

## **ESTUDIOS SOBRE LOS MECANISMOS INMUNOLOGICOS DE LA INFERTILIDAD**

Dr. RODOLFO GONZALES ENDERS (\*)

Existen parejas infértiles que son anatómica y hormonalmente normales; se ha tratado de dar múltiples explicaciones a este fenómeno y una de ellas es la inmunológica. Esta fue documentada en 1964 por Franklin y Dukes (1) y en 1967 por Schwimmer (2) y colaboradores.

Schwimmer y Col. (2) encontraron que el 37.5% de mujeres con infertilidad primaria y 50% de aquellas con infertilidad secundaria de causa desconocida tenían aglutininas espermáticas y que sólo al desaparecer estas aglutininas algunas de estas parejas concebían.

Se trató de obtener un modelo experimental y Sawada (3), así como Otani (4) y colaboradores pudieron reproducir esta infertilidad temporal y relativa en conejas y cobayas inmunizadas con semen por vía subcutánea y vaginal.

Al tener un modelo experimental, se empezaron a hacer los estudios sobre el mecanismo de acción y así Takahashi (5) encontró que se producía ovulación y el transporte de los óvulos a través de las trompas de las conejas era enteramente normal.

Nuestros experimentos se diseñaron para estudiar fertilización e implantación en conejas inmunizadas con semen total de conejo que tenían títulos más altos que los encontrados por Sawada (3), que ya producían infertilidad temporal y relativa.

Estos experimentos se basaron en la fisiología de la coneja (5) que es un animal que ovula en forma inducida, por la cópula y/o cuando se le inyecta

---

(\*) Universidad Peruana Cayetano Heredia, Dpto. Obstetricia y Ginecología.  
Estudio hecho en el Centro de Investigación de Biología de la Reproducción de la Universidad de Michigan, EE.UU. de N.A. - Ford Foundation Grant N° 37482.

Trabajo de incorporación a la Sociedad Peruana de Obstetricia y Ginecología.

gonadotropina coriónica. Además sabemos que en la coneja existe un período de capacitación de los espermatozoides de 12 horas; que la 1ª y 2ª división celular de la mórula se realiza entre 24 y 36 horas después del coito y la implantación del blastocisto que entre el 7º y 8º día después de la inseminación.

#### MATERIAL Y METODOS

Se emplearon conejas de raza Nueva Zelandia de 3,000 a 4,000 g., que habían tenido una camada y se encontraban en jaulas separadas. Los machos dadores de semen fueron de la misma raza y entrenados para eyacular en una vagina artificial.

Las conejas fueron agrupadas en controles e inmunizadas, a su vez cada grupo de los anteriores en dadores y receptores. La mecánica del experimento consistía en que una vez alcanzado un título por hemoaglutinación mayor a 1/1,000 en los animales inmunizados, se superovulaban las conejas dadoras y se inseminaban; 24 a 36 horas después se contaban las puntas de ovulación y se recuperaban los óvulos de las trompas, los que se estudiaban para determinar la división celular a 2-4-8 células.

Una vez establecida la fertilización y la formación de la mórula, se transplantaban en condiciones estériles 5 mórulas a cada una de las trompas de las conejas pseudo embarazadas, controles e inmunizadas; para reoperárseles al 9º día de gestación y hacer el recuento de implantaciones (blastocistos). Algunas conejas se mantenían vivas hasta el 28º ó 29º día de gestación para ver el desarrollo de los blastocistos implantados.

#### **Inmunización (3)**

Se practicó con semen total de conejo, diluido en suero fisiológico de modo que contenga 20 mg. de proteína cc.; mezclado con igual volumen de adjuvante completo "Difco.". Se administraba un total de 24 mg. de proteína por inmunización, subcutáneamente en la espalda, en 10 lugares diferentes. Estas inmunizaciones se repetían cada 3 semanas hasta obtener un título mayor de 1/1,000. A los animales controles se les trató igual, con la excepción de inyectar suero fisiológico en lugar de proteína.

