

Patogénesis de la enfermedad pélvica inflamatoria. Modelo animal con la biovariedad murina de *Chlamydia trachomatis*

Fabio Carmona Velásquez, M.Sc.*

RESUMEN

Se inocularon hembras de ratones blancos suizo (Balb/c), entre 4 y 6 semanas con la serovariedad MoPn de *Chlamydia trachomatis* para producirles una salpingitis clamidial experimental. Directamente en la rama uterina izquierda se inyectaron 30 μ l equivalente a 6×10^4 UFI. La misma cantidad se inyectó en la bursa del ovario del mismo lado, a través del tejido graso que se encuentra en este sitio. Se sacrificaron grupos de hembras a los 7 y 14 días después de la inoculación para buscar inflamación, hidrosálpinx y respuesta de anticuerpos tipo IgG e IgM. Otras hembras inoculadas se aparearon para observar la tasa de infertilidad bilateral que ocasionaba la infección. Un tercer grupo de animales se trató con tetraciclina, ibuprofén y prostaglandina E_1 . El tratamiento temprano, hacia el segundo día después de la inoculación, impidió la inflamación, la formación de hidrosálpinx y la infertilidad normal bilateral. Los agentes antiinflamatorios, usados solos, no tuvieron ningún efecto para prevenir la inflamación, ni aun en combinación con tetraciclina. Un cuarto grupo se trató con anticuerpos monoclonales dirigidos contra la subpoblación linfocítica L3T4 (equivalente en seres humanos a CD4). En los ratones con L3T4 se observó un agotamiento (depleción) total de la población linfocítica L3T4 hacia el segundo día después de la inoculación. El agotamiento persistió por lo menos hasta el día 20, pero no alteró significativamente los porcentajes de células expresadas por Thy 1.2 (célula de antígeno T) o Lyt_2 (célula de antígeno T supresor/citotóxico, que equivale a los CD8 en el hombre). Se concluye que los continuos inóculos con *Chlamydia*, generan una respuesta inmune que termina con daño del tejido y conduce a la infertilidad.

Palabras claves: *Chlamydia trachomatis*. Enfermedad pélvica inflamatoria. Respuesta inmune.

Chlamydia trachomatis es una bacteria intracelular obligada, que por infectar primariamente la mucosa oculogenital puede producir uretritis, cervicitis y conjuntivitis. Las infecciones oculares conducen al tracoma, la más importante causa de ceguera prevenible, en el mundo¹. Estas infecciones genitales generalmente se resuelven sin secuelas adversas pero en ocasiones progresan hasta una inflamación severa que resulta en infertilidad. La patogénesis de las consecuencias probablemente se comprende bien, aunque estudios previos sugieren que hay mecanismos inmunológicos comprometidos². Estos estudios proponen que la repetida exposición a los antígenos clamidiales provoca respuestas de hipersensibilidad que

llevan a un daño tisular irreversible; las secuelas son particularmente graves debido a que la infección del tracto genital femenino puede a menudo conducir a enfermedad pélvica inflamatoria (EPI), embarazo ectópico o infertilidad tubárica³. Westrom y Mardh⁴ monitorearon una cohorte de mujeres a quienes se les comprobó EPI por laparoscopia y encontraron que las que habían padecido un solo episodio de EPI mostraban 6.1% como tasa de infertilidad, mientras que en las que habían tenido tres o más episodios la tasa de infertilidad llegó a 54%.

Alrededor de 750,000 mujeres en los EEUU anualmente requieren tratamiento para EPI⁵. Además de la morbilidad y los costos asociados con la enfermedad aguda, el riesgo de presentar secuelas a largo plazo

en esta condición parece ser sustancial. Un estudio prospectivo en Suecia de 415 mujeres con salpingitis aguda, verificada por laparoscopia, informó frecuencias de 21.2% de infertilidad involuntaria, 18% de dolor abdominal crónico y 4.1% de embarazos ectópicos después de un episodio de EPI⁶. Safrin *et al.*⁷ en su estudio retrospectivo de 140 mujeres admitidas para tratamiento de EPI en el Hospital General de San Francisco, encontraron que 12 (24%) tuvieron dolor pélvico durante seis o más meses después de la hospitalización, en 22 (43%) hubo subsecuentes episodios de EPI y 40% fueron infértiles involuntarias. El tratamiento temprano de la EPI puede conducir a una recuperación completa sin daño de la función reproductiva. Infortunadamente, un número significativo de casos son

* Profesor Titular, Departamento de Microbiología, Escuela de Medicina, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Cali.

asintomáticos, leves o mal diagnosticados y no se toman medidas terapéuticas para resolver el problema⁸.

La etiología de la EPI es probablemente multifactorial, y la sintomatología y secuelas a largo plazo pueden ser el resultado de la interacción entre el o los microorganismos patógenos y el sistema inmune de la paciente⁹. Entre las bacterias *C. trachomatis* parece jugar un papel preponderante en la EPI. Varios estudios seroepidemiológicos en los países occidentales han mostrado una prevalencia en aumento de títulos altos de anticuerpos frente a *C. trachomatis* sobre todo en mujeres con infertilidad tubárica¹⁰⁻¹⁴ y en pacientes con embarazo ectópico^{9,15-17}. También se ha descubierto ADN clamidial más frecuente en cérvix de mujeres infértiles (26.3%) frente a un grupo control de fértiles (12.5%)¹⁸.

Por estudios en animales se ha establecido que tanto la producción de anticuerpos específicos como la inmunidad mediada por células frente al agente de la pneumonitis del ratón (MoPn) de *C. trachomatis* son dependientes de células T. Además, en estudios anteriores se ha visto que en la respuesta inmune también hay producción de gamma interferón (IFN-gamma). Este interferón mostró capacidad para inhibir *in vitro* la replicación de la bacteria y se observó además que su producción en el bazo también dependía de células T¹⁹: el agotamiento *in vivo* de interferón en ratones de laboratorio puede exacerbar la infección. También se sabe que la administración de un anticuerpo monoclonal (inmunoglobulina de rata G2b. IgG 2b) contra los linfocitos L3T4 deprimen la población de células T ayudadoras/inductoras en los ratones²⁰. Esto se asocia con la supresión de inmunidad humoral a los antígenos

T dependientes y lleva también a alguna supresión de la inmunidad celular. Estos hallazgos sugieren que los anticuerpos monoclonales dirigidos contra antígenos linfocíticos específicos pueden servir como sondas para delinear o determinar las poblaciones específicas de linfocitos que contribuyen a la respuesta inmune.

Se han obtenido modelos experimentales de salpingitis por la inoculación de serovariedades humanas y murinas de *C. trachomatis* a la vía del tracto superior reproductivo de ratones hembras²¹⁻²³.

En estos modelos, después de los episodios de infección aguda, en un número significativo de animales hubo lesiones del oviducto que resultaron en infertilidad unilateral o bilateral; sin embargo, hay aún muchas preguntas sin respuestas con respecto al papel de la respuesta inmune del huésped en lo relacionado con la infertilidad.

En un intento para ganar una mejor comprensión de los cambios inmunopatológicos que conducen a la infertilidad, se utilizó el modelo murino de salpingitis que ha sido desarrollado en el laboratorio de clamidias para estudiar la patogénesis, los parámetros inmunológicos de la infección, las secuelas inducidas por la enfermedad y en términos de subsecuente infertilidad y por último, la efectividad de diversos esquemas de tratamiento para minimizar las secuelas de la infección aguda.

