

## Diagnòstic d'infertilitat per causa immunològica en la parella

<sup>1</sup>Victoria Garcia Framis, <sup>2</sup>M<sup>a</sup>Angeles Bielsa, <sup>1</sup>Paz Martínez, <sup>2,3</sup>Pablo Andolz  
<sup>1</sup>Jose Egozcue.

1 Institut de Biologia Fonamental "V. Villar Palasí" i Dept de Biologia Cel·lular i Fisiologia. Universitat Autònoma de Barcelona. 08193 Bellaterra (Barcelona).

2 Laboratorio de Investigaciones Seminológicas, Aribau 110, 2. 2. Barcelona.

3 Hospital de Nostra Senyora de la Esperança, Barcelona.

### Abstract

#### The diagnosis of immunological infertility in the couple.

A significant incidence of sperm antibodies (ASA) is found in patients with unexplained infertility. The important role of antisperm antibodies in male and female infertility induced, in the last years, a wide proliferation of specific tests for the detection of these antibodies. In this communication we compare the classical methods of agglutination: Passive Hemagglutination Test (PHA) and Tray Agglutination Test (TAT) with the Immunofluorescence Test (IFT). The last technique was developed for the localization of immunoglobulins on the cell surface. Hyperimmunized rabbit antisera were used. The antigens were whole sperm and their fractions (tail and head). Some infertility patients were tested by the three techniques mentioned and the results obtained were compared with a control group.

**Key words:** Antisperm antibodies, Passive Hemagglutination, Tray Agglutination Test, Immunofluorescence Test

## Introducció

El procés de fertilització no sempre s'assoleix satisfactòriament, comportant una infertilitat. Aquesta infertilitat pot ésser deguda a moltes causes, entre d'altres l'immunològica, provocada per l'aparició en sèrum i secrecions genitals d'anticossos antiespermatozoides (ASA) que interfereixen el procés de fertilització (VILLARROYA et al., 1986; BLEIL et al 1980) Actualment s'ha estat trobant, en un nombre significatiu d'homes i dones, afectes d'una infertilitat d'etiologia desconeguda, elevats títols d'ASA.

Degut a aquesta elevada incidència clínica dels nivells d'ASA en individus infèrtils és interessant disposar de tècniques per poder detectar-los. D'entre aquestes tècniques cal destacar dues tècniques d'aglutinació:

Hemaglutinació passiva (PHA) i el "Tray Agglutination Test" (TAT), a més d'una tècnica de localització: Immunofluorescència Indirecta (IFT).

Aquestes tècniques de diagnòstic han estat aplicades en animals d'experimentació hiperimmunitzats amb espermatozoides humans sencers i fraccions dels mateixos (caps i cues) obtingudes per sonicació a fi de conseguir elevades concentracions d'anticossos que ens permeteran mesurar l'especificitat, sensibilitat i reproduïbilitat de les tècniques anteriorment citades.

Paral·lelament hem realitzat un estudi preliminar d'un nombre de sèrums de pacients infèrtils.

## Material i Mètodes

En general, per poder detectar anticossos, s'ha d'evaluar la reacció específica antígen-anticòs mitjançant algun mètode que la posi de manifest. Els mètodes de detecció d'aquesta reacció estan basats en les diferents formes d'interacció antígen-anticòs: aglutinació, utilització d'anticossos conjugats amb molècules fluorescents, amb enzims (peroxidasa, ureasa, etc.), utilització d'eritròcits sensibilitzats amb antígen, etc.

L'antigen utilitzat per nosaltres es l'espermatozoide humà procedent

de donants voluntaris i sans entre 18 i 30 anys. La seva obtenció és per masturbació, previa abstinència sexual de tres a set dies.

Degut a les variacions quantitatives i qualitatives d'un ejaculat en funció de l'edat, malalties, estacions de l'any i l'activitat sexual, hem emprat els següents paràmetres com a control de normalitat espermàtica: volum, aspecte, número d'espermatozoides, tipus de motilitat, tipus de morfologia i vitalitat. Considerem que els paràmetres normals d'una mostra de semen son:

Volum: entre 2-6 ml.