#### **Titulación**

Los títulos de anticuerpos se determinaron por hemoaglutinación (7 - 8) 7 a 10 días después del tratamiento, y el título requerido se obtenía después de 3 a 4 inmunizaciones (60 - 90 días).

### **Superovulación (9)**

Utilizamos 25 u.i. de FSH postmenopáusicas humanas (Pergonal) subcutáneamente por 3 días y al 4º día se inyectaba endovenosamente 200 u.i. de HCG humana, al mismo tiempo que se inseminaban las conejas dadoras con un cc. de semen total fresco; paralelamente se producía pseudo-embarazo en las conejas receptoras.

### **Pseudo-embarazo**

Se inyectaban 200 u.i. de HCG humana endovenosamente y se inseminaban con 1 cc. de semen total muerto.

### **Trasplante de Zigotes (10 - 11)**

24 a 36 horas después de la inseminación se llevaba a las conejas dadoras y receptoras a la sala de operaciones y mediante anestesia general con pentobarbital-éter se exanguinaban las dadoras.

Se extraían los huevos lavando las trompas con 1 cc. de solución salina estéril, inyectándola por el extremo proximal (unión útero-tubaria) y luego se examinaba el líquido al microscopio buscando las mórulas, confirmaba su existencia se operaban las conejas receptoras y en las mismas condiciones de esterilidad, con una pipeta capilar se colocaban 5 cigotes en cada extremidad distal de las trompas receptoras con 0,1 cc. de suero fisiológico y sin burbujas de aire. Todo este procedimiento de trasplante duraba 15 minutos. Las conejas receptoras recibían penicilina-estreptomina profiláctica post-operaria.

### **Lectura de implantaciones (10 - 11)**

Al 9º día de gestación en condiciones estériles, se operaban las conejas receptoras y se contaban implantaciones. Algunas conejas se sacrificaban por exanguinación y otras se suturaban para sacrificarlas entre los 25 a 28 días de gestación y poder examinar la morfología de los fetos.

## **RESULTADOS**

### **Fertilización**

Para este estudio se utilizaron los animales que llamamos dadores superovulados e inseminados, de acuerdo a la técnica descrita. Se contaron los puntos de ovulación, el número de óvulos recuperados y el número de óvulos fecundados.

CUADRO N° 1  
FERTILIZACION

N°	Números crias	Peso	Título de anticuerpos	N° de puntos de ovulación	Número de óvulos	
					Fecundados	No fecundados
<b>CONTROLES</b>						
39	6	4540	0	93	65	5
31	6	4340	0	87	70	1
71	6	3550	0	52	41	1
<b>INMUNIZADOS</b>						
11	7	1930	1/1280	22	15	3
14	8	1930	1/5120	21	14	4
15	6	3570	1/5120	41	20	2
25	8	4050	1/1280	82	69	1

En el cuadro N° 1 se observa:

- En animales inmunizados se produce ovulación (superovulación) y fertilización en el 71% semejantes al 66% de los controles.
- El índice de recuperación de óvulos fue del 84%.

### Implantación

Para este estudio se trasplantó los cigotes de las conejas dadoras a las conejas receptoras pseudo embarazadas, contándose los blastocistos implantados en los cuernos uterinos al 9° día de gestación.

En el cuadro N° 2 se observa:

- Que hay 55% de implantación de cigotes al ser trasplantados a conejas no inmunizadas.
- Este porcentaje decrece al 23.3% en conejas inmunizadas con semen total de conejo.

### DISCUSION

En el Centro de Investigaciones de Biología de la Reproducción de la Universidad de Michigan, desde hace algunos años se están estudiando los mecanismos de la infertilidad humana por causa inmunológica (2).

