

75
23

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



Determinación de anticuerpos anti-esperma (IgAs)
en moco cervical y en la saliva de mujeres con
infertilidad de tipo inmunológica

TESIS

Que para obtener el Título de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

Presenta

LAURA MARTINEZ SANCHEZ

MEXICO, D. F.

1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

Del Departamento de Fisiología de la Nutrición del Instituto Nacional de Nutrición Salvador Zubirán:

Al M en C Enrique Gómez Rodríguez, asesor de este trabajo, por ser parte fundamental en mi formación profesional y por compartir conmigo sus conocimientos y sobre todo su amistad.

Al Dr. Héctor Bourges Rodríguez, Jefe del Departamento de Fisiología de la Nutrición, por su imprescindible ayuda para la realización de este trabajo.

Del Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán:

Al Dr. Vicente Díaz Sánchez, Jefe del laboratorio de Hormonas Esteroides y co-asesor de este trabajo, por su apoyo incondicional para la realización del mismo.

Al Dr. Víctor Hugo Pérez Osorio de la Clínica de Infertilidad, por su colaboración y disponibilidad.

Al Dr. Marco Cerbón y a todo el personal del laboratorio de Endocrinología Molecular, por brindarme su espacio, tiempo y valiosos conocimientos.

A los Drs. Nancy Alexander, Lorenzo Zaneveld, John Herr y James Castillo, por sus importantes comentarios a lo largo del desarrollo experimental de este trabajo.

A 6 CIB diseño, por su participación en la elaboración del presente escrito.

DEDICATORIAS

A mis padres: Brígida y Eloy, por enseñarme a valorar y conservar todo lo buena que me pueda dar la vida.

A mis hermanos: León, Rosa, Esperanza, Guadalupe, Eloy y Mario, por estar presentes en todo momento.

A mi hermana Leticia por su ayuda incondicional durante mi formación académica.

A la familia Martínez Vara, por también ser parte importante de mi vida.

A mis mejores amigos de la Facultad de Química: Alejandro Segura, Lucía Pérez, Sylvia Flores y Sylvia Gutiérrez, por todo lo compartido.

A mis amigos donadores de muestras, por su constante apoyo, siempre que los necesité.

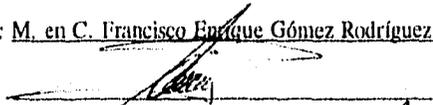
A mis amigos y compañeros del Departamento de Fisiología de la Nutrición.

JURADO ASIGNADO SEGUN EL TEMA

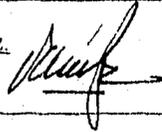
Presidente: Prof.: Saturnino de León Chapa
Vocal: Prof.: Fernando García Tamayo
Secretario: Prof.: Francisco Enrique Gómez Rodríguez
1er. Suplente Prof.: Roxana Pelayo Camacho
2do. Suplente: Prof.: Patricia Morán White

Sitio donde se desarrolló el tema: Depto. de Fisiología de la Nutrición, Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán".

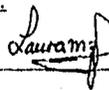
Nombre completo y firma del asesor del tema: M. en C. Francisco Enrique Gómez Rodríguez.



Nombre completo y firma del supervisor técnico: Dr. Vicente Díaz-Sánchez.



Nombre completo y firma del sustentante: Laura Martínez Sánchez.



INDICE GENERAL.

	Página
I. JUSTIFICACION	1
II. OBJETIVOS	2
III. GENERALIDADES	3
1. Aparato reproductor masculino.	3
1.1. Estructura del aparato reproductor masculino.	3
1.2. Composición del semen.	4
1.3. Principales antígenos espermáticos.	5
2. Aparato reproductor femenino.	7
2.1. Ciclo menstrual y ovulación.	7
2.2. Cambios hormonales en el ciclo menstrual.	7
2.3. Moco cervical.	9
3. Proceso de fertilización.	11
4. Infertilidad.	12
4.1. Etiología y epidemiología.	12
4.2. Historia clínica y examen médico.	13
5. Infertilidad inmunológica.	13
5.1. Interferencia de los AAEsp con el proceso de fertilización.	15
5.1.1. En el transporte del espermatozoide.	15
5.1.2. Por interacción con el óvulo.	15
6. Inmunología de las mucosas.	15
6.1. IgA secretoria (IgAs).	16
6.2. Tejido linfoide asociado al intestino.	18
6.3. Sistema inmune común de las mucosas.	20
6.4. Respuesta inmune en el aparato reproductor femenino.	22
7. Efecto de la presencia de AAEsp en la fertilidad.	24

7.1. Autoinmunidad.	24
7.2. Isoinmunidad.	25
7.3. Métodos para la detección de AAEsp.	27
7.3.1 Aglutinación espermática.	27
7.3.2 Reacción de aglutinación mixta (Test IgG MAR).	27
7.3.3 Inmunoesferas (Immunobead).	28
7.3.4 Citotoxicidad dependiente de complemento.	28
7.3.5 Inmunofluorescencia.	28
7.3.6 Radioinmunoanálisis (RIA).	29
7.3.7 Ensayo inmunoenzimático (ELISA) indirecto.	29
IV. MATERIALES Y METODOS.	30
1. Selección de los pacientes.	30
1.1 Criterios de inclusión	30
1.2 Criterios de exclusión	30
2. Número de pacientes.	32
3. Grupo testigo.	32
4. Obtención y procesamiento de las muestras.	32
4.1. Obtención de suero sanguíneo.	32
4.2. Obtención de saliva de la glándula parótida.	33
4.3. Obtención del moco cervical.	33
4.4. Obtención de muestras de semen.	33
5. ELISA indirecto para la detección de AAEsp en las muestras de suero, saliva y moco cervical.	34
5.1. Sensibilización de las placas de ELISA.	34
5.2. Detección de AAEsp de clase IgG e IgA en las muestras de suero, de saliva y de moco cervical.	35
6. Detección de AAEsp dirigidos contra el extracto de proteínas de membrana de espermatozoide (EPME) por la técnica de "Western Blot" en las muestras de suero, de saliva y de moco cervical.	36

6.1 Obtención del extracto de proteínas de membrana de espermatozoide (EPME), mediante solubilización con detergentes.	37
6.2. Electroforesis del EPME en geles de poliacrilamida (PAGE).	37
6.3. Western Blot del EPME con las muestras de suero, de saliva y de moco cervical.	38
7. Análisis estadístico	40
V. RESULTADOS Y DISCUSION	42
1. Especificidad del ELISA indirecto para la detección de AAEsp.	42
2. Valores del grupo testigo en el ELISA indirecto para la detección de AAEsp.	45
3. Detección de AAEsp en las muestras de suero, de saliva y de moco cervical de las pacientes.	48
4. Asociación entre la presencia simultánea de AAEsp en las muestras de suero, de saliva y de moco cervical.	51
5. Proporción de las pacientes que presentaron AAEsp.	56
6. Validez de la detección de los isotipos de AAEsp para el diagnóstico de infertilidad femenina de origen isoimmune.	57
8. Análisis electroforético del EPME.	61
9. Western Blot del EPME.	62
VI. CONCLUSIONES.	64
VII. BIBLIOGRAFIA.	67
VIII. ANEXOS.	76

INDICE DE FIGURAS.

