

El papel de la linfoterapia en la corrección de problemas de infertilidad de causa inmunológica

Edwin Manrique, Verónica Rincón, Licenciados en Biología, Universidad Distrital Francisco José de Caldas, Humberto Ossa, Magíster en Genética Humana, Laboratorio de Genética y Biología Molecular. E-mail: hossa@elsitio.net.co., E-mail: man_75@uolmail.com

ABSTRACT

This paper is based on an experimental model in animals targeted to prove the existence of Blocking Factors (BFs) in the Mixed Lymphocyte Culture (MLC) in subfertile and normal breeding female rabbit groups, which were applied two doses of allogenic lymphotherapy (LIT), in order to analyze its effect in the increase of fertility rates and pregnancy success. The BFs measurement was performed through MLC with the non-radioactive MTT-Formazan technique. The existence of BFs in MLC was demonstrated in all groups of studied female rabbits. In allogenic LIT-treated breeding subfertile female rabbits, a significant increase in the levels of BFs after each LIT was observed, as well as an increase in fertility rates. Also, it is established that BFs of cell proliferation continue inhibiting the MLC in other species, indicating that BFs' inhibitory effect is interspecific and non-intraspecific, as stated heretofore.

Key Words: Mixed lymphocyte culture, oryctolagus cuniculus, lymphotherapy.

RESUMEN

Esta investigación se basa en un modelo experimental de origen animal dirigido a comprobar la existencia de Factores Bloqueadores (FBs) del Cultivo Mixto de Linfocitos (CML) en grupos de conejas reproductoras norma-

les, y subfértiles a quienes se les aplicó dos dosis de Linfoterapia (LIT) alogénica con el fin de analizar sus efectos en el aumento de la tasa de fertilidad y del éxito gestacional. La medición de los FBs se realizó mediante CML con la técnica no radioactiva MTT-Formazan. Se comprobó la existencia de FBs del CML en todos los grupos de conejas estudiadas. En conejas reproductoras subfértiles tratadas con LIT alogénica se observó un incremento significativo de los niveles de los FBs después de cada LIT, así como el aumento en la tasa de fertilidad de las mismas. Además, se estableció que los FBs de proliferación celular actúan inhibiendo el CML de otras especies, lo que indica claramente que el efecto inhibitorio de FBs es interespecífico y no intraespecífico como se ha sostenido hasta ahora.

Palabras claves: Linfoterapia, Factores bloqueadores, Cultivo Mixto de Linfocitos, *Oryctolagus cuniculus*, *Aloinjerto fetal*.

INTRODUCCIÓN

En 1974 Beer y Billingham sentaron las bases de la inmunología de la reproducción. Sus estudios pioneros demostraron que el útero no es un tejido inmunológicamente privilegiado y además, postularon diferentes

teorías para explicar la supervivencia del aloinjerto fetal durante la gestación e implementaron la inmunoterapia como tratamiento para los abortos recurrentes espontáneos (1). Investigaciones posteriores realizadas en modelos animales llevaron al entendimiento de los mecanismos responsables de las reabsorciones fetales o de los abortos habituales, además, de los efectos de la aloinmunoterapia en la reproducción (2, 3).

Actualmente se acepta que la madre reconoce inmunológicamente a su embrión alogénico, y que responde vigorosamente a partir de la implantación del blastocito en la decidua uterina. Por esta razón se cree firmemente que deben existir factores que actúan regulando o suprimiendo dicha respuesta inmunológica contra el embrión en desarrollo, permitiendo el éxito de los placentarios visto al nivel de todos los mamíferos (4).

Uno de los principales propósitos de la inmunología de la reproducción va dirigido a establecer modelos animales experimentales para indagar sobre los fenómenos de la respuesta inmune materna contra el aloinjerto fetal. La eficiencia reproductiva en el campo pecuario de especies para explotación comercial se ha visto afectada en gran medida por las malas prácticas de manejo en los pro-

gramas de mejoramiento genético que conducen a altos índices de endogamia manifestados en una tasa de fertilidad muy baja y que atentan contra la rusticidad de estas especies. La importancia de este estudio radica precisamente en la evaluación del efecto de la inmunoterapia como tratamiento para corregir problemas específicos de infertilidad.