Aspecte: color blanc-grisós, poques restes cel·lulars sense presència d'aglutinacions i lleugera viscositat.

Número d'espermatozoides:  $\geq 20 \times 10^6$  espermat/ml.

Motilitat:  $\geq 50\%$  d'espermatozoides amb formes mobils (motilitat progressiva).

Morfologia : entre el 50-60 % de formes normals.

Vitalitat: 75% d'espermatozoides vius.

#### Obtenció de les mostres de sèrum

Les mostres de sèrum humanes son proporcionades per l'Hospital de l'Esperanza, de pacients infèrtils amb una infertilitat desconeguda.

Els animals d'experimentació emprats són conills femelles de raça blanca de Nova Zelanda, mantinguts en l'estabulari de la Universitat Autònoma de Barcelona. Seran immunitzats amb espermatozoides humans sencers i fraccions dels mateixos (caps i cues) obtingudes per sonicació, a l'objecte de valorar l'existència de diferents parts d'una mateixa cèl·lula.

Després de la injecció periòdica de diferents dosis de record s'obté el sèrum mitjançant una sagnada en la vena del pavelló auricular de l'animal.(CHASE et al.).

#### Tècniques de detecció d'anticossos anti-espermatozoides

D'entre les tècniques utilitzades en diagnòstic d'infertilitat per causa immunològica cal destacar els mètodes clàssics d'aglutinació, tals com el TAT (Tray Agglutination Test) i el PHA (Hemaglutinació Passiva).

Varem utilitzar la Immunofluorescència Indirecta com a tècnica de localització dels anticossos anti-espermatozoides (ASA) en una regió de l'espermatozoide.

#### - "Tray agglutination Test"

Es basa en l'observació de microaglutinacions en plaques de Terasaki. Es dispositen 5 µl de les diferents dilucions de l'antisèrum a valorar en el fons de cada pouet. Seguidament a cada dilució de l'antisèrum s'hi afageix 1 µl d'espermatozoides resuspesos en PBS a una concentració de  $40 \times 10^6$  cel/ml.

Després de quatre hores d'aglutinació pot ésser observada al microscopi (FRIBERG et al., 1974; NOEL.R et al., 1976)

#### - Hemaglutinació Passiva (PHA)

Es sensibilitzen eritròcits de carner amb espermatozoides humans. La unió es realitza amb 1 % d'àcid tànic en tampó veronal amb  $MgCl_2$  2.4m M i  $CaCl_2$  0.68 mM a pH 7.5 durant 30 minuts, a temperatura ambient. S'uneixen  $10^8$  eritròcits amb  $10^7$  espermatozoides (1:1, v/v).

S'inactiva l'antisèrum a valorar a 56°C durant 30 minuts i s'absorbeixen tres vegades amb eritròcits de carner; es realitzen diferents dilucions de l'antisèrum problema i s'afegeixen 50 µl dels eritròcits units a l'antigen. Les plaques es deixen tota la nit a 4°C i l'endemà ja es poden llegir a simple vista (SUBBI et al., 1979; R.J.T HANCOCK 1979).

#### - Immunofluorescència Indirecta (IFT)

Aquesta tècnica permet la localització dels anticossos anti-espermatozoides en la superfície de l'espermatozoide, així como la classe d'immunoglobulina que es troba present en el sèrum avaluat. Es depositen 10 µl d'una concentració d'espermatozoides  $10 \times 10^6$  espermit/ml en cada un dels cercles d'un portadjectas de vidre per a fluorescència. Després de deixar-los 2 o 3 hores a temperatura ambient es deixen en metanol 30 minuts. Es dispensen 10 µl d'una dilució de l'antisèrum problema en un

cercle i en un altre 10  $\mu$ l de l'antisèrum sense diluir, això és realitza per cada sèrum a analitzar.