Varios experimentos han mostrado que la tetraciclina oral que se da antes o en el momento de la inoculación puede prevenir la inflamación y la infertilidad. Sin embargo, cuando la tetraciclina se administra en el séptimo día después de la inoculación tiene poco o ningún efecto en prevenir la inflamación o la infertilidad. La infertilidad posterior a la salpingitis

infecciosa resulta del daño causado por la inflamación del oviducto. Debido a que el suministro de tetraciclina en el momento de la inoculación previno la infertilidad²⁴ y que el tratamiento a los siete días después de la inoculación no muestra ningún efecto para reducirla²⁵ se estudió el comportamiento de este antibiótico cuando se empezó en los días 2 y 3 después de la inoculación. También se evaluó la eficacia de tres preparaciones antiinflamatorias (ibuprofén, prostaglandina E₁ e hidrocortisona). Este estudio también se hizo para evaluar la hipótesis que las poblaciones de linfocitos T ayudadores/inductores identificados por el anticuerpo monoclonal L3T4 juegan un papel significativo en la respuesta inmune. Todo se efectuó en ratones inoculados por vía intrauterina con la biovariedad MoPn de *C. trachomatis*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ratones. Hembras de ratón blanco suizo (Balb/c) obtenidas de Charles River Breeding Laboratories, Inc. (Wilmington, MA). Las hembras tenían entre 4 y 6 semanas de edad y los machos por lo menos 8 semanas y fertilidad comprobada.

Organismos. La biovariedad MoPn de *C. trachomatis* se cultivó en monocapa de células McCoy y se congeló en alícuotas a -70° C, según la técnica descrita por Swenson *et al.*²¹; la concentración bacteriana almacenada y que luego se usó para las inoculaciones fue más o menos 2 x 10⁶ UFI/ml (UFI = unidades formadoras de inclusiones).

El plan experimental se llevó a cabo en dos etapas. En la primera se determinó la respuesta inmune y la resolución de la infección en diferentes tiempos de exposición a *C. trachomatis*.

En la segunda fase se estudió el efecto del tratamiento con tetraci-

clina iniciado en los días 2 y 5 después de la inoculación. También se evaluó la eficacia de tres antiinflamatorios (ibuprofén, prostaglandina E₁ e hidrocortisona) para prevenir daño tubárico y la subsecuente infertilidad. En este punto también se estudió el comportamiento de las poblaciones T linfocíticas L3T4 frente a la salpingitis experimental causada por *C. trachomatis*.

Para determinar el efecto de los diferentes tiempos de exposición, se inocularon grupos de 10 ratones hembras. Después de la anestesia con metoxifluorano, se extrajo la rama uterina izquierda, el oviducto y el ovario a través de una incisión realizada en el flanco. Aproximadamente 0.03 ml (6 x 10⁴ UFI) de la suspensión de *C. trachomatis* se inyectó en el ovario izquierdo a través del tejido graso y otros 0.03 ml de la suspensión bacteriana en la rama uterina. Como control por cada grupo de 10 animales se inocularon dos con medio de cultivo estéril. La incisión se cerró en el peritoneo con hilo de sutura N° 4 y la piel con un gancho metálico. El experimento se hizo tres veces y los ratones se sacrificaron al séptimo y al decimo-cuarto días después de la inoculación para determinar los cambios histopatológicos y la respuesta inmune en lo relacionado con la producción de IgM e IgG.

En la segunda etapa del estudio, para establecer los efectos de la tetraciclina y de las drogas antiinflamatorias vs. la fertilidad y la respuesta inmune, después de infectar a los ratones, se empezaron a sacrificar de 1 a 3 de cada grupo entre el séptimo y décimo días después de la inoculación, para confirmar por histopatología la inflamación aguda y para reaislar los microorganismos del oviducto y del útero con la finalidad de observar el mecanismo de reso-

lución de las infecciones.

Fertilidad. Las hembras restantes se aparearon (5 hembras por 1 macho) durante los días 42 hasta el 50 después de la inoculación. Hacia el día 54 los animales se sacrificaron y se hizo un examen postmortem con la finalidad de observar daños macroscópicos y microscópicos.

Serología. Las muestras de suero de los animales inoculados se probaron para IgG e IgM con la técnica de microinmunofluorescencia (micro-f) de Wang y Grayston²⁶, mediante un antígeno de MoPn crecido en saco vitelino de huevos embrionados y un conjugado con inmunoglobulinas antirratón marcadas con fluoresceína (Cappel Laboratories Inc. Cochranville, PA).

Histología y microbiología. Para el examen microscópico de las secciones de oviducto y rama uterina se usó la coloración de hematoxilina eosina, previa fijación de los tejidos en una solución de formol al 10%. Un miembro del Departamento de Patología, Universidad de California, USA, determinó la inflamación, por medio de un modelo ciego, pues revisó varios cortes (3 a 6) de cada muestra, con aumentos microscópicos bajo y alto. La inflamación se definió por la presencia de células inflamatorias en las capas epiteliales y subepiteliales del oviducto. El grado de inflamación severa se dio al encontrar que las células inflamatorias llenaban el lumen del oviducto y que había infiltrado en las capas subepiteliales.

La inflamación moderada se determinó por la presencia de células inflamatorias en el lumen del oviducto pero sin llenarlo y cuando por lo menos algunas células inflamatorias infiltraban las capas subepiteliales. La inflamación mínima se describió como la presencia de células inflamatorias limitadas al lumen del oviducto y a la capa superficial del epitelio. Las muestras

de oviducto y rama uterina se maceraron e inocularon en monocapa de células McCoy, según la técnica de Ripa y Mardh²⁷ con el método de viales, pase ciego y coloración con yodo.

Agentes antimicrobianos. Los animales del grupo de tratados con tetraciclina se alimentaron con clorhidrato de tetraciclina que se impregnó en el alimento (Laboratorios Simonson, Gilroy, California). Los análisis previos indican que este tipo de presentación contiene 0.95 ± 0.06 mg de tetraciclina por gramo. El consumo promedio diario de tetraciclina fue 7.8 mg por ratón. Los ratones se trataron durante 14 días; un primer grupo empezó en el segundo día luego de la inoculación y un segundo grupo en el día quinto.

Agentes antiinflamatorios. A los animales que se trataron con agentes antiinflamatorios se les dio una de las siguientes preparaciones: ibuprofén obtenido como ibuprofenato sódico (Upjohn, Kalamazoo, MI). La dosis se calculó con base en la máxima recomendada para seres humanos en mg por kg de peso. La solución de trabajo se diluyó en el agua que bebían los ratones para conseguir una concentración final de 1.2 mg/dl. Como resultado se obtuvo un consumo promedio de 1.68 mg por ratón/día (56 mg/kg/día). Las concentraciones más altas de ibuprofén condujeron a una disminución en el consumo y bajos niveles en el suero. El nivel promedio de ibuprofén en el suero a las 48 horas fue 11.7 ng/ml y en el día sexto fue 3.4 ng/ml. El ibuprofén se administró desde el día 2 hasta el 16 después de la inoculación.

La 15(s)-15 metil prostaglandina (PGE₁) se obtuvo de la Compañía Upjohn en forma cristalina. La solución de trabajo de 1 mg/ml, disuelta en etanol y PBS 1:10, se preparó antes de cada experimento. Las dosis óptimas se escogieron con

base en los informes existentes sobre supresión de inflamación aguda y crónica en ratas^{28,29}. Esta dosis sin embargo, no la toleraron los ratones suizos, lo que repercutió en una alteración en la ingestión de alimento y agua. Para eliminar esta reacción, el antiinflamatorio se administró por vía subcutánea, con 50 µg, día de por medio, en ocho inyecciones que empezaron el día dos después de la inoculación. Esto dio como resultado un aumento en los hábitos alimenticios, lo que repercutió en el consumo de la tetraciclina que impregnaba el alimento.

La hidrocortisona se obtuvo comercialmente de Merck Sharp & Dohme, Westpoint, PA, en concentración de 50 mg. La dosis más alta tolerable se determinó al inocular diariamente un número determinado de mg/kg de peso con base en la dosis recomendada para seres humanos. Esta dosis se redujo de manera paulatina hasta observar una ingestión normal de alimento y agua. La dosis óptima fueron 5 mg intraperitoneales, día de por medio en ocho inyecciones que comenzaron el día dos después de la inoculación.

