



ISSN: 1561-3194

Rev. Ciencias Médicas. Abril 2007; 11(1):

ARTÍCULO ORIGINAL

Caracterización de células mononucleares en semen de hombres infértiles

Characterization of mononuclear cells in non- fertile men's sperm

William Quintero Pérez ¹, Lorenzo Mallea Sánchez ², Ihosvany Baños Hernández ³, Luis Alexis Peláez Yáñez ⁴, José Carlos Alcalde Pérez ⁵, Diana Inés Álvarez Macías ⁶.

¹ Dr. Especialista en Inmunología. Profesor de Agentes Biológicos. Facultad de Ciencias Médicas. Pinar del Río.

² Dr. Especialista en Inmunología. Profesor de Inmunología. Jefe del Departamento de Inmunología de la Reproducción en el Instituto Nacional de Endocrinología.

³ Dr. Especialista de I Grado en Urología. Hospital Abel Santamaría Cuadrado. Pinar del Río.

⁴ Dr. Especialista en Inmunología. Profesor de Agentes Biológicos. Facultad de Ciencias Médicas. Pinar del Río.

⁵ Licenciado en Microbiología. Profesor de Agentes Biológicos. Facultad de Ciencias Médicas. Pinar del Río.

⁶ Doctora en Medicina.

RESUMEN

Con el objetivo de describir las subpoblaciones de células mononucleares presentes en el semen de pacientes infértiles, se realizó un estudio descriptivo en 78 hombres miembros de parejas infértiles, con leucocitospermia, leucocitos peroxidasa-positivos en semen mayor o igual a 1×10^6 leucocitos/ml, que acudieron a la consulta del Instituto Nacional de Endocrinología (37) y a la del Hospital Abel Santamaría Cuadrado en Pinar del Río (41) entre 1999 y 2001. Se realizó un estudio con anticuerpos que reconocían distintas especificidades celulares, tales como macrófagos, células B, algunas células T activadas, todos los linfocitos T, células NK, linfocitos CD8+, y linfocitos CD4+. Los resultados fueron diferentes de otros estudios revisados, mostrando un predominio de células T y células presentadoras de antígenos. La presencia de ambos tipos celulares indicó la posibilidad de establecer una reacción inflamatoria con liberación de citoquinas dañinas para los parámetros del espermograma y la movilización de células con iguales efectos, no cuantificadas rutinariamente. En poblaciones distintas, donde la prevalencia de infecciones y hábitos tóxicos e irritantes que provocan leucocitospermia son muy diferentes, también pueden observarse diferencias de los patrones celulares en semen.

Palabras clave: INFERTILIDAD/prevalencia/epidemiología.

ABSTRACT

With the purpose of describing mononuclear-cell subpopulations existing in non-fertile men's sperm with leucocytospermia, a descriptive study was performed with 78 men members of infertile couples, with leucocytospermia, peroxidase-positive leucocytes greater than or equal to 1×10^6 leucocytes/ml., who attended the office of the National Endocrinology Institute (37) and the office of Abel Santamaría Cuadrado Hospital in Pinar del Río (41), 1999-2000. The study was carried out with antibodies which recognized different cellular particulars, such as macrophages, B cells, some activated T cells, all T lymphocytes, NK cells, CD8+ lymphocytes, CD4+ lymphocytes. The results were different from other revised studies, showing predominance of T cells and antigen-presenting cells. The presence of both types of cells suggested the chances of establishing an inflammatory reaction with harmful cytokine release for the spermogram parameters, and the mobilisation of cells with the same effects, not quantified routinely. In different populations, where the prevalence of infections and toxic and irritant habits causing leucocytospermia are very different, much difference can be seen in sperm cellular patterns.

Key words: INFERTILITY/prevalence/epidemiology.

INTRODUCCIÓN

La leucocitospermia, leucocitos peroxidasa - positivos en semen mayor o igual a 1×10^6 leucocitos/ml, ha sido asociada a disminución de la calidad del semen.¹ Sin embargo, al ser signo de un proceso inflamatorio activo, es de esperarse que además de estos leucocitos, existan otros que no se detectan con esa tinción, y que su presencia puede influir de alguna manera en la calidad del semen. Algunos trabajos refieren una fuerte asociación entre leucocitospermia e infección,² aunque otros la asocian a procesos secundarios e irritantes químicos.^{3,4} Las respuestas inflamatorias que provocan los diferentes procesos, pueden diferir en cada uno de los casos, y por lo tanto la composición del exudado leucocitario pudiese ser diferente en cuanto a las poblaciones celulares presentes. Como estas poblaciones de células blancas segregan mediadores químicos diferentes y tienen en general funciones disímiles, el hecho de que una u otra predomine, puede cambiar de manera importante el efecto sobre el semen, lo cual ha sido demostrado en un trabajo anterior por parte de los autores.⁵