S'incuben els portes a 37°C en càmera humida 60 minuts. Després de rentar els portes amb PBS s'afegeix l'anticòs conjugat a la peroxidasa. Posteriorment els portes s'observen al microscopi de fluorescència (TUNG.,1975)

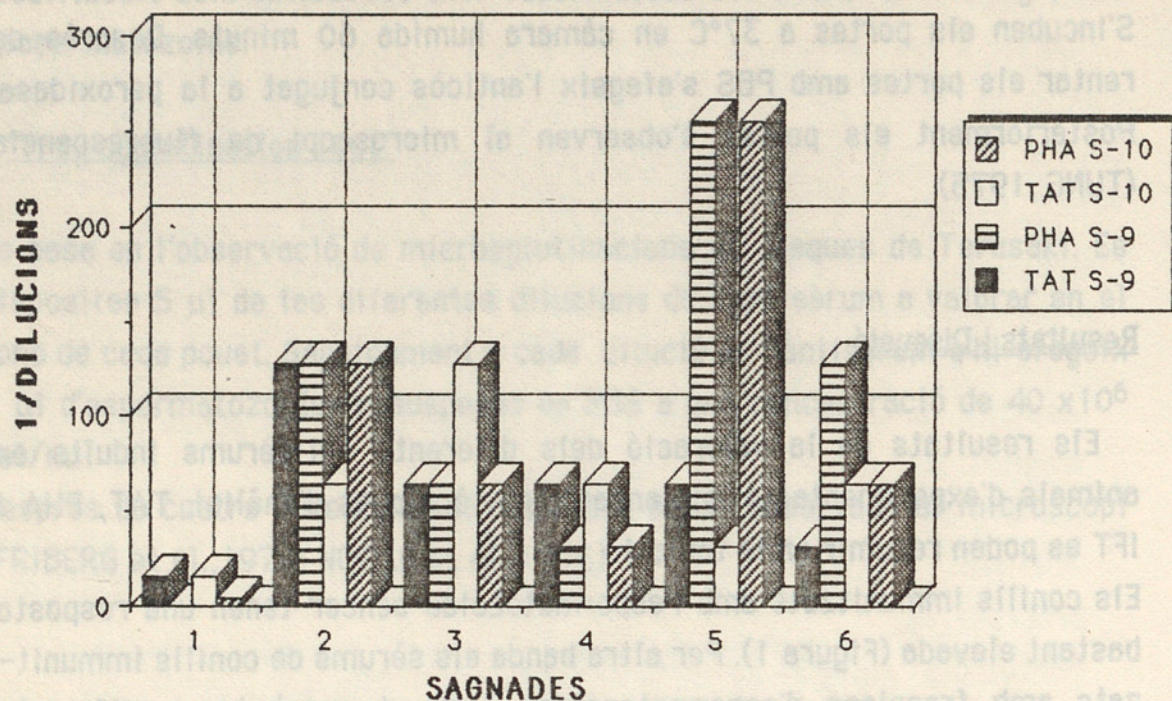
### Resultats i Discussió

Els resultats de la valoració dels diferents antisèrums induïts en animals d'experimentació mitjançant les tècniques d'anàlisi: TAT, PHA i IFT es poden resumir en la taula 1.

