dra. *Sanda Yepe Oliveros*. Instituto Nacional de Endocrinología, Zapata y D, El Vedado, Ciudad de La Habana, Cuba.