Anticuerpos monoclonales. Los ratones del grupo L3T4 recibieron tres inyecciones de anticuerpo monoclonal anti L3T4, mediante el siguiente esquema: 0.4 mg el día antes de la inoculación y otros 0.2 mg los días séptimo y catorce después de la inoculación. De la misma manera a los controles se les dieron volúmenes equivalentes de solución salina fisiológica normal.

Análisis de linfocitos. Los linfocitos de sangre periférica en tres hembras de cada grupo se analizaron los días dos y veinte después de la inoculación por la técnica fluorescente de células activadas (*fluorescence activated cell sorting*, FACS). Las células se tiñeron

mediante la técnica del doble anticuerpo con L3T4 (equivalente en el ratón a los CD4 humanos), Lyt2 (equivalente en el ratón al CD8 humano), o Thy 1,2 (una célula antigénica T), como un primer anticuerpo y una antiinmunoglobulina de rata preparada en cabra, que se marcó con isotiocianato de fluoresceína como un segundo anticuerpo²⁰.

Análisis estadístico. Las tasas de embarazo y salpingitis entre los grupos tratados se compararon por la prueba de Chi cuadrado (χ^2) o la prueba exacta de Fisher. Para el promedio geométrico de los títulos de anticuerpos la comparación se hizo con la prueba 't' de Student.

RESULTADOS

Las hembras infectadas mostraron inflamación aguda desde el día séptimo hasta el catorce después de la inoculación. Significativamente se aislaron más organismos del oviducto hacia el séptimo día (33,000 UFI) frente a 386 UFI obtenidas del útero. Luego, la proporción de animales positivos disminuyó; hacia el día catorce después de la inoculación sólo 50% de las hembras estaban infectadas en el oviducto y ningún microorganismo se recuperó del útero. En el día catorce, casi todos los animales mostraron un infiltrado mixto de reacción inflamatoria aguda y crónica, que cerraba por completo el lumen del oviducto en algunas secciones. Se observó además exudado inflamatorio y tejido necrótico acumulado en el espacio periovárico entre el ostium del oviducto y el ovario. Entre los días 25 y 30 después de la inoculación, la reacción inflamatoria había disminuido y se observó hidrosálpinx aproximadamente en la mitad de los animales. La inoculación en la rama uterina también produjo hidrosálpinx agudo, pero la

respuesta histopatológica fue menor que la observada cuando se inoculó por vía intrabursal. En el presente estudio sólo se encontraron anticuerpos en el día catorce después de la inoculación. El título promedio aritmético de los animales examinados en el día catorce fue 1:180 para IgM y 1:896 para IgG. La búsqueda de anticuerpos en el séptimo día después de la inoculación fue negativa en todos los animales.

Los controles no infectados (n = 12), no presentaron cambios inflamatorios en los días séptimo y catorce después de la inoculación. Tampoco hubo evidencia de anticuerpos contra *C. trachomatis*.

En la segunda etapa del estudio se probó la efectividad del antibiótico y de los agentes antiinflamatorios para impedir la infertilidad; se usaron 143 ratones divididos en cinco grupos:

Grupo 1. Ratones no infectados, como control de fertilidad, n = 20.

Grupo 2. Ratones infectados, sin tratamiento (grupo control de infertilidad inducida), n = 50.

Grupo 3. Ratones infectados y tratados con tetraciclina: días 2 a 16, n = 25; días 5 a 19, n = 16.

Grupo 4. Infectados y tratados sólo con ibuprofén; días 2 a 16, n = 9.

Grupo 5. Ratones infectados y tratados con tetraciclina más ibuprofén; días 2 a 16, n = 23.

Estos resultados se resumen en el Cuadro 1.

Los animales del grupo control no infectados (n = 20), no demostraron cambios entre los días séptimo a décimo después de la inoculación. La tasa de embarazo normal bilateral fue 75% y no hubo evidencia serológica de infección por *C. trachomatis*.

En el grupo de los infectados no tratados (n = 50), se observó inflamación aguda entre los días séptimo a décimo después de la

Cuadro 1
Comparación Entre los Cinco Grupos de Ratones del Grado de Inflamación, Presencia de Hidrosálpinx, Tasa de Embarazo Normal, Títulos de IgG e IgM

Grupo	Inflamación aguda Días 7-10	% hidrosálpinx Días 5-54	# embarazos normales bilaterales	Serología días 50-58 IgM *	IgG*
No infectados (n = 20)	Ninguna	0	15(75) ^{1,2}	0	0
Infectados no tratados (n = 25)	Severa	26 (52) ³	3 (6) ^{1,4}	2.0	1448 ^{5,6}
Tetraciclina días 2-16 (n = 25)	Mínima	0	19 (76)	0	430 ⁵
Tetraciclina días 5-19 (n = 16)	Moderada	0	8 (50) ^{2,4}	0	776 ³
Ibuprofén solo días 2-16 (n = 9)	Severa	2 (22) ²	1 (11)	2.7	1248
Tetraciclina e ibuprofén días 2-16 (n = 23)	Ninguna	0	20 (87)	1.5	223 ⁶

* Serología informada como promedio geométrico de los títulos de anticuerpos.

¹ p < 0.001 ² p < 0.01 ³ p = 0.1 ⁴ p < 0.01 ⁵ p < 0.01 ⁶ p < 0.01
 Análisis estadístico χ^2 para embarazadas y salpingitis (Fisher) X_G Acs por "t"

inoculación, lo mismo que una marcada reducción en la tasa de embarazo bilateral normal que llegó a 6% (p < 0.001). Casi todos estos animales tenían embarazos unilaterales localizados en la rama uterina no infectada. El promedio geométrico de los títulos de anticuerpos en los examinados entre los días séptimo a décimo fue 1:101 para IgM y 1:4,096 para IgG. Estos promedios hacia los días 50 y 54 en los 50 ratones sacrificados para medir la fertilidad fueron 1:2 para IgM y 1:1,448 para IgG.

Los animales tratados sólo con tetraciclina entre los días 2 a 16 después de la inoculación (n = 25), no difirieron significativamente de los controles no infectados con respecto a la fertilidad o a la presencia de hidrosálpinx. Hubo signos inflamatorios mínimos hacia el día séptimo después de la inoculación, observados en secciones histológicas como manchones de polimorfonucleares neutrófilos en el lumen del oviducto.

El grupo que recibió tetraciclina desde los días 5 al 19 (n = 16), mostró un moderado grado de inflamación

con algunas áreas infiltradas por células plasmáticas en el epitelio de la tuba uterina. Se observaron además, polimorfonucleares neutrófilos a través del lumen del oviducto. La tasa de embarazo bilateral fue significativamente más baja que en el grupo control de animales no infectados (p < 0.01) y significativamente mayor que en el grupo de infectados no tratados (p < 0.01). El promedio geométrico de títulos para IgG en los días 50 a 54 después de la inoculación, fue significativamente menor en ambos grupos tratados con tetraciclina, frente a los infectados que no se trataron (p < 0.05).

El grupo que recibió tetraciclina combinada con ibuprofén en los días 2 hasta el 16 después de la inoculación (n = 23), no tuvo signos de inflamación en el día séptimo. Además, este grupo no fue significativamente distinto de los controles no infectados o tratados con tetraciclina sola en los días 2 a 16 en relación con la fertilidad y la presencia de hidrosálpinx. Este grupo sin embargo, tuvo un promedio más bajo de títulos de IgG,

que fue de manera significativa más diferente que en el grupo control de infectados sin tratamiento (p < 0.01).

Por último, el ibuprofén solo (n = 9) en los días 2 a 16 después de la inoculación, no difirió significativamente en ningún aspecto de lo observado en las hembras infectadas y sin drogas, aunque hubo una ligera reducción en la presencia de hidrosálpinx (52% a 22%; p = 0.1).

Los efectos de PGE₁ y de hidrocortisona para reducir la inflamación y en la infertilidad subsecuente, se resumen en el Cuadro 2.