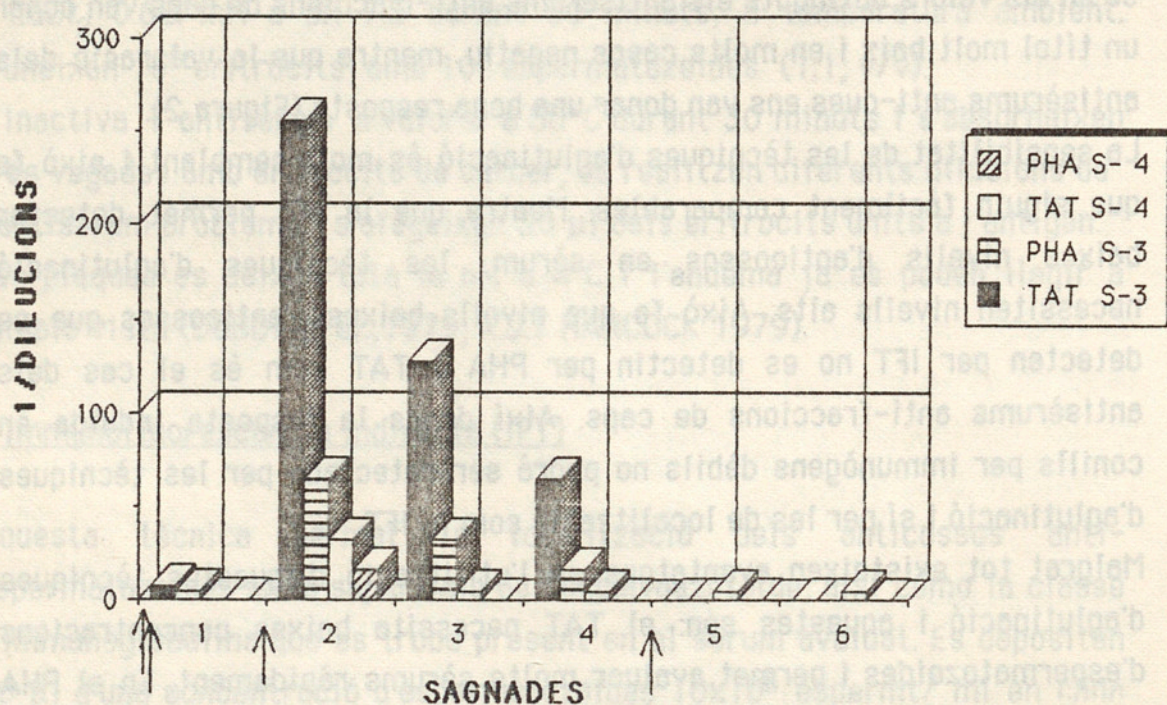
Els conills immunitzats amb l'espermatozoide sencer tenen una resposta bastant elevada (Figura 1). Per altra banda els sèrums de conills immunitzats amb fraccions d'espermatozoides (caps i cues) tenen diferents respostes, això és degut a que el grau d'immunogenicitat dels diferents antigens varia àmpliament: així doncs les fraccions de cues són immunògens més potents que les fraccions de caps. Tal com pot apreciar-se en els valors obtinguts els antisèrums anti-fraccions de caps van donar un títol molt baix i en molts casos negatiu, mentre que la valoració dels antisèrums anti-cues ens van donar una bona resposta (Figura 2).

La sensibilitat de les tècniques d'aglutinació és molt semblant i això fa que siguin fàcilment comparables. Mentre que la IFT permet detectar baixos nivells d'anticossos en sèrum, les tècniques d'aglutinació necessiten nivells alts. Això fa que nivells baixos d'anticossos que es detecten per IFT no es detectin per PHA i TAT com és el cas dels antisèrums anti-fraccions de caps. Així doncs la resposta induïda en conills per immunògens dèbils no podrà ser detectada per les tècniques d'aglutinació i sí per les de localització com la IFT.

Malgrat tot existeixen aventatges en l'utilització d'aquestes tècniques d'aglutinació i aquestes són: el TAT necessita baixes concentracions d'espermatozoides i permet avaluar molts sèrums ràpidament. En el PHA es poden utilitzar mostres congelades i la lectura és molt ràpida, no requereix microscopi.



