UNIVERSIDAD DE GRANADA

TESIS DOCTORAL

"CARACTERIZACION DE LOS LEUCOCITOS SEMINALES HUMANOS Y SU IMPLICACION EN LA ESTERILIDAD MASCULINA"

Mª TERESA GIL RUIZ

GRANADA, 1993

D.ALFONSO HERRUZO NALDA, PROFESOR TITULAR Y JEFE DEL DEPARTAMENTO DE OBSTETRICIA Y GINECOLOGIA DEL HOSPITAL REGIONAL "VIRGEN DE LAS NIEVES" DE GRANADA.

CERTIFICA:

Que Dª Mª Teresa Gil Ruiz ha realizado bajo mi dirección el trabajo de Tesis Doctoral sobre el tema: "CARACTERIZACION DE LOS LEUCOCITOS SEMINALES HUMANOS Y SU IMPLICACION EN LA ESTERILIDAD MASCULINA", que ha finalizado con aprovechamiento, habiendo sido revisado y estando conforme con su presentación para el grado de Doctor, siempre que así lo considere el tribunal que designe la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada.

Granada, 22 de Octubre de 1993.

Fdo: D. Alfoso J. Herruzo Nalda

D. FRANCISCO GONZALEZ GOMEZ, CATEDRATICO DEL DEPARTAMENTO DE OBSTETRICIA Y GINECOLOGIA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA.

CERTIFICA:

Que Dª Mª Teresa Gil Ruiz ha realizado bajo mi dirección el trabajo de Tesis Doctoral sobre el tema: "CARACTERIZACION DE LOS LEUCOCITOS SEMINALES HUMANOS Y SU IMPLICACION EN LA ESTERILIDAD MASCULINA", que ha finalizado con aprovechamiento, habiendo sido revisado y estando conforme con su presentación para el grado de Doctor, siempre que así lo considere el tribunal que designe la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada.

Granada, 22 de Octubre de 1993.

Fdo: D. Francisco González Gómez

D. JOSE ANTONIO CASTILLA ALCALA, DOCTOR EN MEDICINA Y CIRUGIA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA, MEDICO ADJUNTO DEL SERVICIO DE ANALISIS CLINICOS DEL HOSPITAL REGIONAL "VIRGEN DE LAS NIEVES" DE GRANADA.

CERTIFICA:

Que Dª Mª Teresa Gil Ruiz ha realizado bajo mi dirección el trabajo de Tesis Doctoral sobre el tema: "CARACTERIZACION DE LOS LEUCOCITOS SEMINALES HUMANOS Y SU IMPLICACION EN LA ESTERILIDAD MASCULINA", que ha finalizado con aprovechamiento, habiendo sido revisado y estando conforme con su presentación para el grado de Doctor, siempre que así lo considere el tribunal que designe la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada.

Granada, 22 de Octubre de 1993.

Fdo: D. Jose Antonio Castilla Alcalá

Quiero agradecer a D. Alfonso Herruzo Nalda sus enseñanzas y sobre todo la confianza que ha depositado en mí.

A D. Francisco González Gómez su orientación y el interés puesto en este trabajo.

A D. Jose Antonio Castilla Alcalá su apoyo, cariño y enseñanzas, que tanto me han ayudado en el desrrollo de esta tesis.

Al personal de la Sección de Inmunología Celular del Servicio de Análisis Clínicos y de la Unidad de Reproducción del Hospital Regional "Virgen de las Nieves" de Granada, en especial a los Dres. D. Francisco Vergara, D. Ramón Molina y D. Luis Martínez

A D. Francisco Samaniego Muñoz sus enseñanzas, consejos y amistad.

A mi familia y amigos, en especial a mi madre, por su constante apoyo durante este tiempo.

A todos aquellos que, con su colaboración, han hecho posible este trabajo.

A mi familia.

A Jesús.

ABREVIATURAS.-

- cm: Centímetros.
- %: Proporción de casos.
- Ac. Mo.: Anticuerpo monoclonal.
- AAE: Anticuerpos antiespermatozoide.
- Ig/s: Inmunoglobulina/s.
- FIV: Fecundación in vitro.
- HLA/CMH: Complejo Mayor de Histocompatibilidad.
- NK: Células Natural Killer.
- PHA-M: Fitohematoaglutinina M.
- Con-A: Concanavalina A.
- DNA: Acido desoxirribonucleico.
- RNA: Acido ribonucleico.
- IL-1: Interleuquina-1
- IL-2: Interleuquina-2.
- IFN: Interferón.
- HPLC: Cromatografía líquida de alta presión.
- IL-1t: Interleuquina-1-like testicular.
- PGE_2: Prostaglandina E_2.
- $PGF_{2\alpha}$: Prostaglandina $F_{2\alpha}$.
- Recept.: Receptores.
- PMNs: Granulocitos.
- ml: Mililitro.
- g/l: Gramos/litro.
- TcR: Receptor de células T.
- NCAM: Molécula de adhesión celular neural.
- PBS: Solución tamponada de fosfato.
- CD: Cluster de diferenciación.
- LGL: Linfocitos grandes granulares.
- ADCC: Citotoxicidad dependiente de anticuerpos.
- Fc-γ-RIII: Receptor de baja afinidad para la Ig G.

- Poblac. cel.: Población celular.
- µl: Microlitro.
- FITC: Isotiocianato de fluoresceína.
- PE: Ficoeritrina.
- Control (+): Control positivo.
- Control (-): Control negativo.
- FSC: Forward Scatter.
- SSC: Side Scatter.
- FL1: Fluorescencia 1.
- FL2: Fluorescencia 2.
- Fig.: Figura.
- FACs: Citómetro de flujo.
- IBF: Immunoglobulin Binding Factor.
- AAE tipo IgG/A: Anticuerpos antiespermatozoide del tipo Ig G e Ig A.
- TNF: Factor de Necrosis Tumoral.
- céls.: Células.
- Zn: Zinc.
- IFD: Inmunofluorescencia directa.
- nº: Número.
- monoc.: Monocitos.
- LES: Lupus eritematoso sistémico

Indice

INTRODUCCION

I.- Anatomo-fisiología del aparato genital masculino 3

I.1.- Embriología gonadal 3

I.1.1.- Embriología testicular 3
I.1.2.- Conductos genitales 4
I.1.3.- Desplazamiento gonadal 4

I.2.- Organos sexuales masculinos 4

I.2.1.- Testículos 4
I.2.1.1.- Túbulos seminíferos 5
I.2.1.2.- Tejido intersticial 6

I.2.2.- Organos sexuales masculinos 6

II.- Espermatogénesis 7

II.1.- Fase mitótica 9
II.2.- Fase meiótica 11
II.3.- Fase de espermiogénesis 11
II.4.- Cinética de la espermatogénesis 12

II.4.1.- Hasta la pubertad 12
II.4.2.- Durante la etapa de adulto 13

III.- Capacidad antigénica del espermatozoide 13

IV.- Esterilidad como resultado de una respuesta inmune contra los antígenos espermáticos 17

IV.1.- Esterilidad masculina 17
IV.2.- Esterilidad femenina 22

V.- Mecanismos protectores del espermatozoide en el tracto reproductor masculino 26

V.1.- La barrera hemato-testicular 27
V.2.- Falta de expresión de antígenos HLA por las células germinales 29
V.3.- Inmunorregulación 31

V.3.1.- El testículo como lugar de privilegio inmunológico ... 31
V.3.2.- Efectos inmunosupresores del líquido seminal 32
V.3.2.1.- Viabilidad celular 33
V.3.2.2.- Proliferación celular.. 33
V.3.2.3.- Células Natural Killer 34
V.3.2.4.- Efectos anticomplemento 34
V.3.2.5.- Función de fagocitosis 35
V.3.2.6.- Enmascaramiento de los antígenos espermáticos (efecto masking) 36
V.3.2.7.- Relevancia clínica de la inmunosupresión ejercida por el líquido seminal 36

V.3.3.- Células 37
V.3.3.1.- Células de Leydig 38
V.3.3.2.- Células de Sertoli 39
V.3.3.3.- Linfocitos y células del sistema inmune 39

V.3.4.- Factores inmunorreguladores 45
V.3.4.1.- Factores testiculares 45
V.3.4.1.1.- Posibles péptidos inmunorreguladores del testículo 46
V.3.4.1.2.- Esteroides sexuales 51
V.3.4.2.- Productos leucocitarios 52
V.3.4.3.- Otros factores inmunorreguladores 54

OBJETIVOS 57

MATERIAL Y METODOS 61

I.- Instrumentos y material desechable 63
I.1.- Instrumentos 63
I.2.- Material deschable. 63

II.- Medios de cultivo 64

III.- Grupos de pacientes estudiados 64

III.1.- Grupo control de individuos fértiles 66
III.2.- Varones de parejas estériles por factor masculino no inmunológico 67
III.3.- Varones de parejas estériles por factor masculino inmunológico tipo Ig G/A 68
III.4.- Varones de parejas estériles por factor masculino inmunológico tipo Ig G 68
III.5.- Individuos vasectomizados 68

IV.- Marcaje de linfocitos con anticuerpos monoclonales 69

IV.1.- Reactivos 69
IV.1.1.- Solución PBS 69
IV.1.2.- Solución fijadora de paraformaldehído al 1% 69

IV.2.- Anticuerpos monoclonales utilizados 69
IV.2.1.- Poblaciones celulares caracterizadas 72

IV.3.- Procedimiento 78
IV.3.1.- Técnica de inmunofluorescencia directa 78
IV.3.2.- Citometría de flujo 80
IV.3.2.1.- Fundamento de la citometría de flujo 80
IV.3.2.2.- Análisis por citómetro de flujo 85

V.- Análisis por citometría de flujo de las células CD16(+) observadas en eyaculados con AAE. 97
V.1.- Estudio de la captación del Ac. Mo. anti-CD16 por espermatozoides con AAE. 98
V.2.- Estudio de la reactividad cruzada de AAE con los linfocitos de eyaculados. 99

VI.- Métodos estadísticos. 100

VI.1.- Análisis descriptivo. 100
VI.2.- Estudio de la normalidad de las variables. 101
VI.3.- Comparación de medias entre los diferentes grupos 101
VI.4.- Comparación de medias entre dos grupos 102

RESULTADOS 103

DISCUSION 147

CONCLUSIONES 173

BIBLIOGRAFIA 177

Introducción

I.- ANATOMO-FISIOLOGIA DEL APARATO GENITAL MASCULINO.-

I.1.- EMBRIOLOGIA GONADAL.-

El inicio de las gónadas es un relieve longitudinal en el mesotelio celómico, que se produce por un engrosamiento y proliferación de éste. Este relieve o cresta genital crece paulatinamente dentro de la cavidad celómica, de tal modo que al final del desarrollo gonadal, ésta se encuentra casi en su totalidad dentro del celoma, a excepción de una zona por la que queda suspendida mediante una doble hoja peritoneal.

Caudalmente, las dos crestas genitales se fusionan formando el cordón genital.

Inicialmente la gónada es indiferente en su forma, siendo indistinguible el sexo histológico del embrión. En este período, el mesotelio celómico prolifera y forma los cordones sexuales primarios, que se adentran en el mesénquima, en cuya estructura quedan insertos los gonocitos o células germinales, que se habían originado extraordinariamente y que emigran del esbozo gonadal hacia la 6ª semana.

I.1.1.- EMBRIOLOGIA TESTICULAR.-

Entre la 7ª y 8ª semana, se empieza a distinguir los cambios estructurales que permiten establecer el sexo embrionario. Los cordones sexuales se anastomosan y penetran aún más en el mesorquio, haciéndose cada vez más delgados hasta formar una red (rete testis).

La gónada queda cubierta por una capa de tejido fibroso llamada túnica albugínea, que va a separar los cordones sexuales del mesotelio.

Los cordones sexuales se alargan formando los tubos rectos, que conectan con la rete testis; a su vez, ésta se une a los tubulillos mesonéfricos o conductillos eferentes, que actúan como vínculo entre la rete testis y el conducto de Wolff.

I.1.2.- CONDUCTOS GENITALES .-

Durante el período indiferente gonadal, se forman dos sistemas de canales con función excretora llamados de Wolff y de Müller. Más tarde, en el período de diferenciación de las gónadas, el conducto de Wolff en el sexo masculino, se transforma en el epidídimo, canal deferente, vesícula seminal y conductos eyaculadores, regresando el conducto de Müller.

I.1.3.- DESPLAZAMIENTO GONADAL.-

Las gónadas se desarrollan a nivel lumbar, realizando conexiones con vasos y nervios, que las van a acompañar en su periplo hasta su ubicación definitiva. La emigración testicular es muy larga hasta la bolsa escrotal, interviniendo en ella tanto el crecimiento del dorso del embrión como el alargamiento del recessus vaginalis, que da lugar al canal vagino-peritoneal que lleva al testículo, atravesando la pared abdominal, hacia el escroto.

I.2.- ORGANOS SEXUALES MASCULINOS.-

I.2.1.- TESTICULOS.-

Las gónadas masculinas o testículos son dos, de forma ovoidea y simétricas. Miden unos 4,5 x 2,8 cm y pesan alrededor de 30-40 gramos.

Están cubiertas por las siguientes capas:

1ª.- Túnica vaginal.
2ª.- Túnica albugínea.
3ª.- Túnica vascular.

El parénquima testicular está constituído por los túbulos seminíferos y el tejido intersticial.

I.2.1.1.- TUBULOS SEMINIFEROS.-

Ocupan el 75% del parénquima del testículo. Forman unas lobulaciones, que están separadas por tejido fibroso. Los túbulos seminíferos desembocan en la Rete Testis, que ocupa una situación central en el testículo. El epitelio de estos túbulos está constituído por los siguientes grupos celulares:

1º.- Células musculares.

2º.- Células de Sertoli: Su citoplasma descansa en la membrana peritubular, extendiéndose hacia la luz del túbulo seminífero. Las células de Sertoli sólo se reproducen en la vida fetal y perinatal. Grandes proyecciones citoplasmáticas van a envolver las células germinales en maduración. La íntima unión de sus citoplasmas produce una barrera funcional de importancia para la exclusión selectiva de grandes moléculas de la luz del túbulo.

3º.- Células germinales: En los testículos maduros las células germinales van desde las más diferenciadas o espermatogonias, localizadas en la periferia del epitelio seminífero en la membrana peritubular, hasta los espermatozoides maduros, cercanos ya a la luz tubular,

sufriendo un proceso dividido en diversos estadíos, denominado espermatogénesis.

I.2.1.2.- TEJIDO INTERSTICIAL.-

Los túbulos seminíferos se encuentran inmersos en las células intersticiales, vasos y tejido colágeno. La célula que en el intersticio realiza la función principal es la célula de Leydig, que tampoco se divide en el testículo adulto. Estas células poseen gran cantidad de retículo endoplásmico liso y producen esteroides, principalmente testosterona, cuya función es necesaria para estimular la aparición de los caracteres secundarios sexuales y diversas acciones metabólicas.

I.2.2.- ORGANOS SEXUALES MASCULINOS.-

En la rete testis, ubicada en la zona central del testículo, desembocan los túbulos seminíferos. Esta red termina en un solo conducto llamado epidídimo. Hay que resaltar el importante papel que posee este órgano en la maduración de los espermatozoides, que desarrollan la habilidad de fertilizar los ovocitos a su paso por el epidídimo (Hinrichsen y Blaquier, 1980; Moore y cols., 1983). Una expresión de los fenómenos madurativos de los espermatozoides durante el tránsito epididimario está constituída por los cambios en las propiedades antigénicas de estas células, como resultado de la adición, sustración y modificación de los antígenos de la superficie espermática. Paralelamente a sus funciones de absorción y secreción, incluyendo el transporte de los espermatozoides hacia los conductos eyaculadores, se conoce la existencia de linfocitos y macrófagos intraepiteliales en el epidídimo (Ritchie y cols., 1984), que pueden desempeñar un importante papel en la inmunología del tracto reproductor masculino. Asimismo, la mayoría de los cambios funcionales asociados a la adquisición de la motilidad lineal y progresiva tienen

lugar en este órgano.

Sin embargo, algunos investigadores defienden la teoría de que la expresión antigénica y, en definitiva, la capacidad fertilizante de los eyaculados es un fenómeno intratesticular adquirido durante la espermatogénesis (Silber, 1988; Silber y cols., 1988). A favor de esta idea se encuentra el reciente trabajo de Schoysman y cols. (1993), que consiguen elevadas tasas de fertilización en programas de FIV utilizando espermatozoides intratesticulares.

El epidídimo desemboca en un tubo menos enrollado o conducto deferente, de alrededor de 30 cms., que comunica con la vesícula seminal.

Las vesículas seminales son dos pequeños sacos, situados en la cara posterior e inferior de la vejiga. La secreción de este órgano, muy rica en prostaglandinas y fructosa, posee principalmente una función energética y neutralizante.

La próstata es una glándula que se localiza a nivel del cuello de la vejiga. Es atravesada por los conductos eyaculadores, que desembocan en la uretra posterior.

Dentro de los órganos sexuales accesorios, queda por mencionar las glándulas bulbouretrales y uretrales (glándulas de Cowper y Littré), que desembocan respectivamente en la uretra bulbar y en la uretra anterior. Su única función parece ser la de la lubrificación.

II.- ESPERMATOGENESIS.-

Se denomina espermatogénesis al proceso por el cual proliferan y

se diferencian las células germinales masculinas. Este proceso tiene lugar en el interior del epitelio de los túbulos seminíferos, los cuales como ya se ha referido, ocupan la mayor parte del parénquima testicular. Este parénquima está constituído principalmente por las células de Sertoli y por las células germinales, que van desde las menos diferenciadas o espermatogonias, muy periféricas, hasta los espermatozoides, en situación central y cercanos a la luz tubular.

La espermatogénesis se completa totalmente en la pubertad (Nielsen, 1986) y dura aproximadamente 74 días (Heller, 1964), en el transcurso de los cuales, sólo una quinta parte de las células derivadas de la mitosis de las espermatogonias maduran a espermatocitos (Huckins, 1978). La producción de espermatozoides es continua, requiriendo, por tanto, un constante aporte de células germinales en estadíos inmaduros.

La inspección microscópica de cortes de tejidos de los túbulos seminíferos demuestra que está compuesta por células germinales en diversos estadíos del desarrollo. La cinética seguida por las células germinales en los testículos de algunos mamíferos demuestra una ciclicidad en cualquiera de las áreas, es decir, se forman asociaciones celulares precisas denominadas estadíos, que se suceden con carácter cíclico. Aparece, por tanto, el concepto de onda de la espermatogénesis. En los testículos humanos, los cortes de los túbulos seminíferos no han demostrado una espermatogénesis en ondas (Paniagua, 1984). Existe cierta dificultad, por tanto, para comprender la espermatogénesis humana. Sin embargo, se ha podido comprobar en cortes transversales de los túbulos seminíferos, la presencia de diferentes estadíos. Ello podría sugerir una distribución en hélice de las células germinales en el curso de su evolución (patrón helicoidal) (Dadoune y Demoulin, 1991). Algunos investigadores han confirmado una ritmicidad en la espermatogénesis humana, al detectar valores inferiores en el recuento

de espermatozoides en el verano, mientras que los valores máximos se obtienen en primavera y en invierno (Politoff y cols., 1989).

La espermatogénesis se divide en tres fases:

1ª.- Mitótica o de duplicación.
2ª.- Meiótica o de división.
3ª.- Espermiogénesis o de formación de espermatozoides.

II.1.- FASE MITOTICA.-

En esta fase sólo se produce la síntesis de DNA con duplicación del material genético. Cada célula contiene 46 cromosomas, 23 de cada progenitor.

La célula básica en este período es la espermatogonia, de la que existen 8 poblaciones morfológicas:

- Gonocito o célula primordial germinal: De núcleo esférico, con finos grumos de cromatina y dos o más nucleolos. Estas células se diferencian en espermatogonias justamente antes del nacimiento.

- Espermatogonia fetal: Es una célula larga, con cromatina dispersa y acúmulos de cromatina alrededor de la membrana nuclear. Desaparecen hacia los 6 años de edad.

- Espermatogonia transicional: Muy parecida a la anterior, pero con cromatina menos dispersa. Desaparecen igualmente hacia los 6 años de edad.

- Espermatogonia clara: Posee un núcleo redondo, de color pálido-

gris y periférico. Muy semejante a la espermatogonia oscura.

- Espermatogonia oscura: Con una cromatina oscura y una región pequeña con apariencia de vaso.

- Espermatogonia grande: Su núcleo es grande e irregular.

- Espermatogonia nubosa: Con áreas entremezcladas de cromatina oscura y otras claras o pálidas.

Todos estos tipos celulares forman parte de las espermatogonias tipo A.

- Espermatogonia tipo B: Más pequeña y diferenciada, con poco contacto con la lámina basal. Observamos en ella múltiples masas de cromatina unidas a la membrana nuclear.

Durante esta etapa de mitosis, se duplica el material genético, dando lugar a otro tipo de célula germinal denominado espermatocito primario (fase pre-leptotene), que propiciaría la siguiente fase. Durante los distintos estadíos de maduración de las espermatogonias, existen continuas pérdidas y agregados de antígenos de superficie de las células espermáticas. Investigaciones ultraestructurales sobre la localización de antígenos de superficie de los espermatozoides, han demostrado que los antígenos expresados sobre los espermatozoides maduros son diferentes en más del 50% de aquéllos expresados sobre las espermatogonias (Dym y Fawcett, 1970). A causa de esta sustancial modificación de los antígenos de la superficie celular, aún cuando las espermatogonias presentes durante la embriogénesis fueran reconocidas durante el proceso de reconocimiento de "lo propio", el espermatozoide maduro no sería reconocido completamente por el huésped.

II.2.- FASE MEIOTICA.-

La espermatogonia tipo B, ya separada de la membrana basal del túbulo, forma el espermatocito primario, comenzando esta fase de división, mediante la cual se forman células con la mitad de la carga genética, es decir, 23 cromosomas.

Los espermatocitos primarios pasan por varios estadíos denominados: leptotene, cigotene, paquitene, diplotene y diacenesis, según la disposición de los cromosomas. Con la primera división meiótica el espermatocito primario se transforma en el denominado espermatocito secundario, con una vida media muy corta. La segunda división meiótica ocurre en la fase de espermatocito de 2° orden y produce una espermátide redonda (Sa_1), que contiene 23 cromosomas. Romrell y O'Rand (1978) han encontrado que la mayoría de los autoantígenos predominantes en la superficie espermática son insertados en la membrana plasmática después de la transformación a espermátide. Muchos de estos antígenos son capaces de estimular la producción de anticuerpos y de inducir una respuesta inmune. Estos antígenos, que tienen su origen en la espermatogénesis, son capaces de inducir una orquitis autoinmune experimental a través de la producción de autoanticuerpos dirigidos contra las células espermáticas; sin embargo, los antígenos que se adquieren en el tránsito epididimario, y que son una expresión de los fenómenos madurativos que sufren los espermatozoides en este órgano, no son capaces de producirla.

II.3.- FASE DE ESPERMIOGENESIS.-

Clermont (1954; 1963) describió los siguientes pasos en el proceso de la espermiogénesis:

Estadío Sa_1, con espermátides de forma muy redonda; Sa_2, con un núcleo redondo y con acrosoma más desarrollado; estadío Sb_1, con espermátides de acrosoma aún más desarrollado; Sb_2, con un núcleo elongado; y los estadíos Sc_1, Sc_2, Sd_1 y Sd_2, caracterizados por una progresiva condensación nuclear.

En definitiva, la espermiogénesis, que es el paso de espermátide a espermatozoide, se resume en:

1°.- Formación del acrosoma.
2°.- Desarrolo del flagelo.
3°.- Transformación del núcleo.
4°.- Reorganización de las organelas y del citoplasma.
5°.- Liberación de los espermatozoides.

II.4.- CINETICA DE LA ESPERMATOGENESIS.-

II.4.1.- HASTA LA PUBERTAD.-

Durante la época prepuberal se encuentran 8 tipos de espermatogonias, que siguen esta progresión: gonadocito (no observado al nacimiento); espermatogonia fetal (sólo hasta los 6 años); espermatogonia de tránsito (hasta los 6 años); espermatogonia oscura y grande (incrementa su número desde el nacimiento); espermatogonia clara y nubosa (aumenta igualmente tras el nacimiento); y espermatogonia tipo B (aumenta tras los 4 años de edad). Todo este mecanismo de diferenciación interrumpe su desarrollo, completándose en la pubertad (Bustos-Obregón, 1975; Schulze, 1981).

II.4.2.- DURANTE LA ETAPA DE ADULTO.-

Para que la espermatogonia se transforme en un espermatozoide maduro se requieren de 4 a 6 ciclos, cada uno de los cuales se divide en 6 estados de asociación celular. Cada estado representa un grado de maduración. Como cada ciclo dura en el hombre 16 días, el tiempo de maduración o espermatogénesis en el ser humano es de aproximadamente 74 días.

III.- CAPACIDAD ANTIGENICA DEL ESPERMATOZOIDE.-

La naturaleza antigénica del espermatozoide fue reconocida experimentalmente en algunos animales mediante la inmunización activa heteróloga y homóloga en los estudios clásicos de Landsteiner (1899), Metchnikoff (1899) y Metalnikoff (1900).

Los estudios realizados en estos años permitieron definir que el espermatozoide maduro posee una serie de antígenos (órgano y tejido) específicos que no están presentes en la vida fetal en el momento del reconocimiento de "lo propio" y de "lo extraño", ya que la espermatogénesis no se completa hasta el período puberal, como hemos comentado anteriormente. Por este motivo, el proceso de la espermatogénesis debe tener lugar en un medio que evite la exposición de los antígenos espermáticos al sistema inmunocompetente del huésped o que reduzca la respuesta inmune frente a estos antígenos, que se reconocen como extraños. Existe la hipótesis de que durante la vida fetal la actividad de ciertos clones linfocitarios (linfocitos CD4 helper) en condiciones de reaccionar inmunológicamente contra los determinantes antigénicos de "lo propio", sea suprimida (delección funcional) y que los linfocitos CD8 supresores, presentes durante la embriogénesis, desarro-

llen un papel determinante en la inducción de autotolerancia. Esta serie de eventos está en condiciones de prevenir, en la mayoría de los individuos, el desarrollo de una autoinmunización.

Numerosos son los componentes que contribuyen a la antigenicidad del eyaculado. En particular, en lo que se refiere al espermatozoide, podemos definir la existencia de tres grupos antigénicos: superficiales, profundos y los implicados en los procesos de fertilización.

a) Antígenos superficiales: Antígenos de los grupos sanguíneos, -ABO o Rh o subgrupos MNS, Kell, Duffy y P -, si bien estos antígenos no parecen desempeñar una función importante en la esterilidad inmunológica; antígenos del sistema HLA, que podrían potencialmente estimular una importante reacción inmune en mujeres sexualmente activas. Al respecto, los datos más recientes de la literatura son contradictorios, sugiriendo que estos antígenos no se expresan significativamente en la superficie espermática (Schaller y cols., 1993); y antígeno H-Y (Ohno y cols., 1979), codificado por un gen presente en el cromosoma Y, es fundamental en el proceso de diferenciación sexual; aunque su expresión a nivel espermático es todavía controvertida.

b) Antígenos profundos: Entre los que se encuentran las enzimas acrosomales (hialuronidasas, acrosina), estructuras nucleares (protamina, DNA-polimerasa) y estructuras del cuello (isoenzimas de la LDH, hoy conocida como LDH-C4).

c) Antígenos implicados en los procesos de fertilización: Entre estos antígenos, aislados en animales de experimentación, aquéllos que han demostrado un papel relevante en la unión del espermatozoide a la zona pelúcida del ovocito son el PH20 en el cobaya (Myles y cols., 1987; Primakoff y cols., 1985) y el RSA-1 en el conejo (O'Rand y cols., 1988).

El FA-1 (fertilization antigen 1) (Naz, 1988; Naz y cols., 1986) es un antígeno de naturaleza glicoproteica, que está presente a nivel de las células germinales del hombre y del ratón. Este antígeno fue identificado originariamente mediante el Ac. Mo. MA24 (Naz y cols, 1984). Se demostró que este Ac. Mo. es capaz de inhibir la penetración de los espermatozoides humanos en los ovocitos de hámster denudados (O'Rand, 1984a; O'Rand, 1984b) por la inhibición producida a nivel de la capacitación y de la reacción acrosómica (Kaplan y Naz, 1992).

Hasta hoy han sido demostradas varias moléculas en condiciones de reaccionar con autoanticuerpos o con anticuerpos monoclonales, estando la mayor parte de éstas, caracterizadas de forma insuficiente.

Snow y Ball (1992) han caracterizado varios antígenos de la superficie espermática, que parecen estar involucrados en el desarrollo de una esterilidad masculina. Estos autores han detectado por inmunoblotting la presencia de proteínas de 35kd, 40 a 45kd, 57kd, 66 kd y de 88 a 90 kd de peso molecular; asimismo, han caracterizado a la proteína de 88 kd como un antígeno espermático de la membrana plasmática, a la de 66 y a la de 34 Kd como proteínas de la membrana acrosómica, y a la de 35 kd como proteína de la cola. Shai y Naot (1992) identifican un antígeno proteico de 62 kd de peso molecular, mediante electroforesis, que se caracteriza por constituir el más importante de los antígenos que reaccionan con los AAE del semen de varones estériles.

Por otra parte, muchos investigadores han mostrado la existencia de cadenas de mono u oligosacáridos constituídas por D-manosa, D-galactosa y N-acetil-glucosamina fundamentalmente (Roeser y cols., 1988; Mori y cols., 1989; Ravid y cols., 1990; Wollina y cols., 1989a; Wollina y cols., 1989b) en la superficie del espermatozoide (membrana

acrosómica, segmento ecuatorial del acrosoma, áreas postacrosomales y cola) mediante el uso de lectinas conjugadas con fluoresceína. Estos mono u oligosacáridos terminales de la superficie espermática interaccionan con los AAE (Cooper y cols., 1991) y han sido involucrados en la unión y penetración de los espermatozoides por la zona pelúcida (Mori y cols., 1989; Wollina y cols., 1989b; Tesarik y cols., 1991; Ravid y cols., 1990). Igualmente, Kumar y cols. (1990) y Wollina y cols. (1989c) han implicado a estos oligosacáridos en el proceso madurativo que los espermatozoides sufren en el epidídimo, comprobando que los cambios estructurales de la membrana espermática conllevan también cambios de estos oligosacáridos (con un incremento de los terminales de N-acetil-glucosamina).

Existe una controversia acerca del origen de estos antígenos. Mientras unos investigadores defienden la teoría de que son intrínsecos al espermatozoide, otros postulan que forman parte de los denominados "sperm-coating", que se encuentran libres en el plasma seminal, y es en el momento de la eyaculación cuando entran en contacto con los espermatozoides.

La presencia de formas espermáticas anormales implica un cambio en la antigenicidad de los espermatozoides y células germinales inmaduras (Naz y cols., 1991; Kurspiz y cols, 1987). Esta anormalidad estructural puede inducir anticuerpos que se unen al espermatozoide, ocasionando un descenso de la capacidad fertilizante del eyaculado.

En la caracterización de los antígenos espermáticos se ha comprobado que una reacción autoinmune antiespermatozoide puede estar estimulada por varios antígenos, haciendo aún más compleja la identificación de un antígeno único correlacionado con la esterilidad masculina.

Actualmente, los antígenos espermáticos humanos se estudian mediante la técnica de los anticuerpos monoclonales y su caracterización bioquímica y funcional permitirá profundizar los aspectos patogénicos de la esterilidad inmunológica, además de contribuir a la puesta en marcha de vacunas con fines contraceptivos. Una posterior aplicación clínica de estos anticuerpos monoclonales consiste en la identificación de marcadores espermáticos asociados con la potencialidad fecundante del espermatozoide. En 1984, el WHO Monoclonal Antibody Workshop identificó una serie de anticuerpos monoclonales antiespermatozoie que reaccionan con antígenos espermáticos importantes desde el punto de vista funcional. Por ejemplo, el anticuerpo H316 parece unirse al acrosoma humano sólo cuando ha sido capacitado y puede, por lo tanto, ser empleado en la identificación de espermatozoides capacitados (Anderson y Johnson, 1986). Otros anticuerpos han sido asociados a fenómenos de aglutinación espermática; de inmovilización espermática complemento-dependiente como el H6-3C4 y el NUH2 (Tsuji y cols., 1988); de inhibición de la penetración del moco cervical; y de la penetración del ovocito de hámster. Es previsible que en poco tiempo, la puesta a punto de un grupo de tales anticuerpos, pueda ser aplicado clínicamente a la valoración funcional del eyaculado del sujeto estéril.

IV.- ESTERILIDAD COMO RESULTADO DE UNA RESPUESTA INMUNE CONTRA ANTIGENOS ESPERMATICOS.-

IV.1.- ESTERILIDAD MASCULINA.-

Como ya hemos señalado anteriormente, la capacidad antigénica del espermatozoide estimula la producción de AAE en ciertos individuos, ocasionando una esterilidad inmunológica. Igualmente, este fenómeno se ha observado en gran parte de los sujetos que se someten

a una vasectomía. La esterilidad de origen inmunológico afecta de un 10% a un 20% de las parejas diagnosticadas de esterilidad de causa desconocida (Jones, 1980, Menge y Behrman, 1979; Mathur y cols., 1981a; Witkin y cols., 1984).

El origen de los AAE, así como el mecanismo por el que éstos afectan a la fertilidad, está todavía por aclarar. Rümke (1954) fue el pionero en este estudio, al detectar AAE en dos varones estériles. Lo que parece estar claro, es que los AAE que se detectan en semen se producen como consecuencia de una respuesta local y/o sistémica. En el caso de esta última, los AAE alcanzan el tracto genital mediante la trasudación a través del testículo, epidídimo y/o próstata (Rabin y cols., 1977; Alexander y Tung, 1977; Alexander y Fulgham, 1978).

La necesidad de conocer el tipo de inmunoglobulina de los AAE, ha llevado a muchos investigadores a profundizar en el tema, obteniéndose resultados discrepantes. Así, Clarke y cols. (1985) y Francavilla y cols. (1988) han encontrado que los AAE más frecuentes en los espermatozoides son los del tipo Ig G (80-100% de los casos), seguidos de los del tipo Ig A, que se detectaron en una proporción que oscilaba entre el 40-50%. Por otro lado, Gonzales y cols. (1992b) han mostrado que la combinación de AAE más frecuente, que puede detectarse en los eyaculados de individuos estériles de origen inmunológico, es la formada por Ig G, A y M; mientras que Pattinson y Mortimer (1987) han demostrado que es la asociación Ig G e Ig A la que predomina en estos eyaculados, con una incidencia del 50%. Estas discrepancias conectarían con la polémica acerca de si la secreción local de Ig A en el semen va generalmente acompañada de la trasudación de Ig G. Mientras Francavilla y cols. (1988) defienden la idea de que en el 50% de los casos una respuesta local con Ig A en el eyaculado se asocia con la presencia de Ig G trasudada desde el suero; autores como Pattinson y Mortimer (1987) han compro-

bado que en aproximadamente un 15% de los eyaculados con AAE se detecta únicamente AAE tipo Ig A.

El origen de los AAE constituye igualmente un tema de controversia, del que queda hoy en día mucho por resolver. La Ig G es la inmunoglobulina predominante en sangre periférica y se interpreta como el resultado de un respuesta general primaria, después de una inoculación sistémica. Por otra parte, la Ig A es la inmunoglobulina de las superficies mucosas, constituyendo el marcador de una respuesta local (Uehling, 1971). Haas y cols. (1990) han observado que en un mismo eyaculado pueden existir AAE de distinto tipo y que, por tanto, ambas respuestas, local y general, ocurren contra un grupo común de antígenos localizados en los mismos espermatozoides. La demostración de un isotipo de inmunoglobulina concreto en un individuo implica que las respuestas inmunes, sistémica y local, ocurren independientemente. Mediante el análisis por citometría de flujo de las Ig G, se ha revelado el predominio de las Ig G_1 y Ig G_3. La Ig G_1 tiene capacidad de activar el complemento y la Ig G_3 es capaz de unirse a los receptores Fc de las células inmunorreguladoras, lo que sugiere que estas Igs están involucradas en las secuelas patológicas de la esterilidad inmunológica por factor masculino mediada por anticuerpos. Mientras que algunos investigadores proponen que la mayoría de los AAE llegan al semen por trasudación desde el suero (Rümke y Hellinga, 1959; Shulman, 1986; Kremer y Jager, 1992; Rümke, 1974), otros autores defienden la posibilidad de que exista una secreción local de estas inmunoglobulinas, ya que algunos individuos tienen AAE en sus eyaculados y no en el suero. Así, Friberg (1974) y Kremer y Jager (1992) han sugerido la producción local de la Ig A por el epidídimo, encontrando que la Ig A es el tipo de AAE más frecuente en los eyaculados que presentan sólo un tipo de AAE.

El estudio de la Ig A ha demostrado el predomino de la Ig A_1 (Haas

y cols, 1990). Kremer y Jager (1980) proponen que los anticuerpos tipo Ig A presentes en el semen son los responsables de inmovilizar los espermatozoides a los que se han adherido y reducir su penetración en el moco cervical. Estas Ig A se unen mediante su pieza secretora a las glicoproteínas del moco cervical. Es importante destacar que, además de su diferente origen y mecanismo de acción, los AAE poseen diferente pronóstico, ya que se ha demostrado que los de tipo Ig A afectan más a la penetración del espermatozoide por el moco cervical (Wang y cols., 1985), y que los individuos varones con más del 80% de espermatozoides móviles unidos a AAE tipo Ig A (Clarke y cols., 1985) han ocasionado medias de fertilización dentro de un programa de FIV muy pobres.

En lo que se refiere a los AAE tipo Ig M, tampoco existe un acuerdo en los diferentes estudios realizados hasta el momento. Mientras que algunos autores no han detectado esta inmunoglobulina en el semen (Rümke, 1974; Clarke y cols., 1985; Francavilla y cols., 1988), - explicando este hecho por ser la Ig M una molécula de gran tamaño, que no puede ser trasudada -; otros consideran que no sólo está presente, sino que constituye un indicador de mala calidad seminal (Gonzales y cols., 1992b).

La asociación de AAE y esterilidad ha sido sugerida por diferentes investigadores (Alexander y Anderson, 1987; Clarke y cols., 1988; Matson y cols., 1988), pero el efecto de los AAE en la calidad del semen y, consecuentemente en la esterilidad masculina, es un tema controvertido. La mayoría de las evidencias sugieren que estos anticuerpos empeoran la función reproductora del espermatozoide. Así, la presencia de AAE se asocia con una disminución de la incidencia de los tests post-coitales buenos y una reducción de la fertilización de los ovocitos humanos (Matson y cols., 1988). Algunos autores sugieren la influencia negativa de los AAE sobre la motilidad espermática (Mathur y cols.,

1986; Barratt y cols., 1989), mientras otros observan que no existe relación entre los AAE y la motilidad de los espermatozoides (Cerasaro y cols., 1985; Adeghe y cols., 1989).

Se ha sugerido que los diferentes isotipos de los AAE pueden producir distintos efectos sobre la función espermática. Por ejemplo, el transporte espermático puede ser limitado por todas las inmunoglobulinas, pero la Ig A parece ser la más inhibidora (Parslow y cols., 1985); por otra parte, el complemento fijado a la Ig G y a la Ig M interfiere con la capacitación y con la reacción acrosómica (Bronson y cols., 1984), mientras que la presencia de Ig A e Ig G afecta a la fertilización (Matson y cols., 1988). Gonzales y cols. (1992a) han encontrado que la presencia de AAE en el eyaculado se asocia con alteraciones de algunos parámetros seminales, principalmente con baja concentración de espermatozoides, disminución de las formas espermáticas normales y niveles de fructosa descendidos. Sin embargo, otros autores no asocian la presencia de AAE con alguna alteración seminal (Cerasaro y cols., 1985; Haas y cols., 1983; Clarke y cols., 1985).

En resumen, podemos decir que existen varios mecanismos por los cuales los AAE en un eyaculado interfieren en el proceso de la reproducción:

1º.- Interferencia con la motilidad espermática y la penetración del moco cervical (Menge y Beitner, 1989; Rümke y Hellinga, 1959).

2º.- Lisis del espermatozoide unido al anticuerpo por la activación del complemento (Beer y Neaves, 1978) y fagocitosis por los leucocitos de los espermatozoides opsonizados (Austin, 1960; Moyer y cols., 1970).

3º.- Interferencia con la capacitación espermática (Beer y Neaves, 1978) y con la reacción acrosómica (Bandoh y cols., 1992).

4º.- Bloqueo de la interacción del ovocito-espermatozoide (Haas y cols., 1980; Menge y Black, 1979), por la reducción de la unión del espermatozoide y la disminución de la penetración de éste a través de la zona pelúcida (Yanagimachi y cols., 1976; Kamada y cols., 1985).

5º.- Aumento de la incidencia de abortos por persistencia de los antígenos espermáticos en la unidad placentaria, afectando la unión antígeno-anticuerpo al desarrollo del embrión; alteración en la descondensación del DNA y fusión de los pronúcleos masculino y femenino en la fecundación (Jones, 1976; Menge y cols., 1982; O'Rand, 1977).

IV.2.- ESTERILIDAD FEMENINA.-

El despistaje de una eventual esterilidad de base inmunológica debe ser tomado en consideración, especialmente en las mujeres con esterilidad de causa desconocida. Las características antigénicas del eyaculado son ya de todos conocidas y producen igualmente sus efectos en la mujer originando, en muchos casos, la producción de AAE (Livi y cols., 1990), tanto a nivel local como general, que da lugar a parejas estériles. Hay evidencias de que el sistema inmune femenino puede regular respuestas frente a los antígenos presentes en el eyaculado. Se ha comprobado un aumento en el peso de los ganglios linfáticos en ratones hembras cuando han sido expuestos a espermatozoides (Beer y Billingham, 1978); así como un incremento en la producción de γ-interferón por los linfocitos de mujeres con AAE circulantes (Witkin y Chaudhry, 1989).

Debemos además considerar, cómo y a qué nivel del tracto

reproductor femenino, pueden los AAE obstaculizar o impedir la fecundación.

Repetidas inoculaciones intravaginales de millones de espermatozoides no se asocian, en general, al desarrollo de una aloinmunización antiespermática tal, como para poder alterar la fertilidad. La reducida capacidad de la vagina de reaccionar a la eventual estimulación inmunógena del líquido seminal es debida al limitado número de células plasmáticas presentes a nivel del epitelio vaginal (Tourville y cols., 1970). Han sido documentadas respuestas alérgicas tipo Ig E mediadas a nivel vaginal con sintomatología que van desde vulvovaginitis a graves reacciones anafilácticas. Los tests de sensibilidad cutánea han confirmado que no se trata de una reacción aloinmune, sino de una atopía a algunos componentes del plasma seminal. Es necesario recordar que la vagina no posee estructuras glandulares (excepto las glándulas de Skene y Bartolino) capaces de inducir una respuesta inmune local vía Ig A secretora. Al contrario, todas estas condiciones se verifican a nivel del canal cervical que, precisamente por la característica de "amígdala" genital, parece ser el sitio privilegiado para el desencadenamiento de una aloinmunización antiespermatozoide. Podrían actuar como factores desencadenantes, ya sea modificaciones del gameto masculino, -aumento del poder antigénico o reducción de las sustancias inmunosupresoras presentes en el plasma seminal-, o fenómenos adyuvantes del tracto genital femenino, (inflamación, microtraumatismos, ...).

Por otro lado, uno de los sitios en los que mayormente se ha demostrado la interferencia de los anticuerpos sobre los espermatozoides, es el propio canal cervical y, en particular, sus secreciones, el moco cervical. El estudio in vivo de la interacción espermatozoide-moco cervical es comúnmente efectuado a través del test postcoital, que puede

proporcionar datos indirectos acerca de la presencia de AAE a nivel del moco cervical mismo (Moghissi, 1977; Arastey y cols., 1985). Este test debe necesariamente ser programado en el período peri-ovulatorio, dada la función de válvula biológica que el cuello uterino y sus secreciones desarrollan sobre el transporte y sobre la vida espermática en el tracto reproductor femenino.

Thompson y cols. (1991) han comprobado una elevación en el número de los leucocitos en muestras de moco cervical postinseminación, a expensas de los macrófagos, linfocitos CD4(+) y especialmente de los neutrófilos. Estos últimos comprenden el 80% de la población leucocitaria en este caso, lo que sugiere una función de "aclaramiento" de espermatozoides no aptos para la fecundación por estas células.

Los cuadros más comunes en presencia de AAE encontrados en el examen del test postcoital son:

a) Presencia de numerosos espermatozoides con un elevado porcentaje de movimientos vertiginosos no progresivos.

b) Presencia de un número relativamente bajo de espermatozoides inmóviles o con pobre movilidad, en contraste con una óptima concentración de espermatozoides móviles en el eyaculado del compañero.

La explicación del primer fenómeno denominado "shaking phenomenon", supone un tipo de unión por la cual las inmunoglobulinas se adhieren, por un lado, al componente gel del moco cervical mediante el fragmento cristalizable (Fc), y por el otro, reaccionan con los antígenos espermáticos a través del Fab. Se ha demostrado la presencia de receptores para el Fc de las Igs. en las moléculas glicoproteicas del moco cervical.

El segundo cuadro postcoital, antes descrito (hipomotilidad espermática), encuentra su explicación en la activación del complemento del moco cervical después de la reacción antígeno-anticuerpo. Cuando una molécula inmunoglobulínica se une a la superficie espermática está en condiciones de activar al complemento, produciéndose la unión del primer componente del complemento C1 sobre el complejo célula-inmunoglobulina. El sucesivo estímulo de la cascada del complemento puede inducir alteraciones estructurales de la superficie espermática involucrada en la unión de las inmunoglobulinas y, en definitiva, la pérdida de motilidad.

Si estos cuadros patológicos representan una válida indicación para la investigación de los AAE, un test postcoital normal no puede excluir su presencia. En efecto, la producción de anticuerpos locales a nivel cervical puede ser un fenómeno transitorio; además los anticuerpos séricos pueden, por trasudación, estar presentes en un nivel más alto del tracto reproductor (fluido endometrial, tubárico, folicular y peritoneal) y explicar una esterilidad. Los AAE son, por lo tanto, investigados siempre, aún en el campo femenino, no sólo a nivel del moco cervical, sino a nivel sérico.

Menge y Beitner (1989) han confirmado que mujeres con AAE en suero y en el moco cervical sufren un empeoramiento de la penetración del moco por los espermatozoides; así como Kremer y Jager (1992) han demostrado la inhibición de esta penetración y la consecuente migración a través del tracto reproductor femenino por las células espermáticas, a causa de AAE, tanto adheridos a la superficie de los espermatozoides, como presentes en el moco cervical.

Los AAE en el tracto reproductor femenino son el resultado de una trasudación desde el suero o de una producción local. Wira y Sullivan

(1984; 1985) han examinado la influencia de las hormonas sexuales en los niveles de Ig G e Ig A en las regiones cérvico-vaginales y uterinas de ratas ovariectomizadas. La administración de estradiol produjo un descenso cervico-vaginal de Ig A e Ig G. La progesterona descendió igualmente los niveles de Ig A. Por el contrario, los estrógenos han inducido un aumento de los AAE en el útero y una disminución por acción de la progesterona. El hecho de que los estrógenos ejerzan efectos opuestos en cada región del aparato reproductor femenino, indica la influencia hormonal a la hora de responder frente a los antígenos espermáticos. Schumacher (1980) demostró en monos que los AAE varían tanto en las secreciones tubáricas como en el moco cervical a lo largo del ciclo reproductor.

La acción de los AAE sobre la implantación ha sido estudiada por Menge y cols. (1974), quienes inmunizaron por vía sistémica y por inoculaciones intravaginales a conejos hembras mediante semen de conejos machos. Ellos observaron que los AAE tipo Ig A se unían a los blastocitos e inhibían su desarrollo.

V.- MECANISMOS PROTECTORES DEL ESPERMATOZOIDE EN EL TRACTO GENITAL MASCULINO.-

En el individuo sano es probable que los fenómenos autoinmunes contra los espermatozoides sean prevenidos por la combinación de factores fisiológicos y anatómicos, tales como la barrera hemato-testicular; la falta de expresión de antígenos HLA por las células germinales; y la presencia de determinados tipos celulares, así como la producción local de factores inmunosupresores, que ahora comentaremos. Estos mecanismos juegan un papel fundamental en el mantenimiento de un estado de tolerancia inmunológica frente a los determinantes antigénicos del espermatozoide, que hacen posible que la célula germinal

exprese su potencial fecundante y que puede llevar a cabo el proceso de la fecundación.

Importantes evidencias sostienen la hipótesis de que los espermatozoides son antigénicamente extraños para el huésped y que la espontánea formación de AAE es una reacción contra antígenos extraños y no representa el clásico fenómeno autoinmune. De especial relevancia es la observación de que los animales de sexo masculino producen AAE si son sistemáticamente inoculados con sus propios gametos (Freund y cols., 1953).