Los Factores bloqueadores (FBs): son moléculas encargadas de prevenir el rechazo del aloinjerto fetal durante el embarazo (5,6).

Linfoterapia (LIT) o Inmunoterapia: es una preparación purificada de glóbulos blancos que es administrada intradérmicamente. Se inoculan aproximadamente 50 millones de células del padre o de un tercero relacionado con éste (4).

Aloinjerto Fetal: Se considera que el feto es un semialoinjerto, debido que, al poseer un 50% de información genética proveniente del padre, podría expresar aloantígenos propios o paternos, los cuales serían susceptibles de reconocimiento y rechazo inmunológico (3).

Hembras subfértiles: se consideran hembras subfértiles aquellas conejas repetidoras de servicios, es decir, que se montan varias veces y no quedan preñadas. Y la causa de la subfertilidad puede darse por problemas inmunológicos agravados por los altos índices endogámicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de grupo control y grupo problema para el estudio: Se cuantificaron los FBs presentes en el suero de 55 conejas distribuidas así: nueve conejas reproductoras subfértiles las cuales recibieron dos dosis de LIT denominado grupo con tratamiento, ocho conejas reproductoras subfértiles inoculadas con dos dosis de Solución Salina Estéril (SSE) denominado grupo

control, veinte conejas nulíparas de ochenta días, diez conejas multíparas normales y ocho conejas multíparas normales post-parto. Como reproductores se utilizaron machos de fertilidad comprobada y en estado activo durante el tiempo de estudio. Para la obtención de células mononucleares destinados a LIT y CML, la toma de sangre se realizó mediante punción intracardiaca con jeringas heparinizadas, para ello, se utilizaron conejos de raza Nueva Zelanda Blanca (NZB) destinados para sacrificio. Para la obtención de sueros de las hembras problema y control, la toma de sangre se realiza por punción de la vena marginal de la oreja en tubos vacutainer pediátricos sin aditivo.

Protocolo para el montaje del CML con la técnica no radiactiva MTT-FORMAZAN: El ensayo de proliferación celular no radioactivo es un método colorimétrico para determinar células viables en cultivo, éste ensayo está compuesto por un componente de Tetrazolium (3-(4,5-dimetilthiazol-2-yl)-2,5 difenil tetrazolium brinide) MTT. El MTT es incorporado por la célula y llevado hasta la mitocondria donde es reducido por ellas hasta el Formazan el cual es soluble en el medio de cultivo. Esta conversión requiere de enzimas deshidrogenasas presentes en la matriz mitocondrial y que se encuentran en células metabólicamente activas (7-9).

Los linfocitos se separan por gradientes de Ficoll-Hypaque (Densidad 1.077) y centrifugados a 3000 r.p.m. por 40 minutos. Se recupera la capa de blancos con pipeta pasteur y se agrega 10 ml de medio RPMI 1640, luego se centrifuga durante 10 minutos a 2000 r.p.m., este paso se repite dos veces más. Las células del macho o inductoras se tratan con Mitomicina C 0.25 mg / ml (por cada ml de células se utiliza 0.1 ml de Mitomicina C) durante 20 minutos a 37°C. Las células finalmente se llevan a una concentración de 2×10^6

células/ml con medio RPMI 1640, el número de células se ajustó mediante recuento en cámara de Neubauer y la viabilidad se midió con azul de tripan bajo microscopía 40x.

Preparación de placas de ensayo: Se agrega 100 µl de medio de cultivo RPMI 1640 en todos los pozos por triplicado. Luego se adiciona 30 µl de suero de las hembras a probar en el ensayo. Después se siembran 50 µl de células respondedoras (5000 células/ml) y 50 µl (5000 células/µl) de células inductoras previamente inactivadas con Mitomicina C en todos los pocillos de la placa de cultivo, según el número de pruebas. Luego se incuba la placa a 37°C por 72 horas en incubadora con una humedad relativa del 5% y bajo una atmósfera de CO₂ al 5%.

Medición de la Absorbancia y registro de datos: Se adicionan 15 µl de solución Dye en cada pocillo. Luego se incuba la placa a 37°C por cuatro horas en una incubadora con una humedad relativa del 5% y bajo una atmósfera de CO₂ al 5%. Después de cuatro horas se adiciona 100 µl de solución de parada a cada pozo.