CUADRO Nº 2  
I M P L A N T A C I O N

Nº animal	Nº crías	Peso	Título del anticuerpo	Número de zigotes transplantados		Número de blastocistos implantados al 9º día	
				Derecha	Izquierda	Derecha	Izquierda
<b>CONTROLES</b>							
36	6	4150	1/20	5	5	0	0
43	8	4100	1/40	5	5	3	2
44	6	4660	0	51	5	4	3
45	9	4970	1/40	5	5	5	2
70	10	3470	1/40	5	5	4	5
72	5	4240	1/20	5	5	4	3
52	6	4380	1/80	4	5	0	3
				34	35	20	18
				69		38	
<b>I N M U N I Z A D O S</b>							
9	7	3480	1/2560	5	5	3	1
10	6	4240	1/5120	5	5	0	0
13	5	4300	1/1280	5	5	0	0
16	7	2680	1/1280	5	5	0	0
27	4	3470	1/2560	5	5	0	1
28	2	4240	1/2560	5	5	5	4
				30	30	8	6
				60		14	

Los primeros pasos fueron dados al haber logrado reproducir este fenómeno en conejas y cobayas (3 - 4), así, pues, teniendo un modelo experimental animal, en este caso el más adecuado fue la coneja, se diseñaron una serie de experimentos para estudiar los mecanismos que producían esta infertilidad.

En primer lugar se demostró que no había alteración en la ovulación, ni en el transporte de los óvulos a través del tracto genital de conejas inmunizadas con semen total de conejo (5).

Nuestra labor fue la de investigar la fertilización y división celular precoz desde el punto de vista morfológico y especialmente la implantación en el útero en sus primeros momentos.

Por el cuadro N° 1 podemos darnos cuenta que la fertilización y morulación hasta la segunda o tercera división celular se realiza en forma normal, comparable con los animales control, pero que existe una disminución marcada del número de mórulas, transformadas ya en blastocistos, al ser transplantados en idénticas condiciones a conejas inmunizadas (cuadro N° 2).

En esta comparación podemos decir que más de un 50% de mórulas no se implantan en las conejas inmunizadas, frente a una sola variable, que sería la presencia de un alto título de anticuerpo antiseminal circulante.

Con esto deducimos que algo sucede a las mórulas durante su vida intratubaria o intrauterina entre el 2º y 8º día de maduración y las posibilidades podrían ser las siguientes:

- a) Podría ser que la mórula degenera frente a la presencia de anticuerpos antiseminales que existen en el líquido tubario y uterino (12), y esto también explicaría que esta degeneración podría estar en relación al título del anticuerpo y permitir así algunas implantaciones.
- b) Podría ser que producida la fertilización y las primeras divisiones celulares, éstas aparezcan morfológicamente normales, pero que la bioquímica celular esté alterada por la presencia de anticuerpos antiseminales en el líquido tubario, sabemos que alteran el metabolismo aeróbico y anaeróbico de los espermatozoides (13), también podrían alterar el metabolismo de los óvulos o de las mórulas deteniendo su división posterior y llevándolas a degenerar.
- c) Por último podría tratarse de que el anticuerpo antiseminal se encuentre a nivel tisular endometrial, tal como se ha encontrado en humanos (14); estos podrían producir una alteración de la implantación y, por lo tanto, un rechazo del blastocisto.

Por unos pocos casos que seguimos hasta el desarrollo fetal completo, hemos visto que los blastocistos implantados se desarrollan normalmente desde el punto de vista morfológico; algunas placentas degeneraron, pero en número semejante en ambos grupos de conejas: control e inmunizadas.

Mediante este trabajo hemos tratado de dilucidar el mecanismo de acción de los anticuerpos antiseminales como factor de infertilidad y hemos puesto nuevos interrogantes. Estos hallazgos pueden relacionarse con lo descrito por Hertig y Rock (15), que demostraron que la mayor pérdida fetal se debe a abortos en la etapa de pre-implantación; en estas parejas infértiles su de-

fecto se debe quizás, a una alteración inmunológica, produciéndose esta infertilidad temporal y relativa, tan difícil de tratar.