V.1.- LA BARRERA HEMATO-TESTICULAR.-

Estas células están ancladas por un lado a la membrana basal del túbulo seminífero y se extienden en sentido radial hacia la luz del túbulo. La parte intratubular de la célula de Sertoli posee prolongaciones citoplasmáticas que circundan las células germinales. Estas células además de poseer un efecto nutritivo sobre los gametos masculinos, parecen destinadas a aislar el ambiente intratubular (barrera hemato-testicular) (Tung, 1980). En efecto, las 50 ó 60 uniones firmes (tigh junctions) que existen entre cada par de células de Sertoli forman aquello que ha sido definido por Friend y Gilula (1972) como la más eficiente barrera tisular del organismo. Esta barrera ha sido descrita clásicamente como capacitada para prevenir el contacto de cantidades significativas de antígenos espermáticos con las células inmunocompetentes, y para bloquear los linfocitos y los anticuerpos, impidiendo el ingreso a nivel de los túbulos seminíferos que contienen espermatozoides maduros. Esta barrera tiene la capacidad de dejar pasar pequeñas cantidades de antígenos espermáticos solubles en el huésped. Las pequeñas dosis tendrían la capacidad de estimular los linfocitos T supresores, induciendo un estado de tolerancia inmunológica.

La elevada incidencia de AAE en individuos vasectomizados es debida a las lesiones traumáticas de los vasos que a este nivel supone la intervención quirúrgica, ocasionando, de este modo, una solución de continuidad en la barrera hemato-testicular (Pedersen y cols., 1987). No obstante, existen grandes lagunas en el conocimiento de la patogénesis de la esterilidad inmunológica masculina. Algunos individuos vasectomizados no presentan AAE (Linnet, 1983), mientras que en determinados sujetos estériles pueden detectarse AAE sin historia de extravasación espermática a través de la barrera hemato-testicular (Jones, 1982).

Por otra parte, Patrizio y cols. (1989) demostraron que las paredes de los conductos deferentes actúan complementando la barrera hemato-testicular, al comparar los niveles de AAE que existían en un grupo de sujetos con ausencia congénita de vasos deferentes con los individuos vasectomizados. Ellos encontraron la baja incidencia de AAE en el primer grupo con respecto al segundo, ya que en la ausencia congénita de vasos deferentes se produce secundariamente una hipertrofia de la musculatura de las paredes de los conductos deferentes, que evita la exposición inmunológica de los espermatozoides y la consecuente producción de AAE.

Sin embargo, Yule y cols. (1988) han encontrado en ratones espermatocitos en fase de preleptotene y espermatogonias fuera de la barrera hemato-testicular, que expresan autoantígenos accesibles a los anticuerpos circulantes. Este hallazgo plantea la posibilidad de que coexistan varios mecanismos protectores del espermatozoide, ya que los autoantígenos testiculares no serían completamente secuestrados al ser inmunológicamente incompleta la barrera hemato-testicular. Yule y cols. (1988) demuestran la formación de depósitos de inmunocomplejos

formados por espermatozoides e inmunoglobulinas del tipo Ig G (Ig G_1 e Ig G_3) en el 40% de los túbulos seminíferos de ratones inmunizados con extractos testiculares, coincidiendo con determinadas etapas de la espermatogénesis, por lo que se podría deducir que la expresión de los autoantígenos es específica para cada etapa.

Por lo tanto, es posible que los autoantígenos espermáticos entren en contacto con las células del sistema inmune por ser la barrera hemato-testicular incompleta. Para evitar esto, una inmunorregulación local mediada por diversos mecanismos protectores de los espermatozoides, no sólo la barrera hemato-testicular, ha sido propuesta. Veamos en qué consiste dicha inmunorregulación.

V.2.- FALTA DE EXPRESION DE ANTIGENOS HLA POR LAS CELULAS GERMINALES.-

Como ya hemos comentado anteriormente, la expresión de antígenos del sistema HLA por los espermatozoides es un tema controvertido, ya que al contrario de lo que se venía aceptando, recientes investigaciones (Schaller y cols., 1993) han demostrado la falta de expresión de estos antígenos por las células espermáticas. Esto sugiere que un importante mecanismo protector del espermatozoide existe a este nivel, suprimiendo así, la respuesta inmune contra dichas células, tanto en el aparato reproductor masculino, como en el femenino.

Asimismo, algunos autores (Anderson y cols., 1984; Natali y cols., 1984; Kurspiz y cols., 1987; Pöllämen y cols., 1987; Wolff y Anderson, 1988; Jassim y cols., 1989; Kowalik y cols., 1989; El-Demiry y cols., 1987) han comprobado que las células germinales inmaduras de eyaculados de individuos fértiles no expresan antígenos de HLA de clase I ni de clase II. Esta falta de expresión no puede ser explicada por el enmascaramiento

de estos antígenos por alguna de las sustancias inmunosupresoras presentes en el líquido seminal -efecto masking-, ya que se ha comprobado que otras células existentes en los eyaculados, -tales como los leucocitos-, expresan estos antígenos (Wolff y Anderson, 1988; Jassim y cols., 1989), y que pueden ser igualmente detectados en las células germinales inmaduras de muestras de semen de individuos oligo o azoospérmicos (Kurspiz y cols., 1987).

La falta de expresión de los antígenos del sistema HLA por las células germinales inmaduras de los eyaculados puede contribuir a la característica de "lugar inmunológicamente privilegiado" que posee el testículo (Head y Billingham, 1985). Como es de todos conocido, las células germinales son autoantigénicas (Yule y cols., 1988; Jassim y Festenstein, 1987) y la ausencia de expresión de dichos antígenos, probablemente, protege a estas células de la destrucción por los linfocitos CD8 existentes a este nivel. Algunos autores han descrito a nivel testicular varias moléculas moduladoras, que suprimen la expresión de los antígenos del sistema HLA. Tal es el caso del factor de crecimiento epidérmico (EGF), que es segregado en ratas por las células de Sertoli (Tsutsumi y cols., 1986; Schreiber y cols., 1984).

De todo ello, se desprende la posibilidad de que en eyaculados de individuos estériles pueda existir una alteración de este mecanismo protector de los espermatozoides, induciéndose, de este modo, una respuesta inmune contra éstos.

V.3.- INMUNORREGULACION.-

V.3.1.- EL TESTICULO COMO LUGAR INMUNOLOGICAMENTE PRIVILEGIADO.-

Determinados órganos de nuestra economía permiten largas supervivencias de aloinjertos (Barker y Billingham, 1977). Entre estos órganos se encuentran el cerebro y el ojo, caracterizados ambos por su pobre drenaje linfático (Barker y Billingham, 1968). Head y cols. (1983) han presentado evidencias de que el testículo es un lugar inmunológicamente privilegiado, a pesar de su excelente drenaje linfático.

La ruta de la inmunización testicular no es, por sí misma, inmunosupresora. Células alogénicas inyectadas en el testículo, acceden a los vasos linfáticos de la zona, induciendo una respuesta inmune en el huésped (Head y cols., 1983). Por lo tanto, el patrón linfático de los testículos es funcionalmente capaz de producir una respuesta inmune contra el espermatozoide.

La prolongada supervivencia de un aloinjerto en el seno de este órgano sugiere la existencia de factores locales con acción inmunosupresora, que interfieren en el procesamiento de los antígenos a este nivel, por unión de estos factores a los antígenos de membrana o induciendo inmunosupresión por otros mecanismos (Stites y Erickson, 1975).

Algunos mecanismos han sido propuestos para explicar la pobre respuesta inmunológica contra un injerto en el testículo, entre los cuales se encuentran: 1) presencia de agentes antiinflamatorios en el ambiente testicular, dado que una respuesta inflamatoria es propia de un rechazo; 2) las temperaturas más bajas existentes en el testículo; 3) escaso número

de células presentadoras de antígenos; 4) factores inmunosupresores presentes en el líquido seminal, inducidos en muchos casos por las células espermáticas (Hurtenbach y Shearer, 1982); 5) presencia de altos niveles de esteroides sintetizados localmente, alguno de los cuales son inmunosupresores (Pavia y cols., 1979).

Estos tres últimos mecanismos han sido estudiados como realmente relevantes dentro de la inmunorregulación a nivel del aparato reproductor masculino, habiéndose demostrado que el resto carece de importancia (Head y Billingham, 1985). En cuanto al posible descenso de células presentadoras de antígenos, que en algunos órganos, como el cerebro, contribuyen al mantenimiento de un estado inmunológicamente privilegiado, Head y Billingham (1985) han demostrado, sin embargo, la presencia de macrófagos en el intersticio testicular, que evidencian el procesamiento de antígenos a este nivel.

V.3.2.- EFECTOS INMUNOSUPRESORES DEL LIQUIDO SEMINAL.-

El líquido seminal contiene una serie de elementos que, por una parte, han sido descritos como esenciales para facilitar el proceso de la fertilización (enzimas, fructosa, zinc, fosfolipasas...), y por otra, como protectores del espermatozoide ante el daño inmunológico que puede sufrir, tanto en el aparato reproductor masculino, como en el femenino tras el coito.

La prevención de la respuesta inmune contra el espermatozoide es muy importante en el desarrollo de la reproducción. Para poderla estudiar se han desarrollado tests de función inmune a los que se ha añadido líquido seminal, inhibiéndose las actividades de la mayoría de las células que participan en la respuesta inmunológica y en la defensa

del huésped, tales como linfocitos T (Marcus y cols., 1978; Prakash y Lang, 1980; Lord y cols., 1977; Lewis y cols., 1976; Franken y Slabber, 1981; Mathur y cols., 1980; Mathur y cols., 1981b); B (Prakash y Lang, 1980; Anderson y Tarter, 1982; Lord y cols, 1977; Lewis y cols., 1976); células NK (Vallely y cols., 1988); macrófagos (Chvapil y cols., 1977; James y cols., 1983; Stankova y cols., 1976) ; y granulocitos (Peterson y cols., 1980).

Analicemos diferentes aspectos de esta inmunosupresión.

V.3.2.1.- VIABILIDAD CELULAR.-

El plasma seminal a altas concentraciones se caracteriza por ser linfocitotóxico (Prakash y cols., 1976; Allen y Roberts, 1986). El efecto tóxico del plasma seminal radica en su contenido de poliamino-oxidasa (PAO), una enzima que oxida la espermina y la espermidina, presentes a altas concentraciones en el semen, para producir un compuesto aldehíhico muy tóxico. El fraccionamiento del plasma seminal permite separar factores inmunosupresores de citotóxicos, - los de peso molecular más elevado no contienen PAO, por lo que son inmunosupresores -.

V.3.2.2.- PROLIFERACION CELULAR.-

Tras la activación por un antígeno o por un mitógeno, macrófagos y linfocitos segregan monoquinas y linfoquinas que estimulan la proliferación. Se ha demostrado que el plasma seminal ejerce efectos antiproliferativos tras la activación linfocitaria (Anderson y Tarter, 1982). Varios componentes del líquido seminal como las prostaglandinas, poliaminas y proteína plasmática A asociada al embarazo, han sido demostrados como supresores de la proliferación de linfocitos. Empleando la cromatografía del plasma seminal sobre columna de Sephadex G

100, se obtuvo la separación de 5 fracciones distintas (Marcus y cols., 1978). La mayor actividad inmunosupresora fue evidenciada por las fracciones 1 y 3, concluyendo que la inhibición de la transformación blástica que tiene lugar por el semen puede ser debida a que los factores seminales son capaces de unirse a los receptores de los linfocitos específicos para los mitógenos (PHA-M y Con-A), como ya habían apuntado Stites y Erickson (1975).

Igualmente autores como Lord y cols. (1977) han mostrado que el plasma seminal inhibía la generación de linfocitos T citotóxicos en un cultivo mixto de linfocitos; y Turner y cols. (1990) han encontrado que el semen inhibe la destrucción de las células infectadas por el virus de Epstein-Barr por las células T citotóxicas. Esto indica que el plasma seminal puede afectar la capacidad de los linfocitos para reconocer antígenos extraños.

V.3.2.3.- CELULAS NATURAL KILLER.-

La capacidad de las células NK para el reconocimiento de las células diana, - células tumorales o infectadas por un virus -, es inhibida dramáticamente por el plasma seminal (Vallely y cols., 1988). Tarter y cols. (1986) han demostrado que la 19-OH-progesterona detectada en el semen es la responsable de esta inhibición. La disminución por el plasma seminal de los mecanismos de defensa del huésped podría contribuir al desarrollo de enfermedades de transmisión sexual y neoplasias.

V.3.2.4.- EFECTOS ANTICOMPLEMENTO.-

El plasma seminal ha mostrado un acción de supresión de la lisis ejercida por el complemento - muerte de bacterias dependiente del complemento mediada por anticuerpos -. Los factores inhibidores del

complemento se han detectado en la próstata de ratones y monos, pero parecen estar presentes en todo el tracto reproductor masculino (Tarter y Alexander, 1984). Estos factores tienen un peso molecular bajo y posiblemente pertenezcan al grupo de las proteasas (Hess y Marcus, 1980). Peterson y cols. (1980) han comprobado que la adición de plasma seminal disminuía la actividad funcional del complemento (C1 y C3) en más del 50% e inhibía la vía alternativa. Componentes del complemento han sido detectados en el trato reproductor femenino, por lo que los inhibidores del complemento presentes en el plasma seminal podrían servir para proteger a los espermatozoides de la lisis mediada por los anticuerpos. La presencia de tales factores en el aparato reproductor masculino y, por tanto, en el tracto reproductor de mujeres sexualmente activas inhibiría los mecanismos de la inmunidad humoral natural que eliminan los microorganismos causantes de posibles infecciones.

V.3.2.5.- FUNCION DE FAGOCITOSIS.-

El líquido seminal ha mostrado la capacidad de inhibir la opsonización de las bacterias gram negativas por los leucocitos (Brooks y cols., 1981; Stankova y cols., 1976; James y cols., 1983)). Parece que el mecanismo productor de este efecto se basa en la inhibición de la unión del anticuerpo a los receptores Fc de los fagocitos. En este caso el plasma seminal afectaría los receptores Fc de macrófagos o monocitos, granulocitos y células NK. Igualmente, suprime la generación de radicales de oxígeno, imprescindibles en la muerte de microorganismos internalizados (Stankova y cols., 1976; James y cols., 1983; Peterson y cols., 1980)).

V.3.2.6.- ENMASCARAMIENTO DE LOS ANTIGENOS ESPERMATICOS (EFECTO MASKING).-

La supresión de las respuestas inmunológicas frente a los antígenos espermáticos por el plasma seminal puede producirse por el "enmascaramiento" de los antígenos de los espermatozoides, empeorando su reconocimiento por las células inmunocompetentes (Prakash y Lang, 1980; Anderson y Tarter, 1982; Mukherjee y cols., 1983). Este fenómeno se denomina efecto "masking" y puede resultar de la acción de enzimas endógenas (Anderson y Tarter, 1982) o de cambios conformacionales por la interacción de proteínas. En este sentido, hay que destacar el papel de la lactoferrina, que se origina en las vesículas seminales y que se une a la superficie del espermatozoide durante el tránsito epididimario (Hekman y Rumke, 1969); o el de la transglutaminasa del plasma seminal, que parece interaccionar con componentes de la superficie espermática, induciendo cambios conformacionales (Mukherjee y cols., 1983).

V.3.2.7.- RELEVANCIA CLINICA DE LA INMUNOSUPRESION EJERCIDA POR EL LIQUIDO SEMINAL.-

La inmunosupresión que el líquido seminal ejerce, se considera fundamental para que se lleve a cabo el proceso de la reproducción. Esta previene la destrucción de los espermatozoides en el tracto reproductor masculino y minimiza la sensibilización contra las células espermáticas en el aparato reproductor femenino tras el coito. Pero este beneficio contrae un riesgo, ya que en determinados cuadros clínicos las propiedades inmunosupresoras del semen pueden ser relevantes. Así, algunas enfermedades de transmisión sexual, tales como gonorrea, sífilis y uretritis inespecíficas (de Simone y cols., 1988; Cardoso y cols., 1992); infecciones crónicas del tracto urinario; y cervicitis, podrían ser

inducidas por los efectos inmunosupresores del plasma seminal que impedirían los mecanismos normales de defensa, incluyendo anticuerpos e inmunidad celular. Se ha comprobado (Turner y cols., 1990) que el plasma seminal a bajas concentraciones inhibe la respuesta de los linfocitos T citotóxicos frente a la infección del virus de Epstein-Barr, por lo que la replicación viral se vería facilitada en el cérvix de la mujer infectada. El fluído prostático ejerce efectos inmunosupresores locales tales, que se crean las condiciones óptimas para que prostatitis y epididimitis se cronifiquen y se vuelvan resistentes al tratamiento. También ha sido comentado anteriormente, el efecto de los AAE en el caso de que un déficit de las propiedades inmunosupresoras del líquido seminal tenga lugar, dando lugar a una esterilidad masculina y/o femenina inmunológica. En cuanto a las enfermedades tumorales, hay que resaltar el papel "facilitador" que el líquido seminal podría desarrollar en los tumores, - debido a su efecto inhibidor sobre las células NK y macrófagos - (James, 1984; McClean y cols., 1983), prostáticos o de cérvix y útero en el caso de la mujer, debido a las características inmunosupresoras que el semen posee. Por último, habría que resaltar la importancia del semen en la patogénesis del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), ya que cuando el líquido seminal es absorbido por vía rectal a través del intestino, se produce un pico plasmático al cabo de 2 horas (Alexander y cols., 1986), que propiciaría aún más la supresión de las respuestas inmunológicas del individuo afecto por el SIDA.

V.3.3.- CELULAS.-

El estudio de la inmunorregulación a nivel del tracto reproductor masculino ha sido dividido en dos apartados: 1) análisis de los tipos celulares que contribuyen a la protección inmunológica del espermatozoide; y 2) estudio de los factores presentes en los eyaculados

o segregados por cualquiera de los órganos del aparato reproductor masculino, que inducen la inmunosupresión que caracteriza al líquido seminal. Veamos en este apartado el papel de los diferentes tipos celulares.

V.3.3.1.- CELULAS DE LEYDIG.-

Las células de Leydig se encuentran adyacentes a los macrófagos testiculares (Connell y Christensen, 1975; Wing y Lind, 1977; Miller y cols., 1983; Niemi y cols., 1986). Poseen uniones inespecíficas con las membranas de los linfocitos y macrófagos (Rivenzon y cols., 1974; Born y Wekerle, 1981). Las excrecencias de la membrana plasmática de las células de Leydig se insertan a menudo en las invaginaciones de la membrana de los macrófagos (Miller y cols., 1983). Ha sido comprobado que estas células inhiben la proliferación de los linfocitos inducida por mitógenos (Born y Werkele, 1981).

La destrucción de estas células por etano-dimetil-sulfonato produce una reducción del tiempo de supervivencia de un injerto en el testículo, mientras que la destrucción de los macrófagos por dióxido de silicio (Huhtaniemi y cols., 1986) no afecta al tiempo de supervivencia de éste, indicando el relevante papel que las células de Leydig juegan en la supervivencia de los transplantes a este nivel (Maddocks, 1987).

V.3.3.2.- CELULAS DE SERTOLI.-

Whitmore y cols. (1985), de Cesaris y cols. (1986) y Wyatt y cols. (1988) han propuesto la actividad inmunosupresora de las células de Sertoli. Esta actividad se caracteriza por la supresión de la síntesis de DNA, RNA y proteínas por linfocitos de bazo de ratón estimulados y de la proliferación de líneas celulares linfoides y no linfoides de varias

especies de animales.

Las células de Sertoli, al igual que las células germinales, no expresan antígenos del CMH de clase I (Pöllamen y Niemi, 1987; Pöllämen y Maddocks, 1988) ni de clase II (Head y Billingham, 1985; Pöllämen y Niemi, 1987). La falta de expresión de estos antígenos probablemente protege a éstas células de la destrucción por los linfocitos CD8.

Asimismo, como ya se ha comentado anteriormente, las "tigh junctions" que existen entre las células de Sertoli (Dym y Fawcett, 1970), - barrera hemato-testicular -, excluyen a las moléculas de alto peso molecular, - incluso a la Ig G - (Johnson, 1972), de la luz de los túbulos seminíferos, por lo que previenen el desarrollo de reacciones inmunológicas mediadas por anticuerpos dirigidos contra los autoantígenos de las células espermáticas.

V.3.3.3.- LINFOCITOS Y OTRAS CELULAS DEL SISTEMA INMUNE.-

Recientes investigaciones evidencian que los linfocitos T supresores propician un ambiente de inhibición de respuestas inmunológicas contra el espermatozoide y autoantígenos testiculares. Orquitis autoinmunes severas y altos títulos de AAE en suero se desarrollan en ratones de 3 a 4 meses, después de la timectomía realizada en el tercer día del nacimiento. La explicación de este hecho ha sido propuesta por Taguchi y Nishizuka (1981; 1987) y Sakaguchi y cols. (1985). Se basa en el descenso de linfocitos T supresores que se produce con la extirpación del timo, que inhiben y/o regulan la activación de los linfocitos T autorreactivos (linfocitos CD4 helper), induciéndose la producción de orquitis autoinmune.

Asimismo, se ha comprobado que cuando los linfocitos T supresores son selectivamente eliminados del bazo de ratones experimentales inmunizados con espermatozoides, la inducción de la orquitis autoinmune es la regla y que la dosis de células esplénicas para prevenir la orquitis en los ratones machos normales es 10 veces menor que en los orquiectomizados. Estos hallazgos (Alexander y cols., 1987) sugieren que linfocitos T supresores son activados por autoantígenos de los testículos.

Algunas investigaciones han sido realizadas acerca de la producción de epididimitis en ratones NZB. Este hecho merece especial mención, ya que la epididimitis en estos animales de experimentación no es, sino la primera manifestación de una orquitis autoinmune de la timectomía sufrida por el ratón al tercer día; así como la expresión de un defecto en el número y función de los linfocitos T supresores de fenotipo Ly123+, que son los responsables de ejercer un feed-back negativo sobre los linfocitos T helper. De esto último se desprende que, con este defecto de linfocitos T supresores, se origina una disminución en la inhibición de los linfocitos T helper, induciéndose la epididimitis.

Del mismo modo, formas de prostatitis autoinmune post-timectomía (Taguchi y cols., 1985), caracterizadas por pérdida de secreción del órgano, infiltrados linfocitarios y anticuerpos antipróstata circulantes, han sido inducidas en ratones experimentales en los que los antígenos aparecían en el proceso de maduración de la próstata; al igual que un incremento en el número de linfocitos T4 y un descenso de los linfocitos T8 ha sido detectado en ciertas enfermedades autoinmunes, tales como la uveorretinitis autoinmune experimental y la encefalomielitis autoinmune experimental (Calder y Lightman, 1992).

Por tanto, los linfocitos T supresores son, probablemente, el instrumento para el mantenimiento de la tolerancia inmunológica hacia el espermatozoide y hacia los autoantígenos testiculares. A causa de que estos antígenos aparecen en la pubertad, son reconocidos como elementos extraños por los linfocitos maduros, y son los linfocitos T supresores los responsables de inhibir la respuesta inmune contra el espermatozoide.

En biopsias humanas de testículo, epidídimo, vasos deferentes, próstata y vesículas seminales (El-Demiry y cols, 1987; El-Demiry y cols., 1988) se han encontrado preferentemente linfocitos T. Sin embargo, estas células no se han detectado en la porciones periféricas del testículo. Mientras que el fenotipo supresor/citotóxico de los linfocitos T (CD3 CD8) era más abundante en las zonas intraepiteliales, en el compartimento intersticial era el fenotipo helper/inducer (CD3 CD4) el que predominaba. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Ritchie y cols. (1984) y Fritz y cols. (1989), que ya comprobaron el predominio de linfocitos CD3 CD8 supresores/citotóxicos en las áreas intraepiteliales de testículo y epidídimo humanos. La localización de estas células en el epitelio del tracto reproductor masculino y el defecto de los linfocitos T helper inducer a este nivel, sugiere que esta población celular funciona como "secuestradora" de espermatozoides y antígenos espermáticos y previene su paso a la circulación general, complementando, así, el papel de la barrera hemato-testicular. Los estudios de Ritchie y cols. (1984) han demostrado que la subpoblación de linfocitos CD3 CD8 presente en el epitelio del epidídimo constituye un mecanismo celular que limita el desarrollo de una respuesta inmune contra los autoantígenos de los espermatozoides. Esto puede ser de particular importancia en los casos en los que la barrera hemato-testicular se encuentre alterada. El-Demiry y cols. (1987) han detectado un aumento de los linfocitos CD3 CD4 helper inducer en algunos pacientes oligospérmicos y en individuos vasectomizados con AAE.

Por otra parte, los linfocitos CD3 CD8 intraepiteliales limitarían la diferenciación de los linfocitos B y producción de anticuerpos dirigidos contra los antígenos intraluminales. De ahí, que el número de células B encontrado en las distintas áreas del tracto reproductor masculino sea escaso (Ritchie y cols., 1984; El-Demiry y cols., 1987), salvo en la próstata (El-Demiry y cols., 1987; Migliari y cols., 1992).

Migliari y cols. (1992) han estudiado la distribución de células inmunocompetentes en las glándulas bulbouretrales del aparato reproductor masculino (gl. Cowper). Ellos han estimado que un 10% de las células de la mucosa de estas glándulas está constituído por linfocitos T, siendo los linfocitos CD3 CD8 supresores/citotóxicos los que predominan a expensas de un reducido número de linfocitos CD3 CD4 helper/inducer.

Se ha detectado un considerable número de macrófagos en el intersticio testicular alrededor de los túbulos seminíferos, así como en el resto del aparato reproductor masculino (El-Demiry y cols., 1987; Head y Billingham, 1985). El papel de estas células a este nivel todavía ha de ser establecido, porque por un lado, se piensa en una función inmunoprotectora al destruir los espermatozoides que pudieran atravesar la barrera-hemato-testicular y por otro, y dado que son células HLA-DR (+), sería lógico sugerir que son células capaces de inducir respuesta inmune contra el espermatozoide. Estudios más profundos realizados en animales experimentales han mostrado que los macrófagos constituyen en el testículo de rata el 25% de todas las células intersticiales (Niemi y cols., 1986; Pöllämen y Niemi, 1987; Pöllämen y Maddocks, 1988). La presencia de receptores para el complemento, así como receptores Fc para las Ig G en la membrana plasmática de los macrófagos testiculares sugiere que la actividad fagocítica de estas células es similar a la del resto

de los macrófagos existentes en otros órganos (Miller y cols., 1983). Pero a pesar de estas similitudes, los macrófagos testiculares poseen características especiales, tales como la influencia que la FSH ejerce sobre ellos, que es dosis dependiente con la producción del lactato por el macrófago (Yee y Hutson, 1983). Bergh (1985) y Yee y Hutson (1985) han sugerido que los macrófagos cercanos a las células de Leydig están involucrados en su regulación. Macrófagos testiculares en la pared de los túbulos seminíferos y en el intersticio pueden prevenir la exposición de los autoantígenos espermáticos a los linfocitos CD4(+) (Yule y cols., 1988)

La próstata posee unas características especiales en la distribución de células inmunocompetentes. Pareciera como si su inmunovigilancia en el tracto reproductor fuera más relevante. Esta contiene un gran número de células T, macrófagos, linfocitos B y NK. Igualmente que en el resto del tracto reproductor masculino, los linfocitos T, y especialmente los T8 supresores/citotóxicos, representan la subpoblación más numerosa, pero con un porcentaje mayor que en el resto de los órganos (Migliari y cols., 1992).

Hasta aquí, hemos analizado los diversos componentes del sistema inmune en los distintos órganos sexuales masculinos. Veamos el papel de estas células en los eyaculados. Así, la leucocitospermia es definida como la presencia de más de 10^6 leucocitos/ml en el eyaculado (WHO, 1992). Las opiniones sobre la función y la concentración de estas células son variadas. Así, Wolff y cols. (1988) han encontrado una relación entre leucocitospermia y esterilidad, mientras que El-Demiry y cols. (1986a) observaron un mayor número de leucocitos en individuos fértiles.

Tomlinson y cols. (1992) encontraron que muestras de semen con más del 50% de espermatozoides morfológicamente normales contenían un número mayor de leucocitos que aquéllas con más del 50% de formas

espermáticas defectuosas. Esto también ha implicado a los leucocitos en el control de la calidad del eyaculado.

El origen de los leucocitos seminales ha sido investigado por varios autores. La mayoría de los granulocitos, linfocitos y macrófagos presentes en los eyaculados con cultivos bacteriológicos negativos parecen originarse de epidídimo, vasos deferentes y testículos (Tomlinson y cols., 1992; Kortebani y cols., 1992; Olsen y Shields, 1984; Nashan y cols., 1990; Nashan y cols., 1989; Anderson, 1990). Diferentes teorías han sido sugeridas para explicar el origen de la leucocitospermia: en algunos individuos el incremento de leucocitos en el semen se debe al desarrollo de una infección del tracto reproductor; mientras que en otros la existencia de leucocitospermia puede reflejar condiciones inflamatorias no infecciosas o producción anormal de espermatozoides, que atraen a los leucocitos (Wolff y cols., 1990). Smith y cols. (1989) han mostrado mediante observación al microscopio electrónico la existencia de espermatozoides, células germinales y bacterias en el interior de los leucocitos seminales, lo que indica que estas células no siempre van asociadas a una infección genital.

Se han obtenido resultados divergentes en la caracterización de los leucocitos presentes en muestras de semen humano. Así, mientras que Kortebani y cols. (1992) y Zagury y cols. (1984) han comprobado el predominio de los monocitos/macrófagos sobre los linfocitos y granulocitos en los eyaculados; autores como Wolff y Anderson (1988), Tomlinson y cols. (1992) y Kung y cols. (1993) defienden lo contrario. Lo que sí parece estar claro es la gran variabilidad existente en el número de leucocitos y sus poblaciones en el semen humano.

La cuantificación de las diversas subpoblaciones linfocitarias constituye igualmente hoy motivo de polémica. La mayoría de los autores

han demostrado el predominio de los linfocitos T sobre los B en las muestras de semen humano, ya sea de individuos fértiles como de individos estériles. No obstante, no existe un acuerdo sobre la subpoblación de linfocitos T mayoritaria en los diferentes tipos de eyaculados. Así, mientras que algunos investigadores (Zagury y cols., 1984; Witkin y Goldstein, 1988; Anderson y Hill, 1987; Kortebani y cols., 1992; Gonzales y cols., 1992a; Barratt y cols., 1992; Kung y cols., 1993) sugieren el predominio de los linfocitos T8 supresores/citotóxicos en eyaculados de individuos fértiles y el de los T4 helper/inducer en los individuos estériles; otros autores demuestran lo contrario (Wolff y Anderson, 1988; Barratt y cols, 1990b).

Por otro lado, Mazzolli y cols. (1990), Barratt y cols. (1992), Kortebani y cols. (1992), Gonzales y cols. (1992a) y Kung y cols. (1993) han propuesto el posible papel de las citoquinas en la esterilidad masculina, al encontrar un incremento de los linfocitos T4 helper/ inducer activados (HLA-DR(+) o IL-2(+)) en muestras de semen de individuos astenozoospérmicos.

V.3.4.- FACTORES INMUNORREGULADORES.-

V.3.4.1.- FACTORES TESTICULARES.-

Las células inmunes son reguladas localmente en el testículo por las células de Leydig, las células de Sertoli y los macrófagos testiculares. Los efectos de estas células están mediados por varios factores de naturaleza peptídica, que incluyen la protectina y el factor interleuquina-1α like.

V.3.4.1.1.- POSIBLES PEPTIDOS INMUNORREGULADORES EN EL TESTICULO.-

Las células testiculares producen varios péptidos análogos a aquellos que producen afectación de las células del sistema inmune in vivo o in vitro. Estos incluyen:

- Factor de crecimiento insulina-like tipo I (IGF-I) (Hall y cols., 1983; Handelsman y cols., 1985; Smith y cols., 1987): Producido por las células de Sertoli. Da lugar a la inhibición de la proliferación linfocitaria.

- Inhibina (Steinberger y Steinberger, 1976): Sintetizada por las células de Sertoli. Su efecto consiste en estimular la proliferación de timocitos por mitógenos.

- Activina (Lee y cols., 1988): Es segregada por las células de Sertoli y las de Leydig. Inhibe la acción de mitógenos sobre los timocitos.

- Factor TGF-β-like o factor de transformación del crecimiento (Avallet y cols., 1987): Es sintetizado por las células de Sertoli. Ejerce varios efectos, entre los que cabe destacar: la inhibición de la proliferación de linfocitos T por mitógenos como PHA y Con-A; inhibición de la diferenciación de los linfocitos B a células plasmáticas; inhibición de la función de las células NK; e inhibición de la secreción de IL-2 y regulación de los receptores IL-2 en las células T.

- Factor GnRH-like (Sharpe y Fraser, 1980): Es producido por las células de Sertoli. Induce la producción por los linfocitos de un factor LH-like.

- Factor de crecimiento neural β-like (NGF-β-like) (Olson y cols., 1987): Se produce en los espermatocitos y espermátides. Produce estimulación de los linfocitos por la activación de Con-A y aumento de la expresión del receptor de IL-2 en cultivos de linfocitos.

- Laminina (Bohnsack y cols., 1985): Es sintetizada por las células de Sertoli. Aumenta la fagocitosis por los macrófagos.

- ACTH (Peck, 1987): Inhibe la inducción de radicales de superóxido en macrófagos y estimulación de la actividad tumoricida de los macrófagos en ausencia de IFN-γ. Es sintetizada por las células de Leydig.

-α-MSH (Cannon y cols., 1986): Es segregada por las células de Leydig. Inhibe el efecto inmunoestimulador e inflamatorio de la IL-1.

- β-endorfina (McCain y cols., 1982; Puppo y cols., 1985): Da lugar a un aumento de la proliferación de linfocitos inducidos por mitógenos y a una inhibición de la expresión de antígeno HLA-DR en linfocitos T4 en cultivos de células mononucleadas. Es sintetizada por las células de Leydig.

- α-endorfina (Heijnen y cols., 1987): Es sintetizada por las células de Leydig. Ejerce un efecto de supresión sobre la producción de anticuerpos por los linfocitos.

- Arginina-vasopresina (AVP) (Nicholson y cols., 1984): Producida por las células de Leydig, es capaz de estimular la producción de γ-IFN por determinadas células esplénicas.

- Sustancia P-like (Schultze y cols., 1987): Sintetizada por las células de Leydig, es responsable sobre todo de la estimulación de la

proliferación de linfocitos T.

- Factor TRH-like (Morley y cols., 1980): No ha sido determinado el tipo celular productor de este factor. Su acción consiste en la estimulación de la producción de TSH por algunos linfocitos T.

- Factor de crecimiento epidérmico-like (EGF) (Elson y cols., 1984): Colabora en la producción de γ-IFN por los esplenocitos.

Los factores inmunorreguladores mejor caracterizados son la protectina y la interleuquina-1-like. Vamos a pasar a comentarlos.

- PROTECTINA.- La protectina o proteína inmunosupresora testicular se produce en el inicio de la pubertad. Se ha comprobado que una muy pequeña concentración se encuentra presente en los testículos de ratones de experimentación de 21 días, pero que esta concentración aumenta enormemente a los 26 días y que los niveles del adulto se alcanzan en el día 44º (Pöllämen y cols., 1989a).

Mediante HPLC se ha demostrado la existencia de dos picos de actividad inmunosupresora llamados respectivamente protectina A y protectina B. Dos picos adicionales han sido detectados por gel de filtración, denominados protectina C y protectina D.

En lo que se refiere a su acción, la protectina inhibe la transformación blástica que induce la Con-A, siendo esta supresión dosis dependiente con relación a la cantidad de fluído testicular presente. Pöllämen y cols. (1988) han comprobado que la actividad inmunosupresora de la protectina puede bloquear la acción de los receptores de linfocitos T y receptores de IL-2 en la estimulación de linfocitos. Parece que la inhibición de la protectina es mediada por el AMP_c, ya que cultivos de

células mononucleadas con fluído testicular elevaron los niveles de esta sustancia.

La regulación de esta actividad inmunosupresora es llevada a cabo por diferentes factores, tales como: tratamiento con estrógenos, hipofisectomías, tratamientos con HCG que inhiben la secreción de las gonadotropinas o niveles bajos de testosterona en suero o testículo, que inducen un incremento de la inmunosupresión. No está claro si las cuatro protectinas corresponden a alguno de los factores inmunorreguladores identificados a nivel testicular, tales como la ACTH, sustancia P, GnRH, TRH, etc.

La actividad inmunosupresora de la protectina puede jugar un papel muy importante en el mecanismo de la supervivencia prolongada de un injerto en el testículo. Se han detectado niveles elevados de este factor después del transplante de un tejido extraño (Selawry y Whittington, 1984). Por ello, se piensa que la actividad que ejerce la protectina es indispensable para evitar el ataque autoinmune contra el espermatozoide. Este hecho se basa en que su síntesis comienza en la pubertad, cuando las células germinales aparecen en el epitelio de los túbulos seminíferos (Yule y cols., 1988) y cuando la producción testicular de la interleuquina-1-like se inicia por parte de las células de Sertoli (Syed y cols., 1988). Incrementos en sus niveles en algunas patologías como la criptorquidia o el hipogonadismo hipogonadotrópico indica que también podría estar funcionalmente involucrado en la regulación de la espermatogénesis.

La función inmunosupresora de la protectina puede influir en la diseminación de infecciones o enfermedades que se contagian por vía sexual, tales como el SIDA.

- FACTOR INTERLEUQUINA-1-LIKE TESTICULAR.- La interleuquina-1-like (IL-1t) es sintetizada por las células de Sertoli bajo el control de la hipófisis, ya que una hipofisectomía induce el descenso de la IL-1t (Söder y cols., 1988) y una administración exógena de HCG en este caso, induce un aumento de ésta. Se excreta a los túbulos seminíferos en dos direcciones: una hacia la luz tubular; y otra hacia el espacio intersticial (Khan y cols., 1987; Gustafsson y cols., 1988; Syed y cols., 1988). En ratas puede ser detectada ya al principio de la pubertad, aumentando sus niveles hasta alcanzar el plateau del adulto (Syed y cols., 1988). El efecto de este factor es el de estimular la proliferación de timocitos. Como consecuencia del efecto mitógeno de la IL-1t en distintas células -fibroblastos, queratinocitos, células tiroideas, células tumorales-, y conociendo que aparece en la pubertad, se podría especular que la IL-1t está involucrada en la regulación de la espermatogénesis. En animales hipofisectomizados con una espermatogénesis alterada y niveles descendidos de IL-1t, la inyección intratesticular de esta sustancia, incrementa la síntesis de DNA por las espermatogonias (Pöllämen y cols., 1989b). Esto indica que las células de Sertoli pueden regular la espermatogénesis por medio de la secreción de IL-1t. El papel de la IL-1t sobre las células de Leydig es un tema aún sin aclarar.

En cuanto a la función de la IL-1t, se ha comprobado que posee propiedades quimiotácticas tras el daño de las células de Sertoli, dando lugar a la aparición de un infiltrado leucocitario en el testículo. Además la IL-1t es un factor de crecimiento para los linfocitos T, B y para las células leucémicas (Wakasugi y cols., 1987), por lo que un incremento de esta sustancia en el testículo, nos indica la recaída de una leucemia linfoblástica aguda.

No obstante, la existencia de alguna de estos péptidos

inmunorreguladores en otros órganos no privilegiados inmunológicamente, nos hace pensar que la sola presencia de estos factores en el testículo no es suficiente como para explicar la prolongada supervivencia de un injerto en este órgano. Quizás el sinergismo de varios factores sea necesario para una adecuada inhibición linfocitaria a nivel testicular.

V.3.4.1.2.- ESTEROIDES SEXUALES.-

Diversos autores han estudiado el efecto de los esteroides sexuales sobre las células del sistema inmune, con conclusiones discrepantes. Mientras que investigadores como Roubiniam y cols. (1979), Sakans y cols. (1978), Ahn y cols. (1983), Vandenbroucke y cols. (1982) y Sthoeger y cols. (1988) han defendido la hipótesis de que los andrógenos inducen la supresión de la respuesta inmune y los estrógenos son inmunoestimuladores; otros autores (Grossman, 1985; Tarter y cols., 1986) han sugerido que los esteroides sexuales desempeñan fundamentalmente un papel inmunosupresor, al comprobar que animales castrados presentan un incremento de la función de los linfocitos T y, en definitiva, una inducción de la respuesta inmune. Esta inmunosupresión esteroidea se realiza gracias a la presencia en los linfocitos de receptores para estas hormonas (Grossman, 1985).

Muy interesantes son los estudios que Maddocks y cols. (1990) han realizado acerca del efecto de diversos factores sobre la esteroidogénesis testicular, comprobando que la PRL, IGF-I, β-endorfina y PGE inducen su estimulación, y que $PGF_{2\alpha}$, ADH, oxitocina, EGF y glucocorticoides ejercen un efecto depresor de la síntesis esteroidea en el testículo; y sugiriendo la interrelación entre esteroides y esteroidogénesis, leucocitos (poseen igualmente receptores para alguna de las sustancias anteriormente citadas, produciendo un determinado efecto sobre el sistema

inmune) y sus productos; y la espermatogénesis, que precisa de un nivel preciso de andrógenos para que sea llevada a cabo.

V.3.4.2.- PRODUCTOS LEUCOCITARIOS.-

Los productos leucocitarios mejor caracterizados son las interleuquinas de la 1 a la 7, interferón α, β, y γ, y factores de necrosis tumoral α y β (Smith y cols., 1986; Oppenheim y cols., 1986; Nathan, 1987; Morris, 1988). Más recientemente se ha comprobado la producción por los linfocitos de sustancias como: derivados de la Proopiomelanocortina (Johnson y cols., 1982; Westly y cols., 1988), TGF- β (Kehrl y cols., 1986), LH-like (Ebaugh y Smith, 1988), GnRH-like (Emanuele y cols., 1989), PRL-like (Roza y Kelley, 1988) y otros (Harbour y cols., 1988; Baxter y cols., 1988).

Algunos de los productos leucocitarios han mostrado capacidad de afectar la función testicular (Tabla I). Los macrófagos se han asociado recientemente con las células de Leydig (Connell y Christensen, 1975), habiéndose demostrado que cambios morfológicos en las células de Leydig son concomitantes con cambios en los macrófagos (Wing y Lin, 1977). Miller y cols. (1983) han detectado fenómenos de endocitosis de células de Leydig por los macrófagos testiculares, sugiriendo que los macrófagos presentes a nivel testicular están involucrados en la regulación de la función de las células de Leydig.

En la Tabla I especificamos el efecto en el testículo de los productos leucocitarios mejor estudiados:

TABLA I

EFECTOS DE LOS PRODUCTOS LEUCOCITARIOS EN EL TESTICULO.

Factor	Efecto
IL-1α	*Estimulación de la proliferación de las espermatogonias.
IL-1β	*Estimulación de la producción de esteroides C-19 (testosterona) y C-21 (progesterona) por las células de Leydig en ausencia de LH.
	*Inhibición de la producción de niveles de C-19 esteroides por las células de Leydig en presencia de niveles estimuladores máximos de LH.
IFN-α	*Inhibición de la esteroidogénesis por las células de Leydig
IFN-γ	*Inhibición de la esteroidogénesis por las células de Leydig.
	*Disminución del número de espermátides y espermatocitos en el epitelio de los túbulos seminíferos.
TGF-β	*Inhibición de la esteroidogénesis en las células de Leydig.
α-MSH	*Estimulación de la secreción de estradiol por las células de Sertoli prepuberales.
Prolactina-like	*Potenciación del efecto de la LH en la esteroidogénesis de las células de Leydig.
Factor LH-like	*Estimulación de la esteroidogénesis en las células de Leydig.
Factor GnRH-like	*Estimulación de las esteroidogénesis en las células de Leydig.
β –Endorfina	*Inducción de la producción de testosterona.

V.3.4.3.- OTROS FACTORES INMUNORREGULADORES.-

Múltiples factores inmunosupresores han sido detectados en el plasma seminal, encontrándose algunos de ellos en extractos de órganos del aparato reproductor masculino (Anderson y Tarter, 1982) y en muestras de semen de individuos vasectomizados, por lo que parece que en este caso el origen de estas sustancias no sería ni testicular, ni epididimario, ni espermático (Lord y cols., 1977; Bischof y cols., 1983). En la Tabla II exponemos los más importantes.

TABLA II
OTROS FACTORES INMUNORREGULADORES

Factor	Efecto	Referencia
Prostaglandinas	Inhibe la actividad NK.	Vallely y cols.,1988. Tarter y cols., 1986.
Poliaminas (espermina y espermidina)	Inhibe la proliferación linfocitaria y formación de linfocitos citotóxicos.	Byrd y cols., 1977.
PAPP-A[a]	Inhibe la proliferación de linfocitos	Bischof y cols., 1983
Transglutaminasa y uteroglobulina	Suprimen la respuesta proliferativa de las células esplénicas de la mujer a espermatozoides singénicos.	Mukherjee y cols., 1983.
Zn, complejos proteicos de Zn	Inhibe la proliferación linfocitaria inducida por mitógenos.	Chvapil y cols., 1977.
Inmunoglobulinas	Factores bloqueantes	Thaler y cols., 1989.

[a] Proteína A plasmática asociada al embarazo.

TABLA II (Continuación)
OTROS FACTORES INMUNORREGULADORES

Factor	Efecto	Referencia
Transferrina	Por recept. transferrina (NK como células diana).	Faulk y Galbraith, 1979.
Lactoferrina	Inhibe la actividad del complemento.	Morgan y cols., 1975.
α_2-macroglobulina	Enmascara antígenos.	James, 1980.
β_2-microglogulina	Enmascara antígenos.	Mukherjee y cols., 1983.
Antígenos espermáticos	Inducción de células supresoras (tolerancia inmunológica).	Ritchie y cols., 1984.
Productos de las céls. supresoras	Inmunosupresión antígeno específica e inespecífica.	Ritchie y cols., 1984.
Proteína CD16	Inhibe la unión del anticuerpo a los recept. Fc de la superficie de macrófagos y PMNs.	Thaler y cols., 1989.
Esteroides	Inhiben diversas funciones del sistema inmune.	Grossman, 1985; Tarter y cols., 1986.

Como hemos visto hasta ahora, los mecanismos protectores del gameto masculino más importantes parecen ser los inmunorreguladores, tanto los mediados por las células, como por los factores. El estudio de éstos podría responder a alguno de los interrogantes más complejos de la reproducción humana y podría abrir nuevas perspectivas en la terapia de las parejas estériles de origen inmunológico.

Objetivos

El tracto reproductor masculino es una región inmunológicamente dinámica, en la que se encuentran involucrados distintos componentes del sistema inmune (células, inmunoglobulinas, citoquinas ...), que pueden desempeñar una importante función, no sólo en las infecciones genitales, sino en la modulación de la respuesta inmune contra el espermatozoide y en el control de la calidad seminal.

En este estudio, intentamos analizar el papel fisiológico de las diferentes células del sistema inmune presentes en el eyaculado, así como su implicación en la esterilidad masculina, tanto de origen inmunológico, como no inmunológico.

Material y métodos

I.- INSTRUMENTOS Y MATERIAL DESECHABLE.-

I.1.- INSTRUMENTOS.-

- Estufa 205 (SELECTA, España).
- Frigorífico (Zanussi, Madrid, España).
- Congelador (Zanussi, Madrid, España).
- Agitador continuo (Eppendorf, modelo Mischer 5432).
- Centrífuga (Beckman, modelo TJ-G).
- Citómetro de flujo FAC-scan IV (Becton Dickinson; Mountain View; California).
- Cronómetro (Seiko Sports 100).
- Microscopio óptico de contraste de fases (Nikon, Japón).
- Micropipetas automáticas (Beckman Instruments Inc, Brea, USA).

I.2.- MATERIAL DESECHABLE.-

- Cámara de recuento celular de Neubauer.
- Jeringas de insulina de 1 ml, Plastipak ® (Becton Dickinson, Dublin, Irlanda).
- Frasco de plástico de recogida de muestras biológicas.
- Pipetas Pasteur de vidrio (KRAPE, España).
- Cubreobjetos y portaobjetos.
- Guantes de plástico.
- Tubos de plástico de 10 ml (Flow; United Kingdom).
- Tubos de plástico para IFD de 12x75 mm.
- Puntas de pipetas automáticas (DASLAB, España).
- Placas de Petri 35x10 (NUNC, Dinamarca).

II.- MEDIOS DE CULTIVO.-

- Inra Menezzo B-2 (Api-System, Montalieu-Vercieu, Francia).
- RPMI:

A 900 ml de agua bidestilada se añade:

- RPMI - 1640 (Flow) ..... 10,00 g.
- Bicarbonato sódico (Merck) ..... 2,00 g.
- Ampicilina (Antibióticos, S.A) ..... 0,50 g.
- Gentamicina (Antibióticos, S.A) ..... 0,04 g.
- L-Glutamina (Flow Laboratories) ..... 0,50 g.
- Hepes buffer (Flow laboratories) ..... 3,50 g.

Esta mezcla, tras agitación y ajuste a pH = 7,4, se lleva a un volumen de 1000 ml con agua bidestilada.

III.- GRUPOS DE PACIENTES ESTUDIADOS.-

Con objeto de estudiar y aclarar el papel que los leucocitos seminales y determinadas subpoblaciones de éstos juegan en la fisiología de la reproducción humana, procedimos al análisis del eyaculado de 108 varones atendidos en el laboratorio de la Unidad de Reproducción del Hospital Regional Virgen de las Nieves de Granada.

Las muestras de semen se obtuvieron mediante masturbación tras 3 días de abstinencia sexual y fueron recogidas en frascos de plástico estériles. Ninguno de los sujetos tomaba medicación alguna ni presentaba ningún signo o síntoma de patología aparente. Tampoco habían ingerido alcohol ni consumido tabaco recientemente.

Las edades de los 108 individuos sometidos a estudio oscilaba de

22 a 45 años.

Los cultivos microbiólogicos de todas las muestras resultaron negativos.