Número	Página
1. Estructura de la membrana espermática.	5
2. Cambios hormonales durante el ciclo menstrual.	8
3. Interferencia de los AAEsp con el espermatozoide.	14
4. Modelo para el transporte epitelial de la IgA dimerica mediada por CS.	17
5. Mecanismos para la inducción de la respuesta inmune en el tejido linfoide asociado al intestino (GALT).	20
6. Sistema inmune común de las mucosas en humanos.	21
7. Mecanismos inmunológicos que afectan la fertilidad en el aparato reproductor masculino y femenino.	26
8. Selección de las pacientes.	31
9. Titulación de AAEsp de clase IgG en el suero control positivo.	43
10. AAEsp de clase IgG en suero.	48
11. AAEsp de clase IgA en suero.	50
12. AAEsp de clase IgA en saliva.	50
13. AAEsp de clase IgA en moco cervical.	51
14. Patrón electroforético del EPME.	61
15. Western Blot del EPME.	63

INDICE DE CUADROS.

Número	Página
1. Valores de absorbancia ($\lambda=490$ nm) del ELISA indirecto para la detección de AAEsp, con el suero control positivo humano.	42
2. Efecto de las proteínas usadas en el sistema de detección en la especificidad del ELISA para AAEsp de clase IgG.	44
3. Valores de absorbancia del suero, la saliva y el moco cervical del grupo testigo.	45
4. Intervalos de confianza al 95% y al 99% de la media de las absorbancias ($\lambda=490$ nm) del grupo testigo.	46
5. Puntos de corte establecidos a partir de la absorbancia ($\lambda=490$ nm) del grupo testigo	47
6. Detección de AAEsp en las muestras de las pacientes estudiadas.	49
7. Asociación de AAEsp de clase IgG en suero con IgA en suero.	52
8. Asociación de AAEsp de clase IgA en saliva con IgA en suero.	52
9. Asociación de AAEsp de clase IgG en suero con IgA en saliva.	53
10. Asociación de AAEsp de clase IgG en suero con IgA en moco cervical.	53
11. Asociación de AAEsp de clase IgA en suero con IgA en moco cervical.	54
12. Asociación de AAEsp de clase IgA en saliva con IgA en moco cervical.	54
13. Proporción de los isotipos de AAEsp en las pacientes con infertilidad de origen "isoimmune" y con infertilidad de "causa no determinada".	57
14. Validez de la detección de AAEsp de clase IgG en suero.	58
15. Validez de la detección de AAEsp de clase IgA en suero.	58
16. Validez de la detección de AAEsp de clase IgA en saliva.	59
17. Validez de la detección de AAEsp de clase IgA en moco cervical.	59
18. Valores de sensibilidad, especificidad, valor diagnóstico, tasa de falsos positivos y tasa de falsos negativos, para la detección de los diferentes isotipos de AAEsp.	60

I. JUSTIFICACION

El estudio de la infertilidad femenina de causa desconocida y presumiblemente debida a fenómenos de isoimmunidad, se basa en la determinación del isoanticuerpo dirigidos contra los espermatozoides, así como los antígenos del semen contra los cuales están dirigidas las inmunoglobulinas.

La mayoría de las pruebas para la detección de anticuerpos antiesperma, tanto en hombres como en mujeres, se realizan en muestras de suero e incluyen pruebas de aglutinación en placa, inmovilización espermática y citotoxicidad mediada por anticuerpos. Estas pruebas están diseñadas para detectar anticuerpos principalmente de las clases IgG e IgM con excepción de la técnica con inmunoesferas la cual se pueden detectar anticuerpos antiesperma de clase IgA en muestras de suero y de moco cervical.

El empleo de muestras obtenidas directamente del tracto genital femenino como es el moco cervical puede reflejar de manera más precisa la condición de una respuesta inmune de tipo secretora mediada por IgAs contra antígenos espermáticos.

El análisis de la concentración relativa de IgAs en el moco cervical de mujeres infértiles, así como la identificación por la técnica de Western Blot de la especificidad contra los antígenos espermáticos más comunes, aporta un elemento diagnóstico más preciso en los casos de infertilidad femenina de causa presumiblemente inmunológica (incompatibilidad moco cervical-semen).

La hipótesis del Sistema Inmune Común de las Mucosas será probada al analizar simultáneamente muestras de saliva de las mismas pacientes a las que se analice la muestra de suero y moco cervical.

Actualmente es posible la determinación de la concentración total de IgAs en saliva mediante ensayos inmunoenzimáticos (ELISA), los cuales tienen alta sensibilidad y especificidad. Se pretende aplicar esta metodología para la detección de anticuerpos antiesperma de clase IgAs en muestras de moco cervical, suero y saliva (36).

Este proyecto forma parte del estudio integral de infertilidad femenina en las pacientes que son atendidas en la Clínica de Salud Reproductiva del Departamento de Biología de la Reproducción, del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán.

II. OBJETIVOS

GENERAL.

Detectar la presencia de anticuerpos antiesperma (AAEsp) de clase IgG e IgA, dirigidos contra los principales antígenos espermáticos en el suero, la saliva y el moco cervical de mujeres con infertilidad inexplicable (presumiblemente de origen isoimmune).

PARTICULARES.

1. Identificar a las mujeres que acuden a la Clínica de Salud Reproductiva del Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán (INNSZ), con problemas de infertilidad, presumiblemente de origen isoimmune.
2. Desarrollar y estandarizar un sistema inmunoenzimático (ELISA indirecto) para la detección de AAEsp de clase IgG e IgA en el suero, la saliva y el moco cervical obtenidas de mujeres con infertilidad inexplicable.
3. Determinar la posible asociación entre los diferentes isotipos de anticuerpos antiesperma (IgG, IgA) en el suero, la saliva y el moco cervical de las pacientes.
4. Validar la técnica de detección de los isoanticuerpos antiesperma (IgG o IgA) para el diagnóstico de infertilidad femenina inexplicable.
5. Desarrollar la técnica de Western Blot para determinar la reactividad de los anticuerpos antiesperma de clase IgG o IgA encontrados en el suero, la saliva o el moco cervical, contra antígenos de la membrana celular del espermatozoide.

III. GENERALIDADES

La vida comenzó hace aproximadamente 4000 millones de años, el sexo hace 1500 millones de años y el ser humano, apenas hace 4.5 millones de años.

Los procesos mediante los cuales se lleva a cabo la reproducción varían según los organismos, pero básicamente se pueden definir en dos grupos: la reproducción asexual y la sexual. La reproducción asexual es simple y directa: en ésta el progenitor único se divide, fragmenta o germina para formar dos descendientes genéticamente idénticos al organismo que les dió origen. En cambio, la reproducción sexual implica la fusión de dos células haploides provenientes de dos individuos de la misma especie para formar una célula diploide que, con el posterior proceso de meiosis y recombinación genética, dan origen a descendientes con características genotípicas y fenotípicas únicas.

La reproducción y la sexualidad son valores muy arraigados dentro de la sociedad y por ello su pérdida o insuficiencia constituyen una alteración que afecta al individuo, a la pareja y al núcleo social-familiar en donde se desenvuelve. Dentro de las alteraciones que pueden existir en la pareja en el proceso de reproducción, la infertilidad es una problemática que requiere una investigación completa y cuidadosa de la pareja. Por lo anterior es necesario hacer un breve repaso de la fisiología de los aparatos reproductores masculino y femenino.

1. Aparato reproductor masculino.

1.1. Estructura del aparato reproductor masculino.

Los testículos están compuestos de asas contorneadas de túbulos seminíferos, donde se forman los espermatozoides a lo largo de sus paredes, a partir de las células germinales. Los dos extremos de cada asa desembocan por una red de conductos en el epidídimo. De allí los espermatozoides pasan a través del epidídimo hacia el conducto deferente y entran por los conductos eyaculadores a la uretra en el cuerpo de la próstata durante la eyaculación.