Estudios sobre las subpoblaciones en semen han demostrado un aumento de los leucocitos en pacientes infértiles.⁶ También se ha visto asociación de las distintas citoquinas y daños en los parámetros del espermograma, por ejemplo, los niveles de Inter leucina 2 (IL-2) e interferón gamma (INF gamma) se han relacionado negativamente con el número, la movilidad y la morfología de los espermatozoides, existiendo además un aumento de ambas en pacientes infértiles.⁷ Existe relación entre las células NK y daño a la movilidad de los espermatozoides.⁵ Estos resultados sugieren participación activa de las células T.⁷

Por lo antes expuesto resultaría importante describir las subpoblaciones de células mononucleares presentes en el semen de pacientes infértiles con leucocitospermia, células que normalmente no se buscan en los exámenes de rutina, lo cual daría una idea más clara de las interacciones celulares que se establecen a este nivel.

MATERIAL Y MÉTODO

Se realizó un estudio descriptivo en 78 hombres miembros de parejas infértiles con leucocitospermia, que acudieron a la consulta del Instituto Nacional de Endocrinología (37) y a la del Hospital Abel Santamaría Cuadrado en Pinar del Río (41), entre 1999 y 2001. El análisis seminal se realizó siguiendo los procedimientos descritos en el manual publicado por la Organización Mundial de la Salud (OMS).⁸

A los pacientes seleccionados se les realizó el estudio de las subpoblaciones mononucleares en semen. Se extrajo el anillo de células mononucleares y se ajustó la concentración a 10^7 células por ml; 10 ml de esta suspensión se aplicaron en cada excavación de un portaobjetos de 8 excavaciones cubierto con teflón. Las láminas se secaron a 37 °C y después se fijaron por 10 min en acetona y se conservaron a -70 °C hasta que se procesaron para inmunohistoquímica.

Para la tinción inmunohistoquímica de las subpoblaciones leucocitarias se utilizó el sistema estreptavidina- biotina- peroxidasa. Los sitios de unión no específicos se saturaron con suero normal de conejo, y después a cada excavación se le añadió el correspondiente anticuerpo biotinilado, que se incubó por 10 minutos y luego, el conjugado estreptavidina- peroxidasa con 5 minutos de incubación. Al final se añadió el sustrato (aminoetilcarbazol) y las láminas se tiñeron con hematoxilina para proporcionar una tinción de contraste.⁵

Por último las láminas se montaron y conservaron hasta su lectura en el microscopio óptico, con objetivo de 40x.

Se utilizaron como control negativo láminas en las que en vez del anticuerpo monoclonal se añadió suero normal de ratón. Para comprobar el funcionamiento en la tinción de los monoclonales se utilizaron células provenientes de sangre periférica humana.

Para la lectura se contaron 100 células en cada excavación y se tomaron como positivas las que exhibían una coloración rojo pardo en el citoplasma. La lectura permitió establecer el perfil porcentual de las subpoblaciones leucocitarias para cada individuo de la muestra.

En el estudio se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales:

Tabla 1. Especificidad de los anticuerpos monoclonales utilizados en el estudio.

NOMBRE	ESPECIFICIDAD
• Dako- LC	Panleucocitario
• Dako HLA-DR	Macrófagos, células B,
• Dako T11	Todos los linfocitos T.
• Dako CD56	Células NK
• Dako ver- MAC3	Macrófagos, monocitos
• Dako 4KB5	Células B
• Dako T8	Linfocitos CD8+
• Dako T4	Linfocitos CD4+

RESULTADOS

Con relación al perfil de subpoblaciones de leucocitos mononucleares existentes en la muestra estudiada pudo determinarse que los rangos de las distintas subpoblaciones muestran una amplia variación, predominando las células T con un 49 % y las células con HLA-DR, 47 %.

En la **Figura 1** se representa la distribución de las subpoblaciones de células T, encontrándose un 28% de linfocitos T CD4 y un 11 % de linfocitos T CD8.