Tras la licuefacción de los eyaculados, estudiamos las siguientes características seminales:

a) Concentración de leucocitos peroxidasa positiva: Mediante la tinción de mieloperoxidasa, usando azul de orthotoluidina (WHO, 1992) y contaje de las células teñidas en cámara de Neubauer. Con esta tinción podemos distinguir los granulocitos y macrófagos de otras células presentes en el semen (Nahoum, 1980).

b) Número de espermatozoides: Mediante valoración en cámara de recuento celular de Neubauer, según las normas de la O.M.S (WHO, 1992).

c) Motilidad espermática: Mediante observación en fresco al microscopio de contraste de fases, utilizando la clasificación de la O.M.S (WHO, 1992). Para este estudio sólo se tuvieron en cuenta los espermatozoides Q (+++), es decir, aquéllos que presentaban un movimiento rápido, lineal y progresivo.

d) Vitalidad: Se analizó mediante la prueba de Eosina-Nigrosina (WHO, 1992), considerando muertos a los espermatozoides que se teñían.

e) Morfología: Mediante la tinción de Papanicolau (WHO, 1992), según la clasificación de la OMS (WHO, 1992).

f) Test hiposmótico: Con el que estudiamos la funcionalidad de la membrana espermática, en el cual enfrentamos a los espermatozoides a una solución hiposmótica, tras lo que consideramos a las formas espermáticas "hinchadas" como espermatozoides que poseen una membrana funcional (WHO, 1992).

g) Determinación de AAE, empleando el "test de immunobead " (WHO, 1992): Los inmunobeads son bolitas de poliacrilamida unidas covalentemente con anticuerpos de conejo anti-inmunoglobulinas humanas (anti-IgG, o anti-IgA; Biorad Laboratories, Richmond, CA, USA). Para esta prueba los espermatozoides, tras ser lavados (300 g durante 5 minutos) dos veces en B2-Menezzo (APISystem, Montalieu-Vercieu, Francia), se resuspendían en una concentración de 10 a 20 millones de células por ml en dicho medio. Una gota de immunobead, era mezclada con una gota de igual volumen de espermatozoides lavados (7µl), sobre las que se depositaba un cubre y se incubaba en una placa de Petri humedificada durante 10 minutos a temperatura ambiente. Observamos la reacción con microscopio de contraste de fases a 40x. Un espermatozoide móvil se consideraba positivo al unirse una o más "bolitas" del test de immunobead a su superficie. Según esto, un semen se clasificaba como positivo cuando más del 20% de sus espermatozoides móviles poseían bolitas Ig A o Ig G adheridas.

Los eyaculados sometidos a estudio se dividieron en 5 grupos:

III.1.- GRUPO CONTROL DE INDIVIDUOS FERTILES.-

Un grupo de 30 varones en espera de ser vasectomizados (prevasectómicos) con, al menos, dos hijos, siendo uno de ellos menor de un año, constituyó nuestro grupo control de individuos fértiles.

III.2.- VARONES DE PAREJAS ESTERILES POR FACTOR MASCULINO NO INMUNOLOGICO.-

Este grupo estaba constituído por 30 individuos estériles (no habían conseguido un embarazo tras dos años de relaciones sexuales habituales con sus parejas) sin AAE, en los que alguno de los parámetros seminales estudiados se encontraba alterado. Según esto y siguiendo los criterios de la O.M.S (WHO, 1992) incluímos en este grupo las siguientes patologías:

- Oligozoospermias: Sujetos en los que la concentración de espermatozoides era menor a 20 x 10^6 espermatozoides/ml.

- Astenozoospermias: Menos del 25% de los espermatozoides presentes en el eyaculado tenían una motilidad del tipo Q(+++).

- Oligoastenozoospermias: En las c una combinación de las dos anteriores tenía lugar.

- Teratozoospermias: Menos del 30% de los espermatozoides eran morfológicamente normales.

- Oligoastenoteratozoospermias: Individuos en los que se asociaban las alteraciones anteriores.

La fertilidad de sus compañeras fue sometida a evaluación mediante la medición de la temperatura corporal basal, estudios hormonales, histerosalpingografia y laparoscopia.

III.3.- VARONES DE PAREJAS ESTERILES POR FACTOR MASCULINO INMUNOLOGICO TIPO Ig G/Ig A.

Los 18 individuos incluídos dentro del grupo de esterilidad inmunológica presentaron en, al menos dos seminogramas, AAE en los eyaculados (estériles AAE (+)). De entre estos 18 eyaculados, establecimos 2 subgrupos. El primero que nos ocupa, compuesto por 11 de estos pacientes, presentó AAE tipo Ig G e Ig A; y el segundo, formado por los 7 eyaculados restantes, será tratado en el apartado siguiente.

La fertilidad de sus compañeras fue evaluada en éste y en el siguiente grupo con los mismos métodos diagnósticos utilizados para el grupo de estériles no inmunológicos.

III.4.- VARONES DE PAREJAS ESTERILES POR FACTOR MASCULINO INMUNOLOGICO TIPO Ig G.-

Los 7 sujetos restantes del grupo de estériles con AAE se caracterizaba por presentar un "test de immunobead" positivo, únicamente para la Ig G.

III.5.- INDIVIDUOS VASECTOMIZADOS.-

Treinta sujetos vasectomizados (postvasectómicos) con, al menos, tres meses de seguimiento médico desde la intervención quirúrgica, constituyeron nuestro último grupo de pacientes estudiados. En ninguno de estos eyaculados se observaron espermatozoides.

IV.- MARCAJE DE LINFOCITOS CON ANTICUERPOS MONOCLONALES.-

IV.1.- REACTIVOS.-

IV.1.1.- Solución PBS.-

Es una solución de fosfato tamponado preparado a partir de tabletas (Oxoid) con la siguiente composición: NaCl 8,0 g/l, KCl 0,2 g/l, Na_2HPO_4 (anhidro) 1,15 g/l, KH_2PO_4 0,2 g/l. Se disuelve una tableta en 100 ml de agua destilada.

IV.1.2.- Solución fijadora de paraformaldehído al 1%.-

Esta solución se preparó a partir de paraformaldehído despolimerizado acuoso al 10% (ultrapure EM grade Polysciences, Warrington, PA, nº 4018) diluído con PBS. El pH de esta solución se ajustó a 7,4 con NaOH 1N.

IV.2.- ANTICUERPOS MONOCLONALES UTILIZADOS.-

Con la aparición de los anticuerpos monoclonales el conocimiento de los antígenos de membrana de los leucocitos humanos y su importancia funcional, así como el desarrollo de técnicas de biología molecular que nos permiten secuenciar los genes que codifican estas moléculas de superficie, ha suscitado un enorme interés y espectacular desarrollo.

Ha sido, por tanto, necesario establecer una coordinación a través de los denominados "Talleres Internacionales de Antígenos de Diferenciación de Leucocitos Humanos", debido al gran número de antígenos

de membrana y anticuerpos monoclonales que actualmente están surgiendo (Shaw, 1987). En el transcurso de estos talleres - el primero de ellos se celebró en París en 1982; el segundo en Boston en 1984; el tercero en Oxford en 1986; y el cuarto en Viena en 1989 - se ha estudiado la especificidad de unos 1000 anticuerpos monoclonales (Sánchez-Madrid y cols., 1987; Sánchez-Madrid y cols., 1989), atendiendo a la distribución celular e hística, a la caracterización bioquímica de las moléculas reconocidas y a su efecto sobre distintas funciones leucocitarias, con el fin de aunar todas las estructuras químicas que han ido apareciendo en estos últimos años y así llegar a un mayor conocimiento de la membrana de los leucocitos y fundamentalmente de los linfocitos.

Fruto del cuarto y último Taller Internacional fue el establecimiento de 78 CD (Knapp y cols, 1989) o "Cluster of Differentiation" distintos (grupos de Diferenciación Antigénicos). Los 78 CD actualmente definidos se distribuyen, atendiendo a su expresión preferencial y/o diferencial en los distintos tipos celulares hematopoyéticos: 12 CD de linfocitos T, 17 de linfocitos B, 12 de monocitos y granulocitos, 21 de NK y células de linaje no específico, 6 de linfocitos activados y finalmente 10 de plaquetas.

Estudios funcionales indican que algunos de los CD establecidos poseen un importante papel en las interacciones de los diferentes tipos celulares del Sistema Inmune, independientemente de su distribución celular. En la Tabla III, detallamos el panel de anticuerpos monoclonales utilizado en nuestro estudio.

TABLA III

PANEL DE ANTICUERPOS MONOCLONALES UTILIZADO.

CD	Ac.Mo	Ref. Nº	Especifidad
CD45	Anti-HLE-1 FITC	7460	T-200 (panleucocitario)
CD14	Anti-Leu-M3 PE	95-0011	Monocitos/macrófagos
IgG_1IgG_{2a}	Simultest control	95-0012	Anti-Igs Ig G_1 e IgG_{2a} de ratón (control (-))
CD3	Anti-Leu-4 FITC	92-0001	TcR (Pan-T)
CD3	Anti-Leu-4 PE	7347	TcR (Pan-T)
CD4	Anti-Leu-3a PE	7323	Subpoblación de linfocitos T
CD8	Anti-Leu-2a FITC	7313	Subpoblación de linfocitos T
CD8	Anti-Leu-2a PE	7317	Subpoblación de linfocitos T
CD45RA	Anti-Leu-18 FITC	7723	Subpoblación T4, T8, B, monocitos
CD11b	Anti-Leu-15/CR3PE	7557	Recept.CR3 para C3bi
CD56	Anti-Leu-19 PE	7747	NCAM
CD3HLA-DR	Simultest Anti-Leu -4FITC+Anti HLA -DR PE	95-0009	Linfocitos T activados
HLA-DR	Anti-HLA-DR FITC	7763	CMH II
HLA-DR	Anti-HLA-DR PE	7367	CMH II
CD16	Anti-Leu-11c PE	7617	Fc-γ-RIII
CD20	Anti-Leu-16 PE	7677	Pan-B
CD5	Anti-Leu-1 FITC	7303	Linfocitos T,subpoblación B

IV.2.1.- POBLACIONES CELULARES CARACTERIZADAS EN NUESTRO ESTUDIO MEDIANTE SIMPLE Y DOBLE MARCAJE CON ANTICUERPOS MONOCLONALES.-

En la Tabla IV resumimos las poblaciones celulares caracterizadas en nuestro estudio, que son las siguientes:

- CD45(+): Las proteínas de membrana celular CD45 se encuentran en todos los leucocitos humanos (antígeno común panleucocitario o T 200) (Thomas, 1989). Su principal utilidad clínica en la citometría de flujo reside en ser el control positivo de los leucocitos y la base para diferenciar las distintas poblaciones leucocitarias.

- CD45(+)CD14(+): Este doble marcaje de anticuerpos monoclonales se emplea en citometría de flujo en la caracterización de la población de monocitos y macrófagos tisulares, que expresan los dos antígenos, y en la diferenciación de linfocitos y granulocitos, que no expresan este último receptor (CD14), específico de los monocitos (Sánchez-Madrid y cols., 1989).

- CD45(+)CD14(-): Nos define las poblaciones de linfocitos y de granulocitos, separándolas de los monocitos, que son CD14(+).

- CD45(+)CD3(+): Con este marcaje diferenciamos exclusivamente los linfocitos T maduros (Davis, 1990), a través de la molécula de membrana CD3, que constituye el marcador principal de estas células, el cual se asocia con el receptor para el antígeno, formando el complejo CD3-TcR. Por tanto, esta molécula de superficie participa en el reconocimiento antigénico y en la activación funcional de los linfocitos T (Klausner y Samelson, 1991).

- CD45(+)CD20(+): Los anticuerpos monoclonales que reaccionan específicamente con estos antígenos de superficie nos definen la población de células B. El antígeno CD20 propio de los linfocitos B parece jugar un papel en la regulación de la activación de las células B y su proliferación (Clark y Shu, 1987).

- CD45(+)CD16(+): Esta pareja antigénica ha sido utilizada para estudiar una población linfocitaria caracterizada por su actividad citotóxica natural o actividad NK, sobre algunas células tumorales o infectadas por determinados virus llamadas células diana (Eiguchi y Alcocer, 1990). Está compuesta por linfocitos de gran tamaño con gránulos citoplasmáticos azurófilos, por lo que ha venido a denominarse LGL (large granular lymphocytes) o "linfocitos grandes granulares". El 90% de los LGL expresa el antígeno CD16 (Fc-γ-RIII) (Robertson y Ritz, 1990; Nagler y cols., 1984). Dicho antígeno constituye el receptor de baja afinidad para la fracción Fc. de la Ig G (Fc-γ-RIII) (Ravetch y Kinet, 1991) de los inmunocomplejos, por lo que la expresión de esta molécula media la Citotoxicidad Celular Dependiente de Anticuerpos (ADCC) y la fagocitosis de los inmunocomplejos, consiguiendo en definitiva un aclaramiento de éstos.

Hay que señalar que la subpoblación linfocitaria de los LGL más eficaz en la citotoxicidad mediada por estas células, es la formada por los linfocitos que no expresan el antígeno CD3, que constituyen, al menos, el 80% de los LGL (Abo y cols., 1982), (frente a los CD3(+) que se detectan en menos de un 20% de estas células). Por lo tanto, el análisis de la subpoblación CD45(+)CD16(+), nos permite el estudio, principalmente, de las células CD3(-)CD16(+) o NK, propiamente dichas, con mayor capacidad citotóxica y madurez, que los restantes LGL o células NK like (CD3(+)CD16(+)).

- CD3(+)CD4(+): Define la población de linfocitos T "helper/ inducer" o colaboradores/inductores (linfocitos T4). Los linfocitos T que poseen la molécula de superficie CD4 intervienen en el reconocimiento de antígenos extraños en asociación con el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) de clase II (Parnes, 1989).

La función de los linfocitos T4 es la de estimular la proliferación de linfocitos B ante la presencia de una sustancia extraña y su transformación en células plasmáticas productoras de inmunoglobulinas, así como, inducir la supresión mediada por las células CD8(+).

- CD3(+)CD8(+): Los anticuerpos monoclonales que reaccionan con estas moléculas de superficie reconocen la población de linfocitos T supresores/citotóxicos. Estos suprimen la proliferación de linfocitos B y la producción de anticuerpos; así como destruyen las células que presentan antígenos extraños (Parnes, 1989; Salter y cols., 1990).

En algunos transtornos autoinmunes (Morimoto y cols., 1984), como mostraremos más adelante, se ha comprobado el descenso en el número de los linfocitos T8 supresores/citotóxicos, que condiciona una alteración en el cociente T4/T8 y que explicaría los fenómenos de inmunoactivación o defectuosa inmunosupresión propios de estas enfermedades.

- CD4(+)CD45RA(+): La expresión o ausencia del antígeno CD45RA en los linfocitos CD4 nos definen dos subpoblaciones distintas (Morimoto y cols., 1983; Morimoto y cols., 1985; Rudd y cols., 1987): CD4(+)CD45RA(+) y CD4(+)CD45RA(-).

TABLA IV

POBLACIONES CELULARES CARACTERIZADAS CON ESTOS ANTICUERPOS MONOCLONALES

Ac. Mo.	Poblac.cel.caracterizada
CD45(+)	Leucocitos
CD45(+)CD14(+)	Monocitos/Macrófagos
CD45(+)CD14(-)	Linfocitos, granulocitos
CD45(+)CD3(+)	Linfocitos T
CD45(+)CD20(+)	Linfocitos B
CD45(+)CD16(+)	Linfocitos Grandes Granulares (LGL).
CD3(+)CD4(+)	Linfocitos T4 helper/inducer
CD3(+)CD8(+)	Linfocitos T8 supr./citotóx.
CD4(+)CD45RA(+)	Linfocitos T4 inductores de supresión (células naive o nativas)
CD4(+)CD45RA(-)	Linfocitos T4 inducer-helper (células memoria)
CD8(+)CD11b(+)	Subpoblación de linfocitos T8 supresores antígeno inespecícos y NK.
CD8(+)CD11b(-)	Subpoblación de linfocitos T8 supresores antígeno específicos y NK.
CD8(+)CD56(+)	Subpoblación de linfocitos T8 citotóxicos no MHC restringidos y NK.
CD3(+)HLA-DR(+)	Linfocitos T activados
CD4(+)HLA-DR(+)	Linfocitos T4 helper/inducer activados
CD8(+)HLA-DR(+)	Linfocitos T8 supr./citotóx. activados
CD20(+)CD5(+)	Subpoblación de linfocitos B inmunorreguladores de respuesta inmune inespecífica.

La primera de ellas, también ha venido denominándose inductora de supresión porque participa en las respuestas inmunes cuyo fin es la inmunosupresión mediante la estimulación los linfocitos T8. La subpoblación CD4(+)CD45RA(+) está constituída por los linfocitos T nativos, que deben su nombre a la incapacidad de proliferar en cultivos ante antígenos solubles (Morimoto y cols., 1985).

En condiciones normales, la mitad de los linfocitos T4 de sangre periférica expresan CD45RA.

- CD4(+)CD45RA(-): Esta subpoblación se compone de los linfocitos T4 que no expresan el antígeno de membrana CD45RA. Según Rudd y cols. (1987), estas células favorecen la respuesta humoral, estimulando la producción de anticuerpos por los linfocitos B. De ahí su denominación de colaboradora o de linfocitos T memoria, ya que tienen la capacidad de proliferar en cultivos ante antígenos solubles (Morimoto y cols., 1983; Morimoto y cols., 1985).

- CD8(+)CD11b(+): Las células que coexpresan estas dos moléculas de superficie son una subpoblación de linfocitos T CD8(+) y ciertas células NK. El antígeno CD11b constituye la cadena alfa del receptor CR3 para el complemento (C3bi).

Funcionalmente, las células caracterizadas por el fenotipo CD8(+)CD11b(+) son supresoras antígeno no específicas (Takeuchi y cols., 1988), es decir, no precisan de la intervención de la subpoblación CD4(+)CD45RA(+) (inductora de supresión) para ejercer su acción. La supresión ejercida por estos linfocitos no requiere, por tanto, de la restricción por el MHC.

- CD8(+)CD11b(-): Los linfocitos CD8(+) que no expresan el

receptor CD11b han sido incluídos por Takeuchi y cols. (1988) dentro del grupo de células supresoras antígeno específicas, necesitando de la mediación de los linfocitos CD4(+)CD45RA(+) o inductores de supresión para su activación en el reconocimiento de un antígeno extraño.

Otros autores (Landay y cols., 1983) consideran que esta población linfocitaria posee características citotóxicas, en contraposición con la subpoblación CD8(+)CD11b(+) que definiría a los linfocitos CD8(+) supresores.

- CD8(+)CD56(+): La subpoblación linfocitaria que responde a este fenotipo se encuentra constituída por algunas células NK y una subpoblación de linfocitos T citotóxicos no restringidos por el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (Lanier y Phillips, 1986).

Algunos autores (Lanier y cols., 1987) especulan que la expresión del antígeno CD56 en la membrana de los linfocitos CD8(+) podría indicar un cierto grado de activación, al encontrar en líneas de cultivos celulares de linfocitos CD8(+) con receptor para la IL-2, el aumento de la captación de este Ac. Mo.

- CD3/CD4/CD8(+)HLA-DR(+): La expresión del antígeno de clase II, integrante del Complejo Mayor de Histocompatibilidad, por los linfocitos T, T4 y T8 respectivamente, ocurre cuando dichos linfocitos se activan.

El incremento en la expresión del antígeno HLA-DR en la membrana de los linfocitos T, T4 o T8 indica, por tanto, un estado de activación celular que se relaciona con algunas patologías, en especial, las enfermedades autoinmunes (Raziuddin y cols., 1988).

- CD20(+)CD5(+): Esta subpoblación de linfocitos B desempeña un importante papel como inmunorreguladora, al producir la mayoría de los anticuerpos polirreactivos, que actúan limpiando restos celulares y células muertas y, lo que es más importante, se encuentra involucrada en la respuesta inmune no antígeno específica (y no en la secundaria) (Raveche y cols., 1990). De ahí el aumento de estos linfocitos en la vida fetal.

IV.3.- PROCEDIMIENTO.-

IV.3.1.- TECNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA.-

Para el estudio de las poblaciones leucocitarias, y en especial, de linfocitos en distintos tipos de eyaculados humanos, así como el papel que la inmunología celular juega en la fisiopatología de la reproducción, hemos utilizado una técnica de inmunofluorescencia directa de doble marcaje con anticuerpos monoclonales.

A partir de una muestra de semen total y tras 45 minutos de licuefacción, se procedió al contaje al microscopio óptico de células redondas y leucocitos peroxidasa positiva, y al análisis de los parámetros básicos seminales (expuestos anteriormente). A continuación, diluímos la muestra con un volumen de PBS igual al del eyaculado y centrifugamos 5 minutos a 400 g. Resuspendimos el pellet en 1 ml de PBS y finalmente, agitamos para obtener una solución celular homogénea.

De acuerdo con Parker y cols. (1990) y según el método rápido de Hoffman y cols.(1980) en sangre periférica y su aplicación en líquidos de naturaleza biológica por Castilla y cols. (1990), se mezclaron 50 µl de muestra de semen con 10 µl de un primer Ac.Mo. conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) y con 10 µl de un segundo

anticuerpo monoclonal directamente conjugado con ficoeritrina (PE). Se agitó la mezcla y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Seguidamente, se realizaron dos lavados con PBS, añadiendo 3 ml de dicha solución a los tubos, que agitamos y centrifugamos a 400 g durante 5 minutos. Por último, decantamos y resuspendimos las células en 200 µl de paraformaldehído al 1%, procediéndose al análisis de las poblaciones leucocitarias y linfocitarias mediante el citómetro de flujo FAC-scan IV (Becton Dickinson; Mountain View, California).

Las diferentes combinaciones de anticuerpos monoclonales utilizadas para definir y cuantificar las poblaciones de leucocitos y, en especial, las subpoblaciones linfocitarias, fueron las siguientes:

Tubo nº 1 .....CD45 FITC CD14 PE (Control (+))
Tubo nº 2 .....IgG_1 FITC IgG_{2a} PE (Control (-))
Tubo nº 3 .....CD45 FITC CD3 PE
Tubo nº 4 .....CD45 FITC CD20 PE
Tubo nº 5 .....CD45 FITC CD16 PE
Tubo nº 6 .....CD3 FITC
Tubo nº 7 .....CD3 FITC CD4 PE
Tubo nº 8 .....CD3 FITC CD8 PE
Tubo nº 9 .....CD3 FITC HLA-DR PE
Tubo nº 10.....CD4 PE
Tubo nº 11.....CD45RA FITC CD4 PE
Tubo nº 12.....HLA-DR FITC CD4 PE
Tubo nº 13.....CD8 FITC
Tubo nº 14.....CD8 FITC CD11b PE
Tubo nº 15.....CD8 FITC CD56 PE
Tubo nº 16.....CD8 FITC HLA-DR PE
Tubo nº 17.....CD20 PE
Tubo nº 18.....CD5 FITC CD20 PE

IV.3.2.- CITOMETRIA DE FLUJO.-

IV.3.2.1.- FUNDAMENTOS DE LA CITOMETRIA DE FLUJO.-

El análisis de una suspensión celular mediante citometría de flujo (Coon y cols., 1987; Ryan y cols., 1988; Van Dam y Lowe, 1992) se basa en la intercepción de cada una de las células de dicha suspensión con un rayo láser, proporcionando información acerca de las características físicas de estas células y de la fluorescencia que emiten una vez que han sido incubadas con anticuerpos monoclonales doblemente conjugados, a través de tres tipos de detectores:

a) SIDE SCATTER (SSC): o de dispersión lateral que produce el rayo que penetra a través de cada componente celular. Nos informa sobre la complejidad citoplasmática y granularidad de las células sometidas al análisis.

b) FORWARD SCATTER (FSC): o de dispersión delantera que emite el rayo láser al atravesar las células. Nos informa sobre el tamaño celular.

c) DETECTORES DE FLUORESCENCIA: En nuestro estudio hemos utilizado dos de los tres de que dispone el FAC-scan IV: FL1 o fluorescencia 1, que capta la longitud de onda correspondiente al color verde de la fluoresceína (FITC) y FL2 o fluorescencia 2, que capta la correspondiente al color rojo de la ficoeritrina (PE). Ambas, fluoresceína y ficoeritrina, son excitadas a la longitud de onda de 488 nm, aunque sus espectros de emisión son lo suficientemente diferentes (525 nm para FITC y 575 para PE) como para permitir el análisis simultáneo de dos antígenos de superficie unidos a anticuerpos monoclonales marcados con ambos fluorocromos.

Para determinar variaciones instrumentales usamos las "calibrite spheres" (Becton Dickinson Immunocytometry Systems), obteniendo variaciones inferiores a 0,9% y 1,5% para la fluoresceína (FITC) y ficoeritrina (PE) respectivamente.

En un primer paso, las células de la suspensión, objeto de estudio, aparecen en un histograma en donde se representa el tamaño celular (medido por el detector de dispersión delantera FSC) en el eje de abscisas, y en el eje de ordenadas la dispersión lateral (SSC) que es proporcional a la complejidad celular.

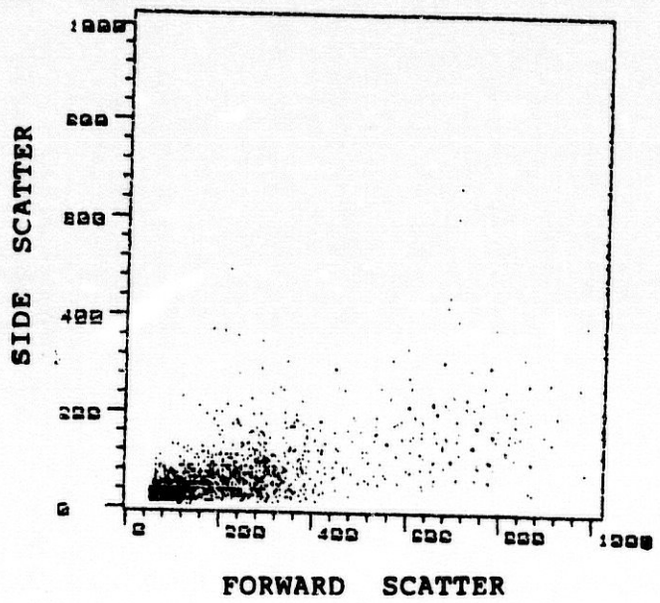
Como se observa en la Fig. 1, se diferencian varios grupos celulares: hematíes y restos celulares, espermatozoides y células redondas, que engloban a los leucocitos, células germinales y epiteliales.

A través del cursor del analizador FAC-scan, podemos seleccionar o adquirir (es lo que se denomina "gatear") las poblaciones celulares que deseemos (Fig. 2). Activando dicho campo, obtenemos un nuevo histograma (Fig. 3), en donde en el eje de abscisas se representa el tamaño celular (FSC) y en el eje de ordenadas la complejidad citoplasmática y las granularidad de las células adquiridas.

Cada punto de la pantalla representa un evento celular dentro del volumen total de la población previamente seleccionada.

Las poblaciones celulares marcadas con los distintos anticuerpos monoclonales que llevan fluorescencia de color verde o rojo, ocupan en cada histograma un determinada posición, delimitada por dos ejes, uno vertical y otro horizontal, del analizador FAC-scan. La posición de los ejes se estandariza al comenzar el análisis de cada muestra de semen por

Fig. 1.- GRUPOS CELULARES DE UNA MUESTRA DE SEMEN TOTAL REPRESENTADAS EN LA PANTALLA "DOT PLOT" DEL FAC-SCAN IV MEDIANTE LOS DETECTORES FSC Y SSC.



medio de los controles (+) y (-) de leucocitos, a los que más tarde haremos referencia.

Según el lugar que ocupen las diferentes subpoblaciones marcadas con FITC o PE dentro del histograma, podremos determinar cuál de ellas es positiva o negativa referente a cada eje.

Si se encuentran por encima o por debajo del eje horizontal, las células teñidas de rojo (PE), serán positivas o negativas respectivamente (Fig. 4). Mientras que en el caso de que ocuparan la parte derecha o

Fig. 2.- ADQUISICION O GATEO DE CELULAS REDONDAS DE UNA MUESTRA DE SEMEN TOTAL MEDIANTE LOS DETECTORES FSC Y SSC.

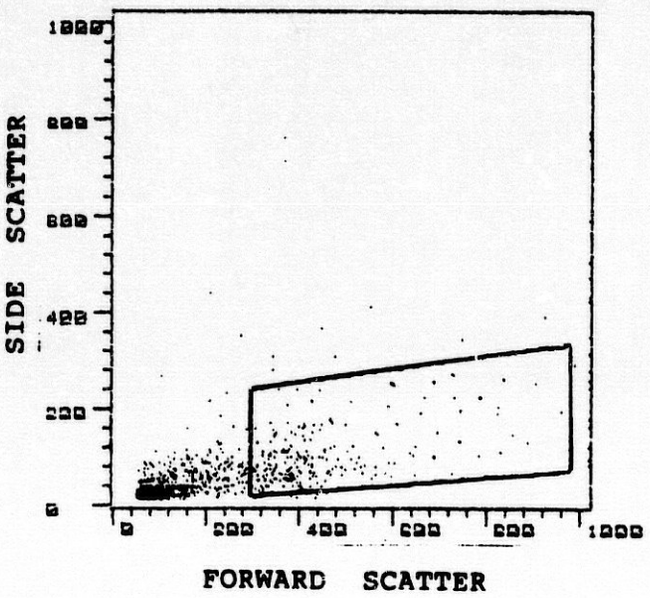
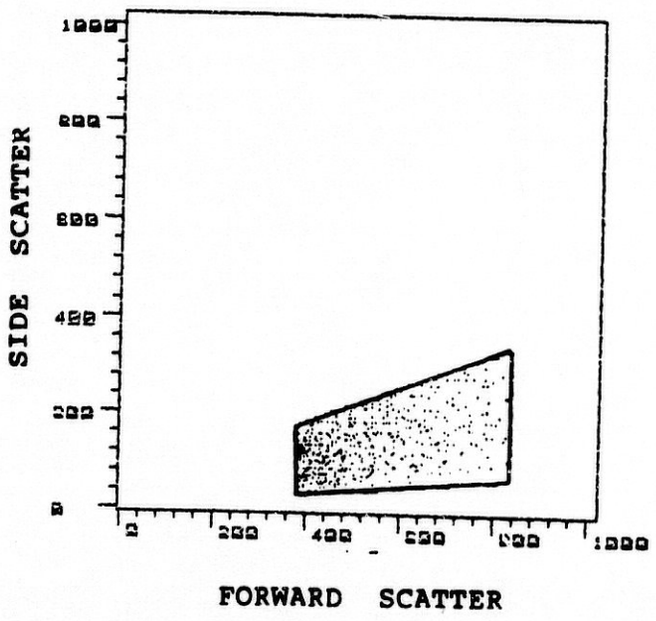


Fig. 3.- ACTIVACION DEL GATEO DE CELULAS REDONDAS DE UNA MUESTRA DE SEMEN TOTAL.



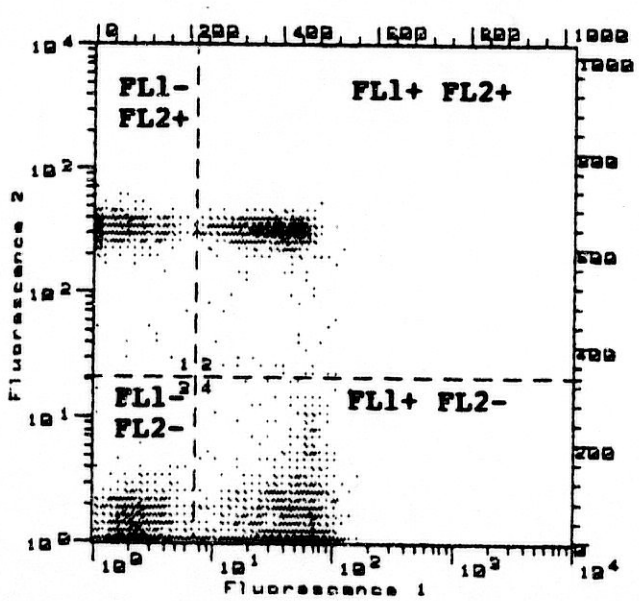
izquierda del eje de ordenadas, las células habrían sido teñidas de color verde (FITC) o no, respectivamente (Fig.4).

Por consiguiente, en el histograma resultante se obtienen 4 cuadrantes, y en cada uno de ellos podemos cuantificar las siguientes subpoblaciones celulares:

- 1er cuadrante: Células FL1(-)FL2(+).
- 2° cuadrante: Células FL1(+)FL2(+).
- 3er cuadrante: Células FL1(-)FL2(-).
- 4° cuadrante: Células FL1(+)FL2(-).

Asimismo, con este histograma podremos calcular la proporción de cada subpoblación del volumen de células seleccionadas.

Fig. 4.- ANALISIS POR CITOMETRIA DE FLUJO DE UNA SUSPENSION CELULAR MEDIANTE IFD DE DOBLE MARCAJE.



IV.3.2.2.- ANALISIS POR CITOMETRO DE FLUJO.-

En nuestro trabajo, el análisis de los leucocitos y determinadas subpoblaciones de éstos en el semen se efectuó mediante el citómetro de flujo FAC-scan IV (Becton Dickinson; Mountain View, California).

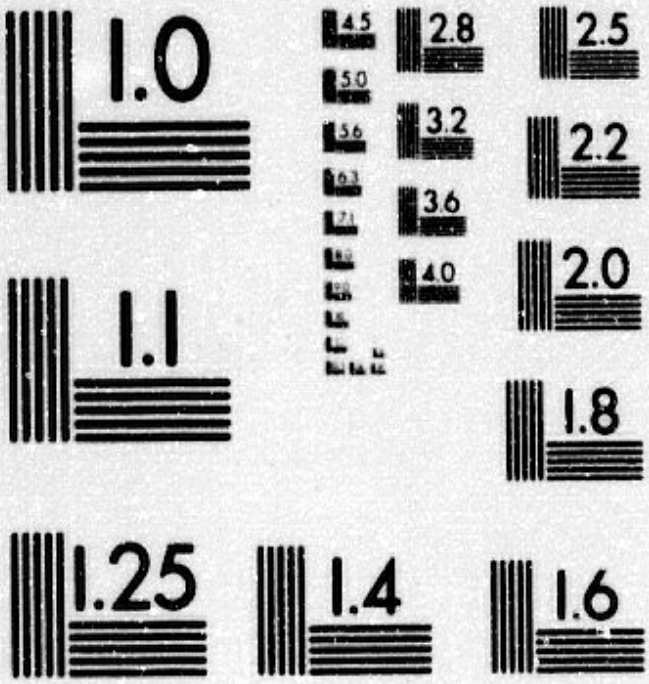
Uno de los problemas existentes en la cuantificación de los leucocitos seminales, se presentó a la hora de diferenciarlos de las células germinales. Ambos tipos celulares se engloban bajo la denominación de células redondas.

Han sido propuestas diversas técnicas y metodologías con el fin de conseguir la identificación de tales células.

Nosotros, al igual que Eggert-Kruse y cols. (1992) y Homyk y cols. (1990) hemos utilizado el Ac. Mo. anti-CD45 (anti-HLE-1) que identifica los leucocitos presentes en los eyaculados.

Para cada combinación de anticuerpos utilizada, adquirimos de 2500 a 5000 células (Giorgi y cols., 1990), cuando fue posible.

De este modo, procedimos a la selección de las células redondas seminales por medio de los detectores de dispersión (FSC/SSC) del FAC-scan IV (Giorgi y cols., 1990), que nos diferencian las células de los espermatozoides, por poseer estos últimos menor tamaño (menor FSC) (Fig.2). Por esta razón, aparecen representados a la izquierda de las células redondas en la Fig. 1. Comprobamos que se trataba de espermatozoides, ya que en una selección previa, no se obtenía positividad alguna cuando analizábamos el tubo que contenía el Ac. Mo. panleucocitario anti-CD45, que no es expresado por los espermatozoides.



MICROCOPY RESOLUTION TEST CHART
NATIONAL BUREAU OF STANDARDS
STANDARD REFERENCE MATERIAL 1010a
(ANSI and ISO TEST CHART No. 2)

IV.3.2.2.- ANALISIS POR CITOMETRO DE FLUJO.-

En nuestro trabajo, el análisis de los leucocitos y determinadas subpoblaciones de éstos en el semen se efectuó mediante el citómetro de flujo FAC-scan IV (Becton Dickinson; Mountain View, California).

Uno de los problemas existentes en la cuantificación de los leucocitos seminales, se presentó a la hora de diferenciarlos de las células germinales. Ambos tipos celulares se engloban bajo la denominación de células redondas.

Han sido propuestas diversas técnicas y metodologías con el fin de conseguir la identificación de tales células.

Nosotros, al igual que Eggert-Kruse y cols. (1992) y Homyk y cols. (1990) hemos utilizado el Ac. Mo. anti-CD45 (anti-HLE-1) que identifica los leucocitos presentes en los eyaculados.

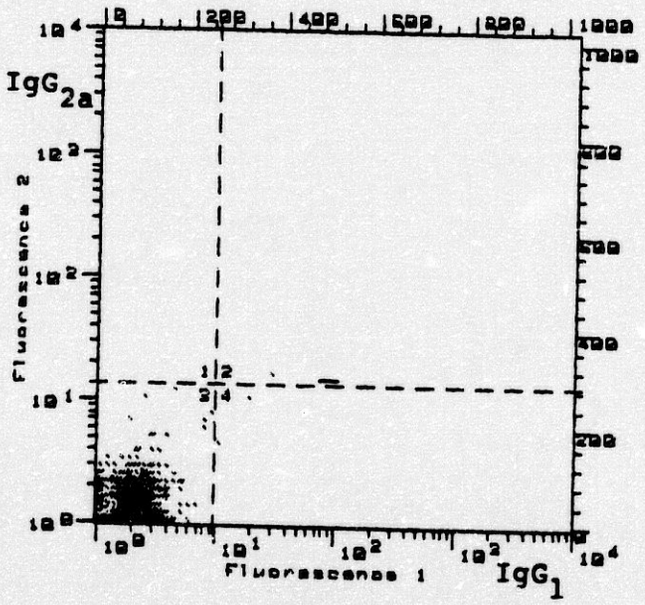
Para cada combinación de anticuerpos utilizada, adquirimos de 2500 a 5000 células (Giorgi y cols., 1990), cuando fue posible.

De este modo, procedimos a la selección de las células redondas seminales por medio de los detectores de dispersión (FSC/SSC) del FAC-scan IV (Giorgi y cols., 1990), que nos diferencian las células de los espermatozoides, por poseer estos últimos menor tamaño (menor FSC) (Fig.2). Por esta razón, aparecen representados a la izquierda de las células redondas en la Fig. 1. Comprobamos que se trataba de espermatozoides, ya que en una selección previa, no se obtenía positividad alguna cuando analizábamos el tubo que contenía el Ac. Mo. panleucocitario anti-CD45, que no es expresado por los espermatozoides.

A continuación, analizamos el tubo nº 2 (IgG_1 IgG_{2a}), que se empleó como control negativo para eliminar la fluorescencia inespecífica que algunas partículas y restos celulares seminales pueden presentar (Wolff y Anderson, 1988) (Fig. 5), obteniendo menos de un 2% de captación de fluorescencia.

El análisis del tubo nº 1 (CD45 CD14) por FL1 constituyó el siguiente paso, obteniendo por histograma el porcentaje de células CD45(+) o leucocitos presentes en el eyaculado estudiado y el de células CD45(-) (células germinales, epiteliales, hematíes). Aplicando dichas proporciones al número total de células redondas que presentó dicha muestra, pudimos conocer el número total de leucocitos/ml que poseía cada eyaculado.

Fig. 5.- ANALISIS DEL CONTROL NEGATIVO (IgG_1FITC IgG_{2a}PE) UTILIZADO EN EL ESTUDIO DE LAS POBLACIONES LEUCOCITARIAS DE DISTINTOS EYACULADOS HUMANOS.



Asimismo, la concentración de leucocitos peroxidasa positiva (macrófagos y granulocitos) nos sirvió como control en la determinación de la concentración de los leucocitos seminales, ya que en el caso de que algún espermatozoide de mayor tamaño hubiera sido representado más a la derecha (mayor FSC) en la Fig. 1, la proporción de leucocitos con respecto al total de células redondas se vería disminuída y podría resultar que el número de leucocitos/ml detectado por citometría de flujo fuera menor que la concentración de leucocitos peroxidasa positiva, lo que sería imposible y nos indicaría que la selección de las células redondas mediante los detectores de dispersión no habría sido bien realizada, ya que la células CD45(+) incluyen a los linfocitos, neutrófilos y monocitos, mientras que la tinción de la peroxidasa sólo identifica a los monocitos y granulocitos (Tabla V).

TABLA V

METODO DE CUANTIFICACION DE LEUCOCITOS SEMINALES.

1.- Contaje al microscopio de células redondas.
2.- Adquisición de células redondas por FSC/SSC.
3.- Análisis por FL1/FL2 del control (-) (IgG_1 IgG_{2a}).
4.- Análisis por FSC/FL1 del tubo con anti-CD45.
5.- Obtención del porcentaje de células CD45(+) o leucocitos del total de células redondas gateadas.

El siguiente objetivo consistía en la cuantificación de las poblaciones de leucocitos presentes en los distintos tipos de eyaculados estudiados. Para ello, se realizó el análisis por citometría de flujo del tubo nº 1 (CD45 CD14) únicamente, de acuerdo con los siguientes pasos:

En primer lugar, seleccionamos o "gateamos" las células CD45(+) o leucocitos totales utilizando el detector de dispersión delantera FSC y el de fluorescencia FL1, según Fig. 6. Con ello, nos asegurábamos de que la población, objeto de estudio, estaba formada por todos los leucocitos presentes en cada muestra y que no existían interferencias con otros tipos celulares. A continuación reanalizamos el tubo nº 1 (CD45 CD14), obteniendo la Fig. 7, que representa en el cuadrante nº 2 las células CD45(+)CD14(+) y en el cuadrante nº 4 las que son CD45(+)CD14(-).

Fig. 6.- ADQUISICION O GATEO DE CELULAS CD45(+) O LEUCOCITOS SEMINALES MEDIANTE LOS DETECTORES FSC Y FL1.

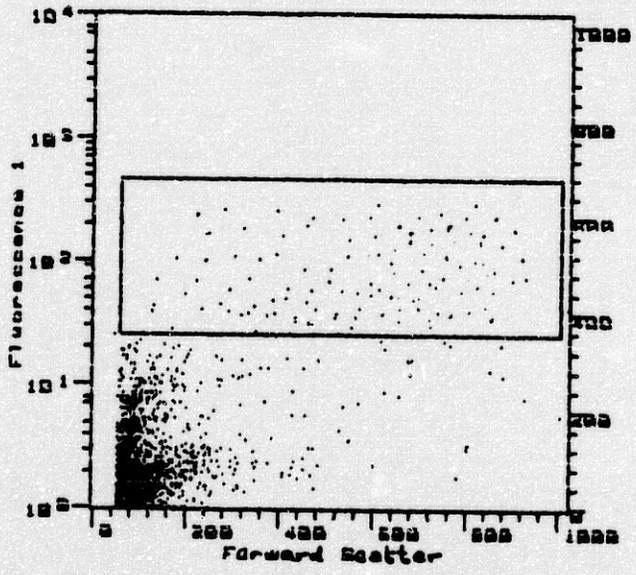
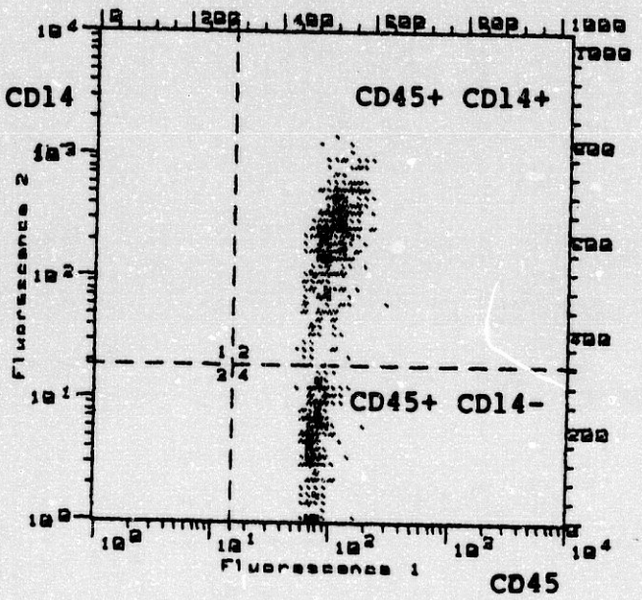


Fig. 7.- ANALISIS POR CITOMETRIA DE FLUJO DE LA PROPORCION DE MONOCITOS CON RESPECTO A LA SUMA DE LINFOCITOS Y NEUTROFILOS (M/L+P).



En este caso, en el cuadrante nº 2, se situarían los monocitos y macrófagos (CD45(+)CD14(+)) y en el nº 4 los linfocitos y granulocitos (CD45(+)CD14(-)). De este modo, obtuvimos la proporción de monocitos con respecto a la suma de los linfocitos más los granulocitos (M/L+P). A partir del número de leucocitos totales, determinado anteriormente, y por simple regla de tres, pudimos calcular el número absoluto de monocitos/macrófagos (Tabla VI)

TABLA VI
METODO DE CUANTIFICACION DE MONOCITOS SEMINALES.

1.- Adquisición de células CD45(+) (leucocitos) por FSC/FL1.
2.- Análisis por FL1/FL2 del tubo CD45 CD14.
3.- Obtención de la proporción de monocitos con respecto a la suma de linfocitos y neutrófilos (M/L+P).
4.- Cálculo del valor absoluto de monocitos a partir del número de leucocitos hallado anteriormente.

En segundo lugar, volvimos a analizar el tubo nº 1 (CD45 CD14), pero realizando un primer "gateo" o selección de las células mononucleadas (monocitos y linfocitos) mediante los detectores de dispersión FSC y SSC (Fig. 8), y posteriormente procedimos como antes, es decir, un segundo gateo de éstas mediante FSC y FL1, seleccionando aquellas células CD45(+), y despreciando las células CD45(-), es decir, las germinales y epiteliales (Fig. 6). De este modo, hallamos la proporción de monocitos (CD45(+)CD14(+)) con respecto a la de linfocitos (CD45(+)CD14(-)) (M/L) (Fig. 9), ya que el análisis por citometría de flujo nos permite la cuantificación de estos leucocitos mediante la intersección de los dos gateos realizados. De nuevo, por simple regla de tres, basada en el número de leucocitos y monocitos, pudimos conocer la concentración de linfocitos y granulocitos de cada una de las muestras de semen estudiadas (Tablas VII y VIII).

Fig.8.- ADQUISICION O GATEO DE CELULAS MONONUCLEADAS DE UNA MUESTRA DE SEMEN TOTAL MEDIANTE LOS DETECTORES FSC Y SSC.

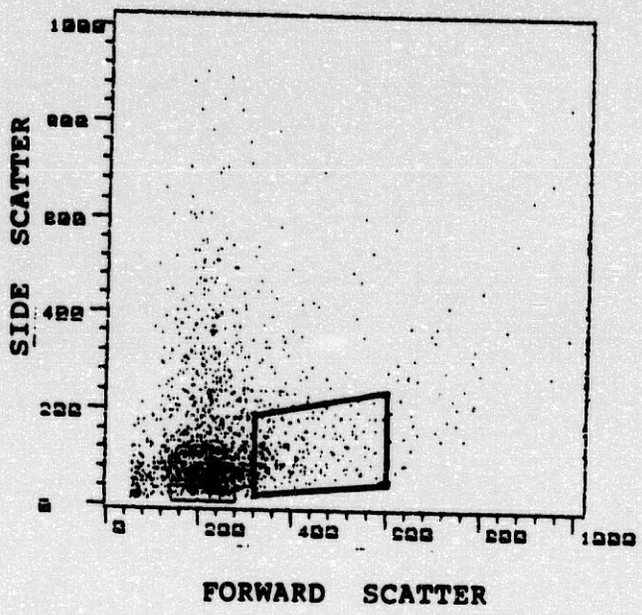


Fig. 9.- ANALISIS POR CITOMETRIA DE FLUJO DE LA PROPORCION DE MONOCITOS CON RESPECTO A LOS LINFOCITOS (M/L).

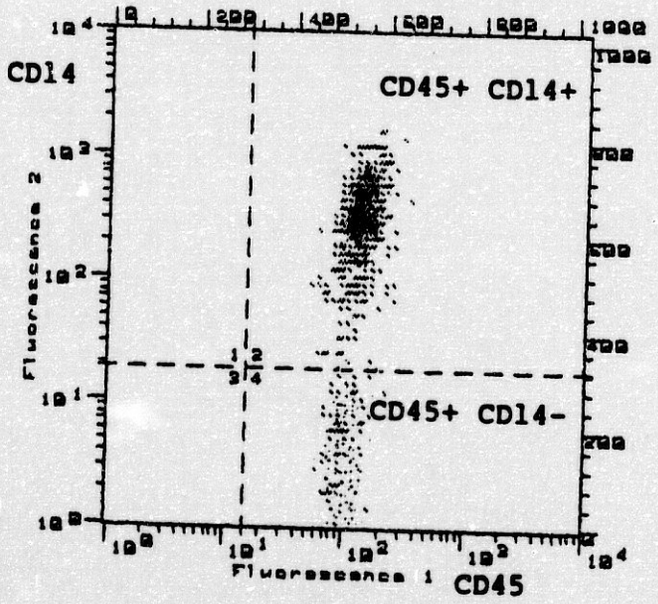


TABLA VII

METODO DE CUANTIFICACION DE LINFOCITOS Y GRANULOCITOS SEMINALES.