Las paredes de los túbulos seminíferos están recubiertas por células germinales y por las células de Sertoli que se extienden desde la lámina basal del túbulo hasta la luz del mismo. Las uniones intercelulares del tipo "unión estrecha" entre las células de Sertoli adyacentes a la lámina basal, forman la barrera hematotesticular (BIT) la cual impide que las proteínas y otras

moléculas grandes pasen del líquido intersticial a la luz de los conductos; solo los esteroides penetran esta barrera con facilidad (31).

La espermatogénesis es un proceso que inicia durante la adolescencia cuando las espermatogonias maduran convirtiéndose en espermatoцитos primarios, los cuales experimentan división meiótica reduciendo su número de cromosomas a 23 (célula haploide); posteriormente se dividen en espermatoцитos secundarios y finalmente en espermátides. Cuando la espermatogonia se divide y madura, sus descendientes permanecen unidos por puentes citoplasmáticos hasta la etapa de espermátide final. Esto aparentemente asegura la sincronía de la diferenciación de cada clona de células germinales. Por este proceso ordenado de espermatogénesis el número estimado de espermátides formadas a partir de una espermatogonia es de 512, y se requieren en promedio de 74 días para formar un espermatozoide maduro a partir de una célula germinal primitiva. Cada espermatozoide maduro está formado de una cabeza compuesta por el acrosoma y el núcleo, una pieza media rodeada por mitocondrias y la cola que obtiene su energía de la vaina mitocondrial (2,4,20,31,45).

1.2. Composición del semen.

El líquido en el interior de los túbulos seminíferos es totalmente diferente del plasma: contiene muy poca proteína y glucosa, pero es rico en andrógenos, estrógenos, K^+ , inositol y ácidos glutámico y aspártico. La conservación de esta composición depende de la BHT, que también protege a las células germinales de agentes tóxicos acarreados por la sangre e impide que los antígenos de las células en división y maduración, pasen a la circulación y generen una respuesta de tipo autoinmune.

El semen contiene espermatozoides y las secreciones de las vesículas seminales, de la próstata, de las glándulas de Cowper y probablemente, de las glándulas uretrales. El volumen promedio por eyaculación es de 2.0 a 5.0 ml de semen (anexo I).

El volumen de semen y el número de espermatozoides decrece rápidamente con la eyaculación repetida. Aunque solo se requiere un espermatozoide para fecundar el óvulo, normalmente existen cerca de 20×10^6 espermatozoides por mililitro de semen, lo que significa que por cada eyaculación se expulsan entre 40 y 100 millones de espermatozoides. Los

espermatozoides se mueven a una velocidad de 3 mm por minuto en el aparato genital femenino y llegan a los oviductos entre 30 y 60 minutos después del coito.

El semen contiene ácido ascórbico, fructosa, ergotionina, fosforilcolina, flavinas y prostaglandinas de las vesículas seminales, las cuales aportan un 60% del volumen total. La espermina, el ácido cítrico, el colesterol, fosfolípidos, la fibrinogenasa, el zinc y la fosfatasa ácida de la próstata aportan cerca del 20% del volumen total (2,20,31).

1.3. Principales antígenos espermáticos.

Los antígenos específicos del espermatozoide se producen desde el momento que se forman en el testículo (figura 1). Al pasar por el epidídimo el espermatozoide continúa su desarrollo y adquiere nuevos antígenos los cuales pueden cambiar al continuar su paso a través del tracto reproductor masculino y posteriormente en los fluidos del tracto reproductor femenino. Solo algunos antígenos espermáticos han sido caracterizados extensamente como la enzima lactato deshidrogenasa C4 (LDH-C4), la protamina, la RS-1 y la acrosina.

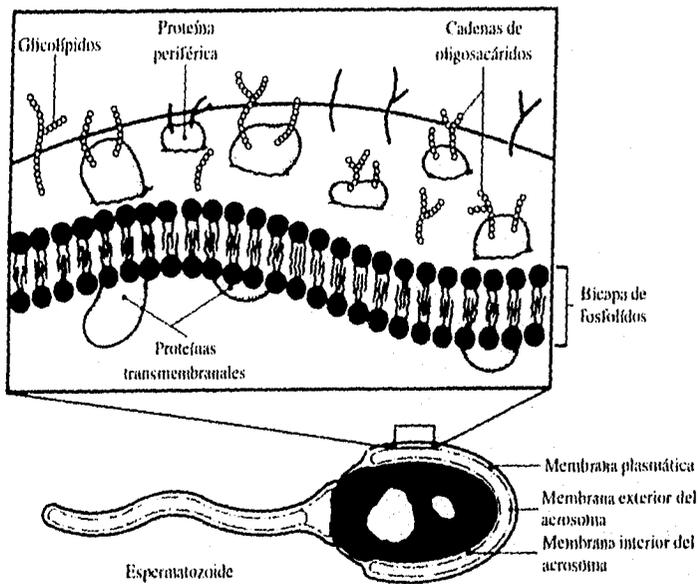


Figura 1. Estructura de la membrana espermática. (Koff WC and Six HR, 52).

La membrana plasmática del espermatozoide que cubre al acrosoma, está compuesta de una membrana externa y otra interna; después de la reacción, lisis y fusión del acrosoma, la membrana acrosomal interna exhibe nuevos antígenos de membrana.

La LDH-C4 es una isoenzima de la lactato deshidrogenasa (EC 1.1.1.27) que se encuentra únicamente en las células germinales masculinas. Esta enzima es una glicoproteína que existe en formas moleculares múltiples debido a la combinación de las subunidades que la componen (las cuales se han designado como A, B y C), homo ó heterotetraméricas con funciones específicas. La LDH-C4 aparece en la pubertad durante la división meiótica del primer espermatozocito y se encuentra también en el espermatozoide maduro. A pesar de ser un antígeno interno, puede atravesar la membrana plasmática y aparecer en la superficie (8,50).

La protamina es un antígeno del espermatozoide que reemplaza a las histonas en el núcleo espermático durante la espermatogénesis. Este antígeno puede inducir autoinmunidad en un 30% de hombres vasectomizados y, al igual que la LDH-C4, es un antígeno interno que puede aparecer en la superficie de la membrana plasmática del espermatozoide (10).

El RSA-1 es otro antígeno específico del espermatozoide el cual se localiza en la membrana plasmática, y cuyo peso molecular es de 14 KD, se cree que participa en la unión del espermatozoide a la zona pelúcida del óvulo (8,50).

La FA-1 es una glicoproteína que se encuentra como dímero con un peso molecular aproximado de 48 a 50 KD ó como monómero de 23 ± 2 KD, en la membrana de las células germinales de varias especies animales y la inducción de una respuesta inmune hacia esta proteína altera directamente el proceso de espermatogénesis y la unión del espermatozoide a la zona pelúcida del óvulo (6,71,72).

El SP-10 es un antígeno que se encuentra en abundancia en el interior de la membrana acrosomal de los espermatozoides maduros, asociada con la reacción acrosomal de la cabeza del espermatozoide y su peso molecular varía de 18 a 34 KD (6).

La acrosina (EC 3.4.21.10) es una proteasa de serina localizada en el acrosoma de los espermatozoides de los mamíferos y se encuentra en forma de zimógeno como proacrosina (PM 53 KD), desde el estadio temprano del espermatozoide y es activada por un mecanismo enzimático intrazimógeno. Esta enzima está involucrada en la reacción y dispersión de la matriz

acrosomal, así como en la unión y en la penetración del espermatozoide a la zona pelúcida del óvulo (9,50,59).

