

IMMUNOLocalITZACIO ULTRAESTRUCTURAL DELS ANTIGENS DE SUPERFICIE D'ESPERMATOZOIDES HUMANS QUE INDUEIXEN RESPOSTA IMMUNITARIA

¹M.Cristina Segura, ¹Paz Martínez, ¹Josep M. Benet-Rubinat, ²M. Angeles Bielsa, ^{2,3}Pablo Andolz i ¹José Egozcue

¹Institut de Biologia Fonamental "V. Villar Palasí" i Departament de Biologia Cel.lular i Fisiologia. Universitat Autònoma de Barcelona. U.A.B. 08193 Bellaterra.

²Laboratorio de Investigaciones Seminológicas, Aribau 110, 2.2. Barcelona

³Hospital de Nostra Senyora de l'Esperança, Barcelona.

Abstract

Ultrastructural immunolocalization of human sperm surface antigens that induce immune response

The presence of antisperm antibodies in serum or in the reproductive tract play a significant role in the impairment of fertility; to localize at the ultrastructural level the antigenic proteins that induce these antibodies, we incubated ultrathin sections of spermatozoa, embedded at low temperature in a methacrylate mixture Lowicryl K4M, with different antisperm antisera and protein A-gold complex. Antisperm antisera were induced in New Zealand white rabbits using different antigens: capacitated and non capacitated whole spermatozoa, heads and tails. The labelling is mainly found over the acrosome with different antisera; on the other hand, the nucleus has practically no gold particles. The sperm tails display a less intensive labelling with anti-whole-sperm antisera than with anti-tail antisera.

Key words: spermatozoa, antisperm antibodies, immunogold labelling, Lowicryl K4M.

Introducció

L'aparició d'autoimmunitat o isoimmunitat contra els espermatozoides, en l'home i la dona respectivament, és un dels múltiples factors que poden interferir en el procés de la fertilització, si bé la demostració d'anticossos antiespermatozoides en el sèrum o en les secrecions genitals (plasma seminal i moc cervical) no és indicativa d'esterilitat permanent; hem de considerar també l'especificitat dels anticossos, la classe d'immunoglobulina, la seva concentració, així com les influències hormonals (SCHUMACHER, 1988).

Referents a l'actuació d'aquests anticossos antiespermatozoides, que poden afectar a la reproducció per efectes humorals directes (per les immunoglobulines i/o el complement) i efectes indirectes mediatos per cèl·lules (fagocitosis d'espermatozoides mediada per macròfags) (LONDON et al., 1984), s'han descrit diversos mecanismes inhibidors de la reproducció tals com l'aglutinació o immobilització dels espermatozoides, la citotoxicitat, la interferència de la capaciació o de la reacció acrosòmica, l'impediment de la penetració en el moc cervical (WANG et al., 1985), la inhibició de la unió o de la penetració de les membranes de l'òvul (ABDEL-LATIF et al., 1986), la inhibició de la fertilització "in vitro" (CLARKE et al., 1988) i la interferència en la implantació dels embrions (HAAS et al., 1986).

Diversos estudis han mostrat que els anticossos antiespermatozoides han estat induïts per antígens de la superfície dels espermatozoides (PARSLOW et al., 1987) o per components del plasma seminal; per a realitzar una localització precisa dels antígens responsables de la seva aparició, hem realitzat una immunolocalització a nivell ultraestructural incubant talls ultrafins d'espermatozoides capacitats, inclosos a baixes temperatures en la reïna Lowicryl K4M, amb diversos antisèrums antiespermatozoides obtinguts immunitzant conills blancs de Nova Zelanda i detectant els anticossos amb un complex de proteïna A-or col·loidal.

Material i mètodes

Obtenció de les mostres de semen humà

Les mostres de semen humà es van obtenir per masturbació, prèvia abstinència sexual de tres dies. Es van recollir en un pot de plàstic estèril i es van mantenir a 37°C perquè tingués lloc una bona líquefacció del semen.

Selecció i capacitació dels espermatozoides

Per a reproduir "in vitro" els canvis que sofreixen els espermatozoides en l'aparell genital femení, les alíquotes de semen (0'5 ml) es van resuspendre en 1'5 ml de tampó BW'W (BIGGERS, WHITTEN i WHITTINGHAN, 1971), modificat per l'addició de 0.050 M de tampó Hepes (Sigma), que contenia 3 mg/ml de HSA (albumina de sèrum humà), es van centrifugar a 600g durant 5 minuts, a 2500g durant 1 minut, i es va aspirar el sobrenadant. El sediment que quedava es va cobrir amb 0'5 ml de tampó BW'W modificat que contenia 33 mg/ml de HSA i es va incubar a 37°C durant 1 hora. La fracció mòbil d'espermatozoides desitjada era la que es trobava en el sobrenadant (0'4 ml). D'aquesta fracció es va eliminar el medi de cultiu centrifugant a 3000g durant 3 minuts i resuspenent el sediment amb PBS (tampó fosfat de sodi 0'1M, pH 7'4).