1.- Adquisición de células mononucleadas por FSC/SSC.
2.- Adquisición de células CD45(+) por FSC/FL1.
3.- Análisis por FL1/FL2 del tubo CD45 CD14.
4.- Obtención de las proporciones de monocitos con relación a los linfocitos (M/L).
5.- Cálculo de los valores de las poblaciones de linfocitos y granulocitos basados en el nº de leucocitos y monocitos existentes.

TABLA VIII

EJEMPLO DE LOS CALCULOS REALIZADOS PARA LA CUANTIFICACION DE POBLACIONES LEUCOCITARIAS (caso nº 17).

- Células redondas: 5.000.000/cc.
- Proporciones obtenidas: M/L+P=70%/30%; M/L=75%/25%.
- Leucocitos: 1.000.000/cc (20% de células redondas eran CD45+).
- Monocitos: 700.000/cc (70% de leucocitos era CD45+ CD14+).
- Linfocitos: 75% monocitos-------- 25% linfocitos
  700.000/cc monoc.----- x

De lo que se desprende que el nº de linfocitos existente en esta muestra es : 233.333/cc.

- Granulocitos: Leucocitos-(linfocitos+monocitos)= 66.667/cc.

Por último, el análisis de los restantes tubos nos proporcionó el porcentaje y número absoluto de las subpoblaciones linfocitarias, objeto de este estudio (Tabla VII). Teniendo en cuenta las recomendaciones del MACSE - Multicenter AIDS Cohort Study Experience - (Giorgi y cols., 1990), la población de linfocitos se seleccionó con los detectores de dispersión FSC y SSC (Fig. 10), a lo que se añadió un segundo gateo usando el detector Foward Scatter junto al de Fluorescencia 1, FL1, que nos permitió escoger las células CD45(+) con menor tamaño (Loken y cols., 1990), en otras palabras, los linfocitos (Fig. 11).

Posteriormente, se estudió el tubo nº 1 (CD45 CD14), que contenía el control (+) de los linfocitos, comprobando que no existían interferencias con otros tipos celulares (Fig. 12), al obtener un proporción de células

Fig. 10.- ADQUISICION O GATEO DE LOS LINFOCITOS SEMINALES MEDIANTE LOS DETECTORES FSC Y SSC.

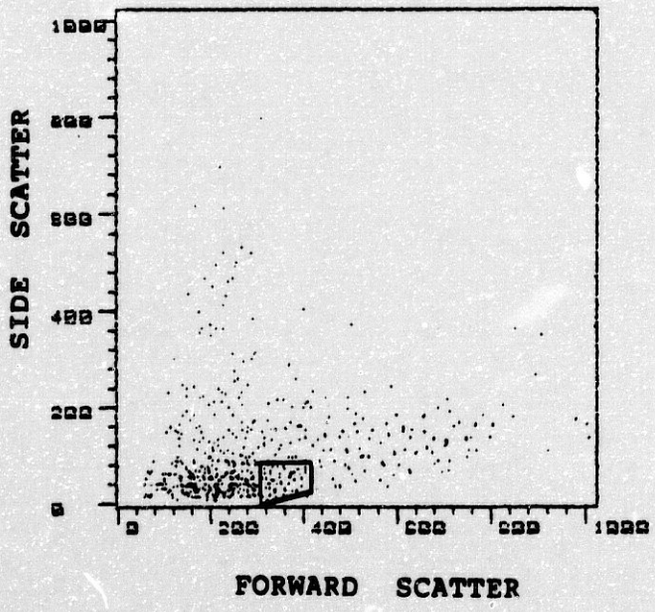


Fig. 11.- ADQUISICION DE LOS LINFOCITOS SEMINALES MEDIANTE LOS DETECTORES FSC Y FL1.

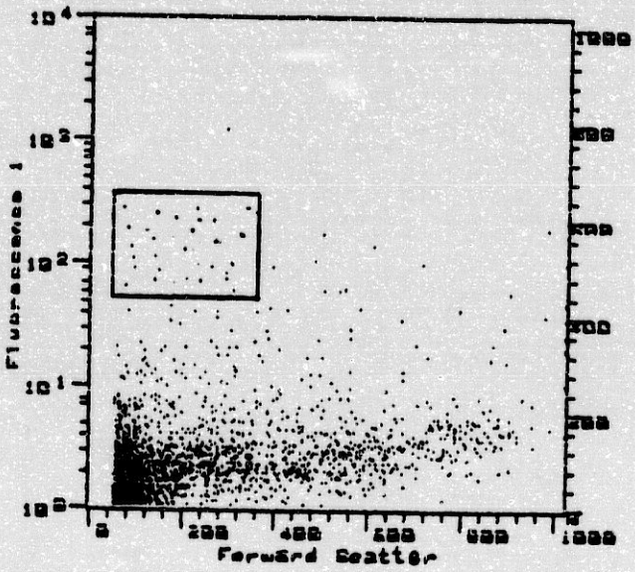
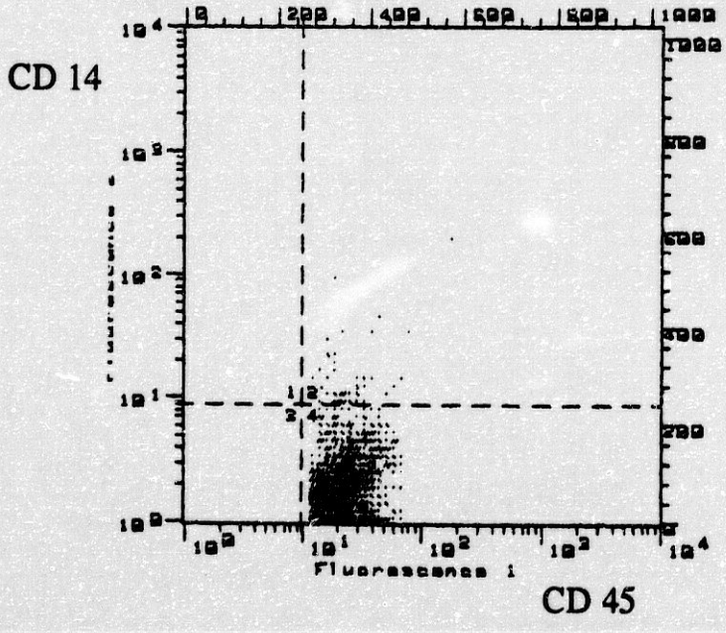


Fig. 12.- ANALISIS DEL CONTROL POSITIVO UTILIZADO EN EL ESTUDIO DE LAS SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS DE DISTINTOS EYACULADOS HUMANOS



CD45(+)CD14(-) mayor del 97%.

El resto de los anticuerpos monoclonales empleados y las poblaciones celulares caracterizadas se expresan en las Tablas III y IV. Todos ellos fueron proporcionados por la Becton Dickinson.

El paso siguiente fue determinar las subpoblaciones de los tubos nº 3 (CD45 CD3), 4 (CD45 CD20) y 5 (CD45 CD16), reflejándose en el cuadrante nº 2 de la pantalla del citómetro, la proporción de linfocitos T, B y LGL respectivamente.

El resto de los tubos sometidos a estudio conservaron el primer gateo (FSC/SSC), realizándose una segunda selección de células mediante el detector de dispersión delantera (FSC) -con el fin de escoger las células mononucleadas de menor tamaño o linfocitos - y alguno de los dos detectores de fluorescencia (FL1 o FL2) que posee el FAC-scan (Sampalo y cols., 1993). Ella se efectuó de la siguiente manera:

- Para los tubos nº 7 (CD3 CD4), 8 (CD3 CD8) y 9 (CD3 HLA-DR), se procedió mediante FSC y FL1, escogiendo las células de menor tamaño que expresaban la molécula de membrana CD3. El tubo nº 6 (CD3 FITC) nos sirvió de control (+). Del mismo modo, en el cuadrante nº 2 calculamos los linfocitos T4, T8 y T activados, respectivamente.

- Para los tubos nº 11 (CD4 CD45RA) y 12 (CD4 HLA-DR), ésta se realizó optando por las células de menor tamaño que expresaron el receptor antigénico CD4, por medio del detector de fluorescencia FL2, puesto que dicho antígeno, en este caso, fue marcado con ficoeritrina. El tubo nº 10 (CD4PE) constituyó el control (+) utilizado para la cuantificación de estas subpoblaciones linfocitarias.

- Las subpoblaciones de linfocitos CD8(+) y la proporción de linfocitos CD8(+) activados (tubos nº 14 (CD8 CD11b), 15 (CD8 CD56) y 16 (CD8 HLA-DR), respectivamente) por selección de los detectores FSC y FL1. Se tomaron aquellas células de menor tamaño, que presentaban positividad para el Ac. Mo. anti-CD8 FITC. El tubo nº 13 (CD8 FITC) fue empleado como control (+) de estos linfocitos.

- Por último, para la detección de los linfocitos B CD5(+), se procedió al gateo de la subpoblación que con menor tamaño captaba el Ac. Mo. anti-CD20 PE, mediante la utilización de los detectores FSC y FL2. El tubo nº 17 (CD20 PE) constituyó el control (+) de este grupo.

TABLA IX

METODO DE CUANTIFICACION DE LAS SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS.

1.-Adquisición de células mononucleadas con menor tamaño.
2.-Adquisición por FSC/FL1 de células CD45(+) con menor tamaño.
3.-Análisis del control (+) de linfocitos (CD45(+)CD14(-) >97%).
4.-Análisis de los tubos: CD45 CD3, CD45 CD20 y CD45 CD16, y cálculc de linfocitos T, B y LGL.
5.-Adquisición FSC/FL1 de células CD3(+) con menor tamaño.
6.-Análisis del control (+) de linfocitos (CD3 FITC).
7.-Análisis de los tubos: CD3 CD4, CD3 CD8 y CD3 HLA-DR y cálculo de linfocitos T4, T8 y T activados.
8.-Adquisición FSC/FL2 de células CD4(+) con menor tamaño.

TABLA IX (Continuación)
METODO DE CUANTIFICACION DE LAS SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS.

9 .-Análisis del control (+) de linfocitos (CD4 PE).
10.-Análisis de los tubos: CD4 CD45RA y CD4 HLA-DR y cálculo de linfocitos ind. helper, ind.supr. y T4 activados.
11.-Adquisición FSC/FL1 de células CD8(+) con menor tamaño.
12.-Análisis del control (+) de los linfocitos (CD8 FITC).
13.-Análisis de los tubos: CD8 CD11b, CD8 CD56 y CD8 HLA-DR y cálculo de los valores de estas subpoblaciones de linfocitos CD8(+).
14.-Adquisición FSC/FL2 de células CD20(+) con menor tamaño.
15.-Análisis del control (+) de linfocitos (CD20 PE).
16.-Análisis de la subpoblación B CD5(+) (CD20 CD5).

Se calculó el porcentaje de cada subpoblación linfocitaria en relación al número total de linfocitos, así como el número absoluto de células por ml, expresando ambos resultados (Tablas XI- XXIII).

V.- ANALISIS POR CITOMETRIA DE FLUJO DE LAS CELULAS CD16 (+) OBSERVADAS EN EYACULADOS CON AAE.-

Con el objeto de comprobar que el aumento de células CD16(+) observado en algunos eyaculados era real, se diseñaron dos experimentos. Algunos investigadores han demostrado la presencia en semen de

proteínas que se unen a las Igs. (AAE) y que captan el Ac. Mo. anti-CD16, proteínas que han sido identificadas como IBF (immunoglobulin binding factor) (Liang y cols., 1992; Kamada y cols., 1991); o como la molécula CD16 (Thaler y cols., 1991; Bukovsky y cols., 1991). Este hecho podría invalidar el incremento de LGL que hemos detectado en pacientes estériles inmunológicos, ya que el complejo Ig (AAE)-espermatozoide podría unirse a dichas moléculas, resultando en la aparente expresión del antígeno CD16 por parte de los espermatozoides.

Paralelamente, debía estudiarse la posible reactividad cruzada de AAE con linfocitos, pues cabía la posibilidad de que los linfocitos pudieran unirse a los AAE del semen al compartir con los espermatozoides algunos antígenos (D'Cruz y Haas, 1993), pudiendo verificarse el caso de que los complejos Igs. (AAE)-linfocitos podrían unirse a la molécula CD16 o IBF (moléculas que unen Igs.), resultando en una aparente captación del Ac. anti-CD16 por parte de algunos linfocitos, que realmente no lo expresan.

V.1.- ESTUDIO DE LA CAPTACION DEL AC. MO. ANTI-CD16 POR ESPERMATOZOIDES CON AAE.-

El primer experimento que diseñamos, por tanto, se basó en el estudio de la captación del Ac. Mo. anti-CD16 por los espermatozoides con AAE en su superficie. Para ello, comparamos la captación media de este Ac. Mo. en un grupo control de espermatozoides sin AAE con la fijación media en un grupo de eyaculados con espermatozoides que presentaron AAE en su superficie.

A partir de 10 muestras de semen, 5 de ellas con AAE y el resto sin ellos, preparamos un swim-up (recogida de espermatozoides móviles) de cada una de ellas. Para ello, a 1cc de muestra se le añadió 3 cc

de medio RPMI. Dicha mezcla fue centrifugada a 300 g, durante 8 minutos. Seguidamente, se retiró el sobrenadante, y al "pellet" se le añadió muy lentamente 1 ml de medio, incubándose en la estufa a 37° C durante 40 minutos. Los espermatozoides móviles migran al medio y es entonces, cuando los recogemos y los contamos en cámara de Neubauer. A continuación y durante 30 minutos a temperatura ambiente, incubamos por un lado 10 µl de cada muestra de espermatozoides con 50 µl del Ac. Mo. anti-CD45 (Anti-HLE-1 FITC; Ref n° 7460; Becton Dickinson) , que sirvió de control negativo para los espermatozoides; y por otro, otras 10 µl de cada muestra con 50 µl del Ac. Mo. anti-CD16 (Anti-Leu-11c PE; ref n° 7617; Becton Dickinson). Concluída la incubación, realizamos dos lavados con PBS (como han sido descritos anteriormente) y medimos en el citómetro de flujo FAC-scan IV (Becton Dickinson), esperando obtener una captación elevada del Ac. Mo. anti-CD16 por los espermatozoides de los eyaculados con AAE, si las moléculas que unen Igs. del semen (CD16 o IBF) son capaces de unirse a los AAE fijados a la superficie de los espermatozoides y a dicho Ac. Mo.

V.2.- ESTUDIO DE LA REACTIVIDAD CRUZADA DE AAE CON LOS LINFOCITOS DE EYACULADOS.-

Con el segundo experimento, intentamos aclarar la posibilidad de que una reactividad cruzada entre los AAE y los linfocitos tuviera lugar. En dicho caso, los linfocitos fijarían los AAE y éstos, a su vez, se unirían a moléculas presentes en el semen como IBF o CD16 que captan el Ac. Mo. anti-CD16, produciéndose un falso incremento en la expresión de esta molécula de membrana en los linfocitos de eyaculados de pacientes estériles de origen inmunológico. Para su comprobación, se comparó el porcentaje de linfocitos que expresaban Ig G en su superficie en eyaculados con y sin AAE, para lo que se utilizó un Ac. Mo. anti-Ig G

humano marcado con FITC (Rabbit anti-human Ig G FITC conjugated; Janssen Biochimica; Beerse; Belgium).

A partir de los mismos 10 eyaculados, preparamos las muestras de la forma explicada en el apartado anterior para estudio de poblaciones linfocitarias en semen, incubando 10 µl de cada muestra con 50 µl de los Ac. Mo. antiCD45 (anti-HLE-1 FITC; ref nº 7460; Becton Dickinson), que nos sirvió de control positivo para los linfocitos; y anti-human-Ig G, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras dos lavados con PBS, las suspensiones celulares se analizaron en el citómetro de flujo FACscan IV (Becton Dickinson).

VI.- METODOS ESTADISTICOS.-

Para la realización del estudio acerca de las caracteristicas seminales y poblaciones linfocitarias en diferentes tipos de eyaculados, se utilizaron los siguientes paquetes estadísticos MICROSTAT (Ecosoft, INC) y BMDP (Biomedical Programs, Statistical Software, INC), efectuándose los siguientes pasos:

VI.1.- ANALISIS DESCRIPTIVO.-

Se han considerado 5 grupos de eyaculados diferentes: fértiles, estériles sin AAE, estériles con AAE IgG y A, estériles con AAE Ig G y postvasectómicos. Realizándose un análisis descripitivo de cada una de las variables objeto de estudio en cada grupo (BMDP 1D), se calcularon los parámetros muestrales básicos: media, desviación típica y rango.

VI.2.- ESTUDIO DE LA NORMALIDAD DE LAS VARIABLES.-

Para comprobar si las variables seguían una distribución normal se

utilizó el test de Shapiro-Wilk (BMDP 2D), rechazándose la hipótesis nula de normalidad por debajo de un $p<0,001$. Tras realizar esto, comprobamos que la mayoría de las variables no seguían una distribución normal, por lo que decidimos utilizar en el análisis estadístico, tests no paramétricos.

VI.3.- COMPARACION DE MEDIAS ENTRE LOS DIFERENTES GRUPOS.-

Para la comparación de las medias entre los distintos grupos estudiados realizamos un análisis de la varianza no paramétrico, mediante el método de Kruskal-Wallis (BMDP 3S). Dado que había un elevado número de comparaciones se realizó una penalización fuerte de la significación, dándose como significativo sólo aquellos estadisticos (H') del test de Kruskal-Wallis que lo fueran por debajo del $p<0.005$, lo que nos lleva a dar significativo cuando comparamos 5 grupos a un $p<0,05$ global a todo estadístico superior a 14,860 (X^2 con 4 grados de libertad), y al $p<0,01$ global a todo estadístico que fuera superior a 18,487. Y de igual manera, cuando comparamos 4 grupos, a un $p<0,05$ global a todo estadístico superior a 12,838 (X^2 con 3 grados de libertad), y al $p<0,01$ global a todo estadístico que fuera superior a 16,266.

Al realizar las comparaciones múltiples, utilizamos el método de Neuman-Keuls, el cual nos permite fijar debidamente en cada comparación el error particular que corresponde. Consiste en ordenar las muestras por orden creciente de rangos y comparar los dos extremos, calculándose un estadístico, t_{exp}, que se compara con t (f = œ;K) en la tabla de Bonferroni, siendo K=k(r-1)/2, y k=número de grupos y r=número de grupos que hay entre las muestras ya ordenadas.

VI.4.- COMPARACION DE MEDIAS ENTRE 2 GRUPOS.-

Este análisis estadístico se utilizó para comprobar que el aumento de células CD16(+) observado en algunos eyaculados era real y no debido a la presencia en los eyaculados de moléculas capaces de unirse por un lado a Ig y por otro al Ac. Mo. anti- CD16. Para lo cual se diseñaron dos experimentos:

a.- Estudio de la captación del Ac. Mo. anti-CD16 por espermatozoides que tenía AAE en su superficie: Para lo que se comparó la captación media de AcMo anti-CD16 en un grupo control de espermatozoides sin AAE con la captación media de AcMo anti-CD16 en un grupo de espermatozoides con AAE en su superficie.

b.- Estudio de la reactividad cruzada de AAE con linfocitos en eyaculados: Para ello se comparó el porcentaje de linfocitos que presentaban Ig G en su superficie en eyaculados con AAE y en eyaculados sin AAE, para lo que se utilizó un AcMo anti-Ig G humana marcado con FITC.

Las comparaciones a y b se realizaron en un total de 10 eyaculados (5 control y 5 con AAE), y se utilizó el test no paramétrico de Wilcoxon de comparación de dos muestras de variables cualesquiera para su análisis estadístico.

Resultados

PARAMETROS ESTUDIADOS.-

- Leucocitos (CD45) (Tablas XI y XII; Graf. 1).
- Monocitos/Macrófagos (CD45(+)CD14(+)) (Tablas XI y XII; Graf. 2 y 3).
- Granulocitos (CD45(+)CD14(-)) (Tablas XI y XII; Graf. 2 y 3).
- Linfocitos (CD45(+)CD14(-)) (Tablas XI y XII; Graf. 2 y 3).
- Linfocitos T (CD45(+)CD3(+)) (Tablas XIII y XIV; Graf.4 y 5; Fig. 13).
- Linfocitos T4 helper/inducer (CD3(+)CD4(+)) (Tablas XIII y XIV; Graf. 4 y 5; Fig. 14).
- Linfocitos T8 supresores/citotóxicos (CD3(+)CD8(+))(Tablas XIII y XIV; Graf. 4 y 5; Fig. 16).
- Linfocitos CD4(+) inducer suppressor (CD4(+)CD45RA(+)) (Tablas XV y XVI; Graf. 6 y 7; Fig. 15).
- Linfocitos CD4(+) inducer helper (CD4(+)CD45RA(-))(Tablas XV y XVI; Graf. 6 y 7).
- Linfocitos CD8(+) supresores antígeno-inespecíficos (CD8(+) CD11b(+)) (Tablas XVII y XVIII; Graf. 8 y 9; Fig. 17).
- Linfocitos CD8(+) supresores antígeno-específicos (CD8(+) CD11b(-)) (Tablas XVII y XVIII).
- Linfocitos CD8(+) citotóxicos no restringidos por MHC (CD8(+)CD56(+)) (Tablas XVII y XVIII; Graf. 8 y 9; Fig. 18).
- Linfocitos CD8(+)CD56(-) (Tablas XVII y XVIII).
- Linfocitos T activados (CD3(+)HLA-DR(+)) (Tablas XIX y XX; Graf. 10 y 11).
- Linfocitos T4 activados (CD4(+)HLA-DR(+)) (Tablas XIX y XX; Graf. 10 y 11; Fig. 19).
- Linfocitos T8 activados (CD8(+)HLA-DR(+)) (Tablas XIX y XX; Graf. 10 y 11).

- Linfocitos B (CD45(+)CD20(+)) (Tablas XXI y XXII; Graf. 12 y 13; Fig. 20).
- Linfocitos B inmunorreguladores (CD20(+)CD5(+)) (Tablas XXI y XXII; Graf. 12 y 13; Fig. 21).
- Linfocitos grandes granulares (LGL) (CD45(+)CD16(+))(Tabla XXIII; Graf. 14 y 15; Fig. 22).
- Leucocitos peroxidasa (+) (Tabla X; Graf. 1).
- Concentración espermática (millones/ml) (Tabla X).
- Motilidad espermática (Q(+++)) (Tabla X).
- Morfología de los espermatozoides (% formas normales) Tabla X).
- Vitalidad espermática (% formas no teñidas) (Tabla X).
- Test hiposmótico (% espermatozoides hinchados) (Tabla X).
- Porcentaje de espermatozoides que reaccionan con anti-CD16 (Tabla XXIV; Fig. 23).
- Porcentaje de linfocitos que reaccionan con AAE (Tabla XXV; Fig. 24)

ABREVIATURAS DE TABLAS.-

- n: Número de casos.
- %: Proporción de casos.
- nº: Número.
- mill/ml: Millones por mililitro.
- POBLAC. CEL.: Población celular.
- FERT: Individuos fértiles (grupo control).
- ESTERIL: Individuos estériles sin anticuerpos antiespermatozoide.
- Ig G/A: Pacientes estériles con anticuerpos antiespermatozoide del tipo Ig G e Ig A.
- Ig G: Pacientes estériles con anticuerpos antiespermatozoide del tipo Ig G.
- POSTV: Individuos vasectomizados.
- Leucocit.: Leucocitos.

- Monocit.: Monocitos/macrófagos.
- Linfocit./Linf: Linfocitos.
- Granuloc.: Granulocitos.
- Helper/ind.: Colaboradores/inductores (helper/inducer).
- Supr./citot.: Supresores/citotóxicos.
- Induc. sup.: Inductores de supresión.
- Ind. helper: Colaboradores.
- Supr.Ag Inespecíf.: Supresores antígeno inespecíficos.
- Supr.Ag Específ.: Supresores antígeno específicos.
- Citot. no MHC restring.: Citotóxicos no MHC restringidos.
- Linf T, T4, T8 activ.: Linfocitos T, T4, T8 activados.
- Linf. B inmunorreg.: Linfocitos B inmunorreguladores.
- PARAM. SEM.: Parámetros seminales.
- % Q+++: Proporción de espermatozoides con motilidad tipo Q+++.
- % normal: Proporción de formas espermáticas normales.
- % no teñidos: Proporción de formas espermáticas no teñidas.
- % hinchados: Porcentaje de espermatozoides hinchados.
- Leuc. perox. (+): Leucocitos peroxidasa positiva.
- AAE: Anticuerpos antiespermatozoide.
- spz: Espermatozoides.
- N.S.: No significación.
- Eyac.: Eyaculados.

ABREVIATURAS DE GRAFICAS Y FIGURAS.-

- Células Perox. (+): Células peroxidasa positiva.
- Estériles: Individuos estériles sin anticuerpos antiespermatozoide.
- Est. Ig G/A: Estériles con anticuerpos antiespermatozoide tipo Ig G y A.
- Est. Ig G: Estériles con anticuerpos antiespermatozoide tipo Ig G.

- Postvasect.: Postvasectómicos.
- %: Resultados expresados en tanto por ciento.
- Linf. T: Linfocitos T.
- Linf. T4: Linfocitos T4.
- Linf. T8: Linfocitos T8.
- Linf. B: Linfocitos B.
- Linf. B CD5(+): Subpoblación de linfocitos B CD5(+).
- LGL: Linfocitos grandes granulares.
- *: Diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo de individuos fértiles (excepto en la Graf. 1 y 2, respecto a los otros tipos de eyaculados).
- Figuras 13-22: La gráfica superior corresponde a eyaculados de individuos fértiles; la intermedia a los de sujetos estériles sin AAE; y la inferior a los de pacientes estériles con AAE; bien del tipo Ig G e Ig A, o del tipo Ig G.

ESTUDIO DE LOS LEUCOCITOS PEROXIDASA POSITIVA Y PARAMETROS SEMINALES EN LOS DISTINTOS TIPOS DE EYACULADOS ESTUDIADOS.-

En el recuento de espermatozoides, hallamos un descenso estadísticamente significativo en el grupo de varones estériles sin AAE con respecto al grupo fértil y al estéril con AAE tipo Ig G/A ($p < 0,05$) (Tabla X).

Los mismos resultados obtuvimos al comparar la vitalidad espermática (% formas no teñidas) entre los grupos de eyaculados (Tabla X).

La motilidad (Q+++) y morfología (proporción de formas espermáticas normales) mostraron un valor significativamente inferior en el grupo de individuos estériles sin AAE en relación al grupo control y a los infértiles inmunológicos del tipo Ig G/A e Ig G (Tabla X).

En el análisis de los valores del test HOS (hiposmótico), sólo encontramos significación en el incremento de espermatozoides "hinchados" que presentaron los individuos pertenecientes al grupo control con respecto a los estériles sin AAE (Tabla X).

Entre los grupos fértiles y estériles sin y con AAE no detectamos diferencias significativas en la concentración media de leucocitos peroxidasa positiva. No obstante, el grupo de vasectomizados se distinguió de los restantes en un descenso significativo ($p < 0,001$) en el número de estos leucocitos (Tabla X; Graf. 1).

TABLA X

PARAMETROS SEMINALES EN LOS DISTINTOS TIPOS DE EYACULADOS ESTUDIADOS.

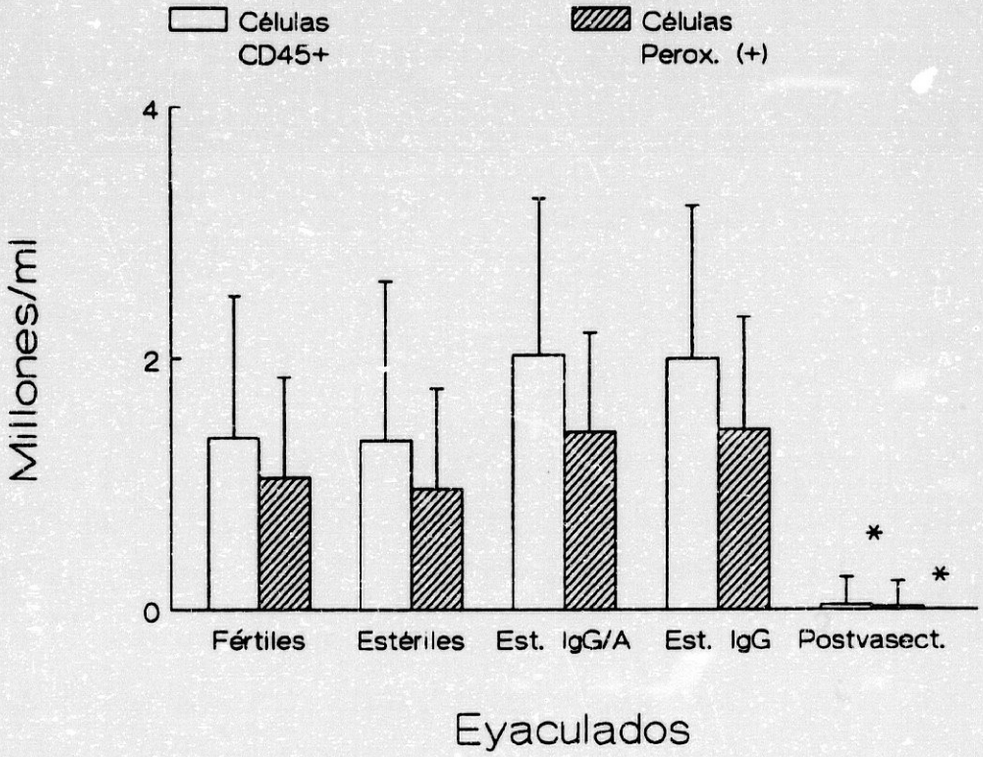
PARAM.SEM.	FERT (n=30)	ESTERIL (n=30)	IgG/A (n=11)	IgG (n=7)	POSTV. (n=30)
Nº spz (mill/ml)	80,2±44,9a (23,0-245,0)	15,4±17,2 (2,0-89,0)	55,4±29,7a (4,0-97,0)	45,5±26,4 (14,5-90,0)	---
Motilidad (% Q+++)	49,2±12,2a (30,0-75,0)	17,0±8,7 (0-40,0	37,7±15,2a (10,0-55,0)	42,1±10,3a (20,0-50,0)	---
Morfología (% normal)	45,5±11,1a (30,0-70,0)	18,5±9,8 (20,0-53,0)	38,5±11,6a (39,0-60,0)	35,0±9,2a (43,0-60,0)	---
Vitalidad (% no teñidos)	57,9±6,6a (48,0-70,0)	41,9±7,9 (20,0-53,0)	52,1±6,3a (39,0-60,0)	50,4±5,9 (43,0-60,0)	---
Test HOS (% hinchados)	58,1±5,5a (47,0-68,0)	51,1±7,9 (35,0-69,0)	54,3±11,1 (30,0-69,0)	55,6±3,6 (50,0-60,0)	---
Leuc.perox.(+) (mill/ml)	1,05±0,8b (0-3,5)	0,96 ± 0,8b (0-3,1)	1,41 ± 0,8b (0,1-3,0)	1,43±0,9b (0,5-3,0)	0,03±0,2 (0-1,0)

a $p < 0,05$ vs grupo estéril

b $p < 0,001$ vs grupo vasectomizados

GRAFICA 1

Leucocitos



VALORES DE LAS POBLACIONES LEUCOCITARIAS EN SUJETOS DEL GRUPO CONTROL, ESTERILES NO INMUNOLOGICOS, ESTERILES INMUNOLOGICOS Y POSTVASECTOMICOS.-

En la determinación de los leucocitos y las diferentes poblaciones de éstos en los 5 tipos de eyaculados analizados, encontramos un número significativamente más bajo de leucocitos, monocitos, linfocitos y granulocitos en el grupo de individuos vasectomizados que en el resto de las muestras de semen estudiadas (Tabla XI; Graf. 2).

Porcentualmente, no encontramos diferencias significativas entre los distintos grupos, destacando que la proporción de poblaciones leucocitarias permanece constante en cada uno de los eyaculados sometidos a estudio (Tabla XII; Graf. 3).

TABLA XI

POBLACIONES DE LEUCOCITOS EN LOS DISTINTOS TIPOS DE EYACULADOS ESTUDIADOS (millones/ml).

POBLAC. CEL.	FERT (n=30)	ESTERIL (n=30)	IgG/A (n=11)	IgG (n=7)	POSTV (n=30)
Leucocit. CD45+	1,364±1,13a (0-4,215)	1,341±1,27b (0-3,927)	2,030±1,24a (0,070-4,712)	1,996±1,22a (0,889-4,092)	0,042±0,22 (0-1,212)
Monocit. CD45+14+	0,902±0,74a (0-2,524)	0,759±0,71b (0-2,769)	1,155±0,57a (0,038-1,896)	1,072±0,63a (0,271-1,863)	0,033±0,17 (0-0,970)
Linfocit. CD45+14-	0,309±0,31b (0-1,185)	0,381±0,44a (0-1,586)	0,608±0,56a (0,020-1,712)	0,584±0,42a (0,210-1,234)	0,007±0,03 (0-0,213)
Granuloc. CD45+14-	0,153±0,23a (0-1,216)	0,200±0,28b (0-1,216)	0,266±0,34a (0,012-1,255)	0,339±0,39a (0,029-1,170)	0,001±0,01 (0-0,029)

a $p < 0,001$ vs grupo de postvasectómicos

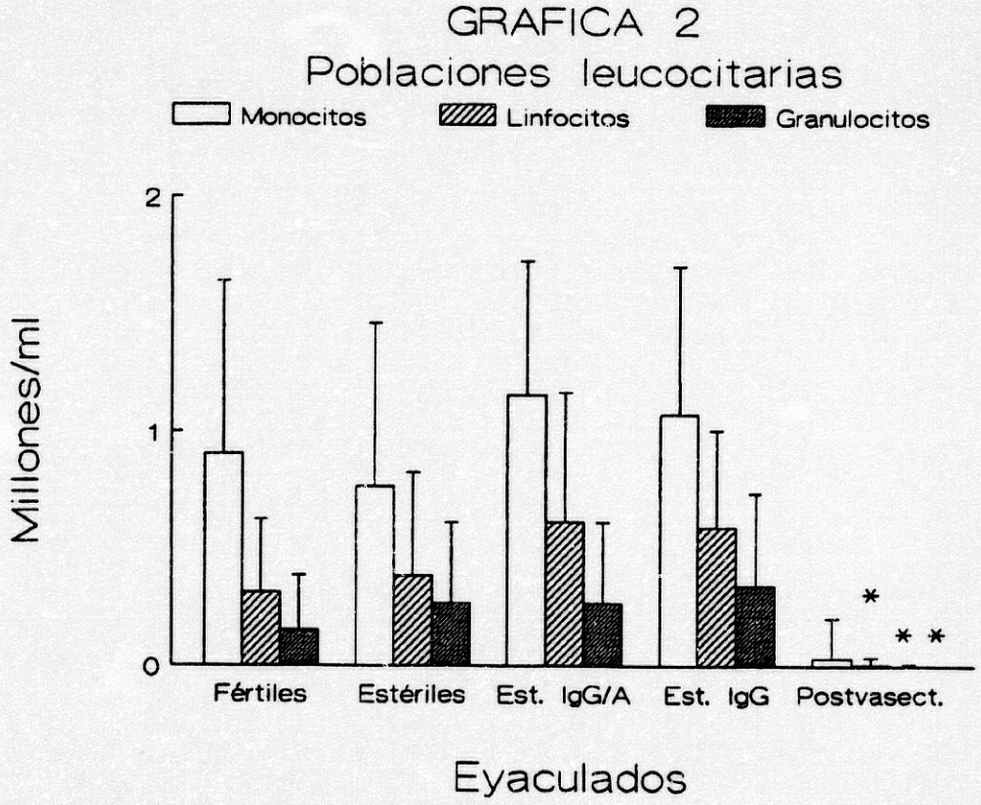
b $p < 0,01$ vs grupo de postvasectómicos

TABLA XII

PORCENTAJES DE LAS POBLACIONES LEUCOCITARIAS EN LOS DISTINTOS TIPOS DE EYACULADOS ESTUDIADOS (%).

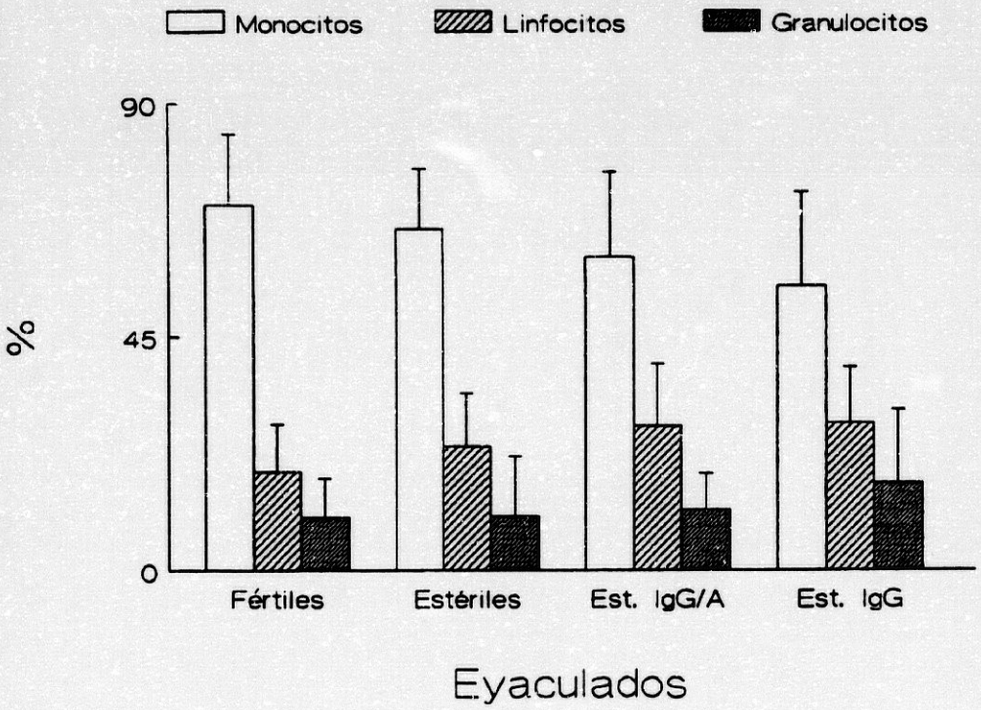
POBLAC. CEL.	FERT (n=25)	ESTERIL (n=24)	IgG/A (n=11)	IgG (n=7)	POSTV (n=10)
Monocit CD45+14+	70,7±13,5 (47,0-87,8)	66,0±11,5 (40,4-79,7)	60,6±16,3 (37,0-88,0)	54,9±18,2 (30,1-80,1)	66,3±14,4 (35,0-85,0)
Linfocit. CD45+14-	18,9±9,2 (9,8-37,0)	23,7±10,4 (5,0-43,0)	27,8±12,0 (6,6-47,7)	28,3±10,8 (17,6-44,4)	22,8±11,5 (10,5-42,8)
Granuloc. CD45+14-	10,2±7,4 (2,2-28,9)	10,4±11,5 (0,1-36,7)	11,6±7,0 (4,6-26,6)	16,7±14,2 (2,4-39,4)	10,7±10,4 (1,4-32,1)

GRAFICA 2



GRAFICA 3

Poblaciones leucocitarias



Eyaculados

VALORES DE LAS SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T EN LOS SUJETOS DEL GRUPO CONTROL, ESTERILES NO INMUNOLOGICOS E INMUNOLOGICOS.-

Establecimos una nueva comparación entre los individuos fértiles y aquellos pertenecientes a los grupos de estériles no inmunológicos e inmunológicos tipo Ig G/A e Ig G. Como se comprueba en la Tabla XIII y Graf. 4, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los 4 grupos, al cuantificar las subpoblaciones de linfocitos T (CD4 y CD8).

Sin embargo, en el análisis porcentual de los datos obtenidos, detectamos un descenso significativo de los linfocitos T (Tabla XIV; Graf. 5) en el grupo de estériles sin AAE y en los dos grupos con AAE con respecto al grupo control ($p < 0,001$); descenso realizado a expensas de una marcada y significativa disminución de los linfocitos CD8 supresores/citotóxicos con respecto a dicho grupo ($p < 0,001$). No obstante, el grupo de pacientes estériles sin AAE presentó un incremento en la proporción de linfocitos CD4 helper/inducer estadísticamente significativa en relación al grupo de individuos fértiles ($p < 0,001$) y al de estériles con AAE tipo Ig G/A ($p < 0,001$)(Fig. 13, 14 y 16).

TABLA XIII

SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T EN LOS DISTINTOS TIPOS DE EYACULADOS ESTUDIADOS (miles/ml).

POBLAC CEL.	FERT (n=30)	ESTERIL (n=30)	IgG/A (n=11)	IgG (n=7)
Linf T CD45+CD3+	237,5 ± 241,4 (0-829,5)	210,0 ± 250,1 (0-999,1)	271,4 ± 274,5 (8,4-890,2)	254,3 ± 207,1 (79,8-612,0)
Linf T4 CD3+CD4+ helper/ind.	56,4 ± 67,3 (0-319,9)	106,1 ± 126,1 (0-456,6)	119,7 ± 133,9 (3,1-448,5)	116,4 ± 95,4 (19,9-278,6)
Linf T8 CD3+CD8+ supr./citot.	156,1 ± 167,8 (0-609,7)	89,7 ± 110,7 (0-467,8)	86,4 ± 82,8 (2,4-294,4)	83,1 ± 68,7 (16,5-179,2)

TABLA XIV

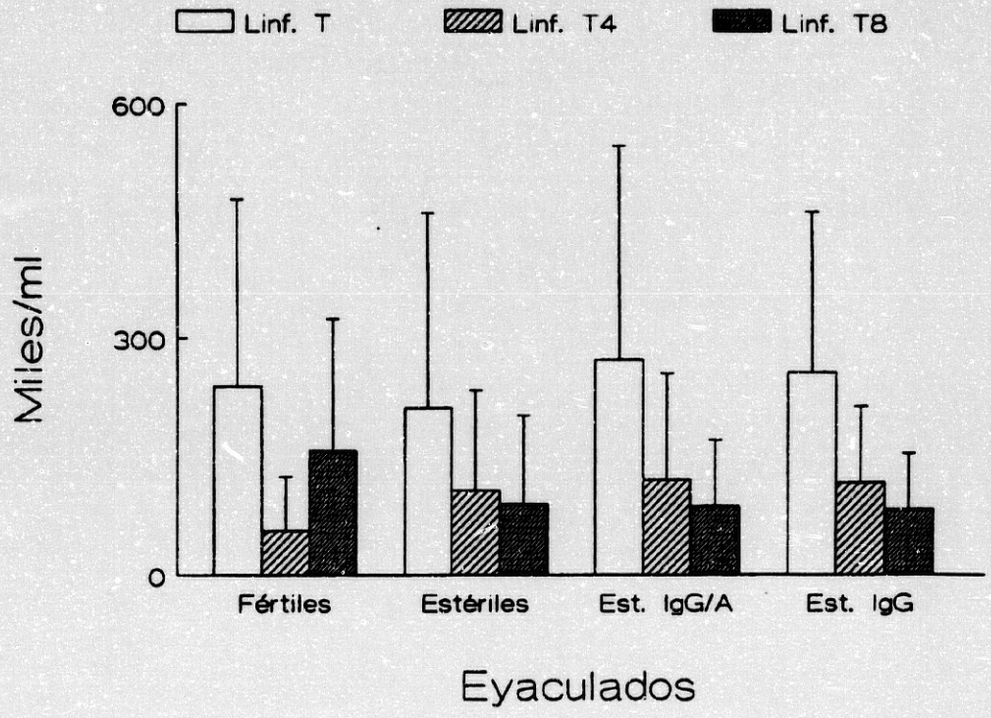
PORCENTAJES DE SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T EN LOS DISTINTOS TIPOS DE EYACULADOS ESTUDIADOS (%).

POBLAC. CEL.	FERT (n=25)	ESTERIL (n=24)	IgG/A (n=11)	IgG (n=7)
Linf T CD45+CD3+	76,2 ± 8,3 (66,8-91,0)	56,4 ± 8,1a (40,0-64,6)	43,1 ± 7,4a (32,0-57,0)	43,4 ± 12,5a (20,0-61,0)
Linf T4 CD3+CD4+ helper/ind.	18,6 ± 5,8 (11,6-27,0)	28,7 ± 5,3a,b (22,0-37,2)	18,7 ± 5,9 (10,5-29,0)	20,3 ± 9,5 (5,0-31,4)
Linf T8 CD3+CD8+ supr./cit.	47,3 ± 14,7 (30,6-74,0)	23,7 ± 4,6a (15,6-29,5)	14,9 ± 6,5a (9,0-31,8)	13,9 ± 4,8a (4,1-18,0)

a $p < 0,001$ vs grupo fértil
b $p < 0,001$ vs grupo IgG/A

GRAFICA 4

Subpoblaciones de linfocitos T



GRAFICA 5

Subpoblaciones de linfocitos T

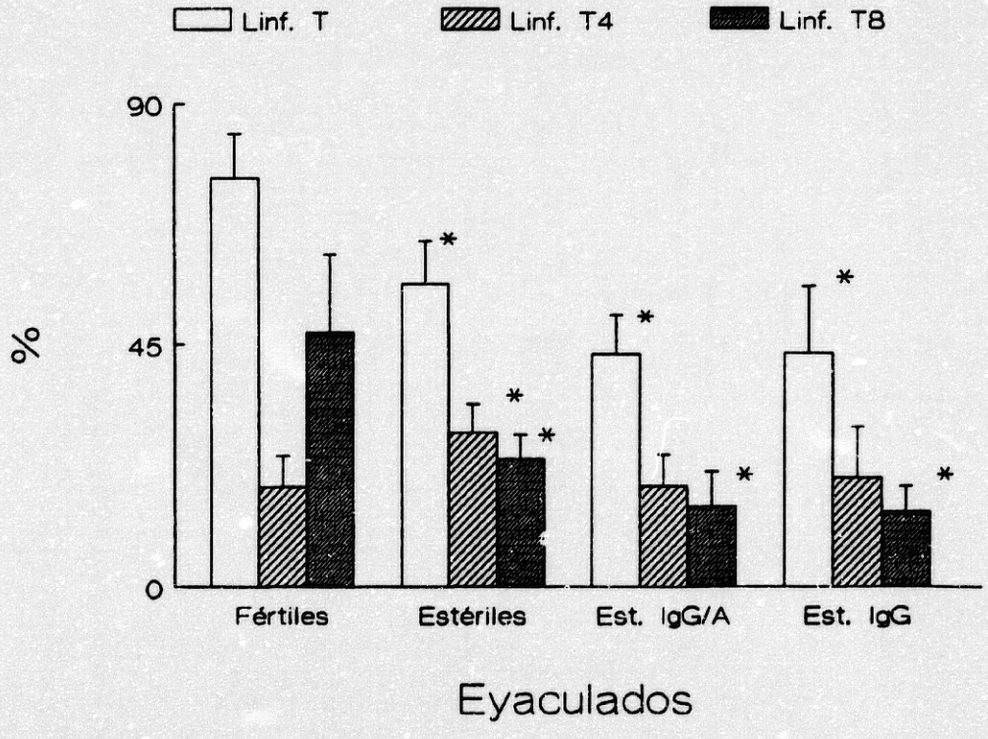


Fig. 13.- PORCENTAJES DE LINFOCITOS T EN LOS DISTINTOS TIPOS DE EYACULADOS ESTUDIADOS.

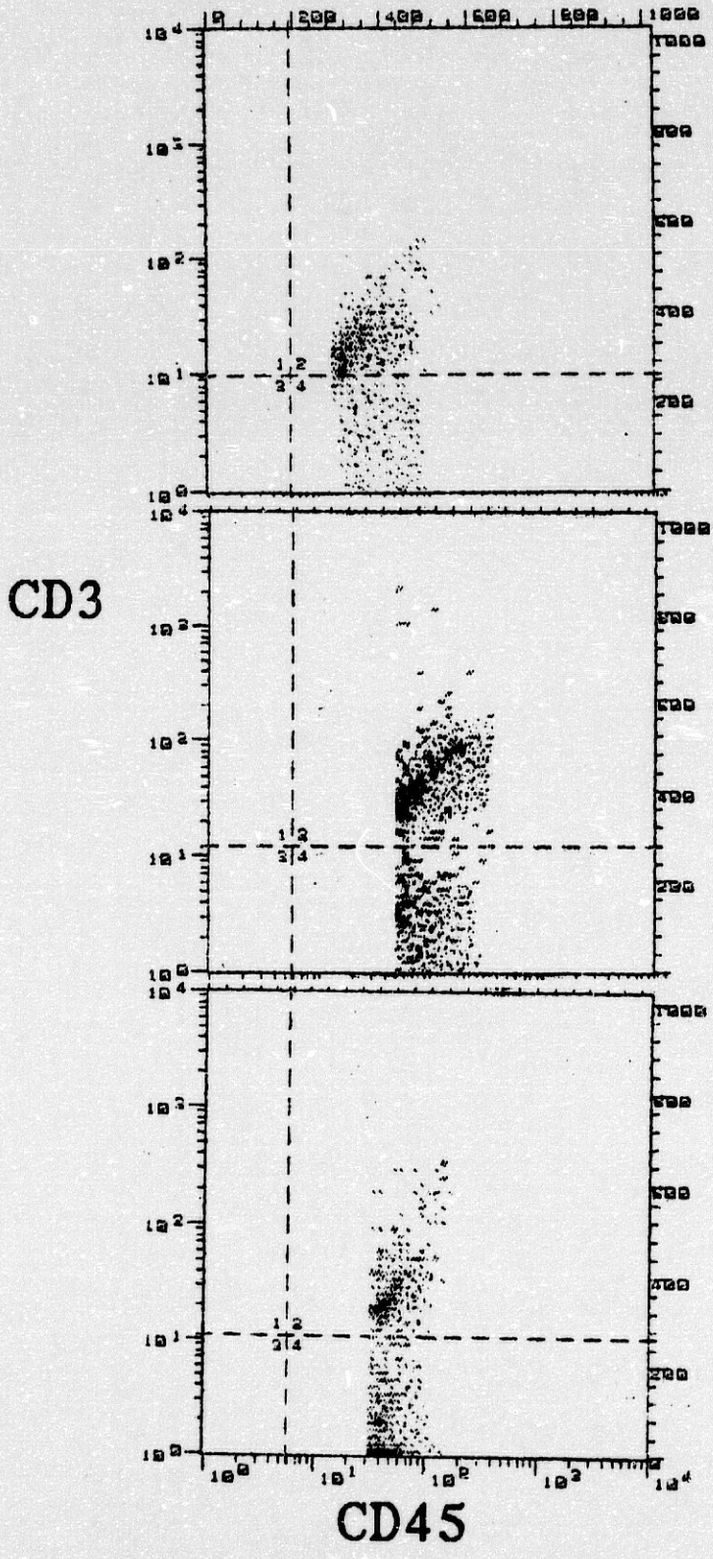


Fig. 14.- PORCENTAJES DE LINFOCITOS CD4+ EN LOS DISTINTOS TIPOS DE EYACULADOS ESTUDIADOS.