Interpretación de resultados: El plato de cultivo se lee en un Lector de ELISA Anthos 2001, a una longitud de onda de 540 nm y con filtro de referencia de 620 nm. Se realiza el cálculo del efecto inhibitorio mediante la siguiente fórmula (10).

$$EI = 1 - \frac{\text{Abs. del CML con el suero Mx}^*}{\text{Abs. del CML del suero AB}^+} \times 100$$

*Donde Abs = absorbancia, Mx= muestra.

RESULTADOS

Se midieron los índices de FBs en cada coneja antes y después del tratamiento. Se evaluó la respuesta proliferativa en presencia de los sueros de las hembras en estudio en el CML. Los valores de los FBs se describen en las tablas 1 y 2.

Tabla No 1. Valores de Factores Bloqueadores de hembras problema subfértiles sin y con dosis de Linfoterapia.

Sin LIT	1 LIT	2 LIT	3 LIT
A	B	C	D
1 %	30%	50,95%	
22,08%	32,77%	47,72%	59,1%*
21,76%	38,64%	47,08%	52,93%*
35,72%	42,21%	56,17%	55,85%*
34,10%	43,51%	48,06%	
24,03%	48,71%	57,80%	
21,11%	54,23%	60,39%	
10,12%	22,07%	29,9%	
6,55%	36,66%	41,64%	

Tabla No 2. Valores de Factores Bloqueadores de hembras problema subfértiles sin y con dosis de Solución Salina Estéril.

Sin SSE	1 dosis de SSE	2 Dosis SSE.
A	B	C
23,96%	21,76%	29,50%
31,14%	29,23%	33,65%
22,16%	22,73%	25,35%
23,36%	21,43%	26,27%
24,56%	25,98%	27,19%
20,56%	19,81%	21,66%
19,36%	18,51%	17,06%
20,84%	23,38%	19,82%

Se obtuvieron los valores de FBs de las hembras Control con un promedio de 28.69%, siendo una referencia para hembras reproductoras normales que no han recibido Linfoterapia alógena. Para las hembras reproductoras subfértiles, se obtuvieron valores promedio de FBs de 20.79% sin la dosis de la aloimmunoterapia. Después de la primera aloimmunización de las hembras reproductoras subfértiles se encontraron valores promedio de FBs de 38.25%; con la segunda dosis de Linfoterapia se obtuvieron valores promedio de FBs de 48.17% y con la tercera dosis los valores promedio de FBs de 55.96%. Lo que nos indica claramente un aumento significativo de los FBs directamente proporcional al número de dosis de Linfoterapia, además, la Linfoterapia incrementó los índices de eficiencia reproductiva, es decir, el éxito gestacional. Como se describe en las tablas 3 y 4.

Tabla 3. Eficiencia reproductiva de las hembras con tratamiento de Linfoterapia.

Hembras problema (LIT)			
No	Estado	No de dosis	Montas
1	Preñada	2 LIT	1
2	Preñada	3 LIT	2
3	Preñada	3 LIT	2
4	Preñada	3 LIT	2
5	Preñada	2 LIT	1
6	Preñada	2 LIT	1
7	Preñada	2 LIT	1
8	Preñada	2 LIT	1
9	Preñada	2 LIT	1

Tabla No 4. Eficiencia reproductiva de las hembras con tratamiento SSE.

Hembras control (SSE)			
No	Estado	No de dosis	Montas
1	Fracaso	2 SSE	4
2	Preñada	2 SSE	1
3	Preñada	2 SSE	1
4	Fracaso	2 SSE	4
5	Fracaso	2 SSE	4
6	Preñada	2 SSE	1
7	Fracaso	2 SSE	4
8	Fracaso	2 SSE	4

El promedio de FBs de hembras nulíparas de 80 días oscila en 17,2 %, para multíparas normales 30,06 % y para multíparas post - parto 44,94 %.

Se observó el efecto de cada uno de los tratamientos en el número y condición de las camadas obtenidas tanto de las hembras tratadas con LIT como las hembras tratadas con SSE (Vea tabla No 5).

Tabla No 5. Efecto de los tratamientos medidos en el número y condición de la camada de hembras reproductoras con tratamiento (LIT y SSE).