La hialuronidato 3-glicano/hidrolasa, conocida como hialuronidasa (EC 3.2.1.35, PM 60-65 KD), se encuentra en el plasma seminal y en la membrana del espermatozoide. También participa en la hidrólisis del acrosoma del espermatozoide (47,52).

2. Aparato reproductor femenino.

2.1. Ciclo menstrual y ovulación.

El desarrollo de los óvulos en el ovario inicia durante la gestación, de modo que al nacer, el número de óvulos presentes en el ovario ya está determinado. Cuando la mujer alcanza la madurez sexual, representada por el primer sangrado menstrual (menarca), se produce la liberación del primer óvulo maduro.

El ovario consta de 3 regiones: la externa o cortical, la interna o medular y el hilio. Sus componentes principales consisten en una cubierta de epitelio celómico, folículos en varios grados de maduración, tejido de soporte conocido como estroma y vasos linfáticos y sanguíneos.

En su etapa más inmadura el folículo se conoce como "primordial" y está separado del estroma por una membrana basal. El folículo contiene un oocito primario rodeado por una sola capa de células en forma de huso, las cuales adquieren una forma cuboidal y el folículo se denomina primario y su posterior transformación da origen a la "zona granulosa" que secreta una glicoproteína que forma la zona pelúcida, que cubre al oocito.

Desde la menarca hasta la menopausia, se observan en la mujer cambios hormonales cíclicos mensuales que se originan en el sistema neuroendócrino, que dan como resultado un sangrado vaginal de origen uterino llamado menstruación.

La duración del ciclo menstrual es variable, pero en su mayoría se considera normal de 25 a 30 días y su duración se calcula desde el primer día de sangrado hasta un día previo al siguiente.

2.2. Cambios hormonales en el ciclo menstrual.

El ciclo menstrual se divide en dos fases: la fase folicular o proliferativa y la fase lútea o secretora. La fase folicular tiene una duración aproximada de 10 a 20 días (14 en promedio),

comienza con el primer día de sangrado y termina el día del pico de la hormona luteinizante (LH) que estimula el desarrollo de los folículos hasta el momento de la ovulación.

La hormona folículo estimulante (FSH) produce el desarrollo inicial y la secreción de estrógenos, principalmente estradiol (E_2) por los folículos ováricos, y la LH induce la secreción de progesterona por las células ováricas durante la fase lútea. Es entonces cuando los folículos denominados primarios inician su desarrollo, el cual se manifiesta por el aumento de tamaño del oocito y por la proliferación de las células de la capa granulosa. Conforme avanza su maduración, el óvulo empieza a separarse de la capa granulosa, a partir de la zona pelúcida secretada por las células foliculares.

Al aproximarse la ovulación (etapa periovulatoria) dos días antes de que termine la fase folicular y los dos primeros días de la fase lútea, hay una elevación en la concentración plasmática del E_2 y se mantiene el pico hasta unas horas antes del pico ovulatorio (figura 2).

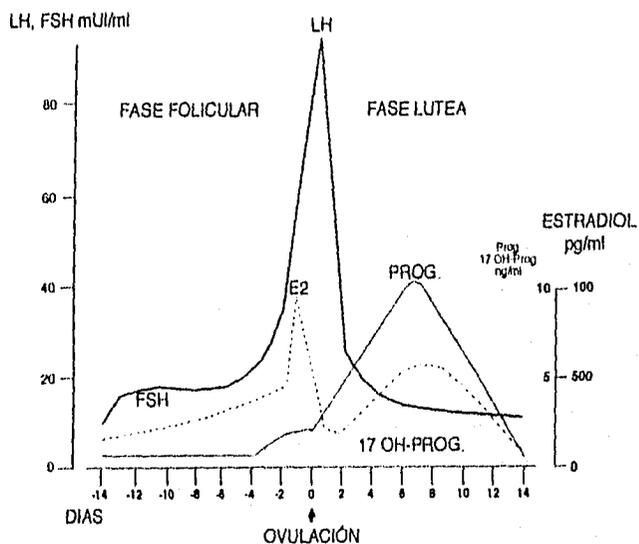


Figura 2. Cambios hormonales durante el ciclo menstrual.

Durante la fase ovulatoria el folículo alcanza su madurez completa, se rompe y el óvulo es expulsado. Esto ocurre cuando hay una elevación de la LH y la FSH. El óvulo es recogido por los extremos fimbriados de las trompas de Falopio y es transportado al útero y, a menos que ocurra la fecundación, hacia el exterior a través de la vagina. Los folículos que crecen, pero no ovulan, degeneran formando folículos atrésicos (45).

En la fase lútea el cuerpo lúteo (amarillo) que se caracteriza por la vacuolización y vascularización de las células de la capa granulosa del ovario, tiene una etapa de crecimiento que dura 7 días (después del pico de la LH), seguida de una fase de 7 días caracterizada por la disminución de la producción de esteroides y si hay embarazo, el cuerpo lúteo persiste por la acción de la gonodotropina coriónica, y por lo general no se presentan más períodos hasta después del parto. Si no hay embarazo, empieza a degenerar 4 días antes de la siguiente menstruación (24o. día del ciclo menstrual) hasta que al fin es reemplazado por tejido cicatrizal, y al final de la menstruación todas las capas se desprenden del endometrio, excepto las profundas.

Después de la menstruación, se regenera el endometrio a partir de las células que quedan en la capa basal, y desde el punto de vista de la función endometrial, la fase proliferativa del ciclo menstrual representa el restablecimiento del epitelio a partir de la menstruación precedente, y la fase lútea la preparación del útero para la implantación del óvulo fecundado (29).

La mucosa del cuello uterino presenta cambios cíclicos en las secreciones que produce. El período fértil en el cual la inseminación puede dar como resultado la fertilización, está íntimamente relacionado con el cérvix y el moco cervical; el cérvix es el órgano blanco de un sofisticado sistema de control endócrino, y uno de sus papeles es modular las propiedades y la secreción del moco cervical.

2.3. Moco cervical.

La mucosa endocervical es un intrincado sistema de criptas que agrupadas dan la impresión de ser glándulas. Estas criptas que consisten en sacos de epitelio columnar de la mucosa cervical, pueden tener una orientación oblicua, transversal o longitudinal, pero que nunca se cruzan entre ellas, aunque pueden bifurcarse o extenderse hacia la porción basal, y su estructura varía según la edad y la etapa del ciclo menstrual. El epitelio cervical comprende

distintos tipos de células secretoras que varían de acuerdo a la abundancia de gránulos secretorios en distintas partes del cuello uterino, formando el moco cervical.

El moco cervical se compone de una fase líquida y una sólida. La fase líquida del moco contiene proteínas, sales inorgánicas y enzimas; la fase sólida consiste en un polímero insoluble de glicoproteína (la mucina), que forman una matriz en la cual se dispersa la fase acuosa y las dos en combinación le confieren integridad estructural y funcional al moco cervical. La variación cíclica de los constituyentes del moco cervical influye en la penetración y la supervivencia de los espermatozoides dentro de la mucosa endocervical.