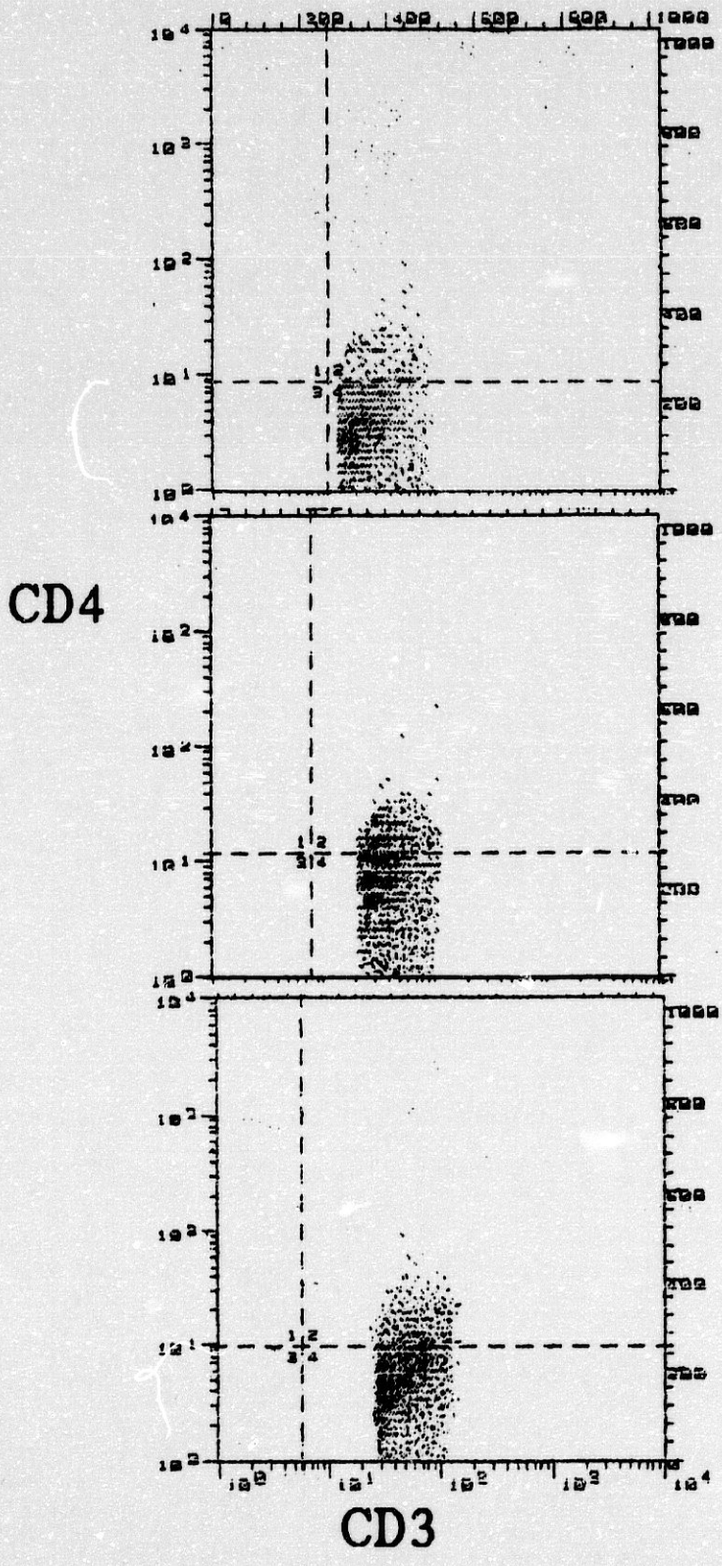
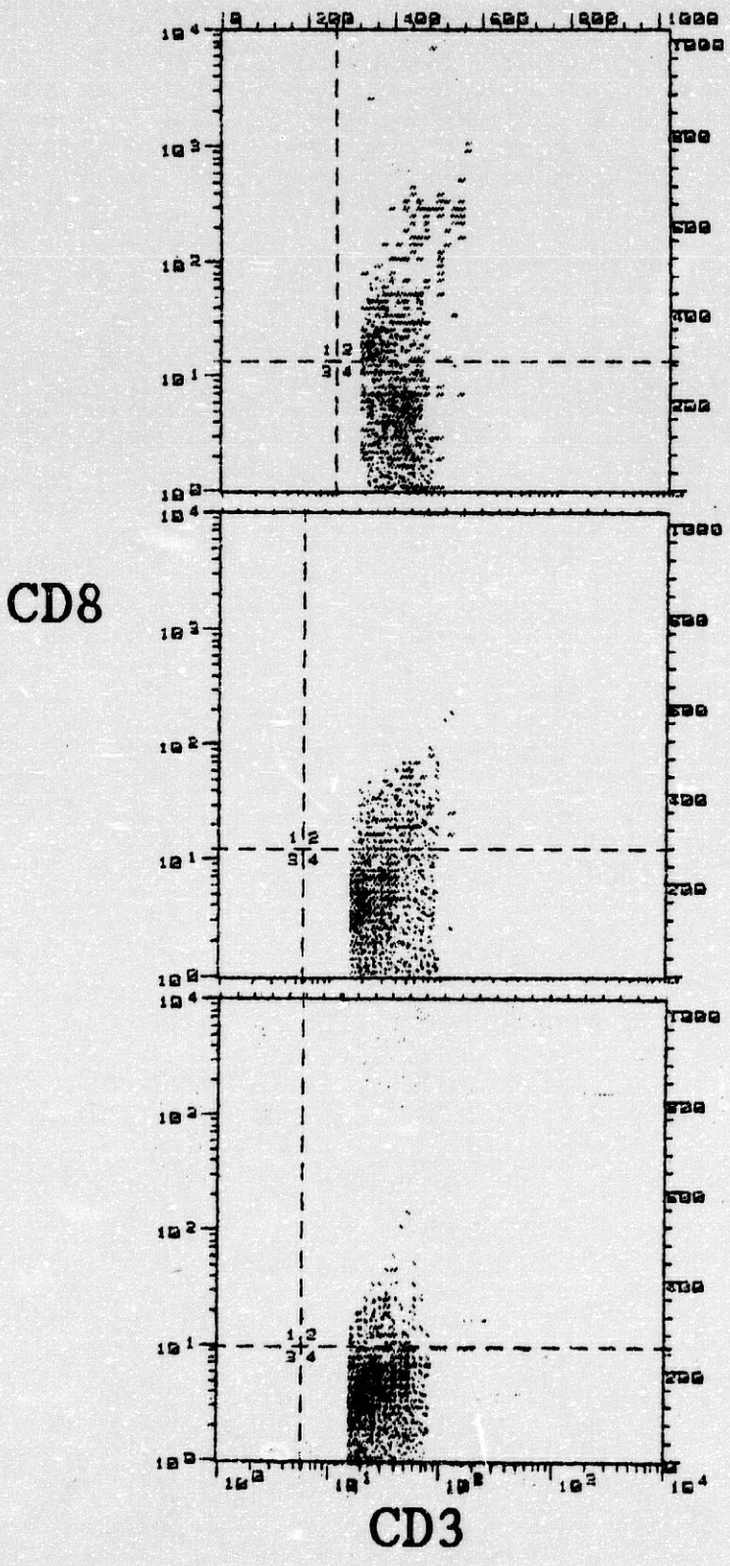


Fig. 16.- PORCENTAJES DE LINFOCITOS CD8+ EN LOS DISTINTOS TIPOS DE EYACULADOS ESTUDIADOS.



VALORES DE LAS SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS CD4(+) EN SUJETOS DEL GRUPO CONTROL, ESTERILES NO INMUNOLOGICOS E INMUNOLOGICOS.-

Los tres grupos de pacientes estudiados presentaron con respecto al grupo control un incremento estadísticamente significativo de los valores absolutos de linfocitos CD4+CD45RA+ o "inductores de supresión" (inducer-suppressor) (Tabla XV; Graf. 6; Fig. 15).

Porcentualmente no sólo resultó significativo este dato, sino que se obtuvo un descenso de los linfocitos CD4+CD45RA- (inducer-helper) o "colaboradores" en los dos grupos de sujetos estériles con AAE con respecto al grupo control y al de pacientes estériles sin AAE (Tabla XVI; Graf. 7)(Fig. 15).

TABLA XV

SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS CD4+ (HELPER/INDUCER) EN LOS DISTINTOS TIPOS DE EYACULADOS ESTUDIADOS (miles/ml).

POBLAC. CEL.	FERT (n=26)	ESTERIL (n=30)	IgG/A (n=11)	IgG (n=7)
Linf CD4+ Induc.sup. CD4+CD45R+	16,6 ± 20,3 (0-82,0)	75,3 ± 88,1b (0-317,2)	105,9 ± 127,5a (3,0-414,3)	102,5 ± 91,5b (14,7-266,7)
Linf CD4+ Ind.helper CD4+CD45R-	39,1 ± 58,2 (0-255,9)	30,7 ± 41,7 (0-165,5)	13,9 ± 12,2 (0,1-38,9)	13,9 ± 8,3 (2,5-26,4)

a $p < 0,01$ vs grupo fértil
b $p < 0,05$ vs grupo fértil

TABLA XVI

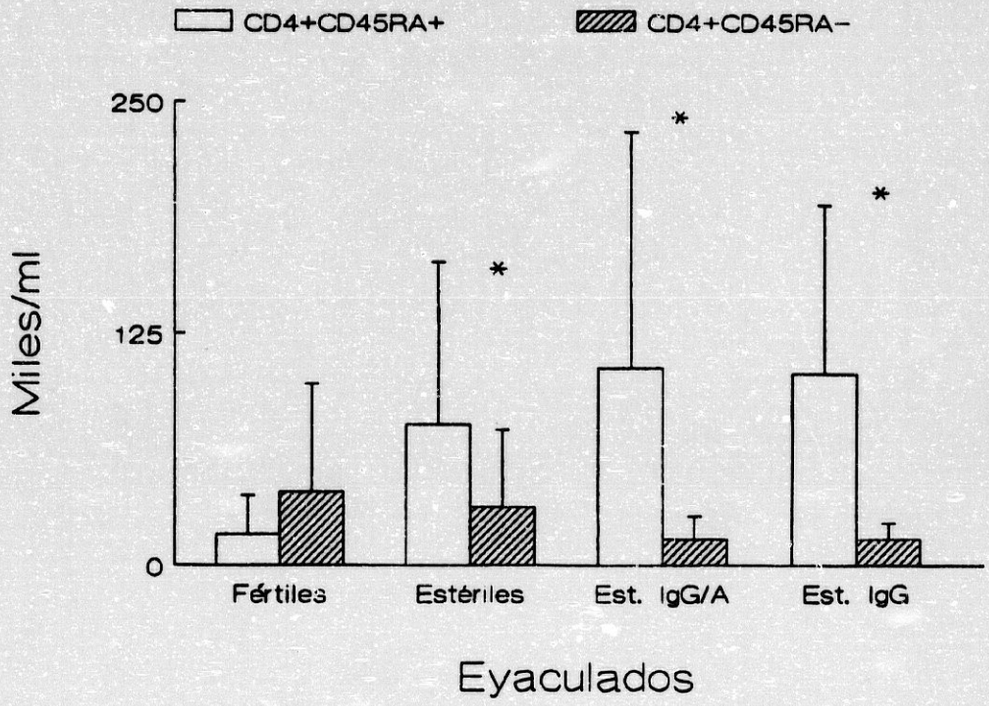
PORCENTAJES DE SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS CD4+ (HELPER/INDUCER) EN LOS DISTINTOS TIPOS DE EYACULADOS ESTUDIADOS (%).

POBLAC CEL.	FERT (n=21)	ESTERIL (n=24)	IgG/A (n=11)	IgG (n=7)
Linf CD4 Induc.sup. CD4+CD45R+	7,0 ± 3,7 (2,9-1,4)	20,8 ± 3,4a (15,6-27,0)	15,9 ± 5,5b (9,2-24,2)	17,1 ± 7,6b (3,7-24,7)
Linf CD4+ Induc.helper CD4+CD45R-	14,0 ± 7,6 (5,0-24,4)	7,9 ± 3,6 (3,2-12,6)	2,8 ± 1,8a,c (0,6-6,3)	3,3 ± 2,8b,d (1,0-8,0)

a $p < 0,001$ vs grupo fértil
b $p < 0,01$ vs grupo fértil
c $p < 0,01$ vs grupo estéril
d $p < 0,05$ vs grupo estéril

GRAFICA 6

Subpoblaciones de linfocitos CD4+



GRAFICA 7

Subpoblaciones de linfocitos CD4+

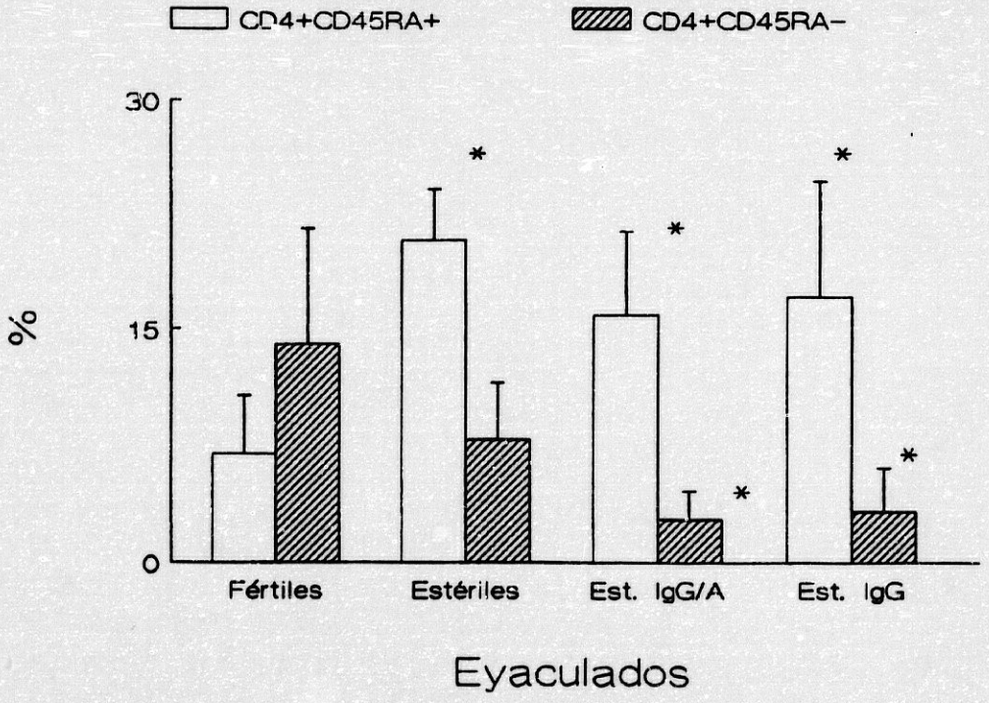
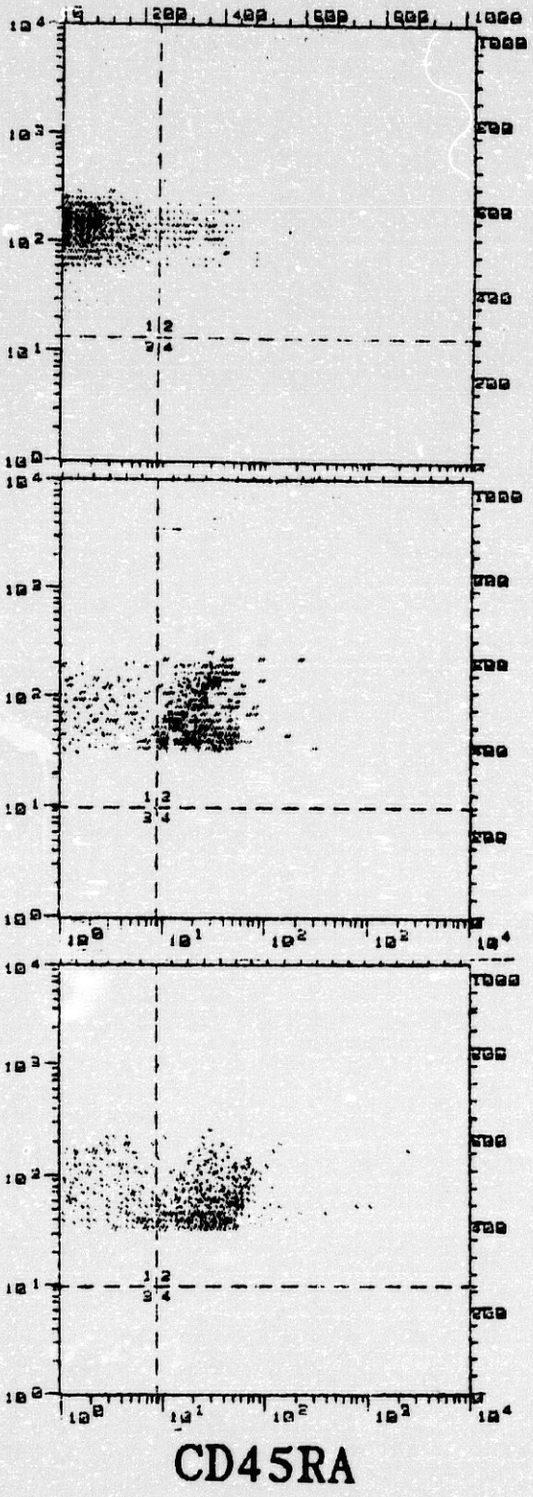


Fig. 15.- PORCENTAJES DE LINFOCITOS CD4+CD45RA+ EN LOS DISTINTOS TIPOS DE EYACULADOS ESTUDIADOS.



VALORES DE LAS SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS CD8(+) EN SUJETOS DEL GRUPO CONTROL, ESTERILES NO INMUNOLOGICOS E INMUNOLOGICOS.-

Con los anticuerpos monoclonales anti-CD11b y anti-CD56, analizamos las subpoblaciones de linfocitos CD8(+) supresores/citotóxicos, no obteniendo diferencias estadísticamente significativas al comparar los valores absolutos de dichas subpoblaciones entre los distintos tipos de eyaculados (Tabla XVII; Graf. 8)

No obstante, el análisis porcentual (Tabla XVIII) nos muestra un descenso significativo de los linfocitos CD8(+)CD11b(+) supresores antígeno-inespecíficos, CD8(+)CD11b(-) supresores antígeno-específicos y CD8(+)CD56(+) citotóxicos antígeno-inespecíficos del grupo de estériles sin AAE con respecto al grupo de sujetos fértiles (Fig. 17 y 18).

Del mismo modo, encontramos diferencias significativas en las subpoblaciones CD8(+)CD11b(+) supresores antígeno-inespecíficos ($p < 0,001$), CD8(+)CD56(+) citotóxicos no MHC restringidos ($p < 0,001$) y CD8(+)CD56(-) ($p < 0,01$), que presentaron un descenso en el grupo de estériles de origen inmunológico IgG/A con respecto al grupo control (Fig. 17 y 18).

Asimismo, un porcentaje significativamente inferior de linfocitos CD8(+)CD56(-) fue detectado en este grupo con respecto a los individuos estériles sin AAE ($p < 0,05$).

Los pacientes estériles con AAE sólo del tipo IgG se caracterizaron por un descenso estadísticamente significativo de los linfocitos CD8(+)CD11b(+) supresores antígeno-inespecíficos ($p < 0,001$),

CD8(+)CD11b(-) supresores antígeno-específicos ($p < 0,01$), CD8(+)CD56(+) citotóxicos antígeno-inespecíficos ($p < 0,01$) y CD8(+)CD56(-) ($p < 0,01$) en relación al grupo control; así como un valor significativamente inferior en el porcentaje de linfocitos CD8(+)CD56(-) con respecto al grupo de sujetos estériles ($p < 0,05$) (Tabla XVIII; Graf. 9)(Fig 17 y 18).

TABLA XVII

SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS CD8+ (SUPRESORES/ CITOTOXICOS) EN LOS DISTINTOS TIPOS DE EYACULADOS ESTUDIADOS (miles/ml).

POBLAC. CEL.	FERT (n=30)	ESTERIL (n=30)	IgG/A (n=11)	IgG (n=7)
CD8+CD11b+ Supr. Ag Inespecif.	95,7 ± 98,1 (0-323,0)	48,9 ± 69,4 (0-345,7)	62,7 ± 55,5 (2,2-193,4)	70,9 ± 59,2 (19,4-172,7)
CD8+CD11b- Supr. Ag Especif.	60,4 ± 73,7 (0-285,9)	44,5 ± 60,1 (0-239,7)	72,2 ± 69,0 (1,8-236,2)	53,3 ± 46,6 (15,7-139,3)
CD8+CD56+ Citot. no MHC restring.	108,6 ± 119,0 (0-447,4)	45,1 ± 62,9 (0-301,3)	91,5 ± 87,3 (2,7-301,3)	95,9 ± 82,8 (28,2-222,1)
CD8+CD56-	47,5 ± 52,9 (0-161,5)	47,2 ± 71,9 (0-276,8)	36,7 ± 34,6 (1,1-111,2)	22,2 ± 19,8 (0,7-54,0)

TABLA XVIII

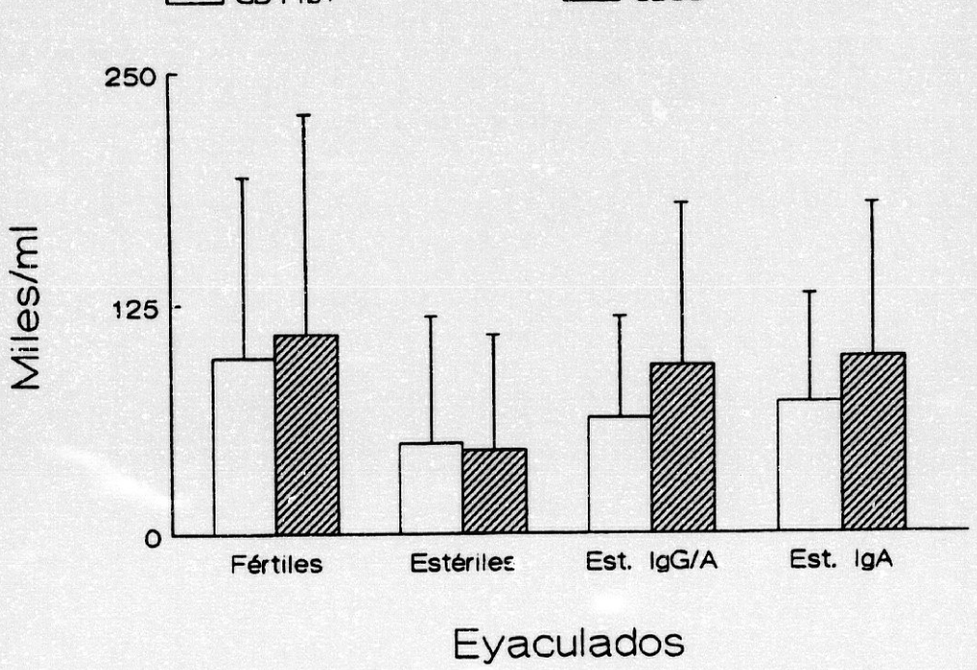
PORCENTAJES DE LAS SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS CD8+ (SUPRESORES/CITOTOXICOS) EN LOS DISTINTOS TIPOS DE EYACULADOS ESTUDIADOS (%).

POBLAC. CEL.	FERT (n=30)	ESTERIL (n=30)	IgG/A (n=11)	IgG (n=7)
CD8+CD11b+ Supr. Ag Inespecif.	30,2 ± 7,5 (20,4-39,2)	13,7 ± 5,9b (5,2-21,8)	11,3 ± 3,9a (8,0-19,8)	11,8 ± 3,8a (7,5-18,6)
CD8+CD11b- Supr. Ag Especif.	17,2 ± 9,1 (5,0-34,7)	11,0 ± 3,9c (4,3-16,8)	11,5 ± 4,0 (8,3-22,0)	8,8 ± 2,8b (4,4-12,9)
CD8+CD56+ Citot. no MHC restring.	33,4 ± 11,3 (22,1-54,3)	13,4 ± 6,5a (3,5-23,4)	15,4 ± 3,4a (12,0-22,0)	15,5 ± 4,2b (10,9-22,0)
CD8+CD56-	14,0 ± 6,0 (8,5-24,0)	10,9 ± 6,6 (1,6-21,7)	6,3 ± 4,2b,d (1,2-17,55)	4,1 ± 2,6b,d (0,2-7,4)

a $p < 0,001$ vs grupo fértil
b $p < 0,01$ vs grupo fértil
c $p < 0,05$ vs grupo fértil
d $p < 0,05$ vs grupo estéril

GRAFICA 8

Subpoblaciones de linfocitos CD8+



GRAFICA 9

Subpoblaciones de linfocitos CD8+

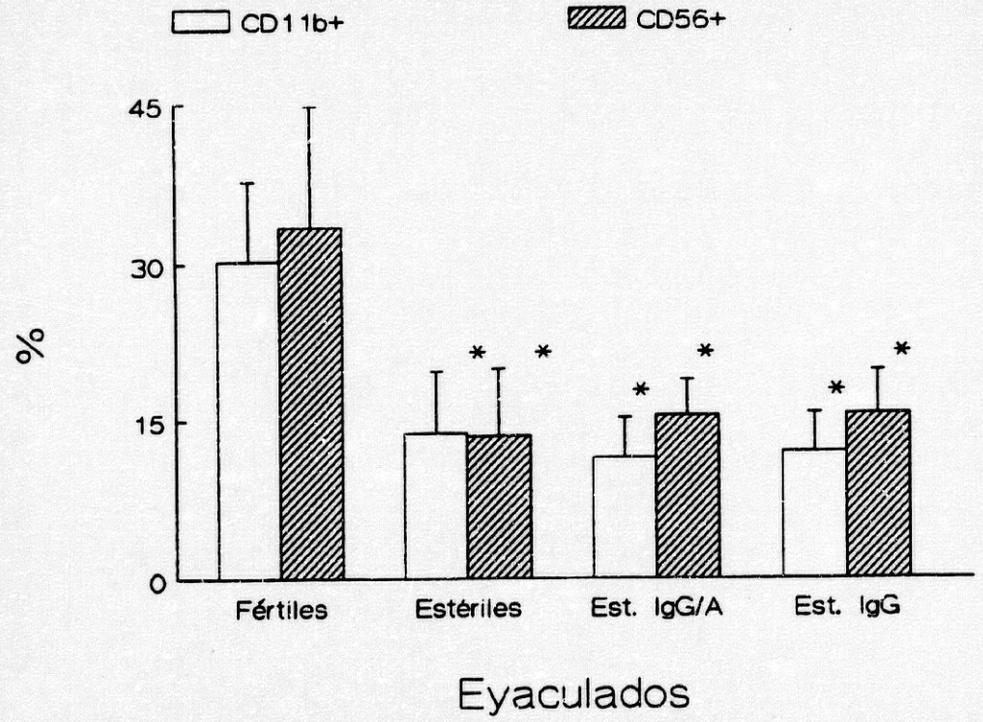


Fig. 17.- PORCENTAJES DE LINFOCITOS CD8+CD11b+ EN LOS DISTINTOS TIPOS DE EYACULADOS ESTUDIADOS.

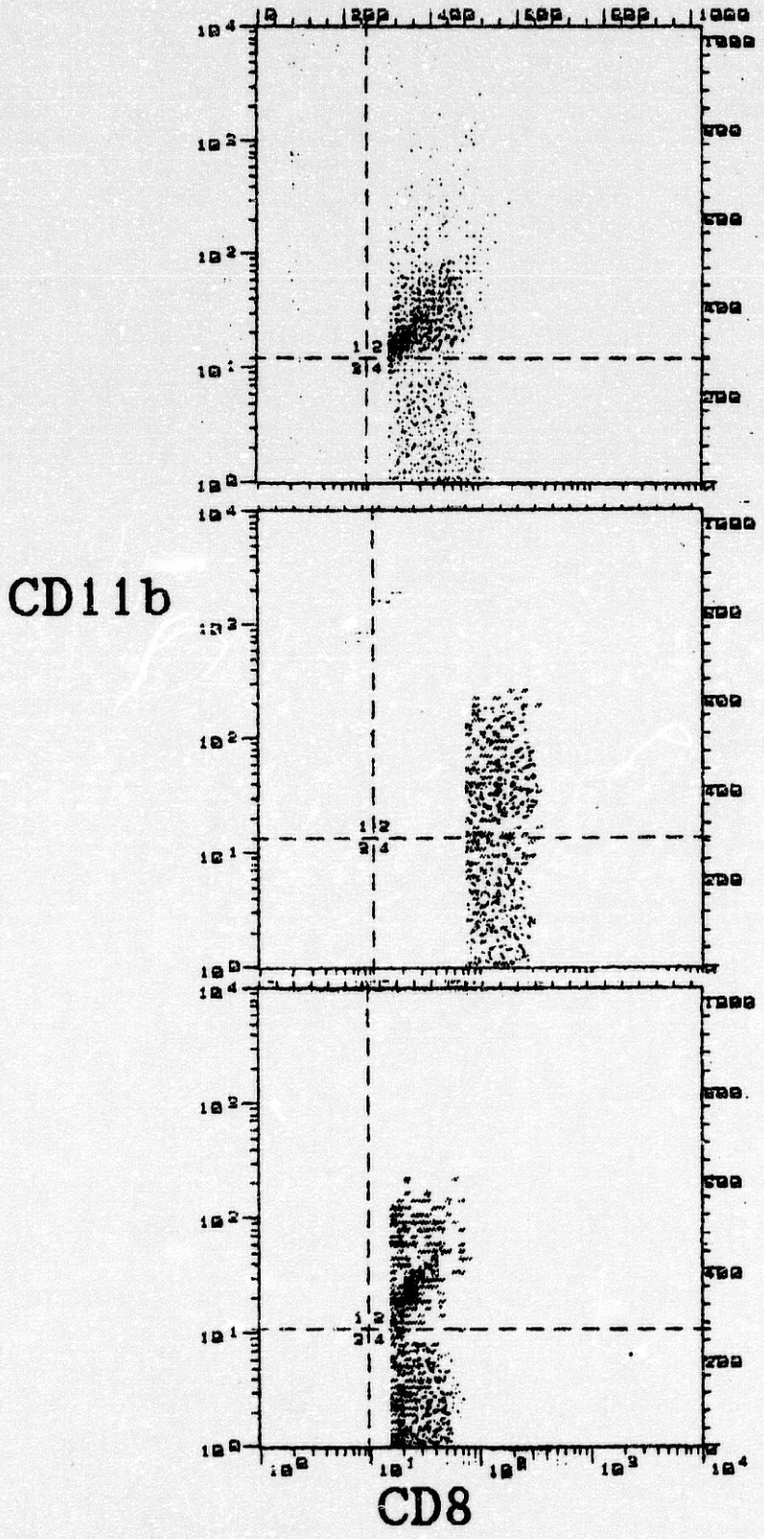
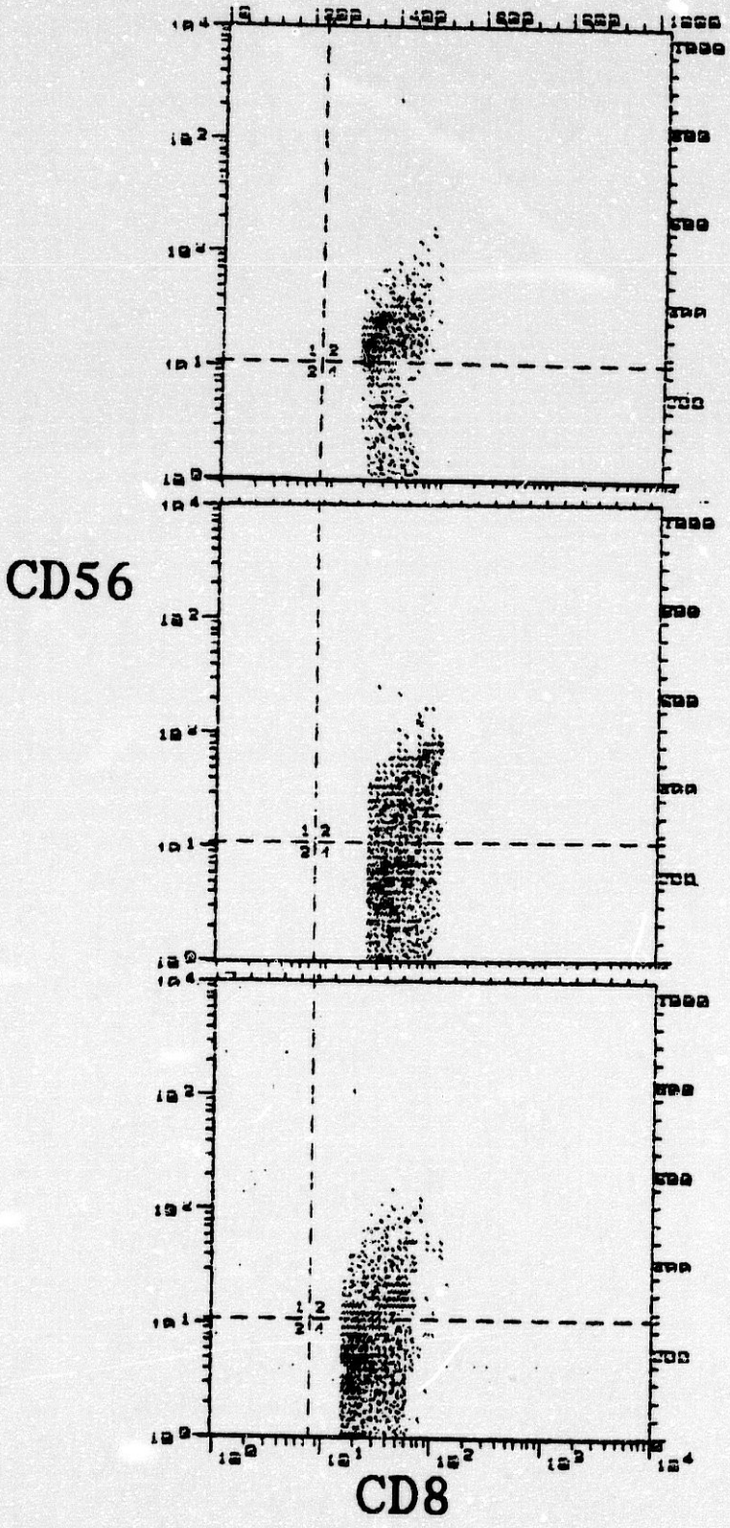


Fig. 18.- PORCENTAJES DE LINFOCITOS CD8+CD56 EN LOS DISTINTOS TIPOS DE EYACULADOS.



GRADO DE ACTIVACION DE LINFOCITOS T, CD4(+) Y CD8 (+) EN SUJETOS DEL GRUPO CONTROL, ESTERILES NO INMUNOLOGICOS E INMUNOLOGICOS.-

Hemos analizado el grado de activación de los linfocitos T y las subpoblaciones de éstos, con el objeto de conocer si alguno de estos parámetros resultaba eficaz en la discriminación de los tipos de eyaculados sometidos a estudio.

En la Tabla XIX (Graf. 10) se detallan los valores absolutos obtenidos en los 4 grupos, mostrándose un aumento estadísticamente significativo de los linfocitos CD4(+) activados (CD4+HLA-DR+) en los 3 grupos patológicos con respecto al grupo control ($p < 0,05$)(Fig. 19).

Porcentualmente estos datos se confirmaron (Fig. 19), añadiéndose un incremento significativo de los linfocitos T activados (CD3+HLA-DR+) en los 3 grupos con relación al grupo control ($p < 0,001$, grupo infértil sin AAE vs grupo control; $p < 0,01$, grupos estériles con AAE vs grupo control); así como un descenso de los linfocitos CD4(+) activados en los individuos con AAE tipo Ig G/A en relación al grupo de individuos estériles sin AAE ($p < 0,05$) (Tabla XX; Graf. 11).

TABLA XIX

SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T ACTIVADOS EN LOS DISTINTOS TIPOS DE EYACULADOS ESTUDIADOS (miles/ml).

POBLAC. CEL.	FERT (n=30)	ESTERIL (n=30)	IgG/A (n=11)	IgG (n=7)
Linf.T activ. CD3+HLA-DR+	50,9 ± 52,8 (0-201,7)	134,5 ± 165,8 (0-642,1)	160,3 ± 140,7 (5,5-455,4)	157,4 ± 109,6 (65,0-356,4)
Linf.T4 activ. CD4+HLA-DR+	23,7 ± 20,2 (0-94,8	110,0 ± 120,6a (0-428,1)	119,1 ± 106,4a (3,0-381,8)	114,6 ± 83,8a (36,0-252,7)
Linf.T8 activ. CD8+HLA-DR+	28,5 ± 26,3 (0-110,7)	32,5 ± 54,7 (0-214,0)	53,1 ± 30,6 (2,5-120,4)	55,8 ± 39,0 (20,9-103,7)

a $p < 0,05$ vs grupo fértil

TABLA XX

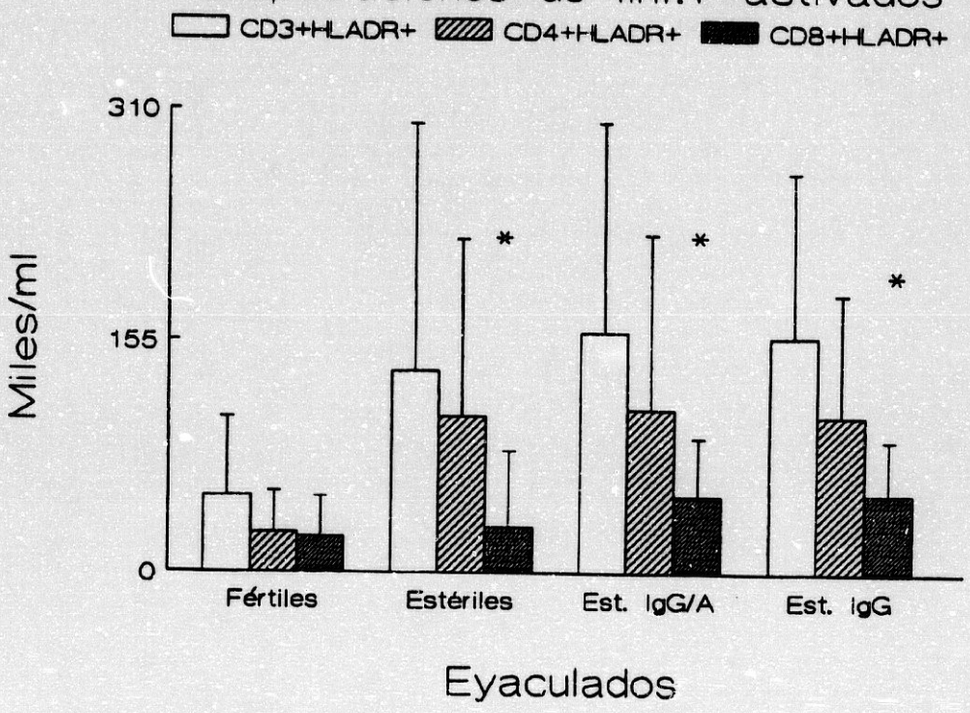
PORCENTAJES DE SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T ACTIVADOS EN LOS DISTINTOS TIPOS DE EYACULADOS ESTUDIADOS (%).

POBLAC. CEL.	FERT (n=25)	ESTERIL (n=24)	IgG/A (n=11)	IgG (n=7)
Linf.T activ. CD3+HLA-DR+	16,6 ± 3,9 (12,2-24,6)	37,8 ± 13,8a (16,7-57,0)	27,1 ± 5,1b (20,8-37,8)	29,6 ± 9,0b (14,3-42,1)
Linf.T4 activ. CD4+HLA-DR+	6,8 ± 1,2 (6,8-11,1)	35,0 ± 9,8a (15,0-48,0)	16,6 ± 4,3b,d (9,0-22,4)	18,5 ± 4,3c (12,6-23,4)
Linf.T8 activ. CD8+HLA-DR+	7,5 ± 3,5 (3,1-13,5)	7,8 ± 5,5 (1,2-20,0)	8,4 ± 4,7 (3,4-17,0)	9,6 ± 6,2 (1,7-22,3)

a $p < 0,001$ vs grupo fértil
b $p < 0,01$ vs grupo fértil
c $p < 0,05$ vs grupo fértil
d $p < 0,05$ vs grupo estéril

GRAFICA 10

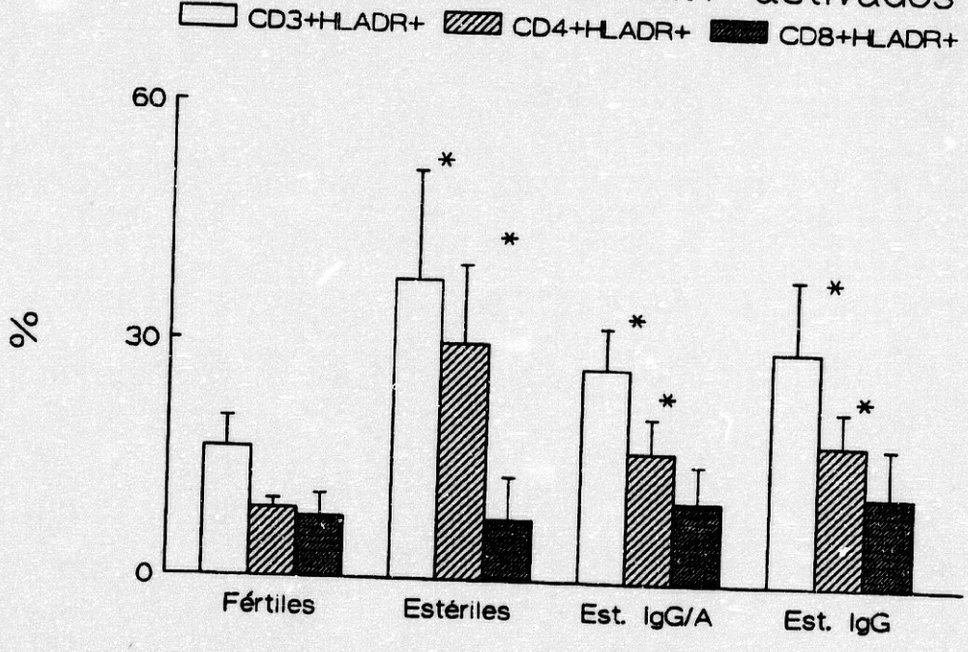
Subpoblaciones de linf.T activados



Eyaculados

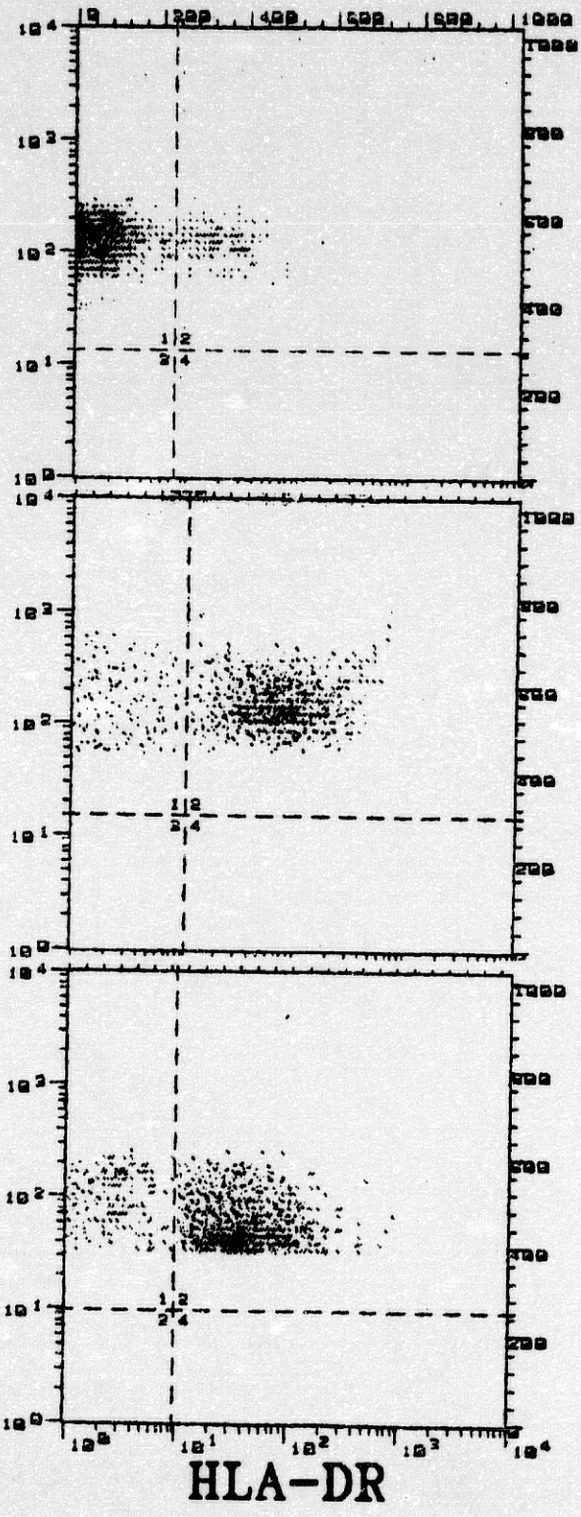
GRAFICA 11

Subpoblaciones de linf.T activados



Eyaculados

Fig. 19.- PORCENTAJES DE LINFOCITOS CD4+HLA-DR+ EN LOS DISTINTOS TIPOS DE EYACULADOS ESTUDIADOS.



VALORES DE LAS SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS B EN SUJETOS DEL GRUPO CONTROL, ESTERILES NO INMUNOLOGICOS E INMUNOLOGICOS.-

En el estudio comparativo de las subpoblaciones de linfocitos B entre el grupo de individuos fértiles y los restantes grupos obtuvimos los siguientes resultados:

- No encontramos diferencias significativas en la cuantificación de linfocitos B en valores absolutos, entre los distintos grupos, aunque la proporción de estas células presentó un incremento estadísticamente significativo en el grupo de individuos estériles sin AAE en relación al grupo control ($p < 0,001$) (Tablas XXI y XXII; Graf. 12 y 13; Fig. 20).

- Los valores absolutos de la subpoblación de linfocitos B CD5(+) (o inmunorreguladores) resultaron significativamente superiores en los individuos estériles de origen no inmunológico ($p < 0,05$) y en los estériles inmunológicos tipo Ig G/A e Ig G ($p < 0,01$) con respecto al grupo control (Tabla XXI; Graf. 12; Fig. 21). Al analizar los porcentajes de esta subpoblación en los 4 grupos de sujetos estudiados, obtuvimos los mismos resultados (Tabla XXII; Graf. 13; Fig. 21).

TABLA XXI

SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS B EN LOS DISTINTOS TIPOS DE EYACULADOS ESTUDIADOS (miles/ml).