No de gazapos de Hembras tratadas con LIT		No de gazapos de Hembras inoculadas con SSE	
1ª Parto	2ª Parto	1ª Parto	2ª Parto
10	8	-	-
7	8	6	4
8	8	6	10
10	8	-	-
12	10	-	-
2	11	9	8
8	10	-	-
7	9	-	-
4	11		

Además se ensayaron sueros de ocho hembras de diferentes especies en un cultivo mixto de Linfocitos con una misma fuente celular de origen humano, para observar la respuesta proliferativa en presencia de dichos sueros y en todos los casos inhibieron la reacción positiva del CML o lo que es lo mismo la proliferación celular (Vea tabla No 6).

Tabla No 6. Valores de FBs de respuesta proliferativa del sueros de hembras en el CML de diversas especies con la misma fuente celular.

Hembras gestantes		Hembras no gestantes	
Animal	Valor FBs	Animal	Valor FBs
Vaca 1	37,33%	Cabra	28,87%
Vaca 2	26,73%	Conejo 2	22,07%
Vaca 3	31,80%	Tinajo 2	26,81%
Tinajo 1	35,27%		
Conejo 1	40,23%		

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para evaluar los efectos reales de la Linfoterapia en el aumento de FBs en hembras reproductoras subfértiles en comparación con el grupo de hembras subfértiles tratadas con solución salina se realizó un análisis de varianza - ANOVA de Diseño en Bloques completos al azar para cada prueba independientemente (11,12).

Con los datos del análisis de varianza se realizaron las pruebas de significancia de las diferencias o las comparaciones entre las medias de las muestras para ello se utilizó un procedimiento de comparación múltiple conocida como prueba DVS o prueba de Tukey (12).

Para el grupo tratado con Linfoterapia se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos y altamente significativas entre el momento sin Linfoterapia y después de la segunda dosis de Linfoterapia (Tabla No 7 y Figura No 1).

Tabla No 7. ANOVA I Tratamiento con LIT

Fuente de variación	GL	SC	CM	F Calculado
(h-1) Bloques	8	1872,33	234,04	5,41
(t-1) Tratamientos	2	3972,50	1986,25	45,89
(h-1) (t-1) Error	16	692,41	43,27	

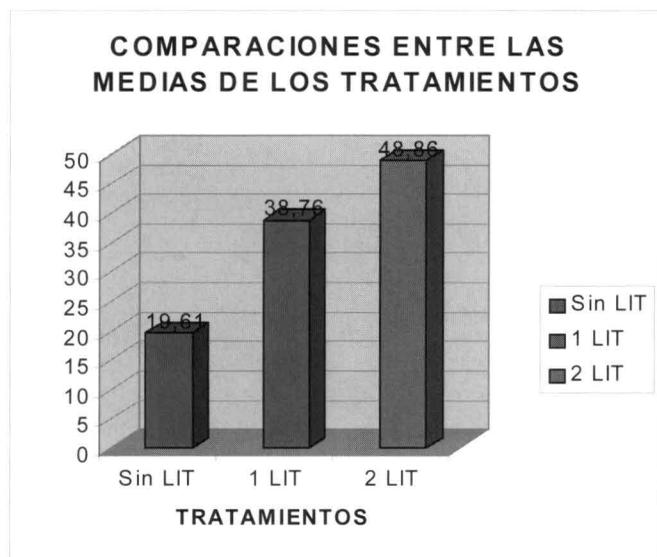


Figura No 1. Comparación entre las medias de los tratamientos de LIT.

Para el grupo tratado con SSE la diferencia entre las medias de las muestras no fue significativa, es decir, todos los efectos del tratamiento son iguales (Tabla No 8 y Figura No 2).

Tabla No 8. ANOVA II Tratamiento con SSE.

Fuente de variación	GL	SC	CM	F Calculado
(h-1) Bloques	7	326,85	46,7	14,62
(t-1) Tratamientos	2	22,25	11,13	3,52
(h-1) (t-1) Error	14	44,32	3,17	

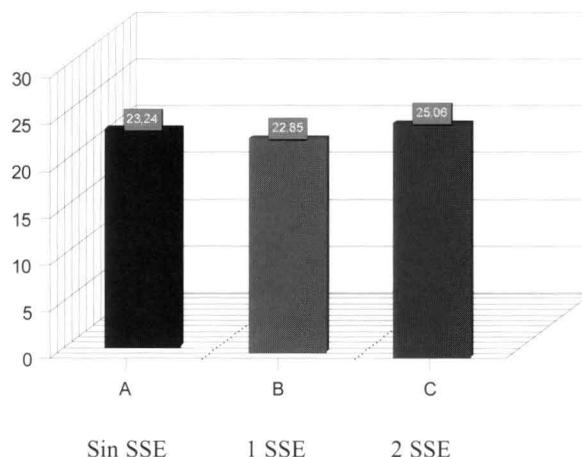


Figura No 2. Comparación de las medias de los tratamientos SSE.