La secreción del moco cervical depende de la función, de la actividad y de la respuesta de las células secretoras del epitelio cervical a las hormonas circulantes. Los estrógenos principalmente el E_2 , estimulan la producción abundante de un moco acuoso por las células epiteliales del cérvix, mientras que la progesterona inhibe su actividad secretora. También el volumen secretado de moco cervical exhibe variaciones cíclicas: en mujeres sanas en edad reproductiva, la producción diaria del moco varía desde 500 μ l durante la mitad del ciclo hasta menos de 100 μ l en otros periodos del ciclo menstrual. Una pequeña cantidad de líquido endometrial tubárico (y quizá folicular) también contribuye a formar el moco cervical. Además en el moco cervical existen detritos celulares procedentes de los epitelios uterino y cervical, así como también leucocitos. Por lo tanto el moco cervical es una secreción heterogénea que contiene más de 90% de agua, gran cantidad de la cual está incluida dentro de la matriz de la mucina.

Durante el ciclo menstrual existen variaciones en la consistencia del moco cervical; justo antes de la menstruación es viscoso, y en los días periovulatorios presenta una mayor hidratación y su microestructura es más abierta con espacios intersticiales más extensos que el moco de la fase lútea, lo cual le confiere una máxima capacidad receptiva al ingreso de los espermatozoides desde el sitio de la eyaculación.

Al entrar los espermatozoides en el moco cervical, los constituyentes del plasma seminal quedan adheridos en su superficie y los espermatozoides son guiados por líneas de fuerza del moco cervical hasta las criptas cervicales, en donde son retenidos y liberados lentamente hacia el útero y las trompas de Falopio. Los intersticios del moco cervical son más pequeños que los espermatozoides, por lo que su penetración depende exclusivamente de movimientos activos de

las colas que están directamente relacionados con el grado de movilidad o vitalidad; solo los espermatozoides morfológicamente normales son capaces de proseguir a través del moco, de esta manera al desplazarse el espermatozoide es empujado hacia los lados y/o bloqueado a través de la microestructura del moco mediado también por contracciones musculares en el tracto reproductor femenino (48,49,87).

La fisiología de la interacción moco-semen no ha sido totalmente aclarada pero se sabe que esta interacción involucra un mecanismo conocido como reservorio espermática, en el cual los espermatozoides pueden permanecer hasta 6 o 7 días a nivel del canal cervical recibiendo aporte energético que los mantiene bioquímicamente activos.

3. Proceso de fertilización.

Antes de penetrar las capas del oocito, el espermatozoide pasa por un proceso de capacitación que normalmente ocurre en el tracto genital femenino. Este proceso de capacitación se define como un conjunto de cambios bioquímicos y morfológicos que ocurren en el espermatozoide al pasar por el oviducto del tracto reproductor femenino, los cuales le permiten la inducción de la reacción acrosomal y el proceso de fusión óvulo-espermatozoide.

La reacción acrosomal consiste en una serie de eventos exocitóticos que se llevan a cabo en la membrana del espermatozoide, los cuales inician con la fusión y la vesiculación progresiva de la membrana exterior acrosomal y la concomitante liberación del contenido acrosomal. La reacción acrosomal depende del control de la activación y de la liberación de las enzimas acrosomales necesarias para que el espermatozoide penetre al óvulo a través de la zona pelúcida. Si la reacción acrosomal ocurre en otro tiempo o en otro sitio diferente a las trompas de Falopio, esto puede ser motivo de infertilidad (25,36,96-99).

Al fusionarse las dos células, la división celular comienza de inmediato y el embrión en desarrollo (blastocito) baja por la trompa de Falopio e ingresa al útero. Una vez en contacto con el endometrio, el blastocito es rodeado por una capa exterior de sincitiotrofoblastos y una capa interior de citotrofoblastos. El blastocito permanece aproximadamente 3 días en la trompa de Falopio y 3 días más en los líquidos del útero antes de implantarse en la pared dorsal del útero, momento en el cual comienza el desarrollo de la placenta y los cambios hormonales característicos del embarazo.

4. Infertilidad.

Son numerosos los factores que pueden ser responsables de la disminución de la concepción y el embarazo. El hombre requiere de una espermatogénesis, función sexual y anatómica normal, para poder depositar un número adecuado de espermatozoides morfológicamente normales y móviles dentro de la vagina. La mujer requiere de ciclos menstruales regulares y normales.

4.1. Etiología y epidemiología.

En lo que respecta a los factores anatómicos y fisiológicos, en una pareja infértil, el hombre es responsable en un 40 a 50% de los casos. El primer dato que se considera para determinar si la infertilidad es de origen masculino es la espermatobioscopia (anexo 1), que consiste en un análisis de las características del semen; si alguna de ellas no se encuentra dentro de los parámetros establecidos, puede ser motivo de infertilidad. Otros factores responsables de infertilidad masculina son una espermatogénesis deficiente, impotencia, eyaculación retrógrada, obstrucción testicular, criptorquidia y secuelas quirúrgicas (53).

Un 30% de los casos de infertilidad femenina se originan por alteraciones del ciclo menstrual (endocrinopatías), un 20% por endometriosis y enfermedades pélvico-inflamatorias, 5% por infecciones, un 20% de causa inexplicable y entre un 5% a 17% de origen inmunológico (45).

En adición a los efectos inherentes de la edad, los órganos reproductivos están expuestos a daños que potencialmente afectan la fertilidad. Las enfermedades congénitas y las infecciones genitales en el hombre, pueden ocasionar una espermatogénesis deficiente o anormal. En la mujer el uso de dispositivos intrauterinos (DIU) puede provocar lesiones que generan enfermedades pélvico inflamatorias (EPI) con una subsecuente infertilidad.

En el tabaquismo crónico en el hombre (aproximadamente 20 cigarrillos por día) se ha reportado que existe una disminución de un 20% a 40% de la concentración de ácido ascórbico en el suero, disminuyendo la calidad del espermatozoide (en su morfología, su movilidad o su concentración). En el caso de las mujeres fumadoras, cerca del 30% de ellas tienen problemas de infertilidad, debido a que los metabolitos de la nicotina están presentes en el moco cervical (24).

El alcoholismo crónico en la mujer induce desordenes ovulatorios y en el hombre afecta la síntesis testicular y la secreción de testosterona, dando como resultado una disfunción sexual, así como una probable impotencia permanente. Finalmente la exposición de hombres y mujeres a una constante radiación o actividades ocupacionales en las que se encuentre en contacto con agentes químicos (mercurio, cadmio) y exposición a altas temperaturas, aumentan el riesgo de tener una infertilidad de tipo idiopática (39).

4.2. Historia clínica y examen médico.

El diagnóstico de infertilidad comienza con la primera visita al médico, el cual debe realizar a la pareja una historia clínica, para poder establecer una evaluación que lleve a conocer la causa probable de la infertilidad. La historia clínica de la mujer incluye, la valoración de su ciclo menstrual, uso de anticonceptivos, frecuencia de actividad sexual, embarazos previos que no llegaron a término, óbitos, etc.

Otro dato importante que debe ser incluido en la historia clínica de la paciente es el perfil endocrinológico y en el cual se incluyen a la hormona luteinizante (LH), la hormona folículo estimulante (FSH), la progesterona (P_4), los estrógenos principalmente E_2 y prolactina (PL).

El estudio anatómico incluye histerosalpingografía y laparoscopia, así como examen pélvico con objeto de detectar anomalías como endometriosis. Mediante el Papanicolau se realiza la búsqueda de microorganismos como *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Chlamydia* y *Neisseria gonorrhoeae*. Por último, se realiza una prueba de penetración espermática (PPE) o prueba post-coital, que refleja la interacción entre el moco cervical y el espermatozoide (anexo 2) (45,58).