### CONCLUSIONES

- 1.— Es posible producir en conejas, anticuerpos antiseminales capaces de causar infertilidad de origen inmunológico.
- 2.— La ovulación y fertilización en conejas inmunizadas se produce normalmente hasta la tercera división celular.
- 3.— La alteración del mecanismo de concepción estaría en la etapa de pre-implantación o implantación inicial.
- 4.— Esta inmunidad es relativa, temporal y por el momento no es de alto grado de protección anticonceptiva.
- 5.— No se ha observado efecto teratogénico en los animales que nacieron de conejas inmunizadas.

### SUMMARY

A review of the mechanisms of immunologic infertility, taking the rabbit as an experimental model, is presented with the following conclusions:

- 1.— In female rabbits it is possible to produce sperm antibodies, capable to be the cause of immunologic infertility.
- 2.— Immunized female rabbits are capable of ovulation, fertilization and cleavage up to the third cellular division.
- 3.— The contraceptive effect observed could be in the pre implantation or initial implantation stages.
- 4.— The immunity developed is relative, temporal and does not give high contraceptive protection.
- 5.— Teratogenic effect in the offsprings of the immunized rabbits was not observed.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.—FRANKLIN, R. and DUKES C. D.: Further studies on Spermaglutinating antibody and unexplained infertility. *J.A.H.A.* 190: 682 - 1964.
- 2.—SCHWIMMER, W. S. USTAY, K. R. and BEHRMAN, S. J.: An evaluation of Immunologic Factors of infertility, *Fertility and Sterility* 18: 167 - 180 - 1969.
- 3.—SAWADA Y.: Comunicación personal.
- 4.—OTANI, Y., and BEHRMAN, S.J.: Immunization of the Guinea Pig. with Homologous Testis and Sperm. *Fertility and Sterility* 14: 467 - 1963.
- 5.—TAKAHASHI, T.: Comunicación personal.
- 6.—AUSTIN C. R.: *The mammalian Egg*, Blackwell Scientific Pub. 1961 - p. 103 - 147.
- 7.—STAVITSKY A. L.: *Micromethods for the study of proteins and antibodies I. Procedure and general Applications of Hemagglutination and Hemagglutination-inhibitions. Reactions with Tanned Acid and Protein-treated Red Blood Cells.* *J. Immunol.* 72: 360 - 367 - 1954 a.
- 8.—STAVITSKY A. L.: *Micromethods for the study of proteins and antibodies II Specific applications of hemagglutination and Hemagglutination-Inhibition Reactions with Tonic Acid and Protein-treated Red Blood Cells.* *J. Immunologic* 72: 368 - 375 - 1954 b.
- 9.—PINCUS, GREGORY: Superovulation in Rabbits *Anat. Rec.* 77: 18 - 1949.
- 10.—CHANG M. C.: Fertility and Sterility as revealed in the study of fertilization and Development of Rabbit Eggs, *Fertility and Sterility* 2: 205 - 221 - 1951.
- 11.—CHANG M. C.: Development and Fate of Transferred Rabbit ova or Blastocyst in relation to the ovulation time of Recipients *J. Exper. Zoology* 114: 197 - 225 - 1950.
- 12.—BEHRMAN S. J.: *Immunology of Oviductal secretions on el "Mammalian Oviduct"*. The University of Chicago Press, 1968.
- 13.—ACKERMAN, D. R. and R. GONZALES ENDERS: Metabolism of Rabbit Spermatozoa in Homologous Immune Serum and Tubal Fluid. In press.
- 14.—SCHWIMMER W. B. USTAY K. A. and BEHRMAN S. J.: Sperm-agglutinating Antibodies and Decreased Fertility in Prostitutes. *Obst. and Gynec.* 30: 192 - 200, 1967.
- 15.—HERTIG, A. T. and ROCK J.: A series of potentially Abortive Ova Recovered from Fertile women *Am. J. Obst. and Gynec.* 58: 468 - 1949.