No hubo diferencia significativa en la inflamación que se observó hacia los días 7 a 10 después de la inoculación o en la tasa de embarazo bilateral. La tasa de presencia de hidrosálpinx fue menor en el grupo tratado con PGE₁, pero no alcanzó significancia estadística (p = 0.06). El promedio geométrico de títulos de IgG fue menor en ambos grupos, los tratados con PGE₁ y con hidrocortisona al compararlos con los controles no tratados, pero estas diferencias tampoco alcanzaron significancia estadística.

En las hembras que recibieron anti L3T4 se observó, hacia el día segundo después de la inoculación, un agotamiento total de la población linfocitaria L3T4 que persistió por lo menos hasta el día 20. El agotamiento de L3T4 no alteró significativamente los porcentajes de células expresadas por Thy 1,2 (células de antígeno T) o LyT2 (célula de antígeno T supresor/citotóxico, equivalente a los CD8 en seres humanos).

Los animales tratados con anticuerpo monoclonal L3T4 antes de la infección se compararon con los infectados sin tratamiento.

El grupo control incluyó controles de fertilidad (ratones sin cirugía), controles de infección (inoculados con medio de cultivo) y

Cuadro 2
Comparación del Grupo de Inflamación, Presencia de Hidrosálpinx, Tasa de Embarazo Normal, y la Respuesta Anticuerpos IgG e IgM de las Hembras Tratadas con Hidrocortisona y sus Controles

Grupo	Inflamación aguda Días 7-10	% hidrosálpinx Días 5-54	# embarazos normales bilaterales	Serología días 50-58 IgM*	IgG*
Sin infección (n = 10)	Ninguna	0	7 (70)	0	0
Infectados sin drogas (n = 26)	Severa	19 (73) ¹	0	5.3	2165
Infectados tratados con PGE ₁ (n = 25)	Severa	12 (48) ¹	1 (4)	1.3	1253
Infectados tratados con hidrocortisona (n = 27)	Severa	17 (63)	2 (7)	1.6	1351

* Serología informada como promedio geométrico de los títulos de anticuerpos.¹ p = 0.06
 Análisis estadístico χ^2 para embarazadas y salpingitis (Fisher) X_G Acs por "t"

Cuadro 3
Efecto del Tratamiento del L3T4

Inoculación	Grupo Tto	Inflamación aguda día 7	Aislamiento de Chlamydia UFI/oviducto día 7	# hembras con hidrosálpinx día 54 grupo %	# hembras con embarazo normal bilateral en grupo %/#	IgG día 54
Ninguno	Ninguno	No	Ninguno	0/15	11/15 ¹ (73)	0
Medio de cultivo	Ninguno	No	Ninguno	0/10	9/10 (90)	0
Medio de cultivo	L3T4	No	Ninguno	0/6	4/6 ² (67)	0
MoPn	Ninguno	Sí	8078 ³	8/16 (50) ⁴	2/16 ¹ (13)	776
MoPn	L3T4	Sí	13848 ³	27/31 (87) ⁴	2/31 ⁵ (6)	2030

¹ p < 0.0001 ² p < 0.005 ³ p < 0.05 ⁴ p < 0.01
 Análisis estadístico χ^2 para embarazadas y salpingitis (Fisher) X_G Acs por "t".

controles de L3T4 (tratados con anti L3T4, pero solamente inoculados con medio). Un resumen de los resultados aparece en el Cuadro 3.

La inflamación aguda a los 7 días después de la infección fue indistinguible en los grupos de hembras infectadas en lo que respecta al tratamiento con L3T4. Significativamente más organismos se recuperaron del oviducto en el día 7 (p < 0.05), en el grupo de las que recibieron anti-L3T4 frente a las no tratadas (promedio de 13,848 UFI vs. 8,078 UFI). Después del apareamiento (día 50), cuando se calcularon los resultados de la fertilidad, no se pudo aislar ningún microorganismo de los oviductos. El

examen histológico de los oviductos reveló una morfología normal con una completa resolución de la inflamación aguda, lo que se demostró por las observaciones al microscopio de luz, excepto por la distensión del lumen tubárico y el aplanamiento del epitelio tubárico en las hembras en las que había hidrosálpinx.

No hubo diferencia significativa en la tasa de embarazo normal bilateral en ninguna de las hembras del grupo control (sin infección) que se siguieron al apareamiento hacia los días 41 hasta 50 después de la inoculación. La tasa de embarazo normal bilateral en las infectadas sin tratamiento fue 13% (2/16),

significativamente más baja que en el grupo de control de infección (p < 0.0001). La tasa de formación de hidrosálpinx hacia el día 54 fue 50% (8/16), y el promedio geométrico de los títulos de IgG fue 776. La tasa de embarazo normal bilateral en las hembras infectadas pretratadas con L3T4 fue 6% (2/31). Esto fue muy diferente de la tasa en hembras no infectadas que recibieron L3T4 (p < 0.005). Los animales infectados y tratados con L3T4 tuvieron una tasa normal de embarazo más baja que la de los controles infectados no tratados (6% vs. 13%). La diferencia no alcanzó significancia estadística.

Sin embargo, la tasa de formación de hidrosálpinx (87%) en el grupo de hembras infectadas y tratadas con L3T4, fue significativamente mayor que en las del grupo de infectadas sin tratamiento (50%, p < 0.01). Luego se encontró que el promedio geométrico de los títulos de IgG anticlamidial en el día 54 después de la inoculación, fue significativamente más alto en el grupo infectado y pretratado con L3T4 que en el grupo de hembras infectadas no tratadas (2,030 vs. 776).

DISCUSIÓN

Se han obtenido modelos experimentales de salpingitis al inocular la serovariedad MoPn de **C. trachomatis** directamente en el tracto superior reproductivo de ratones hembras. Se inocularon 30 μ l (6 x 10⁴) UFI de **C. trachomatis** MoPn en la rama uterina izquierda de las hembras y otros 30 μ l (6 x 10⁴) en la bursa del ovario izquierdo. Se escogió esta concentración debido a que en los últimos trabajos en el laboratorio de **Chlamydia** se ha visto que es un buen inóculo que permite reproducir la enfermedad. Además, hay estudios⁸ conducentes a establecer la infertilidad en hembras inoculadas con concentraciones en

serie de MoPn de *C. trachomatis* que oscilaban entre 10^1 y 10^7 UFI/ratón. Se usó la cepa Balb/c de ratones hembras con seis a siete semanas de edad; la bursa del ovario izquierdo fue la vía de inoculación. Después de varias semanas de experimentos, mientras se realizaban estudios de protección, se encontró que 10^5 UFI de MoPn era la mejor concentración para infectar estas hembras.

En el presente estudio un número significativamente mayor de organismos se aislaron del oviducto en el día siete después de la infección, si se compara con lo obtenido de la rama uterina (33,000 UFI vs. 386 UFI). En otra parte de este estudio también se aisló del oviducto un número más bajo (8,078 UFI), pero siempre más alto que el número de microorganismos obtenidos de la rama uterina.

En este y en otros estudios se ha encontrado que el número de animales positivos declina paulatinamente a través del tiempo, al punto que hacia el día 14 después de la inoculación, sólo 50% de los animales estaban infectados en el oviducto, mientras que no fue posible recuperar ningún microorganismo de la rama uterina. Pal *et al.*^{8,32}, en sus estudios utilizaron la muestra vaginal tomada con escobillón para el aislamiento de *C. trachomatis*, y obtuvieron cultivos positivos en los días 3 y 7 después de la inoculación con un pico máximo entre los días 10 y 16; los ratones cesaron de excretar microorganismos entre los días 20 y 28 después de la inoculación. En otro estudio³¹ se aisló *C. trachomatis* de la vagina de todos los animales infectados en el quinto día después de la inoculación. Luego, el porcentaje de hembras positivas declinó, pero se obtuvieron algunos cultivos positivos hacia la cuarta semana después de la inoculación.

Estos hallazgos pueden ser la consecuencia de haber inoculado en el canal vaginal los microorganismos en concentraciones de 9×10^5 UFI de *C. trachomatis*, 9 veces por encima de las cantidades que se usaron en otros experimentos.