**Fig. 1.** Resposta dels antisèrums anti-espermatozoides sencers (S-9;S-10), valorats per TAT i PHA



**FIG. 2.** Resposta dels antisèrums anti-caps (S-4) i dels antisèrums anticues (S-3) valorats per les tècniques d'aglutinació (TAT i PHA). Les fletxes indiquen les immunitzacions

Tanmateix és necessari utilitzar més d'una tècnica d'anàlisi per poder treure conclusions que no siguin errònies. L'elevada resposta dels conills en front a l'espermatozoide humà ens ha proporcionat una elevada concentració d'anticossos que ens obre el camí per descobrir el paper dels diferents antígens de superfície en la fertilització.

Paral·lelament hem realitzat un estudi preliminar sobre una població de varons infèrtils amb una infertilitat de causa desconeguda. El grup control emprat es tracta de quaranta pacients amb antecedents de fertilitat. Aquest grup ens ha donat una resposta negativa per les tres tècniques PHA i TAT (tècniques d'aglutinació) i la IFT (tècnica de localització).

Dins d'aquesta població distingim dos grups d'individus; un grup de quatre pacients que presenten marcadors externs en el seu ejaculat; tals com aglutinació espontània i/o "shaking" i un segon grup de cinquanta pacients que presenten paràmetres normals o anormals en el seu ejaculat però que no presenten marcadors externs.

L'immunofluorescència és la tècnica més específica i sensible com també en l'anàlisi dels pacients infèrtils. La diferència entre els grups de pacients, es pot veure en el títol que presenten per TAT i PHA els sèrums dels tres pacients amb marcadors front els sèrums dels sis pacients sense marcadors (TAULA 2).

En contraposició amb els valors obtinguts per les tècniques d'aglutinació els resultats per IFT són positius en els dos grups d'individus, éssent l'IgG la classe d'immunoglobulina predominant (TAULA 2). Molts del resultats positius obtinguts per les tècniques d'aglutinació no són indicatius de la presència d'immunoglobulines, això és degut a que aquestes tècniques no són suficientment específiques com per que es pugui distingir entre una aglutinació causada per la presència d'anticossos o per altres raons.

Els individus que tenen marcadors en el seu ejaculat presenten un 100% de positivitat per les tècniques d'aglutinació; el percentatge valorat per IFT és una mica més baix, resultat atribuïble a que no tota l'aglutinació detectada per PHA i TAT és deguda a la presència d'anticossos.

Per altra banda, els individus que no presenten marcadors tenen uns percentatges de positivitat molt més baixos tant per IFT com per les tècniques d'aglutinació (TAULA 3).

TAULA I

Antisèrum anti- espermatozoides	Núm. Sagnades	Tècniques d'anàlisi d'ASA (Títol 1/x)		
		TAT	PHA	IFT (Ig G)
Anti-sencers	1	16	Neg	Superfície, cap i acrosoma
	2	128	128	Acrosoma
	3	64	64	Acrosoma
	4	64	32	Acrosoma
	5	64	256	Acrosoma i cua
	6	32	128	Acrosoma i cua
Anti-cues	1	8	4	Acrosoma i cua
	2	256	64	Acrosoma i cua
	3	128	32	Acrosoma i cua
Anti-caps	1	Neg	Neg	Neg
	2	4	2	Superfície, cap i zona acrosomal (z.a)
	3	32	2	Superfície, cap i z.a
	4	8	Neg	Acrosoma, cua i zona ecuatorial (z.e)
	5	8	Neg	Acrosoma, cua i z.e
	6	8	Neg	Acrosoma i z.e



**TAULA 2**

**Resultats positius per IFT en sèrums de varons infèrtils**

	<u>IFT</u>	<u>TAT (títol1/x)</u>	<u>PHA(títol1/x)</u>
<u>Sense</u>	Superfície cap (IgG)	128	0
<u>Marcadors</u>	Superfície cap (IgG)	16	0
n:6	Superfície (IgG)	4	4
	Post. Acrosoma i cua (IgG)	4	0
	Acrosoma	4	4
	Superfície (IgG)	4	4
<u>Amb</u>	Cap(IgM)	32	4096
<u>Marcadors</u>	Cap(IgM)	8	2048
n:3	Cues (IgG)	64	256