Para el estudio de la infertilidad masculina, la historia clínica debe incluir antecedentes de fertilidad, es decir, actividad sexual, secuelas quirúrgicas en órganos reproductivos, espermatoescopía, enfermedades transmitidas sexualmente y, en ocasiones la frecuencia a la exposición ambiental y ocupacional a metabolitos que pueden dañar o alterar la fertilidad.

5. Infertilidad inmunológica.

El sistema inmune desempeña un papel importante en la reproducción de los mamíferos. Para que ocurra el embarazo se requiere que la respuesta inmune se modifique en el tracto

reproductor femenino, para que se lleve a cabo la fertilización e implantación del óvulo y una posterior embriogénesis, estableciéndose una tolerancia inmunológica que acompaña a los gametos (óvulo y espermatozoide).

En el hombre, la presencia de la BHT limita el paso de las células inmunocompetentes hacia el interior del aparato reproductor en donde se forma y transporta el espermatozoide. Sin embargo, existe la posibilidad de que se produzcan autoanticuerpos (dirigidos hacia antígenos propios) o isoanticuerpos (anticuerpos dirigidos hacia antígenos de otro individuo) contra el espermatozoide, siendo esta respuesta inmune de tipo humoral o mediada por células, a nivel local o sistémico.

La incompatibilidad inmunológica es un problema de infertilidad en aproximadamente un 5 a 17% de las parejas con infertilidad, siendo esta respuesta inmune de tipo humoral o mediada por células, a nivel local o sistémico. Los anticuerpos anti-espermatozoide (AAEsp) reaccionan contra dominios antígenicos específicos del espermatozoide en la cabeza o la cola, pudiendo afectar su función, su movilidad, su viabilidad, su capacitación o su interacción con el óvulo (figura 3).

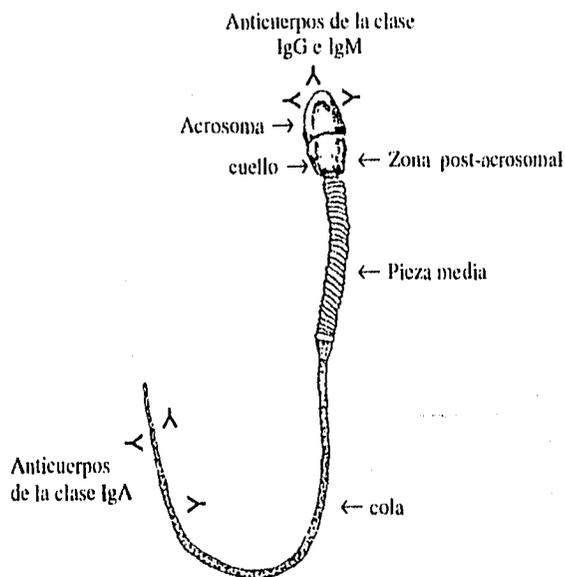


Figura 3. Interferencia de los AAEsp con el espermatozoide.

5.1. Interferencia de los AAEsp con el proceso de fertilización.

Los AAEsp interfieren con la fertilización mediante dos mecanismos principales; el primero sobre la movilidad del espermatozoide y el segundo en la interacción del espermatozoide con el óvulo.

5.1.1. En el transporte del espermatozoide.

La unión de los AAEsp a la superficie del espermatozoide en el semen, modifica su movilidad y capacidad de penetración en el moco cervical. La presencia de anticuerpos reactivos al espermatozoide dentro del moco cervical, también puede producir daño a las membranas celular y acrosomal del espermatozoide.

Los anticuerpos dirigidos contra la cabeza del espermatozoide (principalmente IgG e IgM) activan el sistema del complemento e interfieren con su penetración en el moco cervical y en la unión con el óvulo, mientras que los anticuerpos dirigidos contra la cola del espermatozoide (IgA) promueven la pérdida de la movilidad espermática.

El proceso de opsonización por anticuerpo y el factor C3 del complemento unidos al espermatozoide, puede producir el aumento en la fagocitosis del espermatozoide por los macrófagos presentes en el tracto reproductor femenino.

5.1.2. Por interacción con el óvulo.

Los anticuerpos dirigidos contra la cabeza del espermatozoide pueden obstruir el sitio de unión de este a la zona pelúcida del óvulo impidiendo la interacción física de ambos gametos.

Los anticuerpos que activan complemento (IgG e IgM) dirigidos contra la cabeza del espermatozoide, pueden afectar la capacidad del espermatozoide de penetrar al óvulo. Este efecto está mediado por daño a la zona del acrosoma y a la membrana plasmática espermática, aún cuando la movilidad celular no se vea alterada (14,43,45).

6. Inmunología de las mucosas.

El sistema inmune de las mucosas está representado por la IgA secretoria (IgAs), la cual actúa como primera línea de defensa específica a nivel de las mucosas. La IgAs actúa inhibiendo o retrasando la adherencia de los microorganismos a la superficie de las células epiteliales que

forman las mucosas, impidiendo su entrada hacia los tejidos y su posterior eliminación por otros mecanismos de resistencia a las infecciones.

6.1. IgA secretoria (IgAs).

La IgAs se encuentra presente en altas concentraciones en las diferentes secreciones del organismo, en las lágrimas, la saliva, la leche, el calostro y en los fluidos que bañan los tractos respiratorios, digestivo y genitourinario.

Existe evidencia de que la IgAs no pasa de la sangre a las diferentes secreciones, sino que debajo del epitelio existen células plasmáticas que sintetizan IgA y el péptido de unión o cadena J, por lo que su producto es IgA polimérica, principalmente en forma de dímeros de inmunoglobulina (IgA₂J), la cual es secretada hacia el espacio intersticial. Las células que forman los diferentes epitelios, están íntimamente unidas entre sí por uniones intercelulares del tipo "unión estrecha" (tight junction), que evitan que la IgA dimerica alcance la superficie de los epitelios por difusión simple. Se ha postulado que el componente secretor (CS) o "pieza secretoria", además de otorgarle una ventaja adicional frente a la desnaturalización proteolítica, actúa como el receptor para la IgA dimerica, siendo éste mecanismo de transporte de la IgAs el más aceptado.

El CS es una glicoproteína que se sintetiza como un precursor de 90 KD por las células epiteliales de las mucosas. Después de ser sintetizado, el CS se localiza en las porciones basal y lateral de las células epiteliales, donde actúa como el "receptor para IgA dimerica", con la cual se combina por interacciones no covalentes. Después de unirse, la IgA dimerica es endocitada y transportada dentro de la célula epitelial en forma de vesículas, hasta que es vertida en la luz de los epitelios por un proceso de pinocitosis revertida dependiente de energía. Este sistema de transporte favorece que la IgA dimerica pueda atravesar el epitelio sin que sufra modificaciones enzimáticas, ya que viaja "protegida" dentro de las vesículas.

Este sistema de transporte es único, ya que una pequeña porción del receptor permanece unido con su ligando, después de ser exocitado por la célula. Después de liberar a la molécula de IgA, el fragmento del CS (peso molecular 20 KD), conocido como "fragmento de anclaje" que quedó unido a la membrana de la célula epitelial, ya no es reciclado sino que se degrada intracelularmente. Desde el punto de vista bioquímico, esto genera una gran complejidad, ya que

por un lado, el CS debe ser "anclado" a la membrana de la célula en uno de sus polos para unir a la IgA, mientras que por el otro, parte del CS debe ser "eliminado" junto con su carga, después de haber efectuado su función de transporte.

La adición del CS a la molécula de IgA dimérica, da como resultado la molécula completa de IgA secretoria (IgAs), lo que favorece su estabilidad y le proporciona una ventaja adicional al anticuerpo secretor, ya que aumenta su resistencia a la hidrólisis en las secreciones externas donde efectúa sus funciones protectoras (figura 4) (1,51).