La extensión del daño de la arquitectura del oviducto después de la salpingitis clamidial es difícil de explicar solamente con base en la citotoxicidad para la célula y la multiplicación de los microorganismos. En las hembras infectadas el examen microscópico entre 3 y 7 días después de la inoculación, mostró un significativo infiltrado inflamatorio agudo que ocupaba todas las capas del oviducto y la rama uterina. En otro estudio³², los autores encontraron áreas con un notorio infiltrado inflamatorio agudo con necrosis y formación de abscesos hacia el día 11 después de la inoculación. Estos resultados son semejantes a los obtenidos en el presente trabajo.

Hacia el día 14 casi todas las hembras mostraban un infiltrado mixto agudo y crónico que ocluyó por completo el lumen del oviducto en algunas secciones. Estos hallazgos confirman otro estudio³¹ donde se observó que entre los días 9 y 16 había infiltrado inflamatorio agudo consistente sobre todo de polimorfonucleares. Se pudo apreciar que estas células saturaban la pared del útero en todas las hembras. Los mismos autores³¹ también encontraron todas las capas del oviducto, incluida la superficie serosa, infiltradas por una fuerte reacción inflamatoria aguda. En el presente trabajo se vieron exudados inflamatorios y detritus necróticos acumulados en el espacio periovárico entre el ostium del oviducto y el ovario.

Hacia los días 25 y 30 después de la infección, las reacciones inflamatorias habían disminuido y

la presencia de hidrosálpinx se notó en casi la mitad de los animales. Sin embargo, en un estudio³¹ donde se compararon tres cepas de ratones, se observó que no hubo hidrosálpinx en cuatro Balb/c que se sacrificaron en los días 37 a 49 después de la inoculación, lo que hace pensar que esta cepa murina puede ofrecer cierto grado de resistencia a la infección. En ese estudio el examen histológico de las hembras con hidrosálpinx mostró una marcada dilatación del lumen del oviducto con aplanamiento de la fimbria y atrofia de la capa mucosa³¹.

Se sabe que después de 80 días⁸ la reacción inflamatoria aguda se reemplaza de modo progresivo por un infiltrado inflamatorio crónico, que consiste principalmente de linfocitos y células plasmáticas. Los ratones controles no mostraron ninguna evidencia macroscópica ni microscópica de anomalías a través de todo el experimento.

En el presente estudio, el promedio de los títulos de IgM, 1:180, y de IgG, 1:896 apareció en el día 14 después de la inoculación. En el día 14 algunos animales mostraban títulos de 1:256 para IgM y de 1:1,024 para IgG, pero no se descubrieron anticuerpos en el día 7 después de la inoculación. Pero, Pal *et al.*⁸ encontraron anticuerpos tipo IgM con título de 1:320 en el quinto día después de la inoculación, mas sus hallazgos están de acuerdo con los del presente trabajo en el sentido que sólo encontraron IgG en un título bajo de 1:80 en la segunda semana después de la inoculación. En el presente estudio los títulos más altos a los 14 días fueron 1:1,024 para IgG y 1:256 para IgM, debido a que en el procedimiento para demostrar este último tipo de anticuerpo sólo se hacen 6 diluciones²⁶. Por otro lado en este laboratorio sólo se inyectaron 6×10^4 UFI de MoPn, mientras que Pal *et al.*⁸ usaban

concentraciones mayores.

Se han establecido varios modelos animales^{30,33,34} en el intento de obtener una mejor comprensión de los mecanismos en la patogénesis de la infección por **Chlamydia**, cuyo objetivo a largo plazo es el desarrollo de estrategias terapéuticas y preventivas. Barron *et al.*^{35,36} inocularon primero MoPn de **C. trachomatis** en la vagina de ratones Swiss-Webster y describieron cómo progresaba una infección que duró tres semanas y generó una fuerte respuesta inmune de tipo humoral y también mediada por células. Ramsey *et al.*^{37,38} hicieron tipos similares de experimentos al infectar hembras de ratones Balb/c intravaginalmente con MoPn de **C. trachomatis**. Ito *et al.*³⁹ inocularon hembras Cf-1, también intravaginalmente con **C. trachomatis** serovariedad h y mostraron que cuando la infección tenía lugar durante el estro, aproximadamente 50% de los animales desarrollaban una infección del cérvix, mientras que la tasa de infección cayó significativamente cuando las inoculaciones se hacían en otros estadios del ciclo de fertilidad. Como no se determinaron análisis de la histopatología del tracto genital superior en estos tres modelos de trabajos, ni tampoco se presentaron datos del estado de la fertilidad de los animales después de la infección, estos estudios sólo se pueden considerar como modelos de cervicitis³³.

Swenson y Schachter²² y Swenson *et al.*²¹, infectaron ratones blancos Swiss-Webster con MoPn de **C. trachomatis** directamente en el tracto genital superior y mostraron que estos animales desarrollaban salpingitis e infertilidad unilateral o bilateral en un número significativo de casos. Tuffrey *et al.*^{23,40,41} también demostraron que la infertilidad se podía producir en todo

tipo de cepas de ratones con un pretratamiento con progesterona, seguido de una infección con serovariedades humanas de **C. trachomatis**, directamente en el tracto genital superior. Estos dos modelos han sido extremadamente valiosos para caracterizar algunos de los mecanismos patogénicos comprometidos en la infertilidad clamidial. En este trabajo se utilizó el mismo modelo animal²²; sin embargo, algunos investigadores³¹ dicen que la inoculación en la bursa del ovario o en la rama uterina no tiene paralelo con la infección natural humana ascendente debido a que el inóculo se aplica de modo directo en el tracto genital superior. Además, este procedimiento requiere cirugía abdominal que puede resultar en una alteración de los mecanismos de defensa del huésped y en un daño tubárico. Entonces, aconsejan la inoculación intravaginal de ratones con MoPn de **C. trachomatis**. Prefieren este modelo debido a que se parece más a la ruta natural ascendente de la infección y no necesita cirugía ni pretratamiento con hormonas.

En la segunda etapa de este estudio se pudo comparar el efecto del antibiótico y los agentes antiinflamatorios, vs. la inflamación, salpingitis e infertilidad. Se sabe que el manejo con tetraciclina en el momento de la infección previene la inflamación aguda y la subsecuente infertilidad²⁵. Sin embargo, el tratamiento que empezó hacia el día 7 después de la infección, exactamente en el pico de la inflamación aguda, resultó en una subsecuente infertilidad equivalente a no haber hecho ningún tratamiento. En este estudio hubo 52% de hidrosálpinx entre los días 50 y 54 después de la inoculación y 6% de embarazos normales bilaterales en el grupo de hembras infectadas que no se trataron.

Pal *et al.*⁸ encontraron 10% de embarazos normales bilaterales, también en el grupo de hembras infectadas sin tratar. En los controles del presente estudio hubo 75% de embarazos bilaterales, mientras que en el grupo control de Pal *et al.*⁸, los embarazos normales bilaterales llegaron hasta 80%.

Pal *et al.*⁸ inocularon varias concentraciones bacterianas y encontraron 11% de embarazos normales bilaterales con una concentración de 10⁷ UFI de MoPn; por esta razón, decidieron que el mejor inóculo era de 10⁵ UFI. En el presente estudio se usó una concentración de 6 x 10⁴ UFI de MoPn para infectar los animales. Según De la Maza *et al.*³¹ las hembras Balb/c apareadas a las 6 semanas después de la inoculación con MoPn tuvieron una disminución significativa en la tasa de fertilidad de 40% si se compara con el grupo control cuya tasa de fertilidad llegó a 100%.

Pal *et al.*³² en otro estudio en dos experimentos separados, con un total de 14 hembras en el grupo experimental y 11 en el grupo control, que se aparearon 7 semanas después de la infección inicial, encontraron que en el grupo experimental 10 de 14 (71.4%), tuvieron infertilidad unilateral o bilateral, mientras que en el grupo control sólo 3 de 11 (27.4%) fueron infértiles ($p < 0.05$).