**Taula 3**

**Percentatges de positivitat en sèrums de varons infèrtils obtinguts per tres tècniques d'anàlisi**

	<u>TAT</u>	<u>PHA</u>	<u>IFT</u>
<u>Sense</u>			
<u>Marcadors</u>	12 (24%)	26 (50%)	6 (12%)
n:50			
<u>Amb</u>			
<u>Marcadors</u>	4 (100%)	4 (100%)	3 (75%)
n:4			

### Agraïments

Aquest treball ha estat possible gràcies a la subvenció del Fondo de Investigaciones Sanitarias (referència 88/0891).

### Bibliografia:

- BLEIL J.D, WASSARMANN P.M., (1980) Mammalian sperm-egg interaction: identification of a glycoprotein in mouse egg zonae pellucidae possessing receptor activity for sperm Cell 20., 873-882.
- CHASE M W (1967) Meth. in Immunol & Immunochem. vol.1., Chap 2 237-254.
- FRIBERG J. (1974) A simple and sensitive micro-method for demonstration of sperm-agglutinating antibodies in serum from infertile men and women Acta Obstet. Gynecol.Scand 36.
- NOEL R. ROSE, TAGE HJORT ET AL (1976) Tècniques for detection of iso and autoantibodies to human spermatozoa Clin.Exp.Immunol 23., 175 -199.
- R.J.T.HANCOCK. (1979) A modified mixed haemadsorption procedure for the detection and localisation of sperm antigens J Immunol Meth 27., 93-96
- SUBBI MATHER H., OLIVER WILLIAMSON (1979) Application of Passive Hemagglutination for evaluation of antisperm antibodies and modified coombs' test for detecting male autoimmunity to sperm antigen J Immunol Meth 30., 381-393.
- TUNG KSK (1975) Human sperm antigens and antisperm antibodies I studies on vasectomy patients Clin.Exp.Immunol 20., 93-104.
- VILLARROYA S., SCHLLER R., (1986) Regional heterogeneity of human spermatozoa detected with monoclonal antibodies J.Reprod. Fertil 76., 435-447.s.

## **Anàlisi d'antígens de superfície dels espermatozoides humans responsables de la infertilitat d'origen immunològic.**

**Josep M<sup>a</sup> Benet-Rubinat<sup>1</sup>, Paz Martínez<sup>1</sup>, M<sup>a</sup> Angeles Bielsa<sup>2</sup>, Pablo Andolz<sup>2,3</sup> i Josep Egozcue<sup>1</sup>**

1 Institut de Biologia Fonamental "V. Villar Palasí" i Dept de Biologia Cel·lular i Fisiologia. Universitat Autònoma de Barcelona. 08193 Bellaterra (Barcelona).

2 Laboratorio de Investigaciones Seminológicas, Aribau 110, 2. 2. Barcelona.

3 Hospital de Nostra Senyora de la Esperança, Barcelona.

### **Abstract**

#### **Analysis of human sperm antigens leading to immunological infertility.**

Hyperimmunized rabbit antisera were used for the isolation of some sperm membrane antigens. The high antibody titer produced a good yield of purified immunoglobulins. These antibodies were obtained by ammonium sulphate precipitation and ion exchange chromatography with DEAE Sepharose CL-6B. The antisperm antibodies were coupled to an activated CH-Sepharose 4B for affinity chromatography. Extracts of solubilized human sperm proteins with 2% sodium deoxycholate (DOC) were passed through the immunoabsorbent column; the bound antigens were eluted at high pH and neutralized immediately with glycine. Eight major proteins were recovered and then were analyzed by SDS-PAGE. Their Mr were approximately 131; 93; 73; 44; 34 and 31; 22 and 21 KDa. Two middle bands (34 and 31 KDa) were very weak in an extracted sperm sample although they showed high immunogenicity.

**Key words:** Antisperm antibodies, sperm antigens, infertility, affinity chromatography.