POBLAC. CEL.	FERT (n=30)	ESTERIL (n=30)	IgG/A (n=11)	IgG (n=7)
Linf. B CD45+CD20+	62,3 ± 79,7 (0-355,5)	139,9 ± 183,2 (0-642,1)	140,8 ± 98,6 (5,2-318,6)	125,3 ± 92,4 (57,9-299,2)
Linf. B inmunorreg. CD20+CD5+	18,3 ± 21,9 (0-82,9)	87,2 ± 113,8b (0-372,4)	101,8 ± 72,8a (3,5-232,5)	107,5 ± 94,9a (39,4-272,0)

a $p < 0,01$ vs grupo fértil
b $p < 0,05$ vs grupo fértil

TABLA XXII

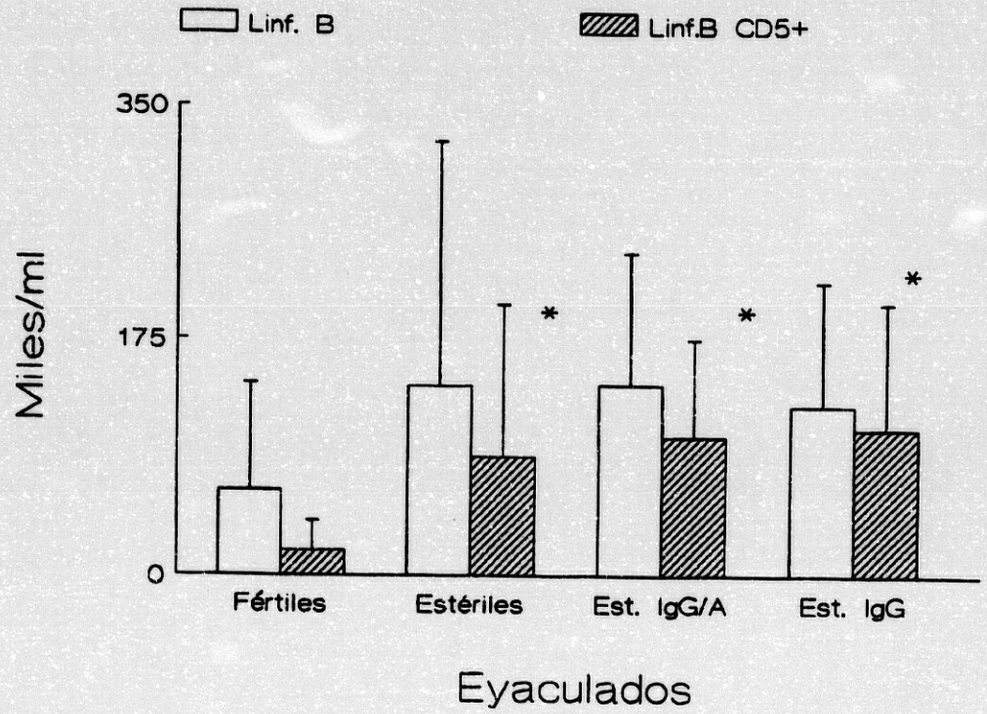
PORCENTAJES DE LAS SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS B EN LOS DISTINTOS TIPOS DE EYACULADOS ESTUDIADOS (%).

POBLAC. CEL.	FERT (n=25)	ESTERIL (n=24)	IgG/A (n=11)	IgG (n=7)
Linf. B CD45+CD20+	20,4 ± 8,4 (8,7-30,0)	34,0 ± 6,6a (26,0-45,0)	27,6 ± 7,9 (15,0-43,0)	23,9 ± 7,7 (7,8-30,0)
Linf. B inmunorreg. CD20+CD5+	5,9 ± 2,9 (2,5-10,3)	21,7 ± 6,6a (11,1-31,5)	20,1 ± 7,6a (9,2-33,0)	19,0 ± 7,5b (5,1-30,6)

a $p < 0,001$ vs grupo fértil
b $p < 0,01$ vs grupo fértil

GRAFICA 12

Subpoblaciones de linfocitos B



GRAFICA 13

Subpoblaciones de linfocitos B

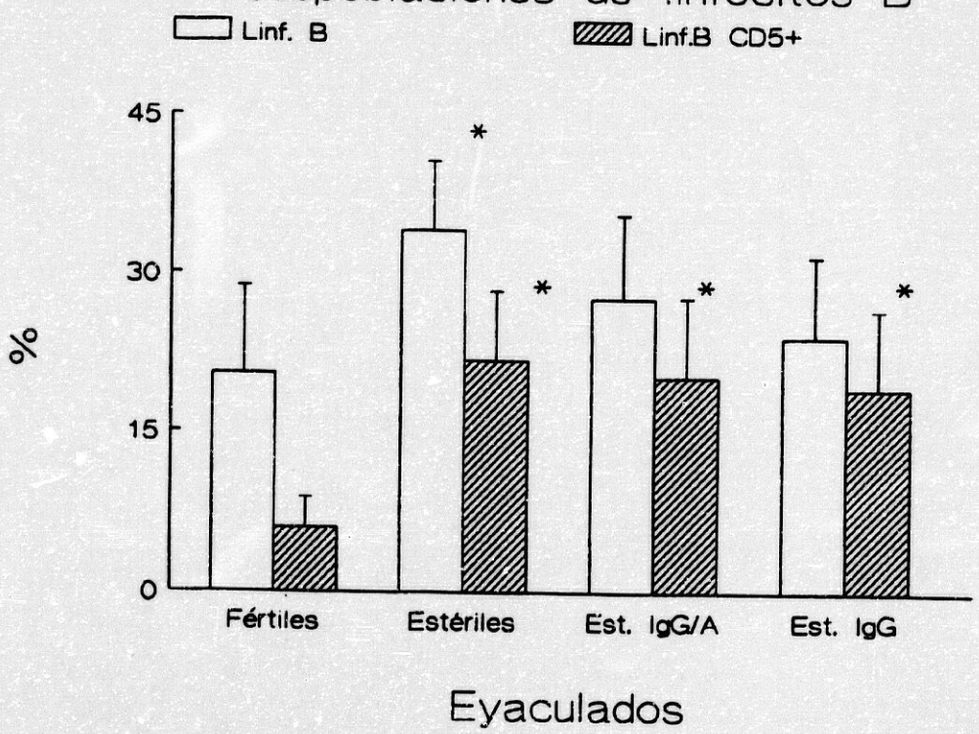


Fig.- 20.- PORCENTAJES DE LINFOCITOS B EN LOS DISTINTOS TIPOS DE EYACULADOS ESTUDIADOS.

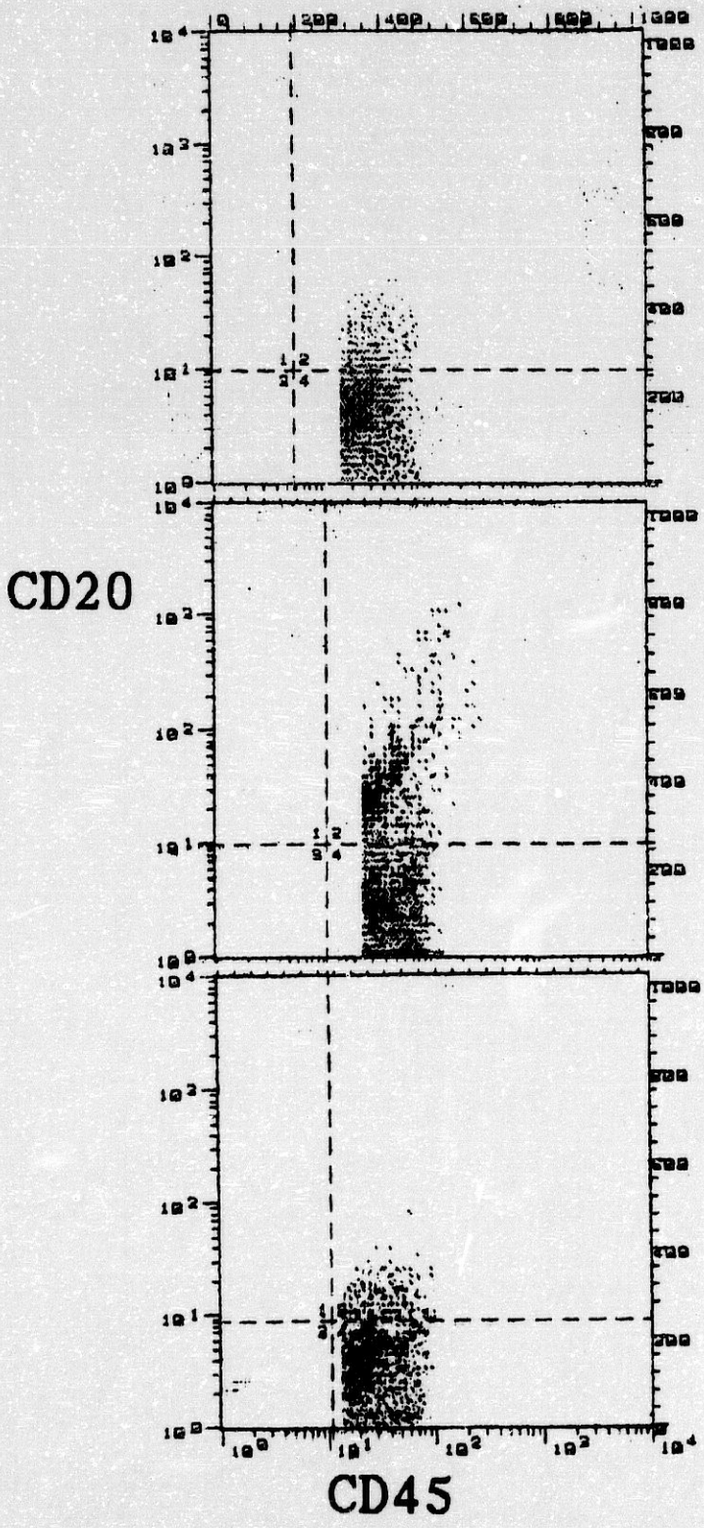
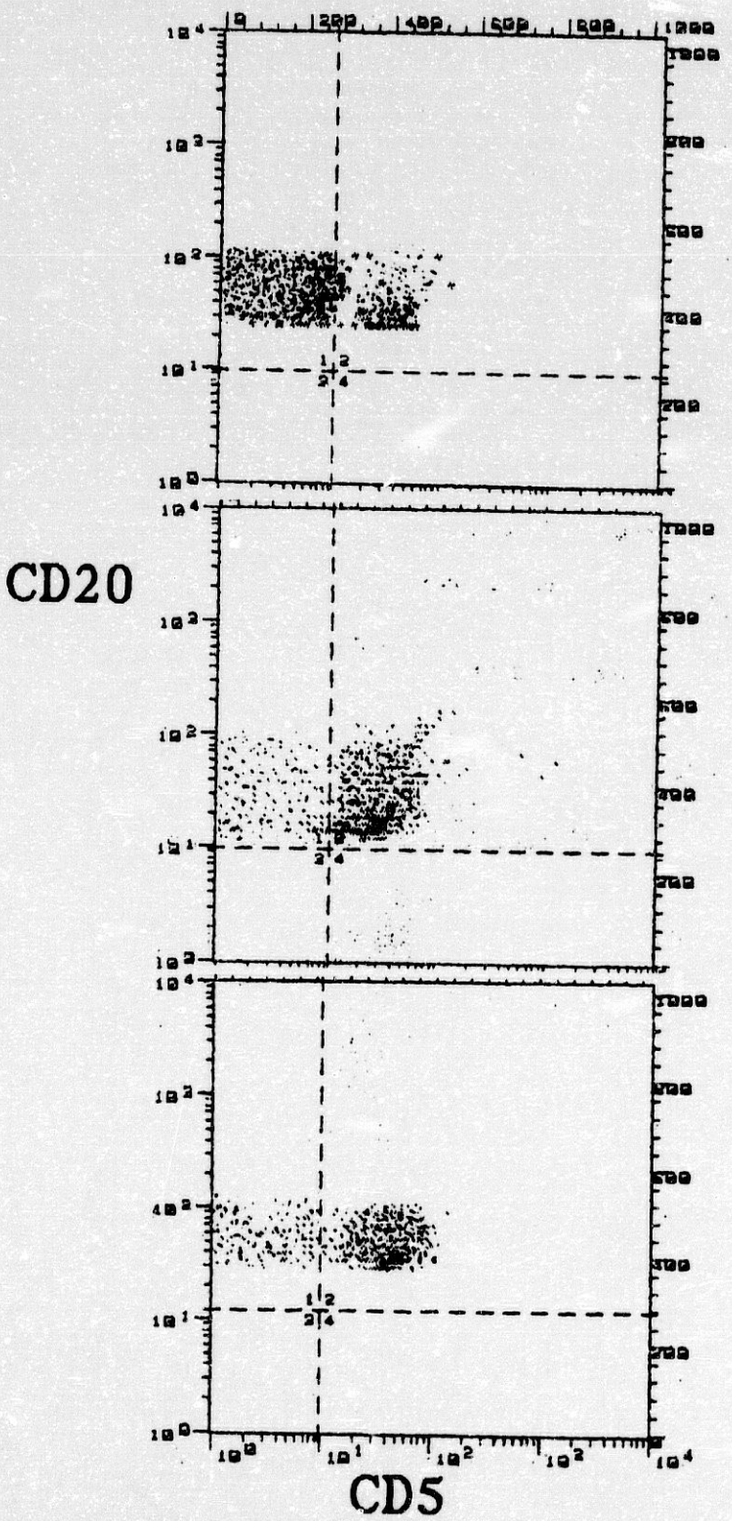


Fig. 21.- PORCENTAJES DE LINFOCITOS B CD5+ EN LOS DISTINTOS TIPOS DE EYACULADOS ESTUDIADOS.



VALORES DE LAS POBLACIONES DE LGL EN SUJETOS DEL GRUPO CONTROL, ESTERILES NO INMUNOLOGICOS E INMUNOLOGICOS.-

Los pacientes estériles con AAE, bien Ig G/A, o sólo Ig G, presentaron una elevación estadísticamente significativa del número absoluto LGL con $p < 0,001$ respecto al grupo control, y con $p < 0,01$ en relación al grupo de individuos estériles sin AAE. Porcentualmente, se obtuvo la misma significación (Tabla XXIII; Graf. 14 y 15; Fig. 22).

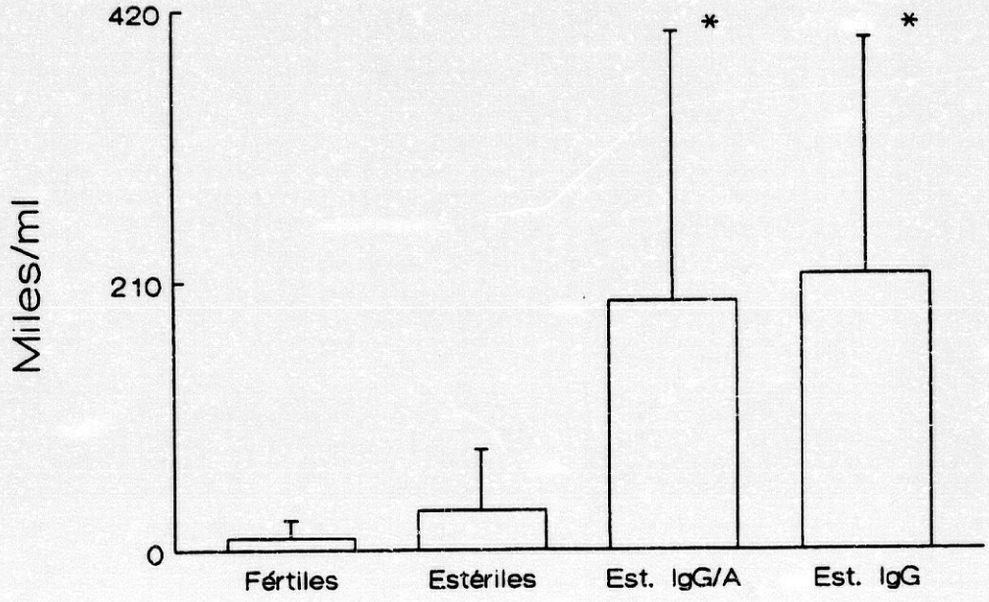
Destacamos, por su posible papel fisiopatológico en la reproducción humana, este incremento de LGL en las muestras de semen con AAE, que a su vez constituye el parámetro discriminativo entre la esterilidad no inmunológica y la que posee AAE en sus eyaculados o esterilidad de origen inmunológico.

TABLA XXIII
PORCENTAJE Y NUMERO ABSOLUTO DE LINFOCITOS GRANDES GRANULARES EN LOS DISTINTOS TIPOS DE EYACULADOS ESTUDIADOS.

POBLAC. CEL.	FERT (n=30)	ESTERIL (n=30)	IgG/A (n=11)	IgG (n=7)
LGL(miles/ml) CD45+CD16+	9,5±14,0 (0-42,2)	30,6±47,1 (0-175,2)	194,6±208,5a,b (6,0-605,3)	215,5±182,7a,b (47,7-486,0)
LGL(%) CD45+CD16+	3,4±2,8 (0,3-7,2)	9,8±6,0 (0,1-17,0)	29,3±6,9a,b (13,2-38,0)	32,9±11,1a,b (22,7-51,0)

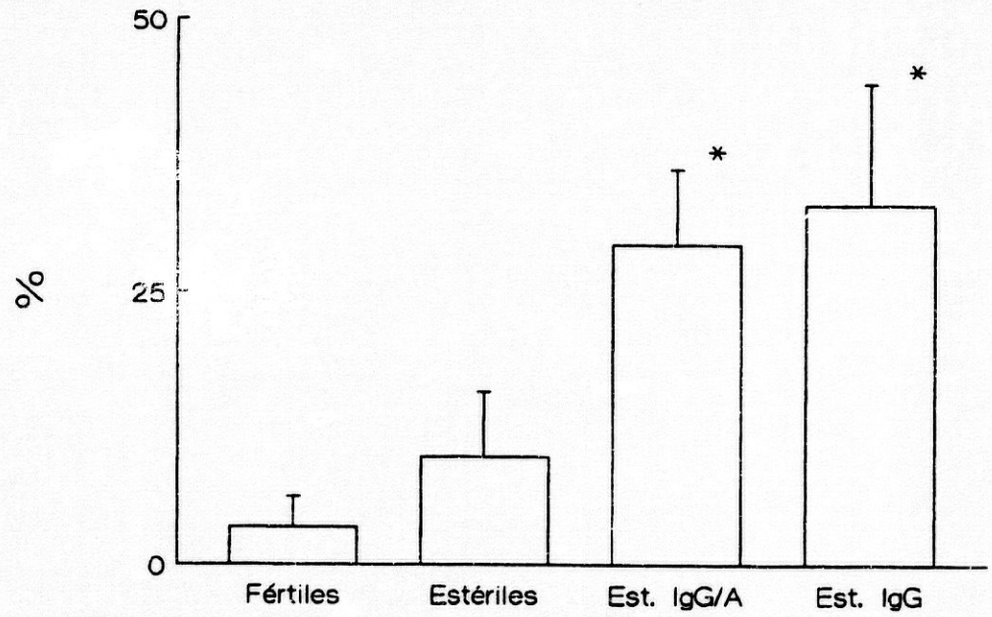
a $p < 0,001$ vs grupo fértil
b $p < 0,01$ vs grupo estéril

GRAFICA 14
Poblaciones de LGL



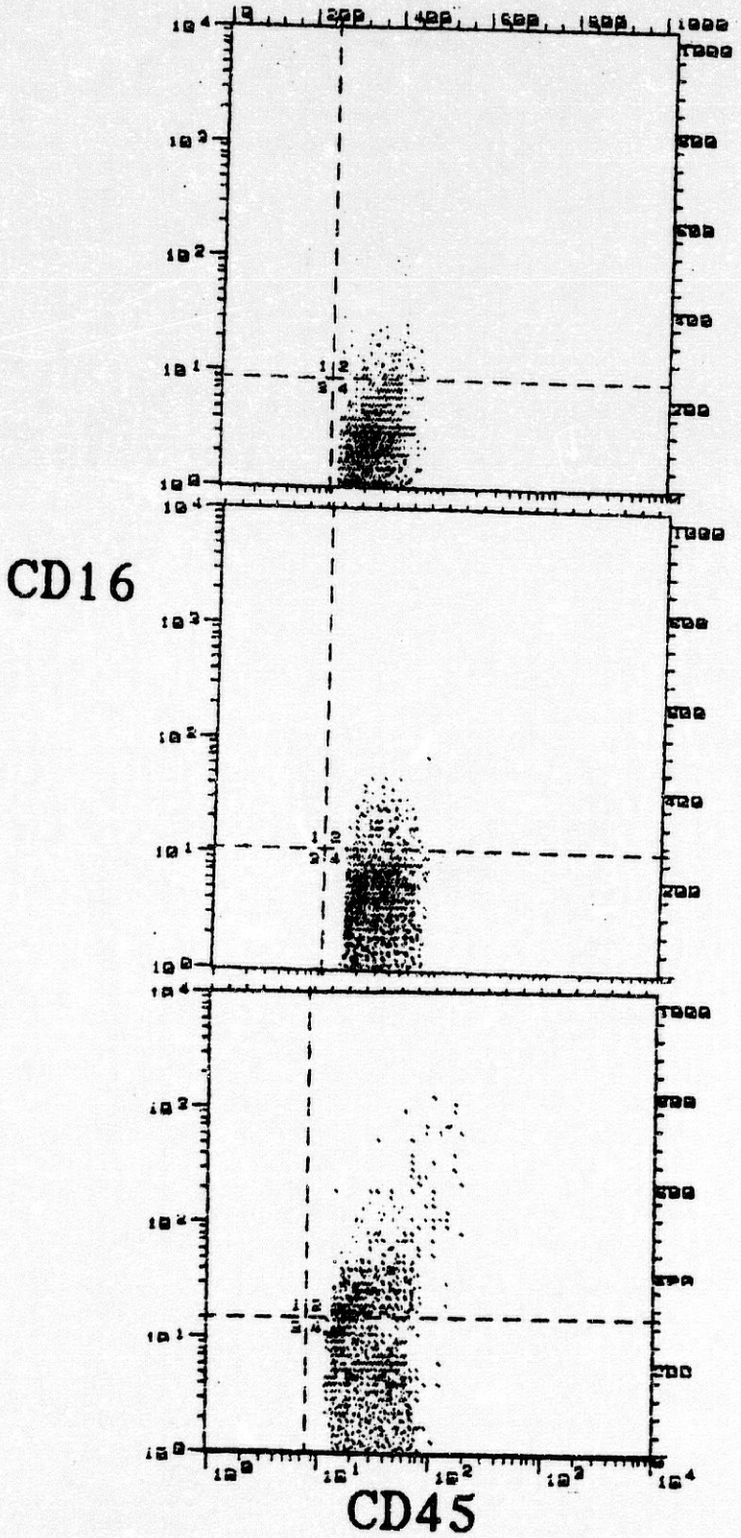
Eyaculados

GRAFICA 15
Poblaciones de LGL



Eyaculados

Fig. 22.- PORCENTAJES DE LGL EN LOS DISTINTOS TIPOS DE EYACULADOS ESTUDIADOS.



VALORACION DE LAS CELULAS CD16(+) OBSERVADAS EN EYACULADOS CON AAE.-

1.- ESTUDIO DE LA CAPTACION DEL ANTICUERPO MONOCLONAL ANTI-CD16 POR ESPEMATOZOIDES CON AAE.-

Como hemos expuesto anteriormente, con el objeto de comprobar que el aumento de las células CD16(+) observado en algunos eyaculados era real, en contraposición a otros autores, que defienden la existencia de moléculas, que unen por un lado al AAE y por otro captan el Ac. Mo. anti-CD16, estudiamos la fijación de este Ac. Mo. por los espermatozoides con AAE en su superficie.

Para ello, comparamos la captación media del Ac. Mo. anti-CD16 en un grupo control de espermatozoides sin AAE con la fijación media en un grupo de eyaculados con espermatozoides que presentaron AAE en su superficie.

El análisis mediante citometría de flujo de 5 muestras de semen de cada uno de los grupos, demostró que este incremento de LGL en eyaculados con AAE era verdadero, al no detectarse diferencias estadísticamente significativas en la expresión de dicho antígeno entre ambos grupos (Tabla XXIV; Fig. 23). En la Fig. 23, se puede apreciar en la gráfica superior la captación del Ac. Mo. anti-CD16 por los espermatozoides de los eyaculados sin AAE; y en la gráfica inferior la de los espermatozoides de eyaculados con AAE.

2.- ESTUDIO DE LA REACTIVIDAD CRUZADA DE AAE CON LOS LINFOCITOS PRESENTES EN LOS EYACULADOS.-

Con el fin de detectar una posible reactividad cruzada de los AAE con los linfocitos presentes en los eyaculados, se comparó el porcentaje de linfocitos que expresaban Ig G en su superficie en eyaculados con AAE y en eyaculados sin éstos.

El análisis por citómetro de flujo de 5 muestras de semen de cada uno de los grupos comparados, demostró que no existían diferencias significativas en la expresión de Ig G por los linfocitos seminales entre ambos grupos, por lo que la posibilidad de que tuviera lugar una reactividad cruzada de los AAE con los linfocitos quedaba totalmente rechazada (Tabla XXV; Fig. 24). En la Fig. 24, se puede observar en la gráfica superior la captación del Ac. Mo. anti-Ig G humana por los linfocitos de eyaculados sin AAE; y en la gráfica inferior la de los linfocitos de eyaculados con AAE.

TABLA XXIV
PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDES DE EYACULADOS CON AAE Y SIN AAE QUE REACCIONAN CON EL ANTICUERPO MONOCLONAL ANTI-CD16.

SPZ DE EYACULADOS	
SIN AAE (n=5)	CON AAE (n=5)
0,5 ± 0,3	0,9 ± 0,7

N.S.

TABLA XXV

PORCENTAJE DE LINFOCITOS DE EYACULADOS CON Y SIN AAE QUE REACCIONAN CON AAE.

Linf. de eyac sin AAE	Linf. de eyac. con AAE
1,3 ± 0,5	1,4 ± 1,1

N.S.

Fig. 23.- CAPTACION DEL AC. MO. ANTI-CD16 POR LOS ESPERMATOZOIDES DE EYACULADOS SIN AAE (GRAFICA SUPERIOR) Y CON AAE (GRAFICA INFERIOR).

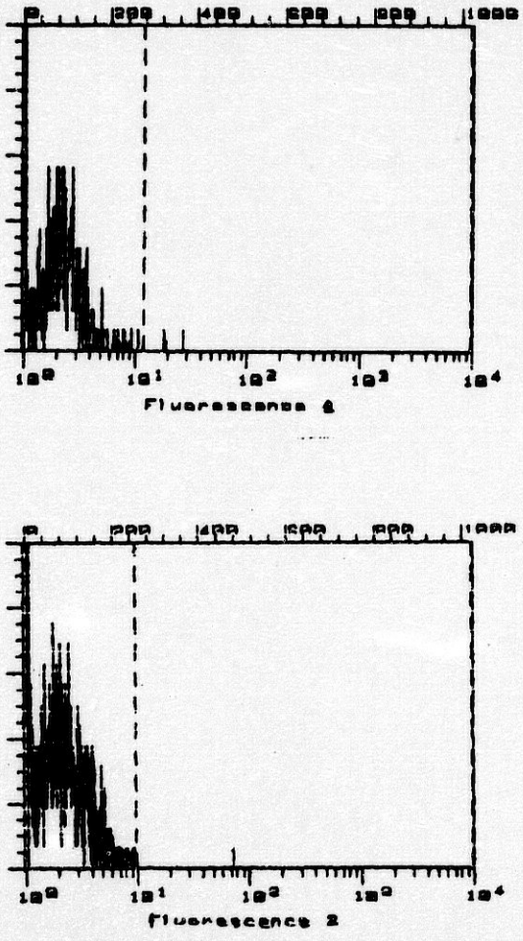
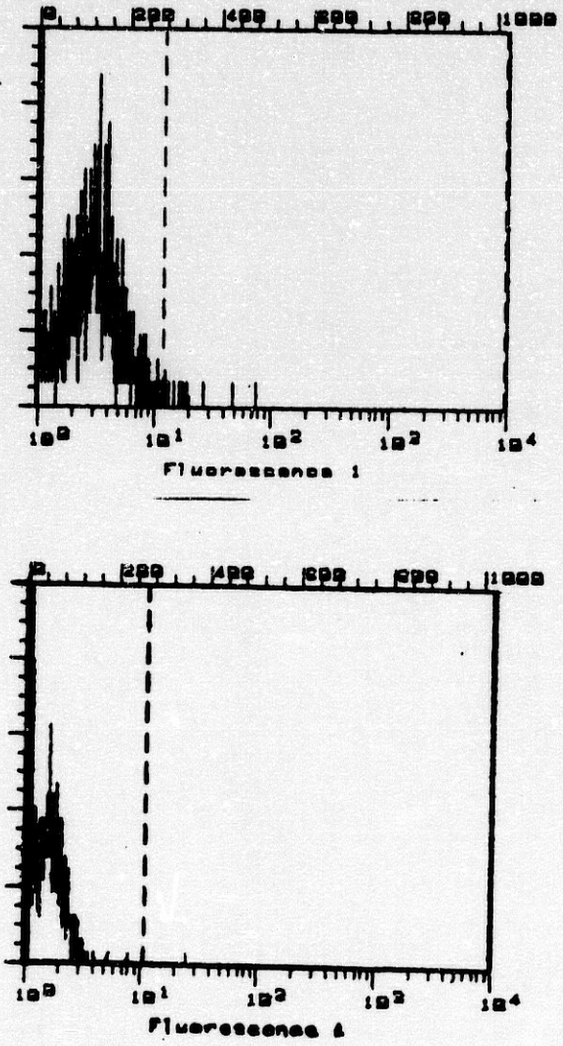


Fig. 24.- CAPTACION DEL AC. MO. ANTI-Ig G HUMANA POR LOS LINFOCITOS DE EYACULADOS SIN AAE (GRAFICA SUPERIOR) Y CON AAE (GRAFICA INFERIOR).



Discusión

El gran auge experimentado en los últimos años en las diferentes técnicas de reproducción asistida ha permitido conocer algunos de los mecanismos más íntimos de la reproducción humana. Sin embargo, diferentes aspectos de la interrelación entre el sistema inmune y el aparato reproductor se encuentran hoy por resolver. Así, los mecanismos que evitan el daño contra el espermatozoide en individuos fértiles o la etiopatogenia de la esterilidad masculina de causa inmunológica no están aún aclarados. La profundización en el estudio de la inmunorregulación a nivel del tracto reproductor masculino y sus posibles alteraciones, ayudaría a mejorar el conocimiento de estos puntos oscuros de la fisiología de la reproducción humana.

Estudios recientes (Barrat y cols., 1988; Mahi-Brown y cols., 1988; Witkin, 1988) sugieren que el tracto reproductor masculino es una región inmunológicamente dinámica y que los diferentes tipos de leucocitos presentes en el semen juegan un papel en la modulación de la respuesta inmune contra el esperm..tozoide. Barratt y cols. (1992) han implicado a los leucocitos seminales, no sólo en las infecciones genitales (Wolff y Anderson, 1988; Jochum y cols., 1986) y en la modulación de la respuesta inmune contra el espermatozoide, sino también en el control de la calidad seminal.

Aspectos innovadores de la relación entre leucocitos y espermatozoides han sido sugeridos por Scolfield y cols. (1992) y Ashida y Scolfield (1987). Los primeros han demostrado que los espermatozoides pueden unirse a algunas células somáticas, tales como los leucocitos, por medio de las moléculas HLA de clase II de éstos, que actuarían como receptores de las células espermáticas; mientras que los segundos, al igual que D'Cruz y Haas (1993), han sugerido la expresión de receptores comunes entre linfocitos y espermatozoides, como el CD46 o proteína cofactora de membrana y el CD55 (Decay Accelerating Factor),

involucrado en la regulación del complemento.

Diversas sustancias sintetizadas por los leucocitos influyen sobre la capacidad funcional del espermatozoide, tanto en el aparato reproductor masculino como en el femenino (Barratt y cols., 1990a). De este modo, Hill y cols. (1987a) han comprobado el empeoramiento de la motilidad espermática en eyaculados a los que se añadió γ-IFN y TNF, mientras que Ricker y cols. (1989) demostraron la capacidad de la citoquina PAF (factor de activación plaquetario) para promover el movimiento de los espermatozoides.

Dado que el estudio de la inmunorregulación a nivel del tracto reproductor masculino nos ayudaría a conocer mejor la fisiología testicular y podría aportar nuevos enfoques en el diagnóstico y tratamiento de la esterilidad masculina de causa inmune, nos propusimos estudiar el papel fisiológico de las diferentes células del sistema inmune presentes en el eyaculado; así como sus implicaciones en la esterilidad masculina de causa inmunológica y no inmunológica.

Una primera aproximación al estudio de las células inmunocompetentes presentes en el semen consistió en intentar relacionar la concentración de leucocitos totales con la capacidad fertilizante del eyaculado y determinar el origen de dichas células. Nuestros resultados demuestran la ausencia de diferencias estadísticamente significativas en la concentración media de leucocitos entre los grupos de fértiles, estériles sin AAE e estériles con AAE (Tabla XI), sugiriendo que el número absoluto de leucocitos presentes en un eyaculado con cultivo microbiológico negativo no resulta ser un parámetro indicativo de la capacidad fertilizante de éste, y que dichas células constituyen un componente natural de las muestras de semen humano. No obstante, otros autores han obtenido resultados discrepantes en el análisis de los

leucocitos seminales y su papel en relación a la esterilidad masculina. Wolff y Anderson (1988) hallaron una asociación entre semen leucocitospérmico y esterilidad, mientras que El-Demiry y cols. (1986a) detectaron lo contrario. Tales discrepancias pueden fundamentarse en los criterios seguidos para la selección de individuos fértiles (Smith y cols., 1989) y a la inclusión de pacientes con posibles infecciones genitales, excluídos, por otra parte, de nuestro estudio.

Han sido propuestas diversas teorías etiológicas sobre la existencia de leucocitos en el semen: en algunos varones, la presencia de leucocitos puede ser atribuíble a una infección del tracto reproductor masculino (estos sujetos no han sido incluídos en nuestro estudio), mientras que en otros, la presencia de estas células en semen, reflejaría un proceso inflamatorio, o la producción de espermatozoides morfológicamente anormales que atraerían a los leucocitos en respuesta a la presencia de restos celulares. Esta última hipótesis es defendida por Barratt y cols. (1992), tras observar que muestras de semen con más del 50% de espermatozoides morfológicamente normales poseían un número significativamente más alto de neutrófilos y macrófagos que aquéllos con más del 50% de espermatozoides con defectos en la cabeza.

La relación entre leucocitos en semen y calidad del eyaculado continúa siendo motivo de polémica entre diferentes autores. Nosotros no hemos detectado una relación entre los leucocitos seminales y determinadas alteraciones en los parámetros seminales (motilidad, vitalidad, morfología, concentración espermática y test hiposmótico) (Tabla X), lo que coincide con lo obtenido por otros autores (Queseda y cols., 1968; Moberg y cols., 1980; Swenson y cols., 1980; Kung y cols., 1993), discrepando de lo observado por El-Demiry y cols. (1986a) y Wolff y cols.(1990). Algunos productos solubles sintetizados por los leucocitos resultan tóxicos para los espermatozoides "in vitro", ya que

empeoran su motilidad y su capacidad fertilizante (Anderson y Hill, 1988; Hill y cols., 1989; Hill y cols., 1987b). No obstante, un "efecto transitorio" de los productos de los leucocitos seminales en la capacidad fertilizante del eyaculado explicaría que la leucocitospermia no pudiera ser causa de esterilidad masculina (Anderson y Hill, 1988). Además, Kovalski y cols. (1992) han demostrado que el plasma seminal confiere cierta protección, debida a la presencia de factores de alto y bajo peso molecular.

Otras características del eyaculado, no estudiadas por nosotros, pueden verse afectadas por la presencia de leucocitos. Así, Engh y cols. (1992) han mostrado que la condensación de la cromatina es una de las características espermáticas que se ve afectada por la presencia de leucocitos en el eyaculado, independientemente de la calidad seminal, sugiriendo que a través de productos leucocitarios (citoquinas) se produce el daño de la maduración espermática o de la espermatogénesis y, en definitiva, la esterilidad.

Por otra parte, nuestros resultados demuestran que la presencia de AAE no se relaciona con una mayor concentración de leucocitos en el eyaculado (Tabla X), lo que coincide con otros autores (Kortebani y cols., 1992; Wolff y cols., 1990;), sugiriendo que, a pesar de que ambas alteraciones son manifestaciones de una respuesta inmunológica, no se interrelacionan. Por el contrario, Gonzales y cols. (1992a) observaron una asociación entre leucocitospermia y AAE, que puede responder a la relación entre aquélla y la hipofunción de las vesículas seminales que padecían los pacientes de su estudio.

Asimismo, otro objetivo de nuestro estudio ha sido esclarecer el origen de estas células presentes en el semen, concluyendo como la mayoría de los autores (Barratt y cols., 1992; Kortebani y cols., 1992;

Olsen y Shields, 1984; Nashan y cols., 1990; Nashan y cols, 1989, Anderson, 1990), que los leucocitos seminales en eyaculados con cultivos microbiológicos negativos proceden del epidídimo, conductos deferentes o testículos, ya que sujetos vasectomizados presentaron un número significativamente menor de estas células ($p < 0,001$) (Tabla XI).

Ya que, como hemos comentado, el número absoluto de leucocitos no se relacionaba con ninguna característica del eyaculado, nos propusimos a continuación una caracterización más detallada de las subpoblaciones de los leucocitos seminales con el objeto de conocer cuál es el papel de estas células en la calidad del semen y en la esterilidad masculina.

En nuestro trabajo, el análisis de las poblaciones leucocitarias de los distintos eyaculados estudiados (Tabla IV) ha sido realizado mediante citometría de flujo, que había sido propuesta por Spano y cols. (1984) como la metodología que aporta una información más detallada en la evaluación andrológica del paciente, a través de la cuantificación de los diferentes tipos celulares (células germinales, espermatozoides, leucocitos,...) presentes en cada muestra de semen, proponiendo la introducción del análisis por citometría de flujo en el estudio de la esterilidad masculina. Algunos autores basan el análisis de los leucocitos en la medición de quimioluminiscencia (Krausz y cols., 1992) o, en la reducción de nitroazul de tetrazolio a azul de formazán (Kovalski y cols., 1991), debido a la producción de radicales de oxígeno por los neutrófilos seminales. De este modo, el estudio de los leucocitos seminales queda reducido a la cuantificación de los granulocitos, imposibilitando la caracterización de las restantes poblaciones leucocitarias, lo que limitaría el conocimiento de las células inmunocompetentes en la fisiología de la reproducción. Por ello, la citometría de flujo parece constituir el

método más completo en el análisis de las células inmunes presentes en las muestras de semen humano.

A diferencia de Zagury y cols. (1984) y de Mazzolli y cols. (1990), nosotros no hemos utilizado la separación de células mononucleadas por gradientes de Percoll, debido a que la población de neutrófilos se deposita en el pellet del tubo, y no en el halo celular que se recoge para efectuar el análisis. Este hecho fue comprobado por Krausz y cols. (1992), que no detectaron quimioluminiscencia en fracciones de eyaculados obtenidas por gradientes de Percoll, a causa de la ausencia de granulocitos. Por lo que consideramos más adecuado para el estudio de las poblaciones leucocitarias de los eyaculados el análisis por citometría de flujo del semen total, y no sólo de la fracción de células mononucleadas.

Nosotros, al igual que varios autores (Eggert-Kruse y cols., 1992, Homyk y cols., 1990; Wolff y Anderson, 1988; El-Demiry y cols., 1986b; Witkin y Goldstein, 1988; Barratt y cols., 1991), hemos utilizado anticuerpos monoclonales para la identificación de los diferentes leucocitos del semen humano. No obstante, el semen contiene sustancias que podrían enmascarar determinados antígenos característicos de ciertas poblaciones leucocitarias - efecto "masking" - (Weil y Rodenburg, 1962; Holt, 1980; Hekman y Rumke, 1969), lo que impediría que los anticuerpos monoclonales se unieran a dichos antígenos, invalidando los resultados obtenidos en el análisis por citometría de flujo en los eyaculados humanos. Sin embargo, parece improbable que este hecho tenga lugar, ya que al igual que Kurspiz y cols. (1987), Wolff y Anderson (1988) y Jassim y cols. (1989), nosotros hemos comprobado la captación de diversos anticuerpos monoclonales por los leucocitos y, en especial, por los linfocitos seminales, permitiendo la caracterización de las diferentes poblaciones linfocitarias en los distintos tipos de eyaculados estudiados. Además, Wolff y Anderson (1988) comprobaron que la

incubación de leucocitos de sangre periférica con líquido seminal no alteraba la expresión de diferentes antígenos de superficie.

En la cuantificación del número absoluto y el porcentaje de macrófagos, linfocitos y granulocitos, al igual que Wolff y Anderson (1988), hemos comprobado la alta variabilidad en el número de células existente entre los eyaculados (Tabla XI). Sin embargo, las proporciones de monocitos, granulocitos y linfocitos son constantes para todos los tipos de eyaculados, constituyendo la población predominante la de los monocitos/macrófagos, seguida de los linfocitos y los granulocitos (Tabla XII). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Kortebani y cols. (1992) en su grupo control, aunque ellos han detectado diferencias en las proporciones de los granulocitos que se ven incrementadas en el grupo de astenozoospérmicos, debido quizás a la coexistencia de una hipofunción de vesículas seminales en estos pacientes que induce el aumento de los granulocitos. Igualmente, Zagury y cols. (1984) han comprobado el predominio de los monocitos/macrófagos sobre los linfocitos seminales, utilizando en la separación de las células mononucleadas del semen los gradientes de Percoll.

Sin embargo, nuestros resultados discrepan de los obtenidos por otros autores (Tomlinson y cols., 1992; Wolff y Anderson, 1988; El-Demiry y cols., 1986a; Kung y cols., 1993); discrepancias que pueden ser debidas a los criterios seguidos para la selección de individuos fértiles y a la inclusión de pacientes con posibles infecciones genitales, excluídos de nuestro estudio, viéndose, en este caso incrementado el número de granulocitos con respecto a nuestros resultados.

Nuestros resultados muestran el predominio de los macrófagos sobre el resto de los leucocitos seminales en los distintos tipos de eyaculados, lo que podría estar relacionado, tanto con la eliminación de

restos celulares, como con la inmunosupresión que caracteriza al líquido seminal y que contribuye a la protección del espermatozoide del sistema inmune. De este modo, y al igual que otros autores (Tomlinson y cols., 1992; Barrat y cols., 1992; Smith y cols., 1989) podría implicarse a los macrófagos seminales en la fagocitosis activa de bacterias, espermátides, restos de células germinales y espermatozoides defectuosos; fagocitosis que puede ser regulada por diversas sustancias, tales como el zinc, procedente del fluído prostático (Star'kova y cols., 1976). Además, Nashan y cols. (1990) han comprobado la función de fagocitosis que los macrófagos llevan a cabo en la zona afectada por la vasectomía, constituyendo un importante mecanismo en el procesamiento de los espermatozoides después de la intervención.

Chouaib y cols. (1984) han demostrado la síntesis de sustancias inmunosupresoras por los macrófagos, tales como la PGE_2 (monoquina) que bien directamente (Tilden y Balch, 1982) o por medio de la estimulación de los linfocitos T8 supresores/citotóxicos produce una inhibición de la síntesis de IL-2, y por consiguiente la inhibición de la activación de los linfocitos T (Walker y cols., 1983). Tarter y cols. (1986) han detectado la existencia de esta prostaglandina en el líquido seminal. Asimismo, Phipps y cols. (1990) han descrito a los macrófagos como reguladores del sistema inmune, no sólo por su función inmunosupresora, sino porque también se encuentran involucrados en la inducción de tolerancia a determinados antígenos - en nuestro caso, los antígenos de las células espermáticas -, inhibiendo la diferenciación y proliferación de los linfocitos B. De hecho, estos autores han comprobado la asociación de la producción de PGE_2 por los macrófagos y la inducción de tolerancia. Una futura investigación más detallada acerca del estado de activación en que se encuentran los macrófagos presentes en cada tipo de eyaculado, podría explicar aún mejor el papel que éstos juegan en la fisiología de la reproducción humana, ya que la activación de estas

células conlleva la producción de ciertas citoquinas (IL-1. TNF, γ-IFN), que terminaría por propiciar la respuesta inmune (Johnston, 1988), en este caso, contra el espermatozoide; y que induciría la expresión de un receptor en las células endoteliales, permitiendo la extravasación de células T hacia el interior del tracto reproductor masculino (Cavender y cols., 1986; Cavender y cols., 1987).

Por otra parte, la presencia de granulocitos en los distintos tipos de eyaculados analizados, responde igualmente a la función de fagocitosis de bacterias, y más frecuentemente de espermatozoides y restos de células germinales (Smith y cols., 1989; El-Demiry y cols., 1986a; El-Demiry y cols., 1986b). Esta última teoría es defendida por Tomlinson y cols. (1992) y Barratt y cols. (1992), que como hemos apuntado anteriormente, observan un número significativamente más elevado de neutrófilos en muestras de semen con más del 50% de espermatozoides morfológicamente normales. Además, Thompson y cols. (1991) han comprobado un incremento en el número de granulocitos en muestras de moco cervical postinseminación, sugiriendo que dichas células desempeñan una función de "aclaramiento" de los espermatozoides no aptos para la fecundación y constituyen una importante línea de defensa contra las bacterias existentes a este nivel.

Como hemos visto hasta ahora, ni los monocitos, ni los granulocitos presentes en los eyaculados con cultivos microbiológicos negativos, resultan ser un parámetro indicativo de la capacidad fertilizante de éstos, constituyendo un componente natural de las muestras de semen humano. Veamos a continuación cuál es el papel de las distintas subpoblaciones linfocitarias en la fisiología seminal.

I.- SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T.-

Los resultados que hemos obtenido en la cuantificación de los linfocitos en diferentes tipos de eyaculados coinciden con los de otros autores (Wolff y Anderson, 1988; Witkin y Goldstein, 1988; Kung y cols., 1993), que señalan un predominio de los linfocitos T sobre los B en muestras de semen humano, ya sea de individuos fértiles como estériles (Tablas XIII y XXI). En nuestro estudio no hemos observado diferencias estadísticamente significativas en el número absoluto de linfocitos CD4 ni CD8. No obstante, hemos detectado un mayor porcentaje de linfocitos CD8 supresores/citotóxicos que de CD4 helper/ inducer en los eyaculados fértiles en contraposición al grupo de individuos con alteraciones en la calidad seminal, que presentaron un porcentaje de linfocitos CD4 helper/inducer más elevado que el de los CD8 supresores/citotóxicos. Nuestros resultados coinciden con los de otros autores (Zagury y cols., 1984; Witkin y Goldstein, 1988; Anderson y Hill, 1987; Kortebani y cols., 1992; Gonzales y cols., 1992a; Kung y cols., 1993), aunque existen opiniones discrepantes (Wolff y Anderson, 1988; Barratt y cols., 1990b), que defienden el predominio de los linfocitos CD4 helper/inducer en las muestras de semen de individuos fértiles; diferencias en los resultados, que pueden ser debidas a la distinta metodología utilizada, ya que estos autores manejan microscopía óptica, técnica subjetiva comparada con la objetividad de la citometría de flujo empleada por nosotros.

A pesar de que el plasma seminal a altas concentraciones se caracteriza por ser linfocitotóxico (Prakash y cols., 1976; Allen y Roberts, 1986), parece improbable que una "selectiva" disminución de los linfocitos CD4 helper/inducer tenga lugar a este nivel. Por otro lado, el análisis por citometría de flujo de los linfocitos seminales nos ha permitido en todo momento la "selección" o "gateo" por medio de los

detectores de dispersión (FSC y SSC) y de fluorescencia (FL1 y FL2) de las células vivas, en este caso linfocitos, ya que las células muertas aparecen representadas, como ya hemos comentado en Material y Métodos, junto a los restos celulares y hematíes, separadas de los linfocitos normales.

Así pues, los linfocitos CD8 supresores/citotóxicos predominantes en eyaculados fértiles, podrían colaborar en la inmunosupresión característica del semen, ejerciendo una función protectora del espermatozoide frente al sistema inmune. Esta inmunosupresión parece alterarse en los individuos estériles con y sin AAE, en los que desciende la proporción de estas células, induciéndose probablemente un estado de "inmunoactivación", que se traduce en el incremento de otras subpoblaciones linfocitarias que más adelante analizaremos. Esta situación podría ser análoga a la descrita en algunos epitelios (Brandtzaeg y cols., 1988) en los que se ha comprobado el predominio de los linfocitos CD8 intraepiteliales, sugiriendo que estas células son las responsables de la inmunosupresión existente en la zona. Igualmente, Brandtzaeg y cols. (1988) confirman la relación entre el predominio de los linfocitos CD8 supresores/citotóxicos y la inducción de un estado de tolerancia frente a determinados antígenos.

El hecho de que en eyaculados fértiles se detecte un predominio de linfocitos CD8 sobre los CD4 helper/inducer podría explicarse mediante la posible activación de estas células por sustancias como la PGE_2 (Chouaib y cols., 1982) y/o por las células germinales del tracto reproductor masculino, tal y como han demostrado Hurtenbach y Shearer (1982); y podría conectar con el hallazgo de El-Demiry y cols. (1987) en biopsias testiculares, en las que se observa una mayor concentración de linfocitos CD8 supresores/citotóxicos que de linfocitos CD4 helper/inducer en el epitelio de la rete testis y conductos deferentes.

Por otra parte, y a diferencia de Witkin y Goldstein (1988), no podemos asociar la presencia de AAE en los eyaculados con un descenso de los linfocitos CD8 supresores/citotóxicos, ya que como hemos mostrado en al Tabla X, no existen diferencias estadísticamente significativas en el número absoluto de estos linfocitos entre los grupos de estériles de causa inmunológica y el grupo control; lo que coincide, por otra parte, con los resultados de Barratt y cols. (1990b), y sugiere que la relación entre AAE y linfocitos CD8 supresores/citotóxicos no es tan directa como se había propuesto.

En resumen, el predominio de los linfocitos CD8 supresores/ citotóxicos en muestras de semen humano, y en definitiva, en el tracto reproductor masculino, puede prevenir una respuesta inmune contra los autoantígenos de los espermatozoides. Recientes estudios han mostrado que el tracto reproductor masculino no es impermeable al sistema inmune y que linfocitos sensibilizados a espermatozoides reaccionan específicamente con los autoantígenos espermáticos cuando entran en contacto con ellos (Tung y cols., 1987). Por ello, sería necesario un mecanismo que limitara la puesta en marcha de esta respuesta inmunológica; mecanismo que podría ser protagonizado por los linfocitos CD8(+) supresores/citotóxicos del eyaculado fértil.