DISCUSION

Debido a las diferentes teorías propuestas tendientes a explicar la supervivencia del aloinjerto fetal, varios grupos de investigación han centrado sus esfuerzos en profundizar acerca de la actividad esencial que cumplen los FBs para prevenir el rechazo inmunológico de la madre contra el feto. Por este motivo se estudiaron los FBs en conejas reproductoras subfértiles y el principal objetivo se enfocó a cuantificar los FBs del CML en modelos animales los cuales nos pueden brindar nuevos conocimientos sobre este tema y puedan además ser aplicados a la reproducción humana, con énfasis en los problemas reproductivos de origen inmunológico causantes de abortos habituales.

Durante esta investigación se estudió el efecto de la LIT en el aumento de los niveles de FBs y por consiguiente un mayor éxito gestacional en comparación con el grupo tratado con SSE en las conejas reproductoras subfértiles.

Con los resultados obtenidos se logró demostrar que efectivamente los FBs del CML aumentan su concentración después de cada inoculación de Linfocitos en hembras subfértiles, permitiendo sustentar la hipótesis propuesta dado que se encontraron diferencias altamente significativas entre las hembras sin Linfoterapia y después de la segunda dosis de Linfoterapia ($p > 0.01$). En contraposición en las hem-

bras que fueron tratadas con SSE no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$), lo cual nos indica que la Linfoterapia es útil para aumentar los niveles de FBs y por consiguiente corregir las situaciones específicas de infertilidad, siendo un tratamiento inmunológico de gran utilidad en caso de aborto recurrente ya sea en humanos (4) u otros mamíferos, además no se observó ningún efecto nocivo de la Linfoterapia en ésta especie. Es opuesto a otras investigaciones que afirman que la Linfoterapia no es un tratamiento que mejore el éxito gestacional en mujeres abortadoras recurrentes y por tanto los resultados de esta estén relacionados con efectos psicológicos mediados hormonalmente (13,14).

El éxito en la tasa de fertilidad observado en hembras subfértiles tratadas con LIT fue mayor que en las hembras tratadas con SSE. La incidencia de la LIT fue clara puesto que a la segunda dosis de LIT el 66% de las hembras quedaron preñadas y a la tercera dosis el éxito fue del 100%, lo que indica que los niveles de FBs son óptimos a partir de la tercera dosis de LIT, pues se observan diferencias altamente significativas ($p > 0.01$)

entre las hembras sin LIT y aquellas que recibieron hasta tres dosis de LIT. Además, se pudo demostrar que la eficiencia reproductiva esta íntimamente ligada a un buen nivel de FBs.

El tamaño de la camada es dependiente de muchas variables externas tales como la dieta, el estrés, la genética del animal y el tiempo de destete, éste último caso esta relacionado con el manejo de la producción (3). La variabilidad del número de gazapos va desde 1 a 20 por camada siendo esto un dato muy aleatorio para tener en cuenta como referencia del tratamiento con Linfoterapia. Además cabe anotar que la mortalidad prenatal ocurre comúnmente en todas las especies de mamíferos politocas, tales como los conejos, parece ser que cuando hay un número excesivo de mórulas el suplemento normal de nutrientes uterinos es insuficiente para los requerimientos de supervivencia y puede inducir la muerte de muchos embriones, a éste fenómeno se le denomina reabsorción fetal (15-17). Con base en lo anterior y con los resultados obtenidos se puede decir que la LIT esta implicada en la disminución del número de reabsorciones fetales lo que podría indicar que la LIT pue-

de impedir la selección al nivel de útero de embriones consanguíneos (18).