Aquest mètode produeix la capacitació dels espermatozoides. Per a seleccionar-los però sense capacitar-los, no se li afegeix l'HSA al medi BW'W.

Obtenció dels antiserums antiespermatozoides

Els anticossos antiespermatozoides es van induir en conills de la raça blanca de Nova Zelanda, els quals van ser immunitzats amb espermatozoides sencers capacitats i no capacitats i fraccions d'aquests (caps i cues, obtingudes per sonicació) emulsionats amb adjuvant complet de Freund. Els diferents antiserums antiespermatozoides es van obtenir fent la sagnada de l'animal per punció directa al cor. També es van obtenir antiserums control d'animals no immunitzats. Els diferents antiserums es van titular amb l'assaig immunoenzimàtic o ELISA.

Inclusió dels espermatozoides per microscòpia electrònica de transmissió

Una mostra normal d'espermatozoides capacitats es va fixar amb glutaraldehid al 1% durant 1 hora a 4°C i, després de tres rentats amb

tampó cacodilat, va ser encapsulada en agar al 1% i tallada en cubs de 0,5 mm de costat. Aquest material es va deshidratar gradualment amb etanol baixant progressivament la temperatura; la seqüència de deshidratació va ser la següent: etanol al 30% durant 30 minuts a 4°C, i etanol al 50%, 70%, 95% i 100% (dues vegades) a -20°C durant una hora cada un. Seguidament es van infiltrar els cubs d'agar amb la reïna Lowicryl K4M a -20°C d'acord amb el protocol per aquesta reïna, i es van col·locar en càpsules de gelatina que es van omplir a vessar amb Lowicryl pura i es van tapar. Finalment, es va procedir a polimeritzar la reïna irradiant-la indirectament amb llum ultravioleta (làmpares Sylvania blacklite F15/TB/BL 350) durant 48 hores a -35°C i durant 72 hores a temperatura ambient.

Els blocs contenint la mostra d'espermatozoides inclosa van ser seccionats en talls ultrafins (daurats), els quals van ser recollits en reixetes de níquel de 200 mesh.

Immunomarcatge amb la tècnica de l'or col·loidal

Per a dur a terme l'immunomarcatge, es van fer surar les reixetes de níquel on es trobaven els talls ultrafins sobre gotes de les següents solucions a temperatura ambient: en primer lloc sobre PBS contenint un 1% de BSA durant 10 minuts; seguidament sobre l'antisèrum corresponent diluït convenientment (veure taula I) durant 1 hora i a continuació es van rentar tres vegades amb el tampó PBS-BSA durant 15 minuts. Aleshores es van incubar amb un complex de proteïna A-or col·loidal de 15 nm (E.Y. Laboratories) diluït 1/10 durant 30 minuts i després es van rentar, primer amb PBS-BSA com en el cas anterior i després amb aigua destil·lada durant 10 minuts. Una vegada seques les reixetes, s'observaren al microscopi electrònic de transmissió Hitachi HU 12A.

Resultats

Els resultats obtinguts al titular per ELISA els diversos antisèrums induïts i l'anàlisi de les regions de l'espermatozoide on es localitzen els antígens són els que s'exposen a la taula I, així com la dilució emprada en cada cas al realitzar l'immunomarcatge amb la tècnica de l'or col·loidal.

Aquestes dades, que es corresponen molt bé amb les obtingudes anteriorment per marcatge fluorescent i observació al microscopi de fluorescència, mostren que els antígens de superfície d'espermatozoides humans que indueixen resposta immunitària es localitzen principalment a

la regió acrosomal, ja que amb tots els antisèrums s'obté marcatge en aquesta zona mentre que les cues tan sols presenten un marcatge clarament definit quan s'utilitza l'antisèrum anti-cues; s'observa també que el nucli està pràcticament exempt de marcatge (figura 1)

TAULA I

Títol i lloc d'unió dels diversos antisèrums antiespermatozoides induïts en conills blancs de Nova Zelanda

<u>Antiserum</u>	<u>Títol ELISA</u>	<u>Dilució</u>	<u>Immunomarcatge amb or col.loidal</u>
Anti-cues	1/8000	1/5	Acrosoma, superfície cua (nucli)
Anti-caps capacitats	1/1500	1	Acrosoma -part posterior- (nucli, superfície cues)
Anti-caps no capacitats	-	1	Acrosoma
Anti-espermato- zoides sencers capacitats	1/4000	1/3	Acrosoma (superfície cues)
Anti-espermato- zoides sencers no capacitats	1/4200	1/3	Acrosoma (nucli, superfície cues)
Control	negatiu	1	negatiu

Entre parèntesi, les regions lleugerament marcades.