Aunque hay diferentes hallazgos, se sabe que la infección natural y experimental puede ser auto-limitada y que bajo ciertas circunstancias la enfermedad conduce a secuelas crónicas, por ejemplo infertilidad.

En este estudio se definió adicionalmente la ventana de oportunidad como el tratamiento con tetraciclina que puede prevenir la infertilidad, después la salpingitis. Si el tratamiento comenzó en el día dos después de la inoculación, se

previnieron la mayoría de la inflamación y la subsecuente infertilidad. Cuando el tratamiento se inició en el quinto día después de la inoculación no se obtuvo una total prevención y aunque hubo inflamación, ésta fue menos severa, los títulos de anticuerpos subieron pero ligeramente, no hubo hidrosálpinx y se redujo la tasa de infertilidad. Se hizo otro estudio⁴² con azitromicín para prevenir la salpingitis clamidial en hembras inoculadas en la bursa del ovario con la serovariedad humana E de *C. trachomatis* y tratadas variadamente desde una semana antes de la inoculación hasta una semana después, con una dosis única oral del antibiótico. En la autopsia se observó, que todos los 27 controles que no recibieron azitromicín tenían evidencia histológica de salpingitis. La salpingitis se previno en todas las 38 hembras a las que se les dieron dosis iguales o mayores de 60 mg/kg de azitromicín el mismo día que en se hizo la inoculación con *Chlamydia*. La inflamación se vio sólo en 35% de los animales tratados con 60 a 80 mg/kg de la droga desde el segundo día hasta el día 10 después de la inoculación y fue menos severa que en las hembras no tratadas. Si esta dosis se daba más tarde no era efectiva para prevenir la enfermedad. Dosis de 200 a 240 mg y de 100 a 180 mg/kg una semana antes de la inoculación redujeron la cifra de hembras con salpingitis a 33% y 77%, respectivamente, mientras que con dosis de 60 a 80 mg no ocurrió ninguna reducción, aunque las lesiones fueron menos graves. La *Chlamydia* no se recuperó de ninguna parte del tracto genital cuando se dieron dosis mayores o iguales a 60 mg/kg de droga el día de la inoculación y se demostró raramente cuando la droga se dio una semana antes ó 12 días después de la inoculación.

Rumpianesi *et al.*⁴³ también encontraron que el azitromicín inhibió 40 cepas de *C. trachomatis* a concentraciones iguales o más bajas de 0.5 µg/ml. En este mismo trabajo, la eritromicina y el noxitromicín presentaron actividades comparables, mientras que la minociclina fue ligeramente más activa que los macrólidos contra *C. trachomatis* (MIC ≤ a 0.025 mcg/ml).

Kimura *et al.*⁴⁴, probaron la actividad *in vitro* de tres drogas recientes del grupo de las quinolonas: esparfloxacin, tosufloxacin, POC-17116. Estos tres agentes mostraron potente actividad *in vitro* contra *C. psittaci*, *C. trachomatis* y *C. pneumoniae*, presentando MICs que oscilaron entre 0.031 µg/ml hasta 0.125 µg/ml. Estos valores fueron más altos que los obtenidos para minociclina (0.0075 µg/ml a 0.015 µg/ml), pero más bajos que los encontrados para eritromicina (0.25 µg/ml a 0.5 µg/ml) y ofloxacin y ciprofloxacina (0.5 µg/ml a 1.0 µg/ml). Los ratones se inocularon con 10⁵UFI de *C. psittaci* por instilación nasal.

Todos los animales de un grupo control no tratado murieron en 7 días. La tasa de supervivencia de los que se trataron con 40 mg de esparfloxacin, OPC-17116 y tosufloxacin por kg de peso corporal cada 12 horas durante 7 días fue 73%, 73% y 60% respectivamente, 7 días después de la inoculación. En ese estudio se concluyó que las tres nuevas quinolonas podrían ser útiles en el manejo de las infecciones respiratorias causadas por *Chlamydia*.

Por otro lado, Ridgway⁴⁵, comenta que la quimioterapia para la infección no gonocócica del tracto genital es complicada y que el principal germen que se encuentra es indudablemente *C. trachomatis*. En contraste con *Neisseria gonorrhoeae*, esta bacteria no es

susceptible a una simple dosis de quinolona. Mientras que la tasa de curación para la infección gonocócica se espera que sea de 95% después de una dosis única de antibiótico, clínicamente sólo se encuentran tasas de curación de 80% después de la terapia para infección gonocócica a pesar de la erradicación de *C. trachomatis* cuando se ha descubierto. Los compuestos de desarrollo más reciente son muy activos *in vitro*, pero todavía no se han informado ensayos clínicos. Las quinolonas recientes tienen MICs que oscilan entre 0.031 µg/ml a 0.125 µg/ml. Varios ejemplos son: clinafloxacina, esparfloxacin, tosufloxacin, OPC-17116, difloxacina y temafloxacina.

Debido a que las secuelas de la salpingitis, como la infertilidad, se pueden reducir de modo considerable con el tratamiento temprano, es importante identificar y tratar a la mujer con salpingitis clamidial lo más pronto posible, pues se aumenta significativamente su pronóstico de fertilidad. Sin embargo, no es claro todavía qué tan temprano se debe hacer el tratamiento, porque en las hembras de ratones se ha encontrado hacia los dos días después de la inoculación; este concepto no necesariamente se puede aplicar a la condición humana. Es claro que la ventana de oportunidad para el tratamiento exitoso, que incluye prevenir la infertilidad, es un tiempo muy corto. De hecho se puede pensar que es imposible identificar y tratar a la mayoría de las mujeres suficientemente temprano como para ejercer un grado aceptable de éxito en prevenir las secuelas que aparecen a largo plazo por la salpingitis clamidial.

Se sabe que la respuesta inflamatoria mediada por varias citocinas y otros productos celulares contribuye significativamente al

daño de la arquitectura del oviducto lo que ocurre cuando la mujer ha estado expuesta a la **Chlamydia** en varias infecciones asintomáticas; por esta razón, en el presente estudio también se trató de reducir el daño del oviducto y modificar la respuesta inflamatoria. Se empezaron los tratamientos con una variedad de antiinflamatorios con la esperanza de impedir algunos de los daños mediados por la respuesta inflamatoria.

Se utilizó ibuprofén, un antiinflamatorio no esteroideo ampliamente conocido. Se hizo el tratamiento con este agente combinado con tetraciclina y también solo, y se encontró que no tuvo ningún efecto para resolver la infección más allá del que se obtuvo con tetraciclina sola.

Se ha informado la prostaglandina E_1 como un agente que inhibe en forma dramática la respuesta inflamatoria, lo mismo que la hidrocortisona, un esteroideo bien conocido, y que se usa para suprimir la respuesta inmune. Estos agentes en dosis óptimas fallaron para modificar el grado de inflamación o la subsecuente infertilidad después de la salpingitis clamidial. Hubo alguna reducción en la formación de hidrosálpinx y en la respuesta de inmunoglobulinas, pero las diferencias no alcanzaron significancia estadística ($p = 0.06$). Mientras que no se tenga certeza de la utilidad de estas drogas, se deben tener en cuenta para una consideración posterior; sin embargo, hay alguna evidencia experimental que sí menciona éxito con este tratamiento⁴⁶.

Hay un estudio⁴⁷ donde se informó la inhibición del crecimiento de **C. trachomatis**, por la vitamina C, en concentraciones de 120 mg/dl y 1,200 mg/dl; este ensayo se hizo *in vitro* y se observó además que el crecimiento

aumentaba a concentraciones de 0.2, 0.6 y 1.2 mg/dl, valores que coinciden con las concentraciones *in vivo* y que se catalogaron como deficientes, normales y aumentadas en el suero, respectivamente. También se observó que el efecto inhibitorio de la eritromicina contra **C. trachomatis** se reducía en presencia de vitamina C en las tres concentraciones probadas. Los resultados muestran que la vitamina C podría ser un importante nutriente para **C. trachomatis** y que su incorporación en los medios de cultivo podría aumentar el aislamiento y la propagación de **C. trachomatis** en cultivos celulares y que una concentración mayor de vitamina C podría tener un efecto benéfico como ayudante en la terapia con eritromicina.