II.- SUBPOBLACIONES DE LOS LINFOCITOS CD4 HELPER/ INDUCER.-

Como ya se ha expuesto en Material y Métodos, Rudd y cols. (1987) y Morimoto y cols. (1983; 1985) han dividido en dos subpoblaciones a los linfocitos CD4 helper/inducer, según expresen o no en su superficie el antígeno CD45RA. De este modo, la subpoblación CD4(+)CD45RA(+) o "inductora de supresión" (o "naive") participa en las respuestas inmunes cuyo fin es conseguir un estado de

inmunosupresión mediante la estimulación de los linfocitos CD8(+) supresores/citotóxicos; y la subpoblación CD4(+)CD45RA(-) o "colaboradora" (o "memory") estimula la producción de anticuerpos por los linfocitos B.

Nuestros resultados muestran un desequilibrio entre las subpoblaciones CD4(+)CD45RA(+) "inductora de supresión" y CD4(+)CD45RA(-) "colaboradora" en los pacientes estériles con y sin AAE con respecto al grupo de fértiles (Tablas XV y XVI), detectándose un aumento significativo en el número y proporción de la subpoblación CD4(+)CD45RA(+) "inductora de supresión" en los individuos estériles de origen inmunológico y no inmunológico.

En determinadas enfermedades autoinmunes se ha encontrado una alteración en los niveles de los linfocitos CD4(+)CD45RA(+), lo que ha sugerido el posible papel de estas células en la fisiopatología de estos transtornos. De este modo, y de acuerdo con Becker y cols. (1992) que han demostrado un incremento de estos linfocitos en sangre periférica de pacientes afectos de la enfermedad mixta del tejido conectivo, la elevación de los linfocitos CD4(+)CD45RA(+) "inductores de supresión" en los eyaculados de pacientes estériles con y sin AAE podría considerarse un mecanismo "compensador" del descenso relativo de linfocitos CD8(+) supresores/citotóxicos que en estos sujetos tiene lugar (Tabla IV), con el fin de conseguir incrementar el ambiente de inmunosupresión a este nivel, perturbado, probablemente, por el contacto en el tracto reproductor masculino, de los antígenos espermáticos con las células inmunes.

El mecanismo por el que las células CD4(+)CD45RA(+) se elevan en las muestras de semen, podría explicarse mediante el incremento de la síntesis y secreción de sustancias inmunosupresoras, tales como la

PGE_2, por células como los macrófagos (abundantes en los eyaculados), que podrían encontrarse activados por sucesivos contactos con los antígenos de los espermatozoides. La alta concentración de estas sustancias induciría la proliferación de los linfocitos CD4(+)CD45RA(+) "inductores de supresión", en un intento de aumentar el número de linfocitos CD8 supresores/citotóxicos en estos eyaculados (Chouaib y cols., 1984).

Como ya hemos visto, existe un predominio de los linfocitos CD8(+) supresores/citotóxicos en los eyaculados de individuos fértiles; linfocitos que se ven disminuídos en las muestras de semen de los sujetos estériles con y sin AAE. Con el objeto de profundizar, aún más, en el conocimiento de la función que estas células desempeñan en la inmunosupresión del tracto reproductor masculino, procedimos a la caracterización fenotípica de estos linfocitos. Veamos cuáles son las subpoblaciones linfocitarias analizadas.

III.- SUBPOBLACIONES DE LOS LINFOCITOS CD8 SUPRESORES/ CITOTOXICOS.-

En el estudio de las subpoblaciones linfocitarias CD8(+) supresoras/ citotóxicas hemos utilizado los anticuerpos monoclonales anti-CD11b y anti-CD56, determinando en los 108 eyaculados analizados los siguientes linfocitos: CD8(+)CD11b(+) o linfocitos supresores antígeno-inespecíficos (Takeuchi y cols., 1988); CD8(+)CD11b(-) o linfocitos supresores antígeno-específicos (Takeuchi y cols., 1988); CD8(+)CD56(+) o linfocitos citotóxicos antígeno-inespecíficos (Lanier y cols., 1987; Nagler y cols., 1989; Lanier y Phillips, 1986).

Nuestros resultados demuestran que los linfocitos CD8(+) supresores/citotóxicos, predominantes en los eyaculados de individuos fértiles

(Tablas XIII y XIV), se caracterizan por poseer un fenotipo CD3(+)CD8(+)CD11b(+)CD56(+) (Tablas XVII y XVIII), es decir, linfocitos supresores/citotóxicos antígeno-inespecíficos, no restringidos por el Complejo Mayor de Histocompatibilidad, y que no precisan de la intervención de la subpoblación de linfocitos CD4(+)CD45RA(+) "inductora de supresión" para ejercer su acción (Takeuchi y cols., 1988; Nagler y cols., 1989).

De los datos presentados en la Tabla XVII se deduce que no existen diferencias estadísticamente significativas en el número absoluto de las subpoblaciones de linfocitos CD8 entre los eyaculados de individuos estériles con y sin AAE con respecto al grupo control; no obstante, hemos encontrado un descenso relativo (Tabla XVIII) de los linfocitos CD8(+)CD11b(+) supresores antígeno-inespecíficos y de los CD8(+)CD56(+) citotóxicos antígeno-inespecíficos en los grupos de pacientes estériles con y sin AAE en relación al grupo control.

Como ya hemos comentado anteriormente, los eyaculados de estos sujetos se produce un descenso porcentual significativo de los linfocitos CD8(+) supresores/citotóxicos, que se manifiesta principalmente por la disminución de la subpoblación más numerosa de éstos, es decir, de los linfocitos CD8(+)CD11b(+)CD56(+) (supresores/citotóxicos antígeno-inespecíficos no MHC restringidos).

El hecho de que las células CD8(+)CD11b(+) expresen en su mayoría el antígeno CD56 (Takeuchi y cols., 1988) conectaría con el hallazgo que nosotros hemos encontrado en los eyaculados de individuos fértiles, en los que predomina la subpoblación de linfocitos CD8(+) de fenotipo CD3(+)CD8(+)CD11b(+)CD56(+), que parece explicar y contribuir al estado de inmunosupresión característico del líquido seminal, que tendría por objeto evitar la activación de las células del

sistema inmune en el reconocimiento de antígenos extraños, como son los espermáticos. Por otra parte, autores como Gustafsson y cols. (1990) han detectado un descenso de esta subpoblación de linfocitos en ciertas enfermedades, como la esclerodermia, en las que un transtorno en la inmunorregulación tiene lugar.

Otros autores (Clement y cols., 1984; Phillips y Lanier, 1986) han demostrado que las células CD3(+)CD8(+)CD11b(+)CD56(+) (supresoras/citotóxicas antígeno-inespecíficas) aumentan en estados de inmunosupresión, inhibiendo la activación de linfocitos B, la proliferación de células T ante determinados mitógenos (Clement y cols., 1984; Landay y cols., 1984; Landay y cols., 1983) y la secreción de Igs. por las células B (Ceuppens y cols., 1982).

En resumen, los linfocitos con fenotipo CD3(+) CD8(+) CD11b(+) CD56(+), células con actividad supresora/citotóxica antígeno-inespecífica, que no precisan de la restricción del CMH para ejercer su acción, constituyen la población linfocitaria mayoritaria de los eyaculados de individuos fértiles, sugiriendo la participación activa de estas células en los mecanismos que previenen una respuesta inmune contra el espermatozoide. La ausencia o disminución de estos linfocitos podría provocar una agresión contra las células espermáticas. Lo que no parece estar claro, es si una alteración en la espermatogénesis provocaría la disminución de estos linfocitos CD8 supresores/citotóxicos por sucesivos contactos con los antígenos espermáticos; o viceversa, si el trastorno inmune ocasionaría la alteración del proceso espermatogénico, y en definitiva, de las características seminales.

IV.- SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T ACTIVADOS.-

Una de las característica más llamativa de los linfocitos es la de

activarse en respuesta a diferentes estímulos específicos e inespecíficos, ya sea por interacción del antígeno con los linfocitos T, o por la interacción receptor-Ig de la célula B con su correspondiente antígeno (Cuadrado, 1991). Esta activación lleva consigo la expresión en su superficie de moléculas específicas como son los antígenos de clase II del CMH (Evans y cols., 1978; Reinherz y cols., 1979; Hercend y cols., 1981).

Los resultados obtenidos en el análisis de las subpoblaciones de linfocitos T activados coinciden con los observados por otros autores (Kortebani y cols., 1992; Gonzales y cols., 1992a; Mazzolli y cols., 1990; Kung y cols., 1993), al detectar un aumento estadísticamente significativo en el número absoluto y porcentaje de linfocitos CD4 activados (CD4(+)HLA-DR(+)) en los eyaculados de pacientes estériles con y sin AAE con respecto al grupo control (Tabla XIX y XX). Igualmente hemos comprobado un incremento relativo de los linfocitos T activados (CD3(+)HLA-DR(+)) (Tabla XX) en los eyaculados estériles con y sin AAE con respecto a los fértiles, debido a la elevación en número absoluto que sufren los linfocitos CD4(+)HLA-DR(+). Mazzolli y cols. (1990) sugieren que las citoquinas producidas en esta activación celular pueden jugar un importante papel en el desarrollo de una esterilidad.

Ahora bien, parece probable que estos linfocitos CD4 helper/ inducer activados, que se encuentran incrementados en los eyaculados de sujetos estériles con y sin AAE, correspondan a la subpoblación linfocitaria CD4(+)CD45RA(+) "inductora de supresión" que se halla aumentada igualmente en estas muestras de semen, lo que sugiere la inducción de un estado de inmunoactivación a nivel del tracto genital de estos individuos. No obstante, no podemos precisar si estas alteraciones inmunes son causa o consecuencia de un trastorno en la espermatogénesis.

En resumen, en muestras de semen de individuos estériles con y sin AAE hemos detectado un incremento de la subpoblación de linfocitos CD4 activados (CD4(+)HLA-DR(+)) con respecto al grupo control. Este aumento parece indicar la existencia de un estado anormal de activación inmune en dichas muestras.

V.- SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS B.-

La subpoblación de linfocitos B que expresa el antígeno de superficie CD5 (linfocitos B CD5(+)) representa menos del 20% de los linfocitos B circulantes en sangre periférica (Casali y Notkins, 1989). Estos linfocitos desempeñan un papel inmunorregulador en condiciones fisiológicas, contribuyendo a la inmunidad natural (Raveche, 1990). Estas células producen espontáneamente anticuerpos polirreactivos, que actúan limpiando el ambiente de restos celulares, células muertas y autoantígenos, constituyendo una primera línea de defensa contra antígenos extraños (aumento de fenómenos de fagocitosis o lisis mediada por el complemento). Casali y Notkins (1989), al igual que otros investigadores (Casali y cols., 1988; Ternynck y Avrameas, 1986; Dighiero y cols., 1983; Prabhakar y cols., 1984; Dighiero y cols., 1985; Casali y cols., 1986), demostraron que la mayoría de las células B CD5(+) intervienen en la respuesta inmune primaria antígeno-inespecífica, ejerciendo su acción tanto contra antígenos propios como exógenos mediante los anticuerpos que producen.

Nuestros resultados no han detectado diferencias estadísticamente significativas en el número absoluto de linfocitos B entre los distintos grupos de eyaculados estériles en relación al grupo control (Tabla XXI). Sin embargo, hemos observado un incremento significativo en el número absoluto de linfocitos B CD5(+) en los grupos de individuos estériles

sin ($p < 0,05$) y con AAE ($p < 0,001$), tanto tipo Ig G como Ig G e Ig A, con respecto al grupo de sujetos fértiles (Tabla XXI).

Algunos investigadores han obtenido un incremento de los linfocitos B CD5(+) en transtornos, tales como: artritis reumatoide (Hardy y cols., 1987; Hara y cols., 1988); enfermedad de Graves (Iwatany cols., 1989); esclerosis múltiple (Mix y cols., 1990); síndrome de Sjögren (Dauphinee y cols., 1988); diabetes mellitus tipo I (Muñoz y cols., 1991); o LES (Becker y cols., 1990).

Vernino y cols. (1992) han sugerido que el antígeno CD5 es un marcador de los linfocitos B activados, por lo que el aumento en la expresión de este antígeno de membrana por los linfocitos B de eyaculados estériles con y sin AAE, podría interpretarse como la consecuente activación de estas células por el repetido contacto con antígenos espermáticos en el tracto reproductor masculino.

En lo que se refiere a la producción de autoanticuerpos por los linfocitos B CD5(+), sería lógico pensar que en las muestras de semen de sujetos con esterilidad de origen inmunológico debería detectarse una mayor concentración de estas células por la existencia de AAE. Sin embargo, el incremento de estos linfocitos no se asocia con la presencia de los AAE, ya que en los eyaculados de individuos estériles de origen no inmunológico hemos encontrado igualmente una elevación de esta subpoblación linfocitaria, por lo que sugerimos que la función de dichas células en los eyaculados es más inmunorreguladora que productora de anticuerpos.

En resumen, el incremento de linfocitos B CD5(+) obtenido en el análisis de eyaculados de individuos estériles con y sin AAE con respecto al grupo control, parece desempeñar un papel inmunorregulador a nivel

de la respuesta primaria inmune antígeno-inespecífica, constituyendo un marcador de activación de los linfocitos B. Dicha activación podría ser inducida por el repetido contacto con los antígenos espermáticos en el tracto reproductor masculino.

VI.- POBLACION DE LGL Y CELULAS NK.-

Las células Natural Killer forman parte de un grupo de linfocitos caracterizado por poseer grandes gránulos citoplasmáticos, denominando genéricamente LGL o "linfocitos grandes granulares" (Timonen y Saksela, 1980; Timonen y cols., 1981). Los LGL son definidos funcionalmente por su capacidad para lisar células diana sin sensibilización previa y sin restricción del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (Lanier y cols., 1986; Trinchieri, 1989). La actividad citotóxica de este grupo de linfocitos ha sido implicada en la destrucción de células tumorales, resistencia a infecciones virales y regulación de la hematopoyesis (Trinchieri, 1989; Heberman y Ortaldo, 1981).

El 70-90% de los LGL (Abo y cols., 1982) está constituído por las células NK propiamente dichas (CD3(-)CD16(+)), que son las células que poseen mayor capacidad citotóxica y que expresan el antígeno CD16 (Fc-γ-RIII) o receptor de baja afinidad para la fracción Fc de la Ig G. El análisis por citometría de flujo de la subpoblación CD45 CD16 nos permite profundizar en el papel que las células NK juegan en la fisiopatología de la reproducción humana, aunque estos marcadores son expresados igualmente por otros LGL como las células Killer.

La actividad citolítica de las células NK es doble: actividad citotóxica espontánea independiente de anticuerpos no restringida por el CMH (actividad NK); y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). En esta última, las células diana unidas a los anticuerpos son

lisadas por las células efectoras , que poseen el receptor de baja afinidad para la fracción Fc de las inmunoglobulinas (CD16) (Eiguchi y Alcocer, 1990; Robertson y Ritz, 1990).

Los resultados obtenidos en el estudio de las subpoblaciones de LGL en muestras de semen humano han detectado un incremento en el número y porcentaje estadísticamente significativo de estas células en los eyaculados de individuos estériles con AAE tipo Ig G, e Ig G e Ig A con respecto al grupo control ($p < 0,001$) y al grupo de individuos estériles sin AAE ($p < 0,01$) (Tabla XXIII), lo que implica que en estos sujetos existe un desequilibrio de la normal inmunorregulación que se lleva a cabo en el eyaculado de individuos fértiles.

Por otra parte, se ha demostrado en semen la presencia de proteínas que son capaces, por una parte, de unirse a las Igs., y por otra, de captar el Ac. Mo. anti-CD16. Algunos autores las identifican con la molécula CD16 (Thaler y cols., 1992; Thaler y cols., 1991; Bukovsky y cols., 1991; Whyard, 1992) y otros las denominan IBF (immunoglobulin binding factor) (Liang y cols., 1992; Kamada y cols.; 1991). En lo referente al antígeno CD16 detectado en semen, Bukovsky y cols. (1991) y Thaler y cols. (1992) lo han involucrado en la protección del espermatozoide, bien mediante su unión a la inmunoglobulina (AAE), evitando la formación de complejos espermatozoide-AAE; o bien inhibiendo la ADCC contra las células espermáticas, al impedir la unión de la fracción Fc de la Ig (AAE), unida a su vez al espermatozoide, al receptor CD16 de las células NK presentes en los eyaculados.

Ante la posibilidad de que complejos espermatozoide-AAE captaran el anticuerpo monoclonal anti-CD16 mediante estas moléculas (CD16 o IBF), o de que un porcentaje de linfocitos seminales sufriera una reacción cruzada con los AAE de los eyaculados, pudiendo fijar

igualmente el Ac. Mo. anti-CD16, nos propusimos llevar a cabo 2 experimentos para esclarecer si nuestro incremento de LGL en estos varones era o no ficticio (Tablas XXIV y XXV), no encontrando diferencias significativas entre el porcentaje de espermatozoides de eyaculados con AAE que reaccionaron con el Ac. Mo. anti-CD16 y el porcentaje de espermatozoides de eyaculados sin AAE que igualmente captaron dicho anticuerpo monoclonal. Del mismo modo, no detectamos significación alguna entre los linfocitos que reaccionaron con anti-Ig G en eyaculados con y sin AAE. De todo ello se desprende que la elevación de LGL, que hemos demostrado en las muestras de semen de individuos con esterilidad de origen inmunológico, es real y, por otra parte, característica de dichos eyaculados.

Como hemos venido exponiendo hasta ahora, la población de LGL es responsable de la ADCC, habiéndose comprobado que la proliferación de estas células refleja un incremento de las células efectoras de la ADCC (Reynolds y Foon, 1984) y que la molécula de membrana CD16 (receptor para la fracción Fc de la Ig G) media esta función (Fanger y cols., 1989). Autores como Perussia y Trinchieri (1984), Perussia y cols. (1984), Gastl y cols. (1984) y Anderson (1989), han sugerido que la inmunorregulacion que lleva consigo la ADCC tiene como fin destruir el antígeno reconocido por el anticuerpo, en nuestro caso los espermatozoides, siendo responsable en parte de las manifestaciones del cuadro clínico y del agravamiento de éste (Anderson, 1989), que conduciría al daño espermático en estos eyaculados con AAE. Esto conectaría con el hallazgo, que ya hemos comentado en la introducción, de que existe un predominio de la Ig G_3 en los eyaculaods con AAE tipo [illegible]. La Ig G_3 es capaz de unirse a los receptores Fc de las células NK, lo que sugiere que esta inmunoglobulina está involucrada en las secuelas patológicas de la esterilidad masculina de origen inmunológico.

Por otra parte, Rees y cols. (1986) han mostrado que el plasma seminal en condiciones normales, posee la capacidad de inhibir la citotoxicidad ejercida por las células NK; y Bukovsky y cols. (1991) al igual que Thaler y cols. (1992) han especulado con la posibilidad de que una disminución en plasma seminal de la concentración de las sustancias responsables de esa inhibición sea la causa que desencadene un incremento en la ADCC, y por consiguiente un mayor daño espermático en los individuos estériles de origen inmunológico. Nuestros resultados sugieren que, junto a la disminución de estas sustancias en dichos eyaculados, podría concurrir el incremento de las células NK, lo que facilitaría la ADCC, y en consecuencia una mayor afectación espermática.

Todo ello aporta coherencia al hecho de que determinados individuos con AAE en sus eyaculados consigan tener descendencia (Critser y cols., 1989; Eggert-Kruse y cols., 1989), frente a otros que resultan estériles (Bronson y cols., 1984); por lo que una cuantificación de células NK en estos eyaculados resultaría imprescindible a la hora de predecir el daño espermático y nos ayudaría en el seguimiento de estos pacientes. De esta forma, y de acuerdo con Whiteside y Herberman (1989), el incremento de células NK en muestras de semen de individuos con esterilidad de origen inmunológico podría desempeñar el papel de marcador pronóstico y de evolución del paciente; así como, nos sería de utilidad en la monitorización de la respuesta a posibles tratamientos inmunosupresores.

Parece, por tanto, claro la función de "vigilancia inmunológica" que desarrollan las células NK, como han demostrado autores como Gryllis y cols. (1992) al detectar un aumento de los LGL en individuos VIH(+), o Kay y Perri (1989) en la leucemia linfoide crónica de células B. Este papel de "inmunovigilancia" es desempeñado por las células NK por medio del receptor de membrana CD16, que induce una elevación

de células NK y linfocitos activados y, en definitiva, un estado de activación; estado que no sólo es importante en la consecución de la ADCC, sino porque facilitaría la producción de citoquinas por las células NK (Reynolds y Foon, 1984), como el γ-IFN, y la interacción con otros leucocitos seminales. Entre estos leucocitos, se encontrarían los macrófagos, que al activarse por el γ-IFN de las células NK (Bancroft y cols., 1991), desencadenarían la respuesta inmune contra el espermatozoide (Johnston, 1988), por un mecanismo distinto al de la ADCC.

Asimismo, y al igual que Robles y Pollack (1986) y Kay y Perri (1989), se podría implicar a las células NK de estos eyaculados en la regulación de los linfocitos B, inhibiendo su producción de anticuerpos. Así, ante un incremento de AAE en el eyaculado podría producirse la activación y proliferación de las células NK, con el fin de suprimir por parte de las células B la síntesis y secreción de Igs.

Como resumen, digamos que el incremento de las células LGL es la única alteración característica de las poblaciones linfocitarias de los eyaculados estériles con AAE, ya que otras alteraciones observadas en estos eyaculados, tales como la elevación de los linfocitos CD4(+)CD45RA(+), CD4(+)HLA-DR(+) y B CD5(+), se detectan también en los eyaculados estériles sin AAE de baja calidad (oligo-, asteno-, teratozoospérmicos). Los mecanismos que provocan esta inmunoactivación en los dos tipos de eyaculados estériles no tienen por qué ser similares, pudiendo en el caso de los sémenes con AAE estar relacionado con el aumento en el número de LGL y en el caso de sémenes de baja calidad seminal con alteraciones en la espermatogénesis, que lleva a las células del sistema inmune a estar en contacto con antígenos considerados como extraños.

Conclusiones

1.- El uso de la citometría de flujo parece ser un método adecuado en el análisis de la expresión de diferentes antígenos por las células inmunes presentes en los eyaculados.

2.- Los macrófagos, granulocitos y linfocitos seminales presentes en los eyaculados con cultivos microbiológicos negativos parecen proceder del epidídimo, conductos deferentes o testículos.

3.- Los leucocitos de eyaculados con cultivos microbiológicos negativos no resultan ser un parámetro indicativo de la capacidad fertilizante de éstos, constituyendo un componente natural de las muestras de semen humano.

4.- Existe una alta variabilidad en la concentración de leucocitos en los eyaculados humanos, predominando un estado de inmunosupresión en las muestras de semen de sujetos fértiles; estado que viene mediado especialmente por los macrófagos y linfocitos de fenotipo CD3(+)CD8(+)CD11b(+)CD56(+) (supresores/citotóxicos antígeno-inespecíficos).

5.- En los eyaculados de individuos estériles se ve perturbado este ambiente de inmunosupresión, ya que existe un descenso en el porcentaje de los linfocitos CD3(+)CD8(+)CD11b(+)CD56(+), induciéndose un estado de inmunoactivación, reflejado por el incremento de las subpoblaciones CD4(+)CD45RA(+), CD4(+)HLA-DR(+) y B CD5(+). Estas alteraciones podrían ser causa o consecuencia de una alteración en la espermatogénesis.

6.- Este estado de inmunoactivación se encuentra tanto en sujetos estériles de causa inmunológica como no inmunológica, no pudiendo precisar si los mecanismos que producen dicha inmunoactivación son los

mismos en los dos tipos de eyaculados.

7.- No existe relación entre la presencia de AAE y un déficit de linfocitos CD8 supresores/citotóxicos, lo que indica que los mecanismos inmunes que previenen la aparición de los AAE son complejos, encontrándose involucrados diferentes componentes del sistema inmune.

8.- La presencia de AAE en el eyaculado parece provocar una alteración inmunológica, caracterizada por un incremento de las células NK en el semen humano. Esta elevación podría constituir un parámetro fundamental en el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de los pacientes con esterilidad de origen inmunológico.

Bibliografía

Abo T, Cooper D, Balch CM. Characterization of HNK-1+ (Leu-7) human lymphocytes. I. Two distinct phenotypes of human NK cells with different cytotoxic capability. J Immunol 1982; 4: 1752-7.

Adeghe AJH, Zhang J, Cuthbert J, Obharai M. Antisperm antibodies and sperm motility: a study using timed exposure photomicrography. Int J Androl 1989; 12: 281-5.

Ahn IS, Harrington WJ, Simon SR, Mylbaganan R, Pall LM, So AG. Danazol for the treatment of idiopathic thrombocytopenic purpura. N Engl J Med 1983; 308: 1396-9.

Alexander NJ, Anderson DJ. Immunology of semen. Fertil Steril 1987; 47: 192-205.

Alexander NJ, Fulgham DL. Antibodies of spermatozoa in male monkeys: mode of action. Fertil Steril 1978; 30: 334-42.

Alexander NJ, Tarter TH, Ducsay CA, Fulgham DL, Huso N. Rectal absortion of semen. J Reprod Immunol 1986; Abstract: 00-82.

Alexander NJ, Tarter TH, Isahakla M. Regulation of immune responsiveness to sperm antigen. In: Pathology of infertility. Clinical correlations in the male and female. Gondos B, Riddick DH, eds. New York: Thieme Medical Publishers, 1987: p 317-34.

Alexander NJ, Tung KSK. Immunological and morphological effects of vasectomy in the rabbit. Anat Rec 1977; 188: 339-50.

Allen RD, Roberts TK. The relationship between the immunosuppressive and cytotoxic effects of human seminal plasma. Am J Reprod Immunol Microbiol 1986; 11: 59-64.

Anderson CL. Human Ig G receptors. Clin Immunol Immunopathol 1989; 53: S63-71.

Anderson DJ. Immunologic cytokines and reproduction. In: Gamete interactions: prospects for immunocontraception. Alexander NJ, Griffin D, Spieler JM, Waites GMH, eds. New York, Wiley-Liss, 1990: p 175-84.

Anderson DJ, Hill JA. CD4 (T4+) lymphocytes in semen of healthy heterosexual men: implications for the transmission of AIDS. Fertil Steril 1987; 48: 703-4.

Anderson DJ, Hill JA. Cell mediated immunity in infertility. Am J Reprod Immunol Microbiol 1988; 17: 22-30.

Anderson DJ, Johnson PM. The monoclonal antibody 316 wich recognizes polymorphicantigens expressed on human trophoblast also reacts with human testicular germ cells and capacitated sperm. Reprod Immunol (Suppl) 1986; 20: 31.

Anderson DJ, Narayan P, Dewolf WC. Major histocompatibility antigens are not detectable on postmeiotic human testicular germ cells. J Immunol 1984; 133: 1962-5.

Anderson DJ, Tarter TH. Immunosuppressive effects of mouse seminal plasma components in vivo and in vitro. J Immunol 1982; 128: 535-9.

Arestey J, Ferrer-Barriendos J, Castells A, Bonilla-Musoles F. Anticuerpos antiesperma circulantes en la esterilidad femenina. Rev Esp Obst Gin 1985; 44: 227-246

Arestey J, Ferrer-Barriendos J, Castells A, Bonilla-Musoles F, Peris J. Factores inmunológicos locales en la esterilidad femenina. Rev Esp Obst Gin 1985; 44: 64-76

Ashida ER, Scofield VL. Lymphocyte major histocompatibility complex-encoded class II structures may act as sperm receptors. Proc Natl Acad Sci USA 1987; 84: 3395-9.

Austin CR. Fate of spermatozoa in the female genital tract. J Reprod Fertil 1960; 1: 151-7.

Avallet O, Vigier M, Perrard-Sapori MH, Saez JM. Transforming Growth factor-inhibits Leydig cell functions. Biochem Biophys Res Commun 1987; 146: 575-81.

Bancroft GJ, Schreiber RD, Unanue ER. Natural immunity: a T-cell-independent pathway of macrophage activation, defined in the scid mouse. Immunol Rev 1991; 124: 5-24.

Bandoh R, Yamano S, Kamada M, Daitoh T, Aono T. Effect of sperm-immobilizing antibodies on the acrosome reaction of human spermatozoa. Fertil Steril 1992; 57: 387-92.

Barker CF, Billingham RE. Immunologically privileged sites. Adv Immunol 1977; 25: 1-54.

Barker CF, Billingham RE. The role of afferent lymphatics in the rejection of skin homografts. J Exp Med 1968; 128: 197-221.

Barratt CLR, Bolton AE, Cooke ID. Functional significance of white blood cells in the male and female reproductive tract. Hum Reprod 1990a; 5: 639-48.

Barratt CLR, Cooke ID. Sperm loos in the urine sexually rested men. Int J Androl 1988; 11: 201-7.

Barratt CLR, Harrison PE, Robinson A, Cooke ID. Antisperm antibodies and lymphocyte subsets in semen - not a simple relationship. Int J Androl 1990b; 13: 50-8.

Barratt CLR, Harrinson PE, Robinson A, Kessopoulou E, Cooke ID. Seminal white blood cells in men with urethral tract infection. A monoclonal antibody study. Br J Urol 1991; 68: 531-6.

Barratt CLR, Havelock LM, Harrison PE, Cooke ID. Antisperm antibodies are more prevalent in men with low sperm motility. Int J Androl 1989; 12. 10-6.

Barratt CLR, Kessopoulou E, Thompson LA, Tomlinson MJ, Cooke ID. The functional significance of leucocytes in human reproduction. Reprod Med Rev 1992; 1: 115-29.

Barratt CLR, Kessopoulou E, Tomlinson MJ, Cooke ID. The functional significance of leucocytes in human reproduction. Reprod Med Rev 1992; 1:115-29.

Baxter JB, Weigent DA, Riley JE, Blalock JE. Lymphocyte production of rat growth hormone. Fed Am Soc Exp Biol J 1988; 2: A1640.

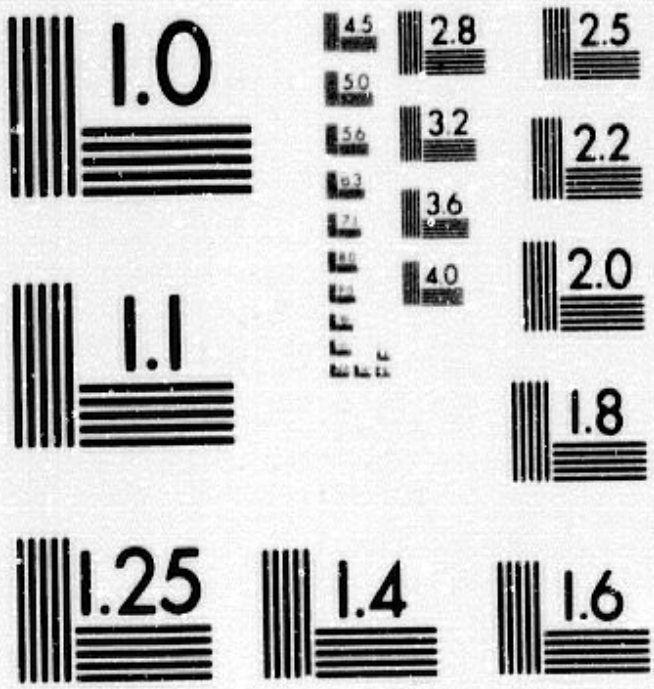
Becker H, Langrock A, Federlin K. Imbalance of CD4+ lymphocyte subsets in patients with mixed connective tissue disease. Clin Exp Immunol 1992; 88: 91-5.

Becker H, Weber C, Storch S, Federlin K. Relationship between CD5+ B lymphocytes and the activity of systemic autoimmunity. Clin Immunol Immunopathol 1990; 56: 219-25.

Beer AE, Billingham RE. Immunoregulatory aspects of pregnancy. Fed Proc 1978; 37: 2374-8.

Beer AE, Neaves WB. Antigenic status of semen from the viewpoints of the female and male. Fertil Steril 1978; 29: 3-22.

Bergh A. Effect of cryptochidism on the morphology of testicular macrophages: evidence for a Leydig cell-macrophage interaction in the rat testis. Int J Androl 1985; 8: 86-96.



MICROCOPY RESOLUTION TEST CHART
NATIONAL BUREAU OF STANDARDS
STANDARD REFERENCE MATERIAL 1010a
(ANSI and ISO TEST CHART No. 2)

Barratt CLR, Bolton AE, Cooke ID. Functional significance of white blood cells in the male and female reproductive tract. Hum Reprod 1990a; 5: 639-48.

Barratt CLR, Cooke ID. Sperm loos in the urine sexually rested men. Int J Androl 1988; 11: 201-7.

Barratt CLR, Harrison PE, Robinson A, Cooke ID. Antisperm antibodies and lymphocyte subsets in semen - not a simple relationship. Int J Androl 1990b; 13: 50-8.

Barratt CLR, Harrinson PE, Robinson A, Kessopoulou E, Cooke ID. Seminal white blood cells in men with urethral tract infection. A monoclonal antibody study. Br J Urol 1991; 68: 531-6.

Barratt CLR, Havelock LM, Harrison PE, Cooke ID. Antisperm antibodies are more prevalent in men with low sperm motility. Int J Androl 1989; 12: 110-6.

Barratt CLR, Kessopoulou E, Thompson LA, Tomlinson MJ, Cooke ID. The functional significance of leucocytes in human reproduction. Reprod Med Rev 1992; 1: 115-29.

Barratt CLR, Kessopoulou E, Tomlinson MJ, Cooke ID. The functional significance of leucocytes in human reproduction. Reprod Med Rev 1992; 1:115-29.

Baxter JB, Weigent DA, Riley JE, Blalock JE. Lymphocyte production of rat growth hormone. Fed Am Soc Exp Biol J 1988; 2: A1640.

Becker H, Langrock A, Federlin K. Imbalance of CD4+ lymphocyte subsets in patients with mixed connective tissue disease. Clin Exp Immunol 1992; 88: 91-5.

Becker H, Weber C, Storch S, Federlin K. Relationship between CD5+ B lymphocytes and the activity of systemic autoimmunity. Clin Immunol Immunopathol 1990; 56: 219-25.

Beer AE, Billingham RE. Immunoregulatory aspects of pregnancy. Fed Proc 1978; 37: 2374-8.

Beer AE, Neaves WB. Antigenic status of semen from the viewpoints of the female and male. Fertil Steril 1978; 29: 3-22.

Bergh A. Effect of cryptochidism on the morphology of testicular macrophages: evidence for a Leydig cell-macrophage interaction in the rat testis. Int J Androl 1985; 8: 86-96.

Bischof P, Martin-Du-Pan R, Lauber K, Girard JP, Herrmann WL, Sizonenko PC. Human seminal plasma contains a protein that shares physicochemical, immunochemical, and immunosuppresive properties with pregnancy-associated plasma protein-A. J Clin Endocrinol 1983; 56: 359-62.

Bohnsack D, Kleinman HK, Takahashi T, O'Shea JJ, Brown EJ. Connective tissue proteins and phagocytic cell function. Lamini enhaces complement and Fc-mediated phagocytosis by cultured human macrophages. J Exp Med 1985; 161: 912-23.

Born W, Wekerle H. Selective, immunologically nonspecific adherence of lymphoid and myeloid cells to Leydig cells. Eur J Cell Biol 1981; 25: 76-81.

Brandtzaeg P, Sollid LM, Thrane PS, Kvale D, Bjerke K, Scott H, et al. Lymphoepitelial interactions in the mucosal immune system. Gut 1988; 29: 1116-30.

Bronson R, Cooper G, Rosenfield D. Sperm antibodies: their role in infertility. Fertil Steril 1984; 42: 171-83.

Brooks GF, Lammel CJ, Petersen BH, Stites DP. Human seminal plasma inhibition of antibody complement-mediated killing and opsonization of Neisseria gonorroeae and other gram-negative organisms. J Clin Invest 1981; 67: 1523-31.

Bukovsky A, Thaler CJ, McIntyre JA. Antigens of immunoglobulin G-Fc receptor III in human male reproductive tract accesory glands. Fertil Steril 1991; 55: 595-602.

Bustos-Obregón E, Courot M, Flechon JE, Hochereau-de-Reviers MT, Holstein AF. Morphologic appraisal of gametogenesis: spermatogenetic processes in mammals with particular reference to man. Andrologia 1975; 7: 141-50.

Byrd WJ, Jacobs DM, Amoss MS. Synthetic polyamines added to cultures containing bovine sera reversibly inhibit in vitro parameters of immunity. Nature 1977; 267; 621-3.

Calder VL, Lightman SL. Experimental autoimmune uveoretinitis (EAU) versus experimental allergic encephalomyelitis (EAE): a comparison of T cell-mediated mechanisms. Clin Exp Immunol 1992; 89: 165-9.

Cannon JG, Tatro JB, Reichlin S, Dinarello CA. -Melanocyte stimulating hormone inhibits immunostimulatory and inflammatory action of interleukin-1. J Immunol 1986; 137: 2232-6.

Cardoso EML, Comini-Andrada E, Arrenger AL, Charovsky MA, von der Walde FE, Andrada JA. Effect of human seminal plasma on in vitro stimulated NK activity. J Immunol and Immunopharmacol 1992; 12: 78.

Casali P, Inghirami G, Nakamura M, Davies TF, Notkins AL. Human monoclonals from antigen-specific selection of B lumphocytes and tranformation by EBV. Science 1986; 234: 476-9.

Casali P, Notkins A. CD5+ B lymphocytes, polyreactive antibodies and the human B-cell repertoire. Immunol Today 1989; 10: 364-8.

Casali P, Prabhakar BS, Notkins AL. Characterization of multireactive autoantibodies and identification of Leu-1+ B lymphocytes as cells making antibodies binding multiple self and exogenous molecules. Int Rev Immunol 1988; 3: 17-45.

Castilla JA, Sampalo A, Molina R, Samaniego F, Mozas J, Vergara F, et al. Mononuclear cell subpopulations in human follicular fluid from stimulated cycles. Am J Reprod Immunol 1990; 22: 127-9.

Cavender D, Haskard DO, Joseph B, Ziff M. Interleukin-1 increases the binding of human B and T lymphocytes to endothelial cell monolayers. J Immunol 1986; 136: 203-7.

Cavender D, Saegusa Y, Ziff M. Stimulation of endothelial cell binding of lymphocytes by tumor necrosis factor. J Immunol 1987; 139: 1855-60.

Cerasaro M, Valenti M, Massacesi A, Lenzi A, Dondero F. Correlation between the direct Ig G Mar test (mixed antiglobulin reaction test) and seminal analysis in men from infertile couples. Fertil Steril 1985; 49: 390-5.

Ceuppens JL, Gualde N, Goodwin JS. Phenotypic heterogeneity of the OKM1-positive lymphocyte population: reactivity of OKM1 monoclonal antibody with a subset of the suppressor/cytotoxic T-cell population. Cell Immunol 1982; 69: 150-65.

Clark EA, Shu G. Activation of human B cell proliferation through surface Bp35 (CD20) polypeptides or immunoglobulin receptors. J Immunol 1987; 138: 720-5.

Clarke GN, Elliot PJ, Smaila C. Detection of sperm antibodies in semen using the immunobead test: a survey of 813 consecutive patients. Am J Reprod Immunol Microbiol 1985; 7: 118-23.

Clarke GN, Hyne RV, du Plussis Y, Johnston WIH. Sperm antibodies and human in-vitro fertilization. Fertil Steril 1988; 49: 1018-25.

Clarke GN, Stojanoff A, Cauchi MN, Johnston WJH. The immunoglobulin class of antispermatozoal antibodies in serum. Am J Reprod Immunol Microbiol 1985; 7: 143-7.

Clement LT, Grossi CE, Gartland GL. Morphologic and phenotypic features of the subpopulation of Leu-2+ cells that suppresses B cell differentiation. J Immunol 1984; 133: 2461-8.

Clermont Y. Cycle de l'epithelium seminal et mode de renouvellement des spermatogonies chez le hamster. Rev Canad Biol 1954; 13: 208-13.

Clermont Y. The cycle of the seminiferous epithelium in man. Am J Anat 1963; 122: 35-40.

Connell CJ, Christensen AK. The ultrastructure of the canine testicular interstitial tissue. Biol Reprod 1975; 12: 368-82.

Coon JS, Landay AL, Weinstein RS. Biology of disease: advances in flow cytometry for diagnostic pathology. Laboratory Invest 1987; 57: 453-79.

Cooper GW, Zhu JZ, Rosenfeld DL. Relationship between antisperm Ig G's in female sera and galactosyl and mannosyl terminated antigens on the human sperm surface. 47th Annual Meeting of the American Fertility Society. October 21-24, 1991; Abstract: O-143.

Critser JK, Villines PM, Coulam CB, Critser ES. Evaluation of circulating antisperm antibodies in fertile and infertile patient populations. Am J Reprod Immunol 1989; 21: 137-42.

Cuadrado E. Antígenos de activación linfocitarios. Inflamación 1991; 2: 427-31.

Chouaib S, Chatenoud L, Klatzmann D, Fradelizi D. The mechanisms of inhibition of human IL-2 production. II. PGE_2 induction of suppressor T lymphocytes. J Immunol 1984; 132: 1851-7.

Chouaib S, Fradelizi D. The mechanism of inhibition of human IL-2 production. J immunol 1982; 129: 2463-8.

Chvapil M, Stankova L, Bernhard DS, Zukoski CF, Drach GW. Effect of prostatic fluid and its fraction on some functions of peritoneal macrophages. Invest Urol 1977; 15: 173-9.

D'Cruz OJ, Haas GG. The expression of the complement regulators CD46, CD55, and CD59 by human sperm does not protects them from antisperm antibody and complement-mediated immune injury. Fertil Steril 1993; 59: 876-84.

Dadoune JP, Demoulin A. Structure et fonctions du testicule. In: La reproduction chez les mammifères et l'homme. Thibault C, Levasseur MC, eds. Paris: INRA ellipses, 1991: p 221-250.

Dauphinee M, Tovar Z, Talal N. B cells expresing CD5 are increased in Sjögren's syndrome. Arthritis Rheum 1988; 31: 642-7.

Davis MM. The cell receptor gene diversity and selection. Annu Rev Biochem 1990; 59: 475-96.

de Cesaris P, Filipini A, Setchell BP, Stefanini, Ziparo E. Immunossuppresive activity in rat testicular fluids. Eur J Cell Biol 1986; 42. Abstract: 1b.

de Simone C, Caretto G, Grassi PP, Covelli V, Lenzi A, Antonaci S, et al. Inhibition of lymphocyte-mediated activity by human seminal plasma. Am J Reprod Immunol Microbiol 1988; 17: 1-4.

Dighiero GP, Guilbert B, Fermand JP, Lymberi P, Danon F, Avrameas S. Thirty six human monoclonal immunoglobulins with antibody activity against cytoskeleton proteins, thyroglobulin, and native DNA: immunologic studies and clinical correlations. Blood 1983; 62: 264-70.

Dighiero GP, Lymberi D, Holmberg I, Lundquist I, Coutinho A, Avrameas S. High frequency of natural autoantibodies in normal newborn mice. J Immunol 1985; 134; 765-71.

Dondero F, Lenzi A, Andrada EC. Patogénesis y clínica de la reacción autoinmune antiespermatozoide en el hombre. In: La infertilidad inmunológica. Dondero F, Lenzi A, Andrada EC, eds. Génova: ATA Azienda Tipografi Associati, 1992: p 12-18.

Dym M, Fawcett DW. The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous ephitelium. Biol Reprod 1970; 3: 308-26.

Ebaugh MJ, Smith EM. Human lymphocyte production of immunoreactive luteinizing hormone. Fed Am Soc Exp Biol J 1988; 2: A1642.

Eggert-Kruse W, Bellman A, Rohr G, Tilgen W, Runnebaum B. Differentiation of round cells in semen by means of monoclonal antibodies and relationship with male fertility. Fertil Steril 1992; 58: 1046-55.

Eggert-Kruse W, Christmann M, Gebhard I, Pohl S, Klinga K, Runnebaum B. Circulating antisperm antibodies and fertility prognosis: a prospective study. Hum Reprod 1989; 4: 513-20.

Eiguchi K, Alcocer J. Citotoxicidad natural y células agresoras naturales (NK). Inmunología 1990; 9: 123-132.

El-Demiry MI, Hargreave TB, Bussutil A, Elton R, James K, Chisholm GD. Immunocompetent cells in human testis in health and disease. Fertil Steril 1987; 48: 470-9.

El-Demiry MI, Hargreave TB, Bussutil A, James K, Chisholm GD. Identifying leucocytes and leucocyte subpopulations in semen using monoclonal antibody probes. Urology 1986b; 28: 492-6.

El-Demiry MI, Migliari R, James K. Lymphocytes subsets and macrophages in the male genital tract in health and disease. Third Annual Meeting of the American Urological Association. Cairo (Egypt), June 3-7, 1988; Abstract: 980. June 3-7, 1988.

El-Demiry MI, Young H, Elton RA, Hargreave TB, James K, Chisholm GD. Leucocytes in the ejaculate from fertile and infertile men. Br J Urol 1986a; 58: 715-20.

Elson DS, Browne CA, Thorburn GD. Identification of epidermal growth factor-like activity in human male reproductive tissues and fluids. J Clin Endocrinol Metab 1984; 58: 589-94.

Emanuele MA, Tnetler J, Kirsteins L, Emanuele NV, Lawrence AM. Rat spleen lymphocytes contain an immunoactive and bioctive luteinizing hormone releasing hormone (LHRH). 71st Annual Meeting of the Endocrine Society. Washington, June 21-24, 1989; Abstract: p 335.

Engh E, Clausen OPF, Scholberg A, Tollefsrud A, Purvis K. Relationship between sperm quality and chromatin condesation measured by sperm DNA fluorescence using flow cytometry. Int J Androl 1992; 15: 407-15.

Eiguchi K, Alcocer J. Citotoxicidad natural y células agresoras naturales (NK). Inmunología 1990; 9: 9-20.

Evans RL, Faldetta TJ, Humphreys RE, Pratt DM, Yunis EJ Schlossman SF. Peripheral human T cells sensitized in mixed leucocyte culture synthesize and express Ia-like antigens. J Exp Med 1978; 148: 1440-5.

Fanger MW, Shen L, Graziano RF, Guyre PM. Cytotoxicity mediated by human Fc receptors for Ig G. Immunol Today 1989; 10: 92-99.

Faulk WP, Galbraith GMP. Trophoblast transferrin and transferrin receptors in the host - parasite relationship of human pregnancy. Proc R Soc Lond (Biol) 1979; 204: 83-97.

Francavilla F, Santucci R, Romano R, Francavilla S, Casasanta L, Properzi G. A direct immunofluorescence test for the detecting of sperm surface bound antibodies. Comparison with sperm agglutination test, indirect IF test and Mar test. Andrologia 1988; 20: 477-83.

Franken DR, Slabber CF. Reproductive immunology: 1. The effect of different protein concentration of seminal plasma on in vitro lymphocyte cultures. Andrologia 1981; 13: 504-7.

Freund J, Lipton MM, Thompson GE. Aspermatogenesis in the guinea-pig induced by testicular tissues and adjuvants. J Exp Med 1953; 97: 711-18.

Friberg J. Sperm agglutinating antibodies and immunoglobulins G and A in stored human seminal fluid. Acta Obstet Gynecol Scand 1974; 36: 21-9.

Friend DS, Gilula NB. Variations in tight and gap junctions in mammalians tissues. Cell Biol 1972; 53: 758-76.

Fritz FJ, Westermann J, Pabst R. The mucosa of the male genital tract; part of the common mucosal secretory immune system?. Eur J Immunol 1989; 19: 475-9.

Gastl G, Niederwieser D, Marth C, Huber H, Egg D, Schuler G, et al. Human large granular lymphocytes and their relationship to natural killer cell activity in various disease states. Blood 1984; 64: 288-95.

Giorgi JV, Cheng HL, Margolick JB, Bauer KD, Ferbas J, Waxdal M, et al. Quality control in the flow cytometry measurement of T-lymphocyte subsets: the Multicenter AIDS Cohort Study Experience. Clin Immunol Immunopathol 1990; 55: 173-86.

Gonzales GF, Kortebani G, Mazzolli AB. Effect of isotypes of antisperm antibodies on semen quality. Int J Androl 1992b; 15: 220-8.

Gonzales GF, Kortebani G, Mazzolli AB. Leukocitospermia and function of the seminal vesicles on seminal quality. Fertil Steril 1992a; 57: 1058-65.

Grossman CJ. Interactions between the gonadal steroids and the immune system. Science 1985; 227: 257-61.

Gryllis C, Wainberg MA, Bentwich Z, Gornitsky M, Brenner BG. Increased LAK activity against HIV-infected cell lines in HIV-1+ individuals. Clin Exp Med 1992; 89: 356-61.

Gustafsson K, Söder O, Pöllämen P, Ritzén EM. Isolation and partial characterization of an interleukin-1-like factor from rat testis intersticial fluid. J Reprod Immunol 1988; 14: 139-50.

Gustafsson R, Tötterman TH, Klareskog L, Hällgren R. Increase in activated T cells and reduction in suppressor inducer T cell in systemic sclerosis. Ann Rheum Dis 1990; 49: 40-5.

Haas GG Jr, D'Cruz OJ, DeBault LE. Assessment by fluorescence-activated cell sorting of whether sperm-associated immunoglobulin (Ig) G and Ig A occur on the same sperm population. Fertil Steril 1990; 54: 127-32.