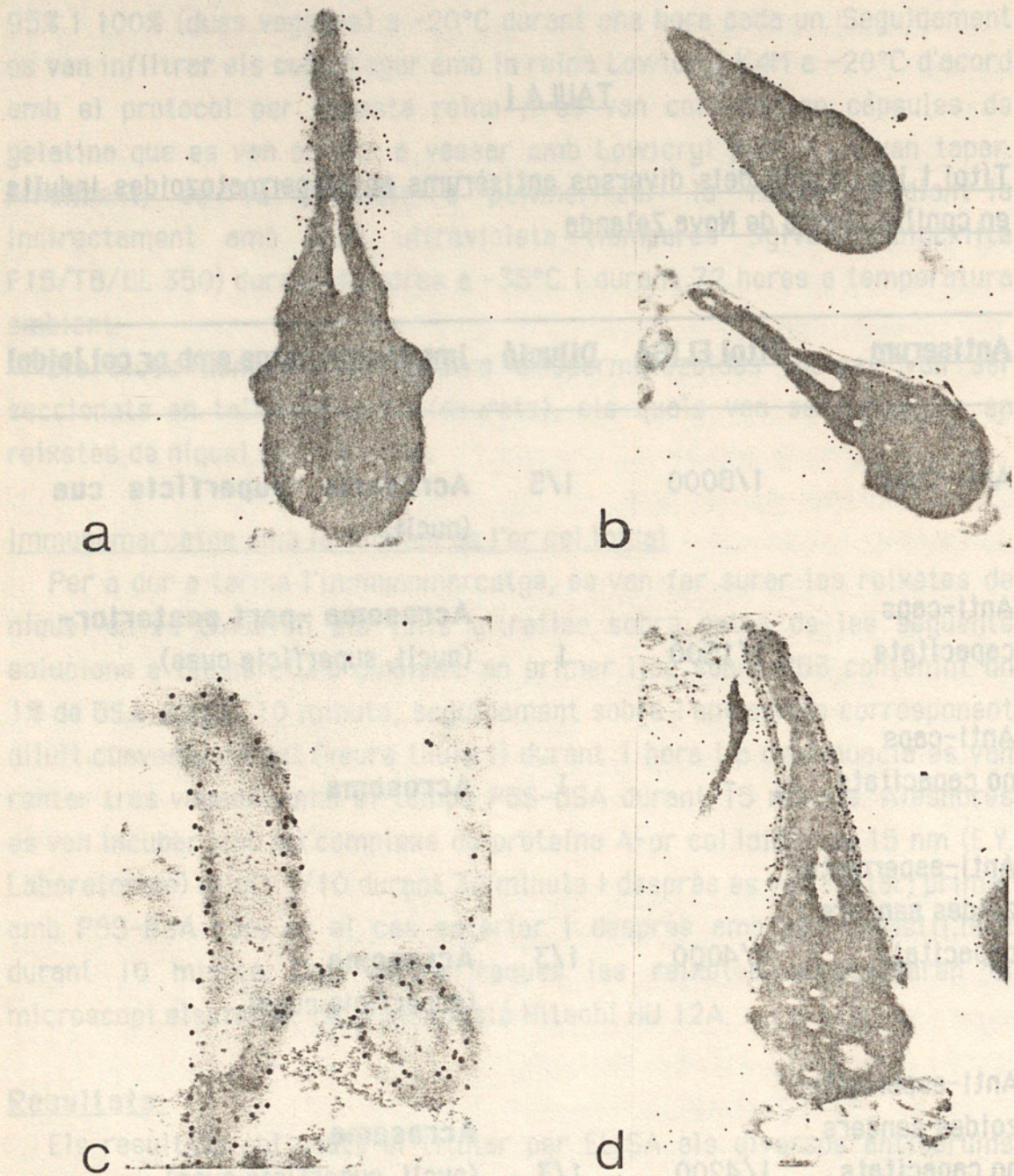


Fig. 1: Diversos patrons de marcatge obtinguts a l'incubar talls ultrafins d'espermatozoides capacitats amb els diversos antisèrums:

a) principalment l'acrosoma sencer; b) principalment la part posterior de l'acrosoma; c) la superfície de les cues; d) l'acrosoma, i un lleuger marcatge sobre el nucli i les cues.