El siguiente objetivo con este modelo fue recapitular con éxito la respuesta inflamatoria y la subsecuente infertilidad en salpingitis clamidial humana. Se usó este sistema para definir luego las subpoblaciones de linfocitos comprometidas en la respuesta inmune de la salpingitis clamidial murina, debido a que en algunos estudios^{48,49} se ha visto que contra esta infección hay una gran respuesta humoral, pero que la respuesta inmune mediada por células también juega un papel importante en la resolución de la infección genital por **Chlamydia** y además que esta resolución puede ocurrir independientemente de la respuesta de anticuerpos⁴⁸. También se sabe que en los ratones infectados es posible encontrar una respuesta inmune compleja. Pal *et al.*³² caracterizaron la respuesta inmune después de haber originado una infección intrauterina con MoPn de **C. trachomatis** y encontraron bandas inmunodominantes por medio de análisis de Western blot en el suero. Estas bandas

corresponden a pesos moleculares de 72, 60, 42 y 28 kda y al lipopolisacárido (LPS). Se encontraron además anticuerpos contra la proteína de choque térmico (HSP) de 60 kda y contra la proteína rica en cisteína de 60 kda a los 2 días y a las 3 semanas respectivamente, después de la inoculación. Satoh *et al.*⁵⁰, en el modelo animal, hicieron investigaciones conducentes a estudiar la respuesta inmune en el sitio de la infección con el método de tinción ABC y anticuerpos monoclonales dirigidos contra cada una de las células inmunocompetentes. Los niveles de IgA e IgG también se midieron. Estos fueron sus hallazgos:

1. En relación con la respuesta inmune en el sitio de la infección, hubo un infiltrado mayor de células T que de células B. La determinación de las subpoblaciones de células T reveló que las células CD8+ sobrepasaron a las CD4+. Adicionalmente se observó que entre las células B hubo un moderado infiltrado de IgA en ellas, mientras que la infiltración por IgM e IgG en las células positivas B fue más leve.

2. Los anticuerpos tipo IgA e IgG se demostraron hacia el día 7 después de la infección. La correspondencia de estos anticuerpos elementales de **C. trachomatis** se investigó por análisis de Western blot. Una banda reaccionó con MOMP (39.5 kda), mientras que una segunda banda reaccionó con la proteína 60 kda.

Los estudios inmunológicos han mejorado por los nuevos reactivos disponibles, como anticuerpos monoclonales contra las diferentes especies específicas de células inmunocompetentes. Los anticuerpos monoclonales antilinfocíticos han llegado a ser una herramienta invaluable para la investigación.

En el presente estudio uno de

tales anticuerpos se usó para deprimir selectivamente la subpoblación linfocítica ayudadora (L3T4), antes de la infección con *C. trachomatis*. Esto resultó en varias alteraciones en el curso de la salpingitis inducida experimentalmente. Mientras que la respuesta inflamatoria aguda pareció semejante, las hembras con agotamiento de células L3T4+ tuvieron títulos altos de IgG anticlamidial a más largo plazo y significativamente más presencia de hidrosálpinx. Los títulos altos de IgG implican una mayor exposición al antígeno clamidial, tal vez debido a una aclaración más lenta de la infección o a un aumento en la proliferación de los organismos. De hecho, el número promedio de organismos aislados fue significativamente más alto en el grupo de las hembras que se trataron para L3T4. El número mayor de organismos aislados se puede relacionar con la ausencia de linfocitos L3T4, que deben contribuir a la respuesta inmune y a resolver la infección. Es claro que la subpoblación de linfocitos participa de modo directo para resolver la infección genital por *C. trachomatis*⁴⁸ y que esta resolución ocurre independientemente de la respuesta de anticuerpos. Esto se demostró al tomar linfocitos T esplénicos de ratones que se habían inmunizado antes con MoPn y que se trataron con anticuerpos específicos y complemento para deprimir CD4+ o CD8+. Se encontró que la línea CD4, se deprimió en forma total con el tratamiento mientras que CD8 conservó una parte de su poder.

SUMMARY

Females white mice between 4 and 6 weeks old were inoculated with *Chlamydia trachomatis* mouse pneumonitis (MoPn) serovar to cause in them an experimental

salpingitis; 30 µl containing 6 x 10⁴ IFU (inclusions former units) were directly injected into the left side of the uterus. The same amount was also injected through the fat tissue into the ovary of the same side. Mice groups were killed between 7 and 14 days after the inoculation to look for inflammation, hydrosalpinx, IgG and IgM in them. Another female group infected was paired to see the normal bilateral infertility caused by the infection. A mice third group was treated with tetracycline, ibuprofen and prostaglandine E₁. This treatment was successful when it was started at the second day after the inoculation. It avoided the inflammation, the hydrosalpinx and the infertility. When antiinflammatory agents were used alone, didn't have any effect. A fourth group was treated with monoclonal antibodies sent to the L₃T₄ linfocitic populations (CD₄ in humans). This amount was minimal at the second day after the inoculation and this depletion remained until the 20 day and this depletion didn't after the amount of T cells Thy_{1.2} or Lyt₂ (cytotoxic/suppressor cells, CD₈). It is proposed, the frequent infection lead to arise a harmful immune response and the tissue may result damaged and this situation to lead to the infertility.

REFERENCIAS

1. Dawson CR, Jones BR, Tarizzo M. *Guide to trachoma control in programmes for the prevention of blindness*. World Health Organization, Geneva, 1982, 62 pp.
2. Morrison RP, Su H, Lyng K, Yuan Y. The *Chlamydia trachomatis* hyp operon is homologous to the groE stress response operon of *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1990; 58: 2701-05.
3. Schachter J. Overview of human diseases. In: Barron AL (ed.). *Microbiology of Chlamydia*. Boca Raton; CRC Press, Inc., 1989. Pp. 153-65.
4. Westrom L, Mardh PA. Chlamydial salpingitis. *Br J Med Bull* 1983; 39: 145-50.
5. Centers for Disease Control. Progress

toward achieving the 1990 objective for the nation for sexually transmitted diseases. *MMWR* 1990; 39: 53-7.

6. Westrom L. Effect of acute pelvic inflammatory disease on fertility. *Am J Obstet Gynecol* 1975; 121: 707-13.
7. Safrin S, Schachter J, Dahrouge D, Sweet RL. Longterm sequelae of acute pelvic inflammatory disease. A retrospective cohort study. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 166: 1300-05.
8. Pal S, Fielder TJ, Peterson EM, De la Maza LM. Protection against infertility in a BALB/c mouse salpingitis model by intranasal immunization with the mouse pneumonitis biovar of *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun* 1994; 62: 3354-62.
9. Brunham RC, Peeling R, Maclean I, Kosheim ML, Paraskevas M. *Chlamydia trachomatis* associated ectopic pregnancy; serologic and histologic correlates. *J Infect Dis* 1992; 165: 1076-81.
10. Brunham RC, Maclean IW, Binns B, Peeling RW. *Chlamydia trachomatis*: Its role in tubal infertility. *J Infect Dis* 1985; 152: 1275.
11. Gump DW, Gibson M, Ashiaga T. Evidence of prior pelvic inflammatory disease and its relationship to *Chlamydia trachomatis* antibody and intrauterine contraceptive device use in fertile women. *Am J Obstet Gynecol* 1983; 146: 153-59.
12. Jones RB, Ardery BR, Hui SL, Cleary RE. Correlation between serum antichlamydial antibodies and tubal factor as a cause of infertility. *Fertil Steril* 1982; 38: 553-58.
13. Punnonen R, Terho P, Nikkanen V, Meurman O. Chlamydial serology in infertile women by immunofluorescence. *Fertil Steril* 1979; 31: 656-59.
14. Puolakkainen M, Vesterinen E, Purola E, Saikku P, Paavonen J. Persistence of chlamydial antibodies after pelvic inflammatory disease. *J Clin Microbiol* 1986; 23: 924-28.
15. Brunham RC, Binns B, McDowell J, Paraskevas M. *Chlamydia trachomatis* infection in women with ectopic pregnancy. *Obst Gynecol* 1986; 67: 722-26.
16. Chow JM, Yonekura ML, Richwald GA, Greenland S, Sweet RL, Schachter J. The association between *Chlamydia trachomatis* and ectopic pregnancy. *JAMA* 1990; 263: 3164-67.
17. Svensson L, Mardh PA, Ahlgren M, Nordenskjold F. Ectopic pregnancy and antibodies to *Chlamydia trachomatis*. *Fertil Steril* 1985; 44: 313-17.
18. Soong YK, Lee PS, Kao CC, Lee CJ. Endocervical chlamydial deoxyribo-