La cuantificación de sueros de hembras normales nos permitió establecer el rango de índices de FBs presentes en hembras normales lo que nos indica que para obtener un buen éxito gestacional en ésta especie el rango de FBs debe oscilar en promedio de niveles superiores al 30% (borderline), además, los niveles de FBs están relacionado con el número de partos, es decir, entre más partos mayor índice de FBs, observado por el promedio de FBs en hembras post-parto siendo en promedio del 45%. El promedio de FBs en hembras nulíparas es de 17%, lo que nos indica que los FBs aumentan durante los primeros diez días y mantienen sus niveles altos durante el transcurso de la gestación (18).

Además se demostró que los FBs no corresponde con anticuerpos clásicos, ya que el suero de varias especies fue utilizado en un CML de un mismo origen y se pudo comprobar que en todos los casos inhibió la reacción positiva y la proliferación celular. Lo que nos indica que los FBs son inter-específicos y no intra-específicos como se ha venido afirmado en otras publicaciones (18).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Beer A, Billingham R E.** The embryo as a transplant. *Scientific American* 1974; 230: 36 - 46.
2. **Maldonado J.** Efecto de la aloinmunoterapia en la reproducción animal. Tesis de grado como requisito parcial para optar al título de Magister en Inmunología. Universidad de Antioquia. Facultad de Medicina. 1993
3. **Ossa J, Sánchez F, Cadavid A.** Inmunología de la Reproducción. Primera Edición. Imprenta Universidad de Antioquia. Colombia. 1993; 206.
4. **Ossa H, Benítez A, Cárdenas S, Moreno C H.** Cuantificación de factores bloqueadores del cultivo mixto de linfocitos en mujeres abortadoras habituales tratadas con Linfoterapia. *Medicina Reproductiva* 2000; 3 (1): 33 - 36.
5. **Gurka G, Rocklin R E.** Reproductive Immunology. *Jama* 1997; 258 (20): 2983,7.
6. **Lancet.** Maternal blocking antibodies, the fetal allograft and recurrent abortion. In: *The Lancet*. 1983; 1175-1176.
7. **Mossman T.** Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Immunological Methods*. 1983; 65: 55 - 63.
8. **Promega, Cell.** Titer 96 TM Aqueous Non-Radioactive cell proliferation Assay. *Technical Bulletin*. 1994; No 169.
9. **Promega, Cell.** Titer 96 TM Non - Radioactive cell proliferation Assay. *Technical Bulletin*. 1995; No 112.
10. **Scott JR, Park M, Edwin S, Brach D.** Interpretation of blocking activity in maternal serum depends on the equation used for calculation of mixed lymphocyte culture results. *Clinical Experimental Immunology*. 1990; 82: 363 - 368.
11. **Daniel W.** Bioestadística. Base para el análisis de ciencias de la salud. Editorial Uteha. Noriega editores. México. 1997; 878.
12. **Reyes C.** Bioestadística Aplicada. Agronomía, Biología, Química. Editorial Trillas. México. 1995; 216.
13. **Mowbray J, Gibbings C, Liddell H, Reginald P, Underwood J, Beard R.** Controlled trial of treatment of recurrent spontaneous abortion by immunisation with paternal cells. *Lancet*. 1985; 8435: 941- 943.
14. **Ober C, Karrison T, Odem R, Barner R, Branch W, Stephenson M, Baron B, Ann M, Scott J, Schreiber J.** Mononuclear cell immunisation in prevention of recurrent miscarriages: a randomised trial. *Lancet*. 1999; 354: 366 - 369.
15. **Adams C E.** Studies on prenatal mortality in the Rabbit, *Oryctolagus cuniculus*: The amount and distribution of loss before and after implantation. *Endocrin*. 1960; 19: 325 - 344.
16. **Adams C E.** Studies on prenatal mortality in the Rabbit, *Oryctolagus cuniculus*: The effect of transferring varying numbers of eggs. *Endocrin*. 1962; 24: 471 - 490.
17. **Adams C E.** Maintenance of pregnancy relative to the presence of few embryos in the rabbit. *Endocrin*. 1970; 48: 243 - 249.
18. **Manrique E, Rincon V.** Cuntificadores de factores bloqueadores mediante cultivo mixto de linfocitos en suero de conejas reproductoras tratadas con linfoterapia. 2000; tesis de grado, Universidad Distrital, Francisco José de Caldas