Discussió

L'espermatozoide, cèl.lula que presenta una elevada especialització, està format per un cap, que conté l'acrosoma (amb els enzims essencials per la fertilització), el nucli i una quantitat mínima de citoplasma, i una cua o flagel. Els anticossos que reaccionen contra antígens de la regió acrosomal poden interferir en el procés de la reacció acrosòmica (NAGAE et al., 1986), la qual és necessària perquè els espermatozoides puguin penetrar les cobertes exteriors de l'òvul i perquè es puguin fusionar amb la seva membrana plasmàtica, i impedir que pugui tenir lloc la fertilització.

L'escàs marcatge observat en la superfície de les cues a l'emprar els antisèrums obtinguts immunitzant els conills amb espermatozoides sencers capacitats i no capacitats, no desmereix la importància dels anticossos que indueixen les cues en la interferència del procés de la fertilització ja que, si bé semblen ser menys immunogèniques que l'acrosoma, presenten una gran superfície i, per tant, són susceptibles de que s'hi uneixin una gran quantitat d'anticossos provocant l'aglutinació o immobilització dels espermatozoides.

El fet que amb l'antisèrum anti-cues les partícules d'or es localitzin també a l'acrosoma, fa sospitar la presència d'antígens comuns o de reaccions creuades entre les dues regions de l'espermatozoide; prèviament ja havíem observat, al realitzar una immunodetecció sobre un extracte de proteïnes de superfície d'espermatozoides humans transferides a membranes de nitrocel.lulosa, que amb antisèrums anti-cues es detectaven bandes que també eren detectades amb els antisèrums anti-caps.

La manca de marcatge a nivell del nucli era previsible ja que els diversos antisèrums s'han obtingut immunitzant els conills amb antígens de superfície. No obstant això, la presència d'anticossos contra antígens nuclears en el sèrum o en les secrecions genitals tindria poca importància a nivell de interferència del procés reproductiu en quant a que, en condicions fisiològiques, aquests anticossos no tenen accés al nucli.

La inducció d'anticossos antiespermatozoides en conills mostra, doncs, que aquests van dirigits contra antígens de la superfície de l'espermatozoide i que poden, per tant, bloquejar la seva mobilitat i la seva capacitat per poder fertilitzar l'òvul. Aquest estudi, que es pot considerar un símil de la infertilitat humana per causa immunològica, justificaria els mecanismes inhibidors de la reproducció, deguts a la

presència d'anticossos antiespermatozoides, descrits anteriorment per diversos autors.

Agraïments

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

Bibliografia

- ABDEL-LATIF, A., MATHUR, S., RUST, P.F., FREDERICKS, C.M., ABDEL-AAL, H., WILLIAMSON, H.O. (1986). Cytotoxic sperm antibodies inhibit sperm penetration of zona-free hamster eggs. Fert. Steril., 45., 542-549.
- BIGGERS, J.D., WHITTEN, W.K., WHITTINGHAM, D.G. (1971). The culture of mouse embryos in vitro. In Daniel J.C. (ed.), Methods in mammalian embryology. W.H. Freeman, San Francisco, pp.86-116.
- CLARKE, G.N., HYNE, R.V., DU PLESSIS, Y., JOHNSTON, W.I.H. (1988). Sperm antibodies and human in vitro fertilization. Fert. Steril., 49., 1018-1025.
- HAAS, G.G., KUBOTA, K., QUEBBEMAN, J.F., JIJON, A., MENGE, A.C., BEER, A.E. (1986). Circulating antisperm antibodies in recurrently aborting women. Fert. Steril., 45., 209-215.
- LONDON, S.M., HANEY, A.F., WEINBERG, J.B. (1984). Diverse humoral and cell-mediated effects of antisperm antibodies on reproduction. Fert. Steril., 41., 907-912.
- NAGAE, T., YANAGIMACHI, R., SRIVASTAVA, P., YANAGIMACHI, H. (1986). Acrosome reaction in human spermatozoa. Fert. Steril., 45., 701-707.
- PARSLOW, J.M.M., POULTON, T.A., HAY, F.C. (1987). Characterization of sperm antigen reacting with human antisperm antibodies. Clin. exp. Immunol., 69., 179-187.
- SCHUMACHER, G.F.B. (1988). Immunology of spermatozoa and cervical mucus. Human Reprod., 3., 289-300.
- WANG, C., BAKER, H.W.G., BURGER, H.G., LUTJEN, P. (1985). Interaction between human cervical mucus and sperm surface antibodies. Fert. Steril., 44., 484-488.