- nucleic acid in infertile women. *Fertil Steril* 1990; 54: 815-18.
19. Williams DM, Grubbs BG, Schachter J, Magee DM. Gamma interferon levels during **Chlamydia trachomatis** pneumonia in mice. *Infect Immun* 1993; 61: 3556-58.
 20. Wofsy D, Seaman WE. Successful treatment of autoimmunity in NZB/NZW F1 mice with monoclonal antibody to L3T4. *J Exp Med* 1985; 161: 378-91.
 21. Swenson CE, Donegan E, Schachter J. **Chlamydia trachomatis** induced salpingitis in mice. *J Infect Dis* 1983; 148: 1101-07.
 22. Swenson CE, Schachter J. Infertility as a consequence of chlamydial infection of the upper genital tract in female mice. *Sex Transm Dis* 1984; 11: 64-7.
 23. Tuffrey M, Falder P, Gale J, Quinn R, Taylor-Robinson D. Infertility in mice infected genitally with a human strain of **Chlamydia trachomatis**. *J Reprod Fertil* 1986; 78: 251-60.
 24. Zana J, Muflat JM, Thomas D, Orfila J, Salat Baroux J, Pocidalo JJ. Roxithromycin treatment of mouse chlamydial salpingitis and prospective effect on fertility. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35: 430-35.
 25. Swenson CE, Sung ML, Schachter J. The effect of tetracycline treatment on chlamydial salpingitis and subsequent fertility in mouse. *Sex Transm Dis* 1986; 13: 40-4.
 26. Wang SP, Grayston JT. Immunologic relationship between genital TRIC, lymphogranuloma venereum and related organisms in a new microtiter indirect immunofluorescence test. *Am J Ophthalmol* 1970; 70: 367-74.
 27. Ripa KT, Mardh PA. New simplified culture technique for **Chlamydia trachomatis**. In Holmes KK, Hobson D, (eds.). *Nongonococcal urethritis and related infections*. American Society for Microbiology: Washington, 1977. Pp. 323-27.
 28. Kunkel SL, Ogawa H, Conran PB *et al*. Suppression of acute and chronic inflammation by orally administered prostaglandins. *Arthritis Rheum* 1981; 24: 1151-58.
 29. Kunkel SL, Thrall RS, Kunkel RG, McCormick JR. Suppression of immune complex vasculitis in rats by prostaglandin. *J Clin Invest* 1979; 64: 1525-29.
 30. Landers DV, Erlich K, Sung M, Schachter J. Role of L3T4 bearing T-cell populations in experimental murine chlamydial salpingitis. *Infect Immun* 1991; 59: 3774-77.
 31. De la Maza LM, Pal S, Khamesipour A, Peterson EM. Intravaginal inoculation of mice with the **Chlamydia trachomatis** mouse pneumonitis biovar results in infertility (Note). *Infect Immun* 1994; 62: 2094-97.
 32. Pal S, Fielder TJ, Peterson EM, De la Maza LM. Analysis of the immune response in mice following intrauterine infection with **Chlamydia trachomatis** mouse pneumonitis biovar. *Infect Immun* 1993; 61: 772-76.
 33. Patton DL. Animal models for the study of pelvic inflammatory disease. In: *Sexually transmitted diseases*. Quinn TC (ed.). New York; Raven Press Ltd. 1992. Pp. 85-111.
 34. Landers DV, Sung M, Botles K, Schachter J. Does addition of anti-inflammatory agents to antimicrobial therapy reduce infertility after murine chlamydial salpingitis? *Trans Dis* 1993; 20: 121-25.
 35. Barron AL, Rank RG, Moses EB. Immune response in mice infected in the genital tract with mouse pneumonitis agent (**Chlamydia trachomatis** biovar). *Infect Immun* 1984; 44: 82-5.
 36. Barron AL, White HJ, Rank RG, Soloff BL, Moses EB. A new animal model for the study of **Chlamydia trachomatis** genital infections: infection of mice with the gene of pneumonitis. *J Infect Dis* 1981; 143: 63-6.
 37. Ramsey KH, Newball WJ, Rank RG. Humoral immune response to chlamydial genital infection of mice with the agent of mouse pneumonitis. *Infect Immun* 1989; 57: 2441-46.
 38. Ramsey KH, Soderberg LSF, Rank RG. Resolution of chlamydial genital infection in B-cell deficient mice and immunity to reinfection. *Infect Immun* 1988; 56: 1320-25.
 39. Ito JI, Harrison HR, Alexander ER, Billings LJ. Establishment of genital tract infection in the CF-1 mouse by intravaginal inoculation of a human oculogenital isolate of **Chlamydia trachomatis**. *J Infect Dis* 1984; 150: 577-82.
 40. Tuffrey M, Alexander F, Woods C, Taylor-Robinson D. Genetic susceptibility to chlamydial salpingitis and subsequent infertility in mice. *J Rep Fertil* 1992; 95: 31-8.
 41. Tuffrey M, Taylor-Robinson D. Progesterone as a key factor in the development of a mouse model for genital-tract infection with **Chlamydia trachomatis**. *FEMS Microbiol Lett* 1981; 12: 111-15.
 42. Tuffrey M, Woods C, Taylor-Robinson D. The effect of a single oral dose of azithromycin on chlamydial salpingitis in mice. *J Antimicrob Chemother* 1991; 28: 741-46.
 43. Rumpianesi F, Morandotti G, Sperning R, Cevenini R. *In vitro* activity of azithromycin against **Chlamydia trachomatis**, **Ureaplasma urealyticum** and **Mycoplasma hominis** in comparison with erythromycin, roxithromycin and minocycline. *J Chemother* 1993; 5: 155-58.
 44. Kimura M, Kishimoto T, Niki Y, Soejima R. *In vitro* and *in vivo* antichlamydial activities of newly developed quinolone antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 801-03.
 45. Ridgway GL. Quinolones in sexually transmitted diseases. *Drugs* 1993; 45 (suppl 3): 134-38.
 46. Blanco JD, Patterson RM, Patterson RM, Ramzy J, Turner T. Clindamycin and ibuprofen effects on chlamydial salpingitis in mice. *Sex Transm Dis* 1989; 16: 192-94.
 47. Wang SW, Patton D, Kuo CC. Effects of ascorbic acid on **Chlamydia trachomatis** infection and on erythromycin treatment in primary cultures of human amniotic cells. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 2551-54.
 48. Ramsey KH, Rank R. Resolution of chlamydial genital infection with antigen-specific T- lymphocyte lines. *Infect Immun* 1991; 59: 925-31.
 49. Villeneuve A, Brossay L, Paradis G, Hebert J. Characterization of the humoral response induced by a synthetic peptide of the major outer membrane protein of **Chlamydia trachomatis** serovar B. *Infect Immun* 1994; 62: 3547-49.
 50. Satoh T, Kumamoto Y, Hisose T. Studies on immune response in mouse model of experimental **Chlamydia trachomatis** intrauterine infections. *J Japan Assoc Infect Dis* 1994; 68: 304-13.