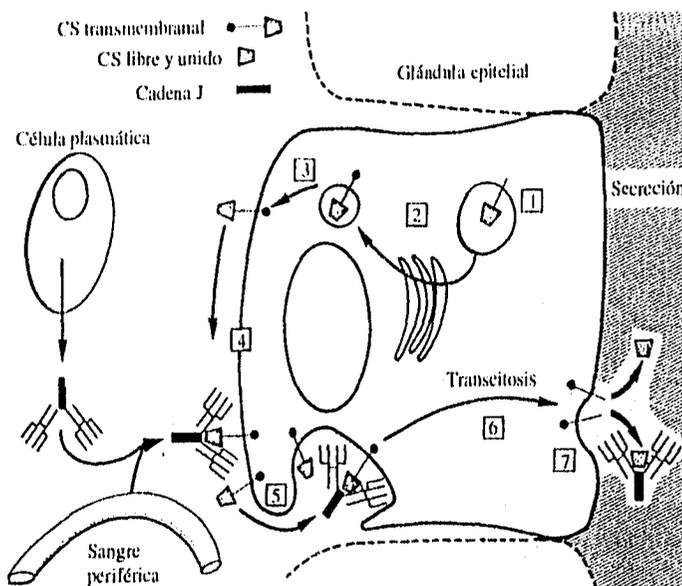


Figura 4. Modelo para el transporte epitelial de la IgA dimérica mediada por CS.

1. Síntesis del CS en el retículo endoplásmico rugoso (RER) de las células epiteliales.
2. Glicosilación del CS en el aparato de Golgi.
3. Expresión del CS en las porciones basal y lateral de la célula epitelial.
4. Formación del complejo CS-IgA₂J.
5. Endocitosis del complejo CS-IgA₂J.
6. Formación de las vesículas.
7. Liberación de IgA secretoria (IgAs) y de CS libre.

6.2. Tejido linfoide asociado al intestino.

Los tejidos linfoides asociados a los epitelios de la mucosa contienen un número mayor de células linfoides (linfocitos B y T) y células plasmáticas (70-80%), que las que contienen el bazo, los nódulos linfáticos y la médula ósea en conjunto (20-30%).

Desde el punto de vista inmunológico, el intestino es un órgano que participa activamente en los mecanismos de defensa específicos del organismo. El tejido linfoide asociado al intestino (GALT, por sus siglas en inglés), forma parte de un sistema de protección especializado que se conoce como Tejido Linfoide Asociado a las Mucosas (MALT), dentro del cual también se incluye al tejido linfoide asociado a los bronquios (BALT).

Una de las características más estudiadas del sistema inmune de las mucosas, es la localización y síntesis de los isotipos de la IgA polimérica y la IgAs en las mucosas. La secreción de la IgAs en la superficie de las mucosas, es la primer línea de defensa específica, aunque la respuesta inmune humoral involucra a otras inmunoglobulinas como IgG e IgM.

El aparato digestivo tiene como característica el estar en contacto con gran cantidad de antígenos de diversa índole, por lo cual es necesario gran cantidad de tejido linfoide para mantener la homeostasis, por lo que le confieren 2 funciones principales: proteger al organismo de infecciones entéricas por virus, bacterias y parásitos, y minimizar la inducción de una respuesta inmune mediada por células y por anticuerpos.

En el intestino se encuentran localizados agregados linfoides en forma dispersa a lo largo del intestino conocidos como placas de Peyer; éstas son más grandes y abundantes en la porción terminal del intestino (íleon). Se encuentran de 20 a 30 placas de Peyer en el ser humano, mientras que en el ratón son alrededor de 12 (1,26).

En cada una de las placas de Peyer se encuentra un centro germinativo constituido principalmente por linfocitos B IgA+. La zona interfolicular, y en especial la más cercana a la luz intestinal, contiene linfocitos Th (CD4+), Ts (CD8+) y los llamados linfocitos T contrasupresores (Tcs) que pueden potenciar la respuesta inmune contra antígenos en el tracto intestinal.

Las células linfoides que se encuentran dispersas en el intestino, pueden ser de dos tipos:

- Linfocitos intraepiteliales (IEL). El 80 a 90%, son linfocitos T cuyo fenotipo es supresor/citotóxico (Ts, CD8+); el resto de las células se cree que son células NK. Otra

característica importante de los IEL., es que no se encuentran linfocitos B dentro de esta población (26).

- Linfocitos de la lámina propia (LPL). Son células linfoides que se localizan por debajo de la membrana basal, dentro del tejido conectivo que las sostiene, estas células incluyen a linfocitos B (30%), linfocitos T (50%) y macrófagos (\approx 25%). La superficie de las placas de Peyer está cubierta por un epitelio especializado de células epiteliales de forma cuboide que presentan antígenos HLA-DR+, muy pocas células caliciformes y una célula especializada en el transporte de antígenos, conocida como célula M debido a que en su superficie apical presenta "micropliegues" en lugar de microvellosidades.

La célula M posee numerosas mitocondrias debajo de la porción apical de su membrana, así como numerosas vesículas con las cuales endocita y transporta moléculas y microorganismos. Su núcleo se localiza en la porción basal y su citoplasma generalmente "rodea" a una o más células que la penetran, las cuales pueden ser linfocitos, linfoblastos, macrófagos, células plasmáticas y, menos frecuentemente, PMN. Estas células se encuentran en el espacio intercelular que forma una mella en su citoplasma, formando lo que se conoce como "hoyo central" (figura 5).

La célula M es considerada como el principal punto de entrada a la placa de Peyer por la pinocitosis y transporte intacto de los antígenos, a través del epitelio hacia el tejido linfóide del interior de la placa de Peyer (función que probablemente esté asociada con macrófagos y células dendríticas), iniciando de esta manera una respuesta inmune por las células T y B.

La célula M carece de moléculas del HLA de clase II, por lo que ésta no participa en el procesamiento del antígeno, así como tampoco lo hace para el transporte de la IgA por carecer de componente secretor; sin embargo se ha sugerido que la IgA de la luz intestinal puede afectar la unión y transporte de antígenos por la célula M, ya que se ha demostrado que ciertos complejos antígeno-IgA pueden adherirse selectivamente a la membrana de la célula. Por lo tanto la unión y el transporte eficiente de el complejo antígeno-IgA por la célula M permite sostener la respuesta inmune una vez que ésta ha sido iniciada.