Haas GG Jr, Schreiber AD, Blasco L. The incidence of sperm- associated immunoglobulins and C3, the third component of complement, in infertile men. Fertil Steril 1983; 39: 542-7.

Haas GG Jr, Sokoloski JE, Wolf DP. The interfering effect of human Ig G antisperm antibodies on human sperm penetration of zona-free hamster eggs. Am J Reprod Immunol 1980; 1: 40-3.

Hall K, Ritzén EM, Johnsonbaugh RE, Parvinen M. Pubertal rise of immunoreactive somatomedin and its eventual source. In: Insulin-like growth factor/somatomedins. Basic biochemistry, biology, clinical importance. Spencer EM, ed. New York, Walter de Gruyter Co., 1983: p 611-4.

Handelsman DJ, Spaliviero JA, Scott CD, Baxter RC. Identification of insulin-like growth factor I and its receptors in the rat testis. Acta Endocrinol 1985; 109: 543-9.

Hara M, Kitani A, Hirose T, et al. Stimulatory effect of CD5 antibody on B cells from patients with rheumatoid arthritis. Clin Immunol Immunolpathol 1988; 49: 223-30.

Harbour DV, Smith EM, Meyer WJ. Molt-4 T lymphocyte production of TSH and expression of TRH receptors. An in vivo neuroendocrine model. Fed Am Soc Exp Biol J 1988; 2: A1642.

Hardy RR, Hayakawa K, Shimizu M, Yamasaki K, Kishimoto T. Rheumatoid factor secretion from human Leu-1+ B cells. Science 1987; 236: 81-3.

Head JR, Billingham R. Immune privilege in the testis. II. Evaluation of potential local factors. Transplation 1985; 40: 269-75.

Head JR, Neaves WB, Billingham RE. Reconsideration of the lymphatic drainage of the rat testis. Transplation 1983; 35: 91-5.

Heberman RB, Ortaldo JR. Natural killer cells: Their role in defenses against disease. Science 1981; 214: 24-30.

Hees EV, Marcus ZH. The inhibitors in seminal plasma. J Lab Clin Med 1980; 96: 577-81.

Heijnen CJ, Criset G, Zijlstra J, Ballieux RE. Modulation of lymphocyte function by endorphins. Ann N Y Acad Sci 1987; 496: 161-5.

Hekman A, Rumke P. The antigens of human seminal plasma. With special reference to lactoferrin as a spermatozoa-coating antigen. Fertil Steril 1969; 20: 312-23.

Heller CG, Clermont Y. Kinetics of the germinal epithelium in man. Recent Prog Horm Res 1964; 20: 545-50.

Hercend T, Ritz J, Schlossman SF, Reinherz EL. Comparative expression of T10, and Ia antigens on activated human T cell subsets. Hum Immunol 1981; 3: 247-59.

Hill JA, Cohen J, Anderson DJ. The effects of lymphokines and monokines on sperm fertilizing ability in the zona-free hamster egg penetration test. Am J Obstet Gynecol 1989; 43: 274-8.

Hill JA, Haimovici F, Anderson DJ. Effects of soluble products of activated lymphocytes and macrophages (lymphokines and monokines) on human sperm motion parameters. Fertil Steril 1987b; 47: 460-5.

Hill JA, Haimovici F, Anderson DJ. Products of activated lymphocytes and macrophages inhibit mouse embryo development in vitro. J Immunol 1987a; 139: 2250-4.

Hinrichsen MJ, Blaquier JA. Evidence supporting the existence of sperm maturation in the human epididymis. J Reprod Fertil 1980; 60: 291-4.

Hoffman RA, Kung PC, Hansen WP, Goldstein G. Simple and rapid measurement of human T lymphocytes and their subclasses in peripheral blood. Proc Natl Acad Sci USA 1980; 77: 4914-7.

Holt WV. Surface-bound sialic acid on ram and bull spermatozoa: deposition during epididymal transit and stability during washing. Biol Reprod 1980; 23: 847-57.

Homyk M, Anderson DJ, Wolff H, Herr JC. Differential diagnosis of immature germ cells in semen utilizing monoclonal antibody MHS-10 to the intra-acrosomal antigen SP-10. Fertil Steril 1990; 53: 323-30.

Huckins C. The morphology of kinetics of spermatogonial degeneration in normal adults rats: an analysis using a simplified classification of the germinal ephitelium. Anat Rec 1978; 190: 905-26.

Huhtaniemi I, Nikula H, Lehtonen E, Hovatta O. Testicular morphology and endocrine function after silica-induced damage of intersticial macrophages. In: Molecular and ceilular Endocrinology of the testis. Stefanini M, Conti M, Geremia R, Ziparo E, eds. Amsterdam: Elsevier Science Publishers BV (Biomedical Division), 1986: p 57-62.

Hurtenbach U, Shearer GM. Germ cells-induced immune suppression in mice. Effect of inoculation of syngeneic spermatozoa on cell-mediated immune responses. J Exp Med 1982; 155: 1719-29.

Iwatani Y, Amino T, Kaneda K, et al. Marked increase of CD5+ B cells in hyperthyroid Graves'disease. Clin Exp Immunol 1989; 78: 196-200.

James K. Alpha-2 macroglobulin and its possible importance in immune systems. Trends Biochem Sci 1980; 5: 43-6.

James K. Seminal lymphocytes, plasma and AIDS. Nature 1984; 309: 117.

James K, Harvey J, Bradbury AW, Hargreave TB, Culen RT, Donaldson K. The effect of seminal plasma on macrophage function - a possible contributory factor in sexually transmitted disease. AIDS Res 1983; 1:45-57.

Jassim A, Festenstein H. Mollecular dissection of human testicular germ cell differentiation with monoclonal antibodies. J Reprod Immunol 1987; 12: 173-89.

Jassim A, Ollier W, Payne A, Biro A, Oliver RT; Festenstein H. Analysis of HLA antigens on germ cells in human semen. Eur J Immunol 1989; 1215-20.

Jochum M, Papst W, Schill WB. Granulocyte elastase as a sensitive diagnostic parameter of silent male genital tract inflammation. Andrologia 1986; 18: 413-9.

Johnson HM, Smith EM, Torres BA, Blalock JE. Regulation of the in vitro antibody response by neuroendocrine hormones. Proc Natl Acad Sci USA 1982; 79: 4171-4.

Johnson MH. The distribution of immnoglobulin and spermatozoal autoantigen in the genital tract of the male guinea pig. Fertil Steril 1972; 23: 383-92.

Johnston RB. Monocytes and macrophages. N Eng J Med 1988; 318: 747-52.

Jones WR. Immunization against spermatozoal antigens. In: Immunological fertility regulation. Oxford Blackwell Scientific Publications 1982: p 121-5.

Jones WR. Immunologic infertility - fact or fiction?. Fertil Steril 1980; 33: 557-60.

Jones WR. Immunological aspects of infertility. In: Immunology of human reproduction. Scott JS, Jones WR, eds. London, Academic Press, 1976: p 375- 80.

Kamada M, Daitoh T, Hasebe H, Irahara M, Yamano S, Mori T. Blocking of human fertilizing in vitro by sera with sperm-immobilizing antibodies. Am J Obst Gynec 1985; 153: 328-31.

Kamada M, Liang ZG, Koide SS. Identification of Ig G and Fc binding proteins in human seminal plasma. Arch Androl 1991; 27: 1-7.

Kaplan P, Naz RK. The fertilization antigen-1 does not have proteolytic/acrosin activity, but its monoclonal antibody inhibits sperm capacitation and acrosome reaction. Fertil Steril 1992; 58: 396-402.

Kay NE, Perri RT. Evidence that large granular lymphocytes from B-CLL patients with hypogammaglobulinemia down-regulate B-cell immunoglobulin synthesis. Blood 1989; 73: 1016-9.

Kehrl JH, Wakefield LH, Roberts AB, Jakowlev S, Alvarez-Mon M, Deryveck R, Sporn MB, Fauci AS. Production of transforming growth factor- by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. J Exp Med 1986; 163: 1037-50.

Khan S, Söder O, Syed V, Gustafsson K, Lindh M, Ritzén EM. The rat testis produces large amounts of an interleukin-1-like factor. Int J Androl 1987; 10: 494-503.

Klausner RD, Samelson LE. T cell antigen receptor activation pathways: the tyrosine kinase connection. Cell 1991; 64: 875-8.

Knapp W, Rieber P, Dörken B, Schmith RE, Stein H, Borne AEG. Towards a better definition of human leucocyte surface molecules. Immunol Today 1989; 10: 253-8.

Kortebani G, Gonzales GF, Barrera C, Mazolli AB. Leucocytes populations in semen and male accesory gland function: relationship with antisperm antibodies and seminal quality. Andrologia 1992; 24: 197-204.

Kovalski NN, de Lamirande E, Gagnon C. Determination of neutrophil concentration in semen by measurement of superoxide radical formation. Fertil Steril 1991; 56: 946-53.

Kovalski NN, de Lamirande E, Gagnon C. Reactive oxygen species generated by human neutrophils inhibit sperm motility: protective effect of seminal plasma and scavengers. Fertil Steril 1992; 58: 809-16.

Kowalik I, Kurspiz M, Jakubowiak A, Janecki A, Lukaszyk A, Szymczynski G. Evaluation of HLA expression on gametogenic cells isolated from human testis. Andrologia 1989; 21: 237-43.

Krausz C, West K, Buckingham D, Aitken RJ. Development of a technique for monitoring the contamination human semen samples with leukocytes. Fertil Steril 1992; 57: 1317-25.

Kremer J, Jager S. Characteristics of anti-spermatozoal antibodies responsible for the shaking phenomenon with special regard to immunoglobulin class antigen-reactive sites. Int J Androl 1980; 3: 143-52.

Kremer J, Jager S. The significance of antisperm antibodies for sperm-cervical mucus interaction. Hum Reprod 1992; 7: 781-4.

Kumar GP, Laloraya M, Agrawal P, Laloraya MM. The involvement of surface sugars of mammalian spermatozoa in epididymal maturation and in vitro sperm-zona recognition. Andrologia 1990; 22: 184-94.

Kung AWC, Ho PC, Wang C. Seminal leucocyte subpopulations and sperm function in fertile and infertile Chinese men. Int J lexayte Androl 1993; 16: 189-194.

Kurspiz M, Fernandez N, Witt M, Kowaliz I, Szymczynski GA, Festenstein H. HLA expression on human germinal cells. J Immunogenetics 1987; 14: 23-32.

Landay A, Clement LT, Grossi CE. Phenotypically and functionally distinct subpopulations of human lymphocytes with T-cell markers also exhibit different cytochemical patterns of staining for lysosomal enzymes. Blood 1984: 63: 1067-71.

Landay L, Gartland L, Clement LT. Characterization of a phenotypically distinct subpopulation of Leu-2+ cells that supresses T cell proliferative responses. J Immunol 1983; 131: 2757-61.

Landay A, Poon MC, Clement LT, Grossi CE. A lymphoproliferative disorder of granular lymphocytes with a novel phenotype and supressor function. J Clin Immunol 1984; 4: 326-34.

Landsteiner K (1899). Citado por Mandelbaum SL, Diamond MP, Decherney AH (1987).

Lanier LL, Le AM, Ding A, Evans E, Krensky AM, Clayberger C, et al. Expression of Leu-19 (NHK-1) antigen on IL-2-dependent cytotoxic and non-cytotoxic T cell lines. J Immunol 1987; 138: 2019-23.

Lanier LL, Phillips JH. Evidence for three types of human cytotoxic lymphocyte. Immunol Today 1986; 7: 132- 134.

Lanier LL, Phillips JH, Hackett J, Tutt M, Kumar V. Natural killer cells: definition of a cell type rather than a function. J Immunol 1986; 137: 2735-9.

Lee W, Schwall R, Mason AJ, Mather JP. Intersticial cell cultures secrete an activity with characteristics of the inhibin - homodimer activin. 5th European Workshop on Molecular and Cellular Endocrinology of the testis. Brighton, April 13-16, 1988; Abstract: A1.

Lewis WR, Whalen JJ, Sherins RJ. Mixed cultures of sperm and leucocytes as a measure of histocompatibility in man. Science 1976; 191: 302-4.

Liang ZG, Kamada M, Mitsudo SM, Koide SS. Immunoglobulin binding factor of seminal plasma: a secretory product of human prostate. Arch Androl 1992; 28: 159-64.

Linnet L. Clinical immunology of vasectomy and vasovasostomy. Urology 1983; 22: 101-14.

Livi C, Coccia E, Versari L, Pratesi S, Buzzoni S. Does intraperitoneal insemination in the absence of prior sensitization carry with it a risk of subsequent immunity to sperm?. Fertil Steril 1990; 53: 137-142.

Loken MR, Brosnan JM, Bach BA, Ault KA. Establishing optimal lymphocyte gates for immunophenotyping by flow cytometry. Cytometry 1990; 11: 453-9.

Lord EM, Sensabaugh GF, Stites DP. Immunosuppresive activity of human seminal plasma.I. Inhibitor of in vitro lymphocyte activation. J Immunol 1977; 118: 1704-11.

Maddocks S. The physiology and immunology of the endocrine testis. Ph D dissertation. University of Adelaide (1987).

Maddocks S, Parvinen M, Söder O, Punnonen J, Pöllämen P. Regulation of the testis. J Reprod Immunol 1990; 18: 33-50.

Mahi-Brown CA, Yule TD, Tung KSK. Evidence for active immunological regulation in prevention of testicular autoimmune disease independent of the blood-testis barrier. Am J Reprod Immunol Microbiol 1988; 16: 165-70.

Mandelbaum SL, Diamond MP, Decherney AH. The impact of antisperm antibodies on human infertility. J Urol 1987; 138: 1-8.

Marcus ZH, Freisheim JH, Houk JL, Herman JH, Hess EV. IN vitro studies in reproductive immunology. 1. Suppression of cell-mediated immune response by human spermatozoa and fractions isolated from human seminal plasma. Clin Immunol Immunopathol 1978; 9: 318-26.

Mathur S, Baker ER, Williamson HO, Derrick FC, Teague KJ, Fudenberg HH. Clinical significance of sperm antibodies in infertility. Fertil Steril 1981a; 36: 486-95.

Mathur S, Barber M, Carlton M, Zeigler J, Williamson HO. Motion characteristics of spermatozoa from men with cytotoxic sperm antibodies. Am J Reprod Immunol Microbiol 1986; 12: 87-90.

Mathur S, Goust JM, Williamson HO, Fundenberg HH. Antigenic cross-reactivity of sperm and T lymphocytes. Fertil Steril 1980; 34: 469-76.

Mathur S, Goust JM, Williamson HO, Fundenberg HH. Cross-reactivity of sperm and T lymphocytes antigen. Am J Reprod Immunol 1981b; 1: 113-8.

Matson PL, Junk SM, Spittle JW, Yovich JL. Effect of antispermatozoal antibodies in seminal plasma upon spermatozoal function. Int J Androl 1988; 11: 101-6.

Mazzolli A, Barrera C, Salama E, Kortebani G. Percoll separation and functional study of semen round cells from asthenozoospermic men with infection history. In: Gamete interaction. Prospects for immunocontraception. Alexander NJ, Griffin D, Spieler JM, Waites GMH, eds. New York, Wiley-Liss, 1990: p 631.

McCain HW, Lamster IB, Bozzone JM, Grbic JT. Endorphin modulates human immune activity via non-opiate receptor mechanisms. Life Sci 1982; 31: 1619-24.

McClean JM, Thomas IK, Leening G. Acquired immunodeficiency syndrome (letter). Br Med J 1983; 286: 1651.

Menge AC, Behrman SJ. Immunologic infertility. Clin Obst Gynec 1979; 22: 231-44.

Menge AC, Beitner O. Interrelationships among semen characteristics, antisperm antibodies, and cervical mucus penetration assays in infertile human couples. Fertil Steril 1989; 51: 486-492.

Menge AC, Black CS. Effects of antisera on human sperm penetration of zona-free hamster ova. Fertil Steril 1979; 32: 214-21.

Menge AC, Medley NE, Mangione CM, Dietrich JW. The incidence and influence of antisperm antibodies in infertile human couples on sperm-cervical mucus interactions and subsequent fertility. Fertil Steril 1982; 38: 439-46.

Menge AC, Rosenberg AC, Burkons DM. Effects of uterine fluids and immunoglobulins from semen-immunized rabbits embryos cultured in vitro. Proc Soc Exp Biol Med 1974; 145: 371-8.

Metalnikoff S (1900). Citado por Dondero F, Lenzi A, Andrada EC (1992).

Metchnikoff E (1899). Citado por Dondero F, Lenzi A, Andrada EC (1992).

Migliari R, Riva A, Lantini MS, Melis M, Usai E. Diffuse lymphoid tissue associated with the human bulbourethral gland. An immunohistologic characterization. J Androl 1992; 13: 337-41.

Miller SC, Bowman BM, Rowland HG. Structure, cytochemistry, endocytic activity and immunoglobulin (Fc) receptors of rat testicular intersticial tissue macrophages. Am J Anat 1983; 168: 1-13.

Mix E, Olsson T, Correale J, et al. B cells expressing CD5 are increased in cerebroespinal fluid of patients with multiple sclerosis. Clin Exp Immunol 1990; 79: 21-7.

Moberg PJ, Eneroth P, Ljung A, Nord C. Bacterial flora in semen before and after doxycycline treatment in infertile couples. Int J Androl 1980; 3: 45-58.

Moghissi KS. Significance and prognostic values of post-coital test. In: The uterine cervix in reproduction. Insler V, Bettendorf G, eds. Stuttgart, 1977: p 237-42.

Moore H, Hartman T, Pryor J. Development of the oocyte penetrating capacity of spermatozoa in the human epididymis. Int J Androl 1983; 6: 310-8.

Morgan OS, Bankay J, Quash GA. The effect of lactoferrin, an iron-binding protein, on complement activity. West Indian Med 1975; 24: 46-54.

Mori K, Daitoh T, Irahara M, Kamada M, Aono T. Significance of D-mannose as a sperm receptor site on the zona pellucida in human fertilization. Am J Obstet Gynecol 1989; 161: 207-11.

Morimoto C, Letvin NL, Distaso JA, Aldrich WR, Schlossman SF. The isolation and characterization of the human suppressor inducer T cell subset. J Immunol 1985; 134: 1508-15.

Morimoto C, Reinherz EL, Borel Y, Schlossman SF. Direct demonstration of the human suppressor inducer subset by anti-T cell antibodies. J Immunol 1983; 130: 157-61.

Morimoto C, Reinherz EL, Distaso JA, Steinberg AD, Schlossman SF. Relationship between systemic lupus erythematosus T cell subsets, anti-T cell antibodies, and T cell functions. J Clin Invest 1984; 73: 689-700.

Morley JE, Meyer N, Pekary AE, Melnud S, Carhon HE, Briggs JE, Hirshman JM. A prolactin inhibitory factor with immunocharacteristics of similar to thyrotropin releasing factor (TRH) is present in rat pituitary tumors (CH3 and W5), testicular tissue, and a plant material alfalfa. Biochem Biophys Res Commun 1980; 96: 47-53.

Morris AG. Interferons. Immunology 1988; 1: 43-5.

Moyer DL, Rimdusit S, Mishell DR. Sperm distribution and degradation in the human female reproductive tract. Obstet Gynecol 1970; 35: 831-40.

Mukherjee DC, Agrawal AK, Manjanath R, Mukherjee AB. Suppression of epididymal sperm antigenicity in the rabbit by uteroglobin and tranglutaminase in vitro. Science 1983; 219: 989-91.

Muñoz T, Gallart T, Viñas O, Gomis R. Increased CD5-positive B lymphocytes in type 1 diabetes. Clin Exp Immunol 1991; 83: 304-8.

Myles DG, Hyatt H, Primakoff P. Binding of both acrosome-intact and acrosome reacted guinea pig sperm to the zona pellucida during in vitro fertiiization. Dev Biol 1987; 121: 559-67.

Nagler A, Lanier LL, Cwirla S, Phillips JH. Comparative studies of human FcRIII-positive and negative natural killer cells. J Immunol 1989; 10: 3183-91.

Nashan D, Cooper TG, Knuth UA, Schubeus P, Sorg C, Nieslag E. Presence and distribution of leucocyte subsets in the murine epididymis after vasectomy. Int J Androl 1990; 13: 39-49.

Nashan D, Malorny U, Sorg C, Cooper TG, Nieschlag E. Immunocompetent cells in the murine epididymis. Int J Androl 1989; 12: 85-94.

Natali PG, Bigotti A, Nicotra MR, Viora M, Manfredi D, Ferrone S. Distribution of human class I (HLA-A, B, C) histocompatibilty antigens in normal and malignant tissues of nonlymphoid origin. Cancer Res 1984; 44: 4679-87.

Nathan CF. Secretory products of macrophages. J Clin Invest 1987; 79: 319-26.

Naz RK. The fertilization antigen (FA-1): applications in immunocontracepcion and infertility in humans. Am J Reprod Immunol Microbiol 1988; 16: 21-7.

Naz RK, Alexander NJ, Isahakia M, Hamilton MS. Monoclonal antibody to a human germ cell membrane glycoprotein that inhibits fertilization. Science 1984; 225: 342-4.

Naz RK, Barad D, Barg P, Ahmad K, Bhargava K. Antigenic differences between human sperm samples having various abnormalities: search for a fertility marker. 47th Meeting of the American Fertility Society. October 21-24, 1991; Abstract: O-087.

Naz RK, Phillips TM, Rosenblum BB. Characterization of fertilization antigen-1 for the development of a contraceptive vaccine. Proc natl Acad Sci USA 1986; 83: 5713-7.

Nicholson HD, Swann RW, Burford GD, Wathes DC, Porte DG, Pickering BT. More steroidogenic tissue containing oxytocin and vasopresin: human testis and fetal adrenal. Regul Pept 1984; 8: 141-6.

Nielsen CT, Skakkebaek NE, Darling JA, Hunter WN, Richardson DW, Jorgensen M, et al. Longitudinal study of testosterone and luteinizing hormone (LH) in relation to spermarche pubic hair, height and sitting height in normal boys. Acta Endocrinol Suppl (Copenh) 1986a; 279: 98-106.

Nielsen CT, Skakkebaek NE, Darling JA, Richardson DW, Hunter WN, Richardson DW, Jorgensen M, et al. Onset of the release of spermatozoa (spermarche) in boys in relation to age, testicular growth, pubic hair, and height. J Clin Endocrinol Metab; 1986b; 62: 532-5.

Niemi M, Sharpe RM, Brown WRA. Macrophages in the interstitial tissue of the rat testis. Cell Tissue Res 1986; 243: 337-44.

O'Rand MG. The presence of sperm-specific surface iso-antigens on the egg following fertilization. J Exp Zool 1977; 202: 267-73.

O'Rand MG, Irons G. Monoclonal antibodies to rabbit sperm autoantigens: II. Inhibition of human sperm penetration of zona-free hamster eggs. Biol Reprod 1984b; 30: 731-6.

O'Rand MG, Irons G, Porter JP. Monoclonal antibodies to rabbit sperm autoantigens: I. Inhibition of human sperm penetration of zona-free hamster eggs. Biol Reprod 1984a; 30: 721-9.

O'Rand MG, Widgren EE, Fisher SJ. Characterization of a rabbit sperm membrane autoantigens, RSA, as a lectin-like zona binding protein. Dev Biol 1988; 129: 231-40.

Ohno S, Nagai Y, Ciccarese S, Iwata H. Testis organizing H-Y antigen and the primary sex determining mechanism of mammals. Rec Progr. Horm Res 1979; 35: 449- 76.

Olsen GP, Shields JW. Seminal lymphocytes, plasma and AIDS. Nature 1984; 309: 116-7.

Olson L, Ayer-LeLievre C, Ebendal T, Sieger A. Nerve growth factor-like immunoreactivities in rodent salivary gland and testis. Cell Tissue Res 1987; 248: 275-86.

Oppenheim JJ, Kovacs EJ, Matsushima K, Durum SK. There is more than one interleukin-1. Immunol Today 1986; 7: 45-56.

Paniagua R, Nistal M. Morphological and histometric study of human spermatogonia from birth to the onset of puberty. J Anat 1984; 139: 535-40.

Parker JW, Adelsberg B, Azen SP, Boone D, Fletcher MA, Gjerset GF, et al. Leukocyte immunophenotyping by flow cytometry in a multisite study: standardization, quality control, and normal values in the Transfusion Safety Study. Clin Immunol Immunopathol 1990; 55: 187-220.

Parnes JR. Molecular biology and function of CD4 and CD8. Adv Immunol 1989; 44: 265-311.

Parslow JM, Poulton TA, Bessar GM, Hendry WF. The clinical relevance of classes of immunoglobulins of spermatozoa from infertile and vasovasostomized males. Fertil Steril 1985; 43: 621-7.

Patrizio P, Moretti-Rojas I, Ord T, Balmaceda J, Silber S, Asch RH. Low incidence of sperm antibodies in men with congenital absence of the vas deferens. Fertil Steril 1989; 52: 1018-21.

Pattinson HA, Mortimer D. Prevalence of sperm surface antibodies in the male parterns of infertile couples as determined by Immnobead screenig. Fertil Steril 1987; 48: 466-9.

Pavia C, Siiteri PK, Perlman JD, Stites DP. Suppression of murine allogeneic cell interactions by sex hormones. J Reprod Immunol 1979; 1: 33-8.

Peck R. Neuropeptides modulating macrophage function. Ann N Y Acad Sci 1987; 496: 264-70.

Pedersen J, Rubenson A, Nilson L. Occurrence of sperm antibodies in adult rats after prefertile traumatic vas lesions. Scand J Urol Nephrol 1987; 21: 1-4.

Perussia B, Trinchieri G. Antibody 3G8, specific for the human neutrophil Fc receptor reacts with natural killer cells. J Immunol 1984; 132: 1410-5.

Perussia B, Trinchieri G, Jackson A, Warner NL, Faust J, Rimpold H, et al. The Fc receptor for Ig G on human natural killer cells: phenotypic, functional, and comparative studies with monoclonal antibodies. J Immunol 1984; 133: 180-9.

Peterson BH, Lammel CJ, Stites DP, Brooks GF. Human seminal plasma inhibition of complement. J Lab Clin Med 1980; 96: 582-91.

Peterson BH, Lammel CJ, Stites DP, Brooks GF. Human seminal plasma inhibition of complement. J Lab Clin Med 1980; 96: 582-91.

Phillips JH, Lanier LL. Lectin-dependent and anti-CD3 induced cytotoxicity are preferentially mediated by peripheral blood cytotoxic T lymphocytes expressing Leu-7 antigen. J Immunol 1986; 136: 1579-85.

Phipps RP, Roper RL, Stein SH. Regulation of B-cell tolerance and triggering by macrophages and lymphoid dendritic cells. Immunol Rev 1990; 117: 135-58.

Politoff L, Birkhauser M, Almendral A, Zorn A. New data confirming a circannual rhythm in spermatogenesis. Fertil Steril 1989; 52: 486-9.

Pöllamen P, Maddocks S. Macrophages, lymphocytes and MHC II antigen in the ram and the rat testis. J Reprod Fertil 1988; 82: 437-45.

Pöllamen P, Niemi M. Immunochistochemical identification of macrophages, lymphoid cells and HLA antigens in the human testis. Int J Androl 1987; 10: 37-42.

Pöllämen P, Söder O, Parvinen M. Interleukin-1 stimulation of spermatogonial proliferation in vivo. Reprod Fertil Dev 1989b; 1: 85-7.

Pöllämen P, Söder O, Sainio-Pöllämen S, Zalewski P, Forbes I, Uksila J, et al. Testicular immunosupressive protein. Proceedings of the IV International Congress of Andrology. Bologna: Monduzzi Editore, 1989a: 177-82.

Pöllämen P, Söder O, Uksila J. The immunosupressive protein. J Reprod Immunol 1988; 14: 125-38.

Prabhakar BS, Saegusa J, Onodera T, Notkins AL. Lymphocytes capable of making monoclonal autoantibodies that react with multiple organs are a common feature of the normal B cell repertoire. J Immunol 1984; 133: 2815-7.

Prakash C, Coutinho A, Möller G. Inhibition of in vitro immune responses by a fraction from seminal plasma. Scand J Immunol 1976; 5: 77-85.

Prakash C, Lang RW. Studies of immune infertility: a hypothesis on the etiology of immune infertility based on the biological role of seminal plasma immune response inhibitor. Mt Sinai J Med 1980; 47: 491-510.

Primakoff P, Hyatt H, Myles DC. A role for the migrating sperm surface antigens PH-20 to guinea pig sperm binding to the egg zona pellucida. J Cell Biol 1985; 101: 2239-44.

Puppo F, Corsini G, Mangini P, Bottaro L, Barroca T. Influence of beta-endorphin on phytohemagglutinin-induced lymphocyte proliferation and on the expression of mononuclear cell surface antigens in vitro. Immunopharmacology 1985; 10: 119-25.

Queseda EM, Dukes GD, Deen GH, Franklin RR. Genital infection and sperm agglutinating antibodies in fertile men. J Urol 1968; 19: 106-8.

Rabin BS, Nankin HR, Troen P. Immunological studies of patients with idiopatic oligospermia. In: The testis in normal and the infertil men. Troen P, Nankin HR, eds. New York: Raven Press, 1977: p 435-41.

Raveche ES. Possible immunorregulatory role for CD5+ cells. Clin Immunol Immunopathol 1990; 56: 135-50.

Ravetch JV, Kinet JP. Fc recpetors. Annu Rev Immunol 1991; 9: 457-92.

Ravid A, Sagiv M, Bartoov B, Eltes F, Novogrodsky A, Allalouf D, et al. Separation of sub-populations of sperm with higher fertility potential from normal and pathological semen by peanut agglutinin. Andrologia 1990; 22: 225-30.

Raziuddim S, Danial HB, Kelley M. OKT4+ T cell abnormality in patients with active systemic lupus erythematosus: HLA-DR antigens expressions. Clin Immunol Immunopathol 1988; 48: 42-9.

Rees RC, Vallely P, Clegg A, Potter CW. Suppression of natural and activated human antitumour cytotoxicity by human seminal plasma. Clin Exp Immunol 1986; 63: 687-95.

Reinherz EL, Kung PC, Pesando JM, Ritz J, Goldstein G, Schlossman SF. Ia determinants on human T-cell subsets defined by monoclonal antibody: activation stimuli required for expression. J Exp Med 1979; 150: 1472-82.

Reynolds CW, Foon KA. T-lymphoproliferative disease and related disorders in humans and experimental animals: a review of the clinical, cellular, and functional characteristics. Blood 1984; 64: 1146-58.

Ricker DD, Minhas BS, Kumar R, Robertson JL, Dodson MG. The effects of platelet-activating factor on the motility of human spermatozoa. Fertil Steril 1989; 52: 655-8.

Ritchie AWS, Hargreave TB, James K, Chisholm GD. Intra-epithelial lymphocytes in the normal epididymis. A mechanism for tolerance to sperm auto-antigens?. Br J Urol 1984; 56,79-83.

Rivenzon A, Rivenzon M, Madden RE. Spontaneous adherence and rosette formation of lymphocytes to Leydig cells: an in vitro technique. Cell Immunol 1974; 14: 411-6.

Robertson MJ, Ritz J. Biology and clinical relevance of human natural killer cells. Blood 1990; 76: 2421-38.

Robles CP, Poliack JB. Antibody responders and regulation: a role for natural killer cells. Natl Immun Cell Growth Regul 1986; 5: 64-74.

Roeser J, Reber TH, Goos M. Demonstration of lectin-receptors on the surface of human spermatozoa by light microscopy. Andrologia 1988; 20: 338-343.

Romrell LJ, O´Rand MG, Capping and ultrastuctural localization of sperm surface isoantingens during spermatogenesis. Dev Biol 1978; 63: 76-93.

Roubinian JR, Talal N, Greenspan JS, Goodman JR, Siiteri PK. Delayed androgen treatment prolonges survival in murine lupus. J Clin Invest 1979; 63: 902-11.

Roza DM, Kelley KW. Con-A activated rat splenocytes and human peripheral blood mononuclear cells secrete bioactive prolactin and somatotropin-like molecules. Fed Am Soc Exp Biol J 1988; 2: A1640.

Rudd CE, Morimoto C, Wong LL, Schlossman SF. The subdivision of the T4 (CD4) subset on the basis of the differential expression of L-C/200 antigens. J Exp Med 1987; 166: 1758-73.

Rümke P. The origin of immunoglobulins in semen. Clin Exp Immunol 1974; 17: 287-97.

Rümke P. The presence of sperm antibodies in the serum of two patients with oligozoospermia. Vox Sang 1954; 4: 135-40.

Rümke P, Hellinga G. Autoantibodies against spermatozoa in sterile men. Am J Clin Pathol 1959; 32: 357-63.

Ryan DH, Fallon HA, Horan PK. Flow cytometry in the clinical laboratory. Clin Chim Acta 1988; 171: 125-75.

Sakaguchi S, Fukuma K, Kuribayashi K, Masuda T. Organ-specific autoimmune disease induced in mice by elimination of T cell subset. I. Evidence for the active participation of T cells in natural self-tolerance; deficit of T cell subset as a possible cause of autoimmune disease. J Exp Med 1985; 161: 72-87.

Sakans T, Steinberg AD, Green I. Studies of immune functions of patients with systemic lupus erythematosus. I. Dysfunction of suppressor T-cell activity related to impaired generation of, rather than response to, suppressor cells. Arthritis Rheum 1978; 21: 657-64.

Salter RD, Benjamin RJ, Wesley PK, Buxton SE, Garrett TP, Clayberger C, et al. A binding site for the T-cell co-receptor CD8 on the alpha 3 domain of HLA-A2. Nature 1990; 345: 41-6.

Sampalo A, López-Gómez M, Jiménez-Alonso J, Ortiz F, Samaniego F, Garrido F. CD5+B lymphocytes in HIV infection: relationship to immunological progression of disease. Clin Immunol Immunopathol 1993; 66: 260-8.

Sánchez-Madrid F, Cebrián M, Landázuri MO, Serra C, Engel P, Vives J et al. Report of the IV International Workshop on leucocyte differentiation antigens. Inmunología 1989; 8: 35-46.

Sánchez-Madrid F, Vives J, Garrido F. Informe sobre el III Taller Internacional de antígenos de diferenciación de leucocitos humanos. Inmunología 1987; 6: 22-9.

Scofield VL, Clisham R, Bandyopadhyay L, Gladstone P, Zamboni L, Raghupathy R. Binding of sperm to somatic cells via HLA-DR. Modulation by sulfated carbohydrates. J Immunol 1992; 148: 1718-24.

Schaller J, Glander HJ, Ladush U, Westholff U, Grosse-Wilde H. Lack of HLA-molecules on human spermatozoa and in seminal plasma. Andrologia 1993; 25: 77-81.

Schoysman R, Vanderzwalmen P, Nijs M, Segal-Bertin G, van de Casseye M. Successful fertilization by testicular spermatozoa in a in vitro fertilization programme. Hum Reprod 1993; 8: 1339.

Schreiber AB, Schlessinger J, Edidin M. Interaction between major histocompatibility complex antigens and epidermal growth factor receptor on human cells. J Cell Biol 1984; 98: 725-31.

Schultze W, Davidoff MS, Holstein AF. Are Leydig cells of neural origin?. Substance P-like immunoreactivity in human testicular tissue. Acta Endocrinol 1987; 115: 373-7.

Schulze C. Morphological characteristics of the spermatogonial stem cell in man. Cell Tissue Res 1981; 198: 191-200.

Schumacher GFB. Humoral immune factors in the female reproductive tract and their changes during the cycle. In: Immunological aspects of infertility and fertility regulation. Dhindsa DS, Schumacher GFB, eds. New York, Elsevier/North Holland, 1980: p 93-142.

Selawry HR, Whittington K. Extended allograft survival of islets grafted into intra-abdominally placed testis. Diabetes 1984; 33: 405-6.

Shai S, Naot Y. Identification of human sperm antigens reacting with antisperm antibodies from sera and genital tract secretions. Fertil Steril 1992; 58: 593-98.

Sharpe KM, Fraser HM. HCG stimulation of testicular GnRH-like activity. Nature 1980; 287: 642-3.

Shaw S. Characterization of human leucocyte differentiation antigens. Immunol Today 1987; 8: 1-3.

Shulman S. Sperm antigens and autoantibodies: effects on fertility. Am J Reprod Immunol Microbiol 1986; 10: 82-9.

Silber S. Pregnancy caused by sperm from vasa efferentia. Fertil Steril 1988; 49: 373-375.

Silber S, Balmaceda J, Ord T, Zuluago C, du Plessis Y, Borrero C, Asch R. Fertilizing capacity of epididymal sperm in the human. Proceedings of the 44th Annual Meeting of the American Fertility Society, 1988; Abstract: 017.

Smith DC, Barratt CLR, Williams MA. The characterization of non-sperm cells in the ejaculates of fertile men using transmission electron microscopy. Andrologia 1989; 21: 319-33.

Smith EP, Svoboda ME, van Wyk JJ, Kierszenbaum AL, Tres LL. Partial characterization of a somatomedin-like peptide from the medium of cultured rat Sertoli cells. Endocrinology 1987; 120: 186-93.

Smith KA, Kishimoto T, Klinman N, Oppenheim J, Schrader J. Draft proposal for interleukin nomenclature. Immunol Today 1986; 7; 321-2.

Snow K, Ball GD. Characterization of sperm antigens and antisperm antibodies in infertile patients. Fertil Steril 1992; 58: 1011-19.

Söder A, Syed V, Pöllämen P, Gustafsson K, Granholm K, Khan S, et al. Testicular interleukin factor-1-like-factor. In: The molecular and cellular endocrinology of the testis. Cooke BA, Sharpe RM, eds. New York: Raven Press, 1988: p 325-32.

Spano M, Calugi A, Capuano V, de Vita R, Göhde W, Hacker-Klom U, et al. Flow cytometry and sizing for routine andrological analysis. Andrologia 1984; 16: 367-75.

Stankova L, Drach GW, Hicks CF, Zukoski CF, Chvpail M. Regulation of some functions of granulocytes by zinc of the prostatic fluid and prostate tissue. J Lab Clin Med 1976; 88: 640-8.

Steinberger A, Steinberger E. Secretion of an FSH-inhibiting facto by cultured Sertoli cells. Endocrinology 1976; 99: 918-21.

Sthoeger ZM, Chiorazzi N, Lahita RG. Regulation of the immune response by sex hormones. I. In vitro effects of estradiol and testosterone on pokeweed mitogen-induced human B cell differentation. J Immunol 1988; 141: 91-8.

Stites DP, Erickson RP. Suppresive effect of seminal plasma on lymphocyte activation. Nature 1975; 253: 727-9.

Sullivan DA, Wira CR. Hormonal regulation of immunoglobulins in the rats uterus: uterine response to multiple estradiol treatments. Endocrinol 1984; 114: 650-658.

Swenson CE, Toth C, Wolgruber L, O'Leary WM. Asymptomatic bacteriospermia in infertile men. Andrologia 1980; 12: 7-11.

Syed V, Söder O, Arver S, Lindh M, Khan S, Ritzén EM. Ontogeny and cellular origin of a testicular interleukin-1-like factor in the reproductive tract of the male rat. Int J Androl 1988; 11: 437-47.

Taguchi O, Nishizuka Y. Experimental autoimmune orchitis after neonatal thymectomy in the mouse. Clin Exp Immunol 1981; 46: 425-34.

Taguchi O, Nishizuka Y. Self tolerance and localized autoimmunity. Mouse models of autoimmune disease that suggest tissue-specific suppressor T cells are involved in self tolerance. J Exp Med 1987; 165: 146-56.

Taguchi O, Kojima A, Nishizuka Y. Experimental autoimmune prostatitis after neonatal thymectomy in the mouse. Clin Exp Immunol 1985; 60: 123-9.

Takeuchi T, DiMaggio M, Levine H, Sclossman S, Morimoto C. CD11 molecule defines two types of suppressor cells within the T8+ population. Cell Immunol 1988; 111: 398-409.

Tarter TH, Alexander NJ. Complement-inhibiting activity of seminal plasma. Am J Reprod Immunol 1984; 6: 28-32.

Tarter TH, Cunningham-Rundles S, Koide SS. Suppression of natural killer cell activity by human seminal plasma in vitro: identification of 19-OH-PGE as the suppressor factor. J Immunol 1986; 136: 2862-7.

Ternynck T, Avrameas S. Murine natural monoclonal autoantibodies: a study of their polyspecificities and their affinities. Immunol Rev 1986; 94: 99-112.

Tesarik J, Mendoza C, Carreras A. Expression of D-mannose binding sites on human spermatozoa: comparison of fertile donors and infertile patients. Fertil Steril 1991; 56:113-8.

Thaler CJ, Critser JK, McIntyre JA, Faulk WP. Seminal vesicles: a source of trophoblast lymphocyte cross-reactive antigen. Fertil Steril 1989; 52: 463-8.

Thaler CJ, Faulk WP, McIntyre JA. Soluble antigens of Ig G receptor FcRIII in human seminal plasma. J Immunol 1989; 143: 1937-42.

Thaler CJ, McConnachie PR, McIntyre JA. Inhibition of immunoglobulin (Ig) G-Fc-mediated cytotoxicity by seminal plasma Ig G-Fc receptor III antigens. Fertil Steril 1992; 57: 187-192.

Thaler CJ, McIntyre WP, Faulk WP. Immunogenetic studies of soluble Fc receptor (CD16) antigens in human seminal plasma. Tissue Antigens 1991; 37: 121-6.

Thomas ML. The leucocyte common antigen family. Annu Rev Immunol 1989; 7: 339-69.

Thompson LA, Tomlinson MJ, Barratt CLR, Bolton AE, Cooke ID. Positive immunoselection - a method of isolating leukocytes from leukocytic reacted human cervical mucus samples. Am J Reprod Immnunol 1991; 26: 58-61.

Tilden A, Balch CM. A comparison of PGE2 effects on human suppressor cell function and on interleukin 2 function. J Immunol 1982; 129: 2469-73.

Timonen T, Ortaldo JR, Heberman RB. Characteristics of human large granular lymphocytes and relationship to natural killer and K cells. J Exp Med 1981; 153: 569-82.

Timonen T, Saksela E. Isolation of human NK cells by density gradient centrifugation. J Immunol Methods 1980; 36: 285-91.

Tomlinson MJ, White A, Barratt CLR, Bolton AE, Cooke ID. The removal of morphologically abnormal sperm forms by phagocytes: a positive role for seminal leucocytes?. Hum Reprod 1992; 7: 517-22.

Tourville DR, Ogra SS, Lippes J, Tomas TB Jr. The human female reproductive tract: immunohistological localization of Ig A, Ig G, Ig M, secretory "piece", and lactoferrin. Am J Obstet Gynecol 1970; 108: 1102-8.

Trinchieri G. Biology of natural killer cells. Adv Immunol 1989; 47: 187-95.

Tsuji Y, Clausen H, Nudelman E, Kaizu T, Hakomori S, Isojima S. Human sperm carbohydrate antigens defined by an antisperm human monoclonal antibody derived from an infertile woman bearing antisperm antibodies in her serum. J Exp Med 1988; 168: 343-56.

Tsutsumi O, Kurachi H, Oka T. A physiological role of epidermal growth factor in male reproductive function. Science 1986; 233: 975-7.

Tung KSK. Autoimmunity of the testis. In: Immunological aspects of infertility and fertility regulation. Dhindsa DS, Schumacher GFB, eds. New York, Elsevier/North Holland, 1980: p 33-40.

Tung KSK, Yule TD, Mahi-Brown CA, Listrom MB. Distribution of histopathology and Ia positive cells in actively induced and passively transferred experimental autoimmune orchitis. J Immunol 1987; 183: 752-9.

Turner MJ, White JO, Soutter P. Human seminal plasma inhibits the lymphocyte response to infection with Epstein-Barr virus. Gynecol Oncol 1990; 37: 60-5.

Uehling DT. Secretory Ig A in seminal fluid. Clin Exp Med 1971; 17: 287-97.

Vallely PJ, Sharrard RM, Rees EC. The identification of factors in seminal plasma responsible for suppression of natural killer cell activity. Immunology 1988; 63: 451-456.

van Dam PA, Lowe DC. Flow cytometry. Br J Obstet Gynecol 1992; 99: 545-6.

Vandenbroucke JP, Valkenburg HA, Boersma JW, Cats A, Festen JJ. Oral contraceptives and rheumatoid arthritis: further evidence for preventive effect. Lancet 1982; 1982: 2: 839-42.

Vernino LA, Pisetsky DS, Lipsky PE. Analysis of the expression of CD5 by human B cells and correlation with functional activity. Cell Immunol 1992; 139: 185-97.

Wakasugi H, Rimsky L, Mahe Y, Kamel AM, Fradelizi D, Tursz T, et al. Epstein-Barr virus containing B-cell produces an interleukin-1 that it uses as a growth factor. Proc Natl Acad Sci USA 1987; 84: 804-8.

Walker C, Kristensen F, Bettens F, deWeck AL. Lymphokine regulation of activated (G1) lymphocytes. Prostaglandin E_2-induced inhibition of IL-2 production. J Immunol 1983; 130: 1770-3.

Wang C, Baker HWG, Jennings MG, Burger HG, Lutjen P. Interaction between human cervical mucus and sperm surface antibodies. Fertil Steril 1985; 44: 484-8.

Weil AJ, Rodenburg JM. The seminal vesicle as the source of the spermatozoa-coating antigen of seminal plasma. Proc Soc Exp Biol Med 1962; 109: 567- 573.

Westly HJ, Goldstein D, Borden EC. β-Interferon augments proopimelanocortin gene expression in human peripheral blood mononuclear cells. Fed Am Soc Exp Biol J 1988; 2: A1640.

Witheside TL, Heberman RB. The role of natural killer cells in human disease. Clin Immunol Immnopathol 1989; 53: 1-23.

Whitmore WF, Karsh L, Gittes RF. The role of germinal epithelium and spermatogenesis in the privileged survival of intratesticular grafts. J Urol 1985; 134: 782-6.

Whyard TC. Protection against antisperm antibodies?. Fertil Steril 1992; 58: 865-6.

Wing YT, Ling HS. The fine structure of testicular interstitial cell in the adult golden hamster with special reference to seasonal changes. Cell Tissue Res 1977; 183: 385-93.

Wira CR, Sullivan DA. Estradiol and progesterone regulation of immunoglobulin A and G and secretory component in cervico-vaginal secretions of the rat. Biol Reprod 1985; 32: 90-5.

Wira CR, Sullivan DA. Hormonal regulation of immunoglobulins in rat uterus: uterine response to multiple estradiol treatments. Endocrinol 1984; 114: 650-8.

Witkin SS. Mechanisms of active supression of the immune response to spermatozoa. Am J Reprod Immunol Microbiol 1988; 17: 61-4.

Witkin SS, Bongiovanni AM, Berkeley A, Ledger WJ, Toth A. Detection and characterization of immune complexes in the circulation of infertile women. Fertil Steril 1984; 42: 384-8.

Witkin SS, Chaudhry A. Circulating interferon-γ in women sensitized to sperm: new mechanisms of infertility. Fertil Steril 1989; 52: 867-869.

Witkin SS, Goldstein M. Reduced levels of T suppressor/cytotoxic lymphocytes in semen from vasovasostomized men: relationship to sperm autoantibodies. J Reprod Immunol 1988; 14: 283-90.

Wolff H, Anderson DJ. Immunohistologic characterization and quantitation of leukocyte subpopulations in human semen. Fertil Steril 1988; 49: 497-504.

Wolff H, Anderson DJ. Male genital tract inflammation associated with increased numbers of potential human immunodeficiency virus host cells in semen. Andrologia 1988; 20: 404-10.

Wolff H, Politch JA, Martínez A, Haimovici F, Hill JA, Anderson DJ. Leucocitospermia is associated with poor semen quality. Fertil Steril 1990; 53: 528-36.

Wollina U, Schreiber G, Hipler C. Lectin-binding sites in testis of men with acrosomeless round-headed spermatozoa. Andrologia 1989b; 21: 271-4.

Wollina U, Schreiber G, Zollmann C, Hipler C. Testicular lectinhistochemistry in the sertoli-cell-only-syndrome. Andrologia 1989c; 21: 555-8.

Wollina U, Schreiber G, Zollman C, Hipler C, Günther E. Lectin-binding sites in normal human testis. Andrologia 1989a; 21: 127-30.

World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. 3rd ed. Cambridge: The Press Syndicate of the University of Cambridge, 1992: p 3-27.

Wyatt CR, Law L, Magnuson JA, Griswold MD, Magnuson NS. Suppression of lymphocyte proliferation by protein secreted by cultured Sertoli cells. J Reprod Immunol 1988; 14: 27-40.

Yanagimachi R, Yanagimachi H, Rogers BJ. The use of zona-free animal ova as a test-system for the assessment of the fertilizing capacity of the human spermatozoa. Biol Reprod 1976; 15: 471-6.

Yee JB, Hutson JC. Effects of testicular macrophage-conditioned medium on Leydig cells in culture. Endocrinology 1985; 116: 2682-4.

Yee JB, Hutson JC. Testicular macrophages: isolation, characterization and hormonal responsiveness. Biol Reprod 1983; 29: 1319-26.

Yule TD, Montoya GD, Russell LD, Williams TM, Tung KSK. Autoantigenic germ cells exist outside the blood testis barrier. J Immunol 1988; 141: 1161-7.

Zagury D, Bernard J, Leibowitch J, Groopman JE, Feldman M, Gallo RC. HTLV-III in the semen and blood of a healthy homosexual man. Science 1984; 226: 449-51.