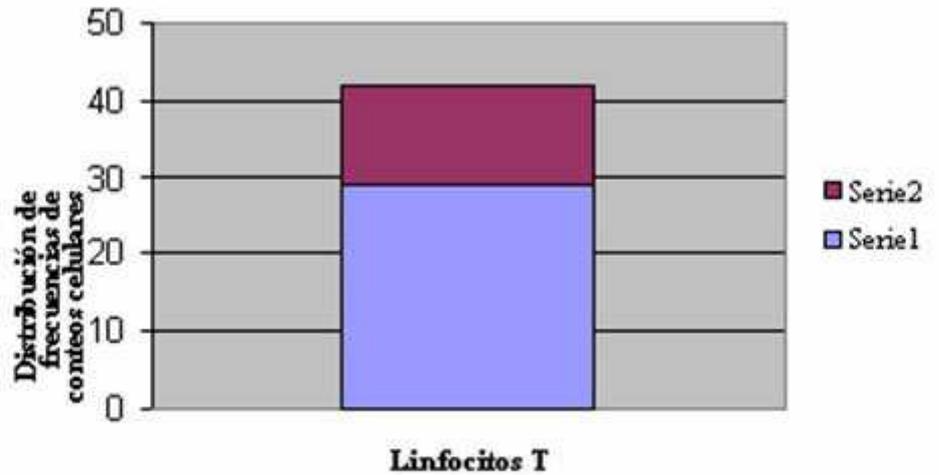


Figura 1. Distribución de linfocitos T CD4 (1) y CD8 (2), en semen de hombres infértiles con leucocitosis, 1999- 2001

La distribución de las células con moléculas HLA-DR, presentadoras de antígenos, como células B y macrófagos, entre otras, aparecen representadas en la **Figura 2**, obsérvese un predominio de macrófagos en relación a las células B y otros tipos celulares.

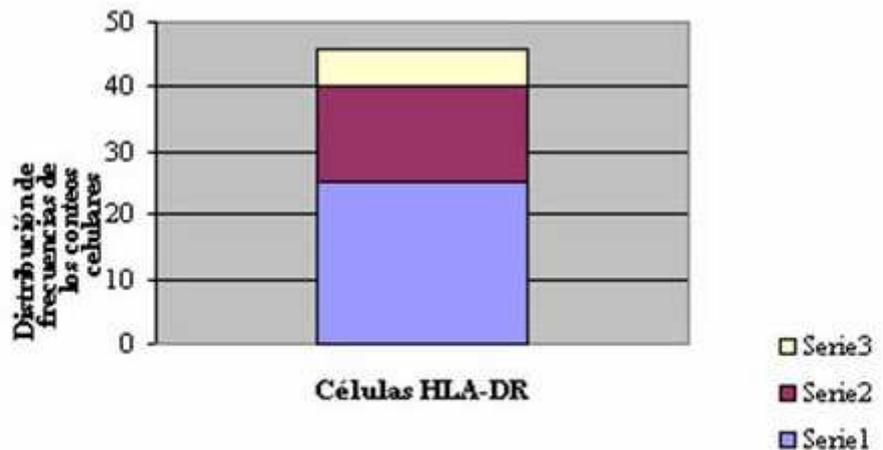


Figura 2. Distribución de células HLA-DR, Macrófagos (1), Células B (2), otros tipos (3) en semen infértiles con leucocitosis. 1999-2001

DISCUSIÓN

La distribución en el semen de subpoblaciones de leucocitos mononucleares observadas (25%) difiere de las observadas por Wolf y Anderson,⁹ con un porcentaje mucho mayor de macrófagos en su muestra (46%).

Por el contrario, estos autores encontraron escasa representación de células T en semen, (6.3%), y en el presente trabajo fue de un 49 %, encontrándose 28% de linfocitos T CD4 (**Figura 1**), que como se conoce son células que brindan la

cooperación para el establecimiento de una respuesta inmune, mediante la liberación de citoquinas que a la vez que activan otras células, pueden producir daños a los parámetros seminales, de este modo son capaces de promover una respuesta inflamatoria local.

Las células atraídas y activadas en esa respuesta inflamatoria pueden producir daños con los productos de su secreción a la calidad seminal, un 11% del total de células fueron linfocitos T CD8, capaces de producir lisis de otras células que porten sobre su HLA clase I, antígenos reconocidos por ellas y liberar citoquinas con conocido efecto deletéreo sobre la calidad seminal como el INF gamma, TNF y en menor grado IL-2.^{7,10} La presencia de esos linfocitos T puede ser resultado de una respuesta autoinmune o no a nivel prostático^{11,12} seminal u otro lugar del sistema reproductor, pudiendo ser sus productos causa de inducción de muerte celular programada por el plasma seminal.¹³

Más aún, la idea de una respuesta inmune organizada, no evaluada rutinariamente, a este nivel en los pacientes estudiados, se ve afirmada por la presencia común de las células descritas y células con moléculas HLA-DR, presentadoras de antígenos, como células B y macrófagos, entre otras (**Figura 2**), necesarias para la activación de los linfocitos T CD4, al presentarles antígenos sobre la molécula HLA de clase II y brindarle señales co-estimuladoras. Además, son capaces de liberar citoquinas dañinas al semen y en el caso de las células B, como es conocido, son capaces de establecer una respuesta de anticuerpos, también deletérea.

La presencia de los tipos celulares descritos indica la posibilidad de establecerse una reacción inflamatoria con la consiguiente liberación de citoquinas dañinas para los parámetros del espermograma y la movilización de células con iguales efectos.^{5,7}

La diferencia entre nuestro estudio y el referido puede deberse a que la composición del exudado leucocitario está relacionada con el tipo de germen implicado o con el factor irritante presente que provoque su aparición,⁴ por lo que es explicable que en poblaciones distintas, donde la prevalencia de infecciones y determinados hábitos tóxicos como exposición a irritantes que provocan leucitospermia son diferentes, también se observen diferencias como las señaladas anteriormente.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Wolff H., Politch JA., Martínez A. Leucocytospermia is associated with poor semen quality. *Fert Steril.* 1990; 53: 523-536.
2. Hillier SL, Rabe LK. Relationship of bacterial characteristics to semen indices in men attending an infertility clinic. *Obstet. Gynecol.* 1990; 75: 800-804.
3. Close CE, Robert PL, Berger RE. Cigarettes, alcohol and marihuana are related to pyospermia in infertile men. *J Urol.* 1999; 144: 900-903.
4. Coskun E. Repercusión de las infecciones genitales sobre la fertilidad. *J Turkish Ger Gynecol Association.* 2005; 6(3):197-203.

5. Quintero W, Mallea L, Machado AJ. Relación entre las distintas subpoblaciones celulares, la enzima superóxido dismutasa y la calidad seminal. Rev Cubana Invest Biomed. 2002; 21(2): 81-85.
6. Tortolero I, Duarte JM, Pamplona M. Efectos de la leucocitospermia sobre la calidad seminal en varones subfértiles con y sin varicocele. Arch Esp Urol. 2004; 57(9): 921-928.
7. Paradasi R, Capelli M, Mandani M, Bellavia E, Flamigni C. Increased levels of interferon-gamma in seminal plasma of infertile men. Andrologia. 1996; 28: 157-161.
8. Manual de laboratorio de la OMS para el examen de semen humano y de la interacción del semen con el moco cervical. Buenos Aires: Editorial Panamericana; 1989.
9. Wolff H., Anderson DJ. Immunohistologic characterization and quantification of leukocytes subpopulations in human semen. Fertil Steril. 1998; 49: 497-504.
10. Hill J. A., Haimovici F., Politch J. A., Anderson D.J. Effects of soluble products of activated lymphocytes and macrophages (lymphokines and monokines) on human sperm motion parameters. Fertil. Steril. 1987; 47: 460-465.
11. Maccioni M, Molina R, Tissera A. Presence of INFgamma-secreting lymphocytes specific to prostate antigens in a group of chronic prostatitis patients. Clin Immunol. 2005; 116(2):149-57.
12. Batsone GR, Doble A, Gastón JS. Autoimmune T cell responses to seminal plasma in chronic pelvic pain syndrome (CPPS). Clin Exp Immunol. 2002 May; 128(2): 302-7.
13. Okamoto M, Byrn R, Eyre RC. Seminal plasma induces programmed cell death in cultured peripheral blood mononuclear cells. AIDS Res Hum Retroviruses. 2002 Jul 20; 18(11): 797-803.

Recibido: 12 de julio de 2006.
Aprobado: 25 de enero de 2007.

Dr. William Quintero Pérez. Facultad de Ciencias Médicas "Dr. Ernesto Che Guevara de la Serna", Km 89 Carretera Central. Pinar del Río. Cuba.