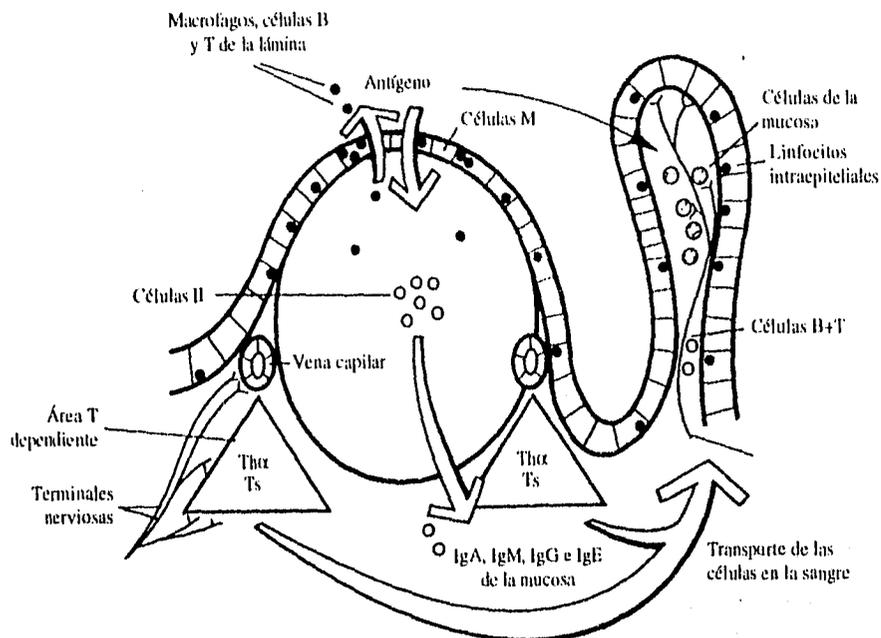


Figura 5. Mecanismos para la inducción de la respuesta inmune en el tejido linfático asociado al intestino (GALT). (Griffin, et al. 37)

6.3. Sistema inmune común de las mucosas.

Las placas de Peyer están enriquecidas en su superficie de células plasmáticas precursoras de IgA, así como en otras mucosas y glándulas de secreción. Los primeros estudios experimentales hechos en ratón, demostraron que los linfocitos de las placas de Peyer se diseminan hacia otros tejidos asociados a mucosas, observando el mismo tipo de respuesta inmune humoral específica (representada principalmente por IgAs) en el BALT y en otras glándulas de secreción externa como la glándula mamaria, las glándulas salivales, las glándulas

lagrimales y el endocérvix, de manera independiente de la inmunidad sistémica. Esto dió origen al concepto de la existencia de un "Sistema Inmune Común de las Mucosas"(1,70).

Los linfocitos B inmaduros que se encuentran en la placa de Peyer, son activados y cambian de isotipo de inmunoglobulina que expresan en su superficie: inicialmente expresan IgM en su membrana (mIgM⁺) y posteriormente IgA de membrana (mIgA⁺) bajo la influencia de una población especial de los linfocitos T de "switch", presentes en las placas de Peyer; estos linfocitos portan el marcador de superficie CD4⁺ característico de linfocitos T con función cooperador/inductor. Una vez activados los linfocitos, abandonan la placas de Peyer a través de los conductos linfáticos eferentes y migran hacia los nódulos mesentéricos, para pasar posteriormente al conducto torácico y de ahí, a la circulación sanguínea (figura 6).

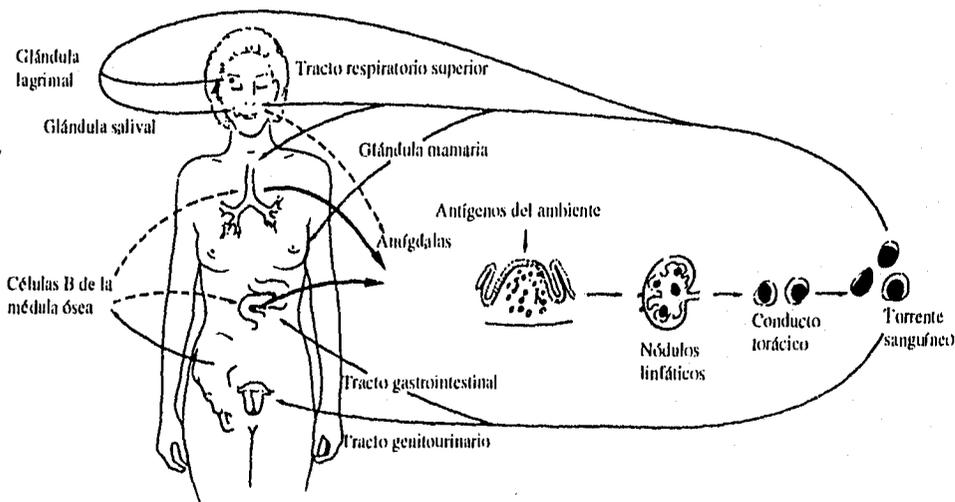


Figura 6. Sistema inmune común de las mucosas en humanos. (Mestecky J, et al. 70)

Se ha demostrado que las células plasmáticas productoras de IgA que fueron estimuladas en el GALT regresan al sitio donde originalmente ocurrió su activación (fenómeno conocido como "homing"), la cual se debe a la presencia de moléculas en la superficie de los linfocitos que las guían hacia el órgano al que finalmente van a alojarse; además que también se pueden dirigir hacia otros sitios asociados a mucosas, como el tracto respiratorio y el tracto genitourinario, así como a las glándulas lagrimales, salivales y mamarias (figura 6).

6.4. Respuesta inmune en el aparato reproductor femenino.

El sistema inmune local de tipo secretor que existe en el útero, el cérvix y la vagina es cualitativamente idéntico al que se encuentra asociado con otras superficies mucosas como el GALT y el BALT. Este sistema es característico por la presencia de células que sintetizan inmunoglobulinas en la submucosa local, la cual reacciona con un estímulo antigénico local con la subsecuente producción de anticuerpos específicos que son secretados a través de la mucosa del tejido.

En el epitelio ectocervical se encuentran las células de Langerhans, que son células dendríticas intraepiteliales que provienen de la médula ósea y se encuentran presentes en hígado, bazo y piel, su principal función es la de reconocer y expulsar antígenos exógenos a la mucosa y presentarlos a los linfocitos T.

Los linfocitos T se encuentran de manera intraepitelial en la capa basal del epitelio escamoso del cérvix. La población de estos linfocitos presentan una relación CD4/CD8 que se encuentra en un rango de 2/3 a 1/9.

Los anticuerpos secretados localmente juegan un papel importante en la protección de las superficies mucosas del tracto reproductor, el isotipo de inmunoglobulina que se encuentra principalmente es de tipo IgAs en un 70%. Estudios inmunohistoquímicos en aparato reproductor femenino han revelado la presencia de células plasmáticas que secretan IgAs, y en menor cantidad IgM e IgG, especialmente en glándulas del endo y ectocérvix, en el útero y en las trompas de Falopio. La detección de la cadena J en las células productoras de IgA, ha sugerido que la IgA polimérica (pIgA) y componente secretor (necesario para el transporte transepitelial de la pIgA en las secreciones externas) están disponibles localmente (37).

Dentro del tracto reproductor femenino residen la mayoría de las células inmunocompetentes, las cuales pueden limitar el tiempo de fertilización del óvulo: a pesar de que el moco cervical recubre a los espermatozoides por un tiempo aproximado de 5 días, éstos son removidos del tracto genital mediante fagocitosis por los leucocitos presentes en los fluidos que migran rápidamente al útero, siguiendo el recorrido de los espermatozoides y ambos son expulsados de la vagina.

Esta secuencia de eventos han sido demostrados en roedores y cerdos, en los mamíferos con una eficiente barrera cervical al transporte de los espermatozoides, es al parecer improbable que mas del 5% del total de los espermatozoides del semen migren por la vagina.

El espermatozoide está expuesto al sistema inmune no solamente dentro de la vagina, sino también, dentro de la cavidad peritoneal, y aún en esas circunstancias la respuesta inmune es raramente inducida por coito natural, y a pesar de ser el espermatozoide altamente inmunogénico tiene la capacidad de evadir la respuesta inmune del tracto genital femenino. Recientemente se demostró la existencia de una proteasa de IgA asociada al espermatozoide que lo protege de los anticuerpos secretados a nivel local en el tracto reproductor femenino (74).

En estudios experimentales de inmