

EVALUACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE INTERLEUCINA 6 (IL-6), IL-8, IL-10, INF- γ Y ÓXIDO NÍTRICO EN EL PLASMA SEMINAL COMO POTENCIALES MARCADORES DE INFECCIÓN O INFLAMACIÓN DEL TRACTO GENITAL MASCULINO

Franca Puccio,^{1,2} Maira Cabrera,² María Isabel Camejo^{1*}

¹ Departamento de Biología de Organismos. Universidad Simón Bolívar.

Baruta, Estado Miranda, Venezuela. Tel. 58-212-9063077. Correo electrónico: mcamejo@usb.ve.

² Instituto de Biomedicina-MSDS-UCV.

Caracas, Venezuela. Correo electrónico: fpuccio@telcel.net.ve.

Resumen

Muchos autores han sugerido que las infecciones en el tracto genital masculino pueden contribuir a la infertilidad. Sin embargo, la selección de un método idóneo para el diagnóstico ha sido controvertida. El objetivo de este estudio fue evaluar la concentración de interferón gamma (INF- γ), interleucina-6 (IL-6), IL-8, IL-10 y óxido nítrico (NO) en el plasma seminal de hombres infértiles y su relación con la leucocitospermia y parámetros seminales. Muestras de semen de setenta y dos hombres infértiles y veinte hombres fértiles fueron analizadas por un sistema automatizado (CASA) y el plasma seminal fue evaluado para determinar las concentraciones de INF- γ , IL-6, IL-8, IL-10 (ELISA) y NO (*Griess reaction*). Los niveles de INF- γ , IL-6 y NO fueron superiores en el grupo con leucocitospermia comparado con el grupo sin leucocitospermia y el control. En el grupo con leucocitospermia, los niveles de IL-6, INF- γ y NO presentaron una correlación negativa con velocidad y movilidad espermática. Sin embargo, en el grupo control, con bajas concentraciones de IL-6 y NO, se observó una correlación positiva de estos parámetros con la velocidad y movilidad espermática. Estos hallazgos pueden sugerir que las citocinas a concentraciones fisiológicas pueden contribuir con las funciones espermáticas, mientras que su incremento durante las infecciones puede provocar disminución de la capacidad fértil. En cuanto a la IL-10, es necesario evaluar su papel en el contexto de la respuesta inmunitaria global. Estos hallazgos indican que otros parámetros de infección, además de la leucocitospermia, tales como IL-6 y NO, pueden ser propuestos como marcadores de calidad seminal en hombres con infertilidad idiopática.

Palabras clave Citocinas, óxido nítrico, plasma seminal, leucocitospermia.

Abstract

Many authors have suggested that male genital tract infections can lead to infertility. However, the selection of the gold standard method for the diagnosis of infections and inflammation has been very controversial. The aim of this study was to evaluate the concentration of interferon gamma (INF- γ), interleukin 6 (IL-6), IL-8, IL-10 and nitric oxide (NO) in seminal plasma of infertile men and their relationship with the presence leukocytospermic and seminal parameters. Semen samples from 72 infertile men and 20 fertile men were tested by the automatic system CASA and seminal plasma were evaluated for INF- γ IL-6, IL-8, IL-10 (ELISA) and NO (Griess reaction). The levels of INF- γ , IL-6 and NO were statistical higher in the leukocytospermic group as compared with the non leukocytospermic infertile male and with the control group. In the leukocytospermic group, the levels of IL-6, INF- γ and NO had a negative correlation with sperm velocity and mobility. However, in the control group, with low concentration of IL-6 and NO, there was a positive correlation of these immune parameters with sperm velocity and mobility. These results could suggest that cytokines at physiological concentrations could mediate the sperm functions, but an increase of these could act in a deleterious form on male fertility. The variations of the concentrations of IL-10 need to be analyzed within the context of the complete immune response during physiological and infections events. These findings indicate that different additional parameters of infection, other than leukocytospermic IL-6 and nitric oxide could be good candidates as markers of the quality of semen in infertile men with idiopathic infertility.

Key words Cytokine, nitric oxide, seminal plasma, leukocytospermic.

INTRODUCCIÓN

El hombre contribuye con aproximadamente el 30-50 % de las causas de infertilidad de la pareja. Aunque en la actualidad se conocen muchos de los problemas que llevan a la infertilidad masculina aún existe un alto porcentaje (33 %) de casos del tipo idiopático. Las infecciones e inflamaciones del tracto genital masculino están dentro del grupo de enfermedades en las cuales no se ha podido identificar claramente su efecto sobre la fertilidad. Las mismas pueden ir acompañadas por incremento de leucocitos en semen y por la liberación de sustancias reactivas al oxígeno (ROS) (Depuydt *et al.*, 1996), citocinas proinflamatorias (Matalliotakis *et al.*, 2002) y óxido nítrico, moléculas que podrían causar deterioro de las funciones del espermatozoide, tales como disminución de su movilidad, aumento de la peroxidación lipídica de la membrana espermática (Camejo *et al.*, 2001; Segnini *et al.*, 2003) y daño al DNA espermático (Henkel *et al.*, 2003; Lopes *et al.*, 1998). Es posible que algunos de los casos incluidos actualmente dentro del grupo de infertilidad idiopática podría ser explicado si se profundiza en el conocimiento de la respuesta inmunitaria durante las infecciones del tracto genital masculino. Dentro de las citocinas proinflamatorias, las más estudiadas han sido la IL-6 y la IL-8, las cuales han sido propuestas como posibles marcadores clínicos de inflamación en semen (Friebe *et al.*, 2003; Krause *et al.*, 2003). Sin embargo, no se ha podido establecer claramente el efecto de su incremento sobre las funciones espermáticas. Entre las moléculas antiinflamatorias está la IL-10, la cual está presente en el plasma seminal y podría estar jugando un papel antiinflamatorio (Camejo, 2003).

El objetivo de este estudio fue determinar la concentración de IFN- γ , IL-6, IL-8, IL-10 y óxido nítrico en el plasma seminal de hombres fértiles e infértiles y observar su posible relación con la leucocitospermia y los parámetros seminales, para poder evaluar su potencial como posibles marcadores de inflamación o infección en el semen humano.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de las muestras

Se tomaron muestras de semen por masturbación, luego de dos o tres días de abstinencia sexual, de veinte hombres de fertilidad comprobada y de setenta y tres hombres que acudieron a la consulta de fertilidad de la Clínica Leopoldo Aguerrevere, en Caracas. Todas las muestras fueron evaluadas siguiendo los criterios

de la Organización Mundial de la Salud y utilizando el sistema automatizado de análisis seminal (CASA).

Determinación de citocinas y óxido nítrico en plasma seminal

Para determinar la presencia de leucocitos se realizó el test de peroxidasa, por tinción con ortotoluidina, a aquellas muestras con más de un millón de células redondas por ml de semen. Luego las muestras fueron centrifugadas y el plasma seminal fue congelado a -20° C para la posterior determinación de las citocinas. La IL-6 y IL-8 fueron determinadas utilizando un *kit* comercial de ELISA (Diacclone), mientras que las concentraciones de IL-10 y el IFN- γ fueron evaluadas por un *kit* de ELISA estandarizado en nuestro laboratorio. El óxido nítrico fue evaluado por la detección de nitratos solubles como marcador de la enzima *óxido nítrico sintetasa* y la producción de radicales de óxido nítrico según la reacción de Griess (Moshage *et al.*, 1995).

El análisis estadístico fue llevado a cabo por *t* de Student. Los coeficientes de correlación fueron calculados por el método de Pearson. Valores de $P < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos

Clasificación de los pacientes en grupos de estudio

Luego de la determinación de leucocitos en el semen, los hombres fueron clasificados en: grupo 1, pacientes infértiles con leucocitospermia ($n = 31$); grupo 2, pacientes infértiles sin leucocitospermia ($n = 42$); grupo 3, hombres fértiles con parámetros seminales normales y sin leucocitospermia ($n = 20$).

RESULTADOS

No se observó diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones de IL-8 entre los diferentes grupos. La concentración de IL-6 en el plasma seminal del grupo con leucocitospermia fue significativamente mayor que el grupo fértil de control ($P < 0,01$) (véase la tabla 1). Los niveles de IL-6 e IL-8 observados en el grupo 2 correlacionan de forma negativa con la velocidad espermática ($P < 0,001$) (véase la tabla 2). Por otra parte, se observó una correlación positiva entre las concentraciones de IL-6 e IL-8. En cuanto a la IL-10, las mayores concentraciones fueron observadas en el grupo 1 seguido por el grupo 2 y por último el 3. Sin embargo, no se observó diferencias estadísticamente significativas entre grupos.

Con relación al IFN- γ , pudimos observar que en el grupo 1 con leucocitospermia (con altos niveles de

Tabla 1 Concentración de IL-6, IL-8, IL-10, IFN- γ y óxido nítrico en plasma seminal de hombres fértiles e infértiles.

	IL-6 (pg/ml)	IL-8 (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)	IFN- γ UI/ml	óxido nítrico (μ M)
Grupo 1 (n = 31)	38,4* (2,3-131,4)	1 292,7 (588,6-2 221,5)	18,3 (0-148,8)	485,21* (0-2 295,7)	14,11* (1,57-271,92)
Grupo 2 (n = 41)	21,8 (0,9-123,8)	1 144,4 (2,3-131,4)	15,1 (0-129,4)	301,05* (0-1 142,3)	10,43* (2,9-77,28)
Grupo 3 (n = 20)	6,9 (0,5-16,7)	1 035,7 (2,3-131,4)	12,5 (0-78,9)	57,54 (0-490)	3,31 (2,4-4,5)

* $P < 0,01$ al comparar con el grupo 3

Tabla 2 Correlación entre velocidad o movilidad espermática y concentración de citocinas en el plasma seminal de los diferentes grupos.

	IL-6 (pg/ml)	IL-8 (pg/ml)	IFN- γ UI/ml	IL-10 (pg/ml)
Grupo 1 (n = 35)	0,42 ($P < 0,001$)	-0,95 ($P < 0,001$)	-0,43 ($P < 0,001$)	ns
Grupo 2 (n = 42)	-0,84 ($P < 0,001$)	-0,84 ($P < 0,001$)	ns	ns
Grupo 3 (n = 20)	ns	ns	0,54 ($P < 0,001$)	ns

Tabla 3 Correlación entre los niveles de oxido nítrico en el plasma seminal y los diferentes parámetros seminales.

Parámetros	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Concentración MM/ml	0,009 ns	-0,03 ns	0,24 $P < 0,05$
Velocidad m/s	-0,125 ns	0,05 ns	0,44 $P < 0,05$
Movilidad total	-0,45 $P < 0,01$	-0,07 ns	0,03 ns
Espermatozoides progresivos	-0,423 $P < 0,01$	0,10 ns	0,020 ns
Espermatozoides no progresivos	0,04 ns	-0,01 ns	0,054 ns
% Formas normales	-0,73 $P < 0,001$	0,056 ns	0,40 $P < 0,05$
% Formas anormales	0,73 ns	-0,056 ns	-0,40 $P < 0,05$

IFN- γ) se notó una correlación lineal negativa entre movilidad espermática y niveles de IFN- γ ($P < 0,01$), mientras que en el grupo 3 o control (bajos niveles de IFN- γ) se observó una correlación positiva entre concentración de esta citocina y movilidad espermática (véase la tabla 2).

El grupo con leucocitospermia presentó una correlación lineal negativa entre niveles de nitritos y movilidad total, movilidad progresiva y formas normales. En cambio, en el grupo control, que presentó los menores niveles de nitritos, se encontró una correlación positiva con concentración espermática, movilidad total y formas normales (véase la tabla 3).

DISCUSIÓN

Aunque muchos autores han sugerido que las infecciones e inflamaciones del tracto genital masculino pueden conducir a la infertilidad (Diemer *et al.*, 2003), aún el tema sigue en debate. Entre los problemas que dificultan llegar a esta conclusión están las dificultades en realizar un buen diagnóstico de infección en el semen, ya que los cultivos de semen pueden dar falsos negativos, debido a las características inmunosupresoras del mismo. Por otra parte, están las características

asintomáticas de muchas infecciones y la dificultad de diagnosticar algunas infecciones frecuentes, como por ejemplo la de *C. trachomatis*. Por esa razón es de utilidad evaluar la respuesta inmunitaria durante las infecciones para de esta forma tratar de encontrar marcadores efectivos de inflamación o infección del tracto reproductor masculino. El presente estudio muestra que los niveles de IL-6 son mayores en el grupo con leucocitospermia, similar a lo observado por otros autores (Friebe *et al.*, 2003), indicando que la IL-6 es producida principalmente por los leucocitos. Por otra parte, las concentraciones de IL-8 fueron similares entre los diferentes grupos, lo que concuerda con algunos trabajos publicados pero difiere con otros. Sin embargo, se observó una correlación positiva entre la IL-6 y la IL-8, lo que puede indicar que ambas citocinas se activan conjuntamente durante el proceso inflamatorio. Adicionalmente, en el grupo con leucocitospermia se observó una correlación negativa entre IL-6, óxido nítrico e IL-8 con la velocidad espermática y movilidad, similar a lo encontrado por otros grupos (Yoshida *et al.*, 2004), lo que podría producir un efecto perjudicial a la capacidad fértil del espermatozoide. Pero por otra parte, bajos niveles de IL-6, IFN- γ y óxido nítrico (Roselli *et al.*, 1998) pueden favorecer la velocidad y movilidad espermática, lo que demuestra el papel

dual que pueden presentar estas moléculas dependiendo de si se encuentran en concentraciones fisiológicas o patológicas, lo que ya ha sido descrito por algunos autores (Calabrese, 2001).

Trabajos previos de nuestro laboratorio (Camejo, 2003) indican que las concentraciones de IL-10 son superiores en los hombres fértiles respecto a los pacientes con infertilidad idiopática, sin signos de infección, lo que se asemeja a los resultados encontrados en este estudio entre los grupos 2 y 3. Sin embargo, los valores más elevados de IL-10 están presentes en el grupo con leucocitospermia, lo cual podría explicarse como una reacción del sistema inmunitario para contrarrestar las altas concentraciones de las citocinas proinflamatorias y, de esta forma, proteger al espermatozoide y a la mucosa genital.

En conclusión, incrementos en los niveles de IL-6, IL-8 y óxido nítrico disminuyen la velocidad y movilidad espermática, lo que podría afectar la capacidad fértil masculina. Variaciones de la concentración de IL-10 en los diferentes grupos necesitan ser analizadas en el contexto global de la respuesta inmunitaria. Estos hallazgos indican que otros indicadores de infección, además de la leucocitospermia, pueden ser importantes al momento de evaluar la calidad seminal del paciente con infertilidad idiopática. Este trabajo indica que la IL-6 y el óxido nítrico son buenos candidatos para ser considerados marcadores de infección o inflamación.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue parcialmente financiado por el Decanato de Investigación y Desarrollo, el Decanato de Postgrado de la Universidad Simón Bolívar y por el Instituto de Biomedicina MSDS-UCV, Caracas.

BIBLIOGRAFÍA

- CALABRESE, E. J. (2001). «Nitric oxide: biphasic dose responses». *Crit. Rev. Toxicol.*, 31:489-501.
- CAMEJO, M. I. (2003). «Relation between immunosuppressive PGE2 and IL-10 to pro-inflammatory IL-6 in seminal plasma of infertile and fertile men». *Arch. Androl.*, 49:111-116.
- CAMEJO, M. I.; SEGNINI, A.; PROVERVIO, F. (2001). «Interleukin-6 in seminal plasma of infertile men, and lipid peroxidation of their sperm». *Arch. Androl.*, 47:97-101.
- DEPUYDT, C. E.; BOSMANS, E.; ZALATA, A.; SCHOONJANS, F.; COMHAIRE, F. H. (1996). «The relation between reactive oxygen species and cytokines in andrological patients with or without male accessory gland infection». *J. Androl.*, 17:699-707.
- DIEMER, T.; HUGO, M.; LUDWIG, M.; WEIDNER, H.; WEIDNER, W. (2003). «Urogenital infection and sperm motility». *Andrologia*, 35:283-287.
- FRIEBE, K.; BOHRING, C.; SKRZYPEK, J.; KRAUSE, W. (2003). «Levels of interleukin-6 and interleukin-8 in seminal fluid of men attending and andrological clinic». *Andrologia*, 35:126-129.
- HENKEL, R.; MAASS, G.; HAJIMOHAMMAD, M.; MENKVELD, R.; STALF, T.; VILLEGAS, J.; SANCHEZ, R.; KRUGER, T. F.; SCHILL, W. B. (2003). «Urogenital inflammation: changes of leucocytes and ROS». *Andrologia*, 35:309-313.
- KRAUSE, W.; BOHRING, C.; GUETH, A.; HORSTER, S.; KRISP, A.; SKRZYPEK, J. (2003). «Cellular and biochemical markers in semen indicating male accessory gland inflammation». *Andrologia*, 35:279-282.
- LOPES, S.; JURISICOVA, A.; SUN, J.; CASPER, R. (1998). «Reactive oxygen species: Potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa». *Hum. Reprod.*, 13:896-900.
- MATALLIOTAKIS, I.; ARICI, A.; GOUMENOU, A.; KOUMANTAKIS, G.; SELA, M. B.; MATALLIOTAKIS, G.; KOUMANTAKIS, E. (2002). «Distinct expression pattern of cytokines in semen of men with genital infection and oligo-terato-asthenozoospermia». *Am. J. Reprod. Immunol.*, 48:170-175.
- MOSHAGE, H.; KOK, B.; HUIZENGA, J. R.; JANSEN, P. L. (1995). «Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation». *Clin. Chem.*, 41:892-896.
- ROSSELLI, M.; KELLER, P. J.; DUBEY, R. K. (1998). «Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction». *Hum. Reprod. Update*, 4:3-24.
- SEGNINI, A.; CAMEJO, M. I. (2003). «Chlamydia trachomatis and sperm lipid peroxidation in infertile men». *Asian J. Androl.*, 5:47-49.
- YOSHIDA, S.; HARADA, T.; IWABE, T.; TANIGUCHI, F. [et al.] (2004). «A combination of interleukin-6 and its soluble receptor impairs sperm motility: implications in infertility associated with endometriosis». *Hum. Reprod.*, 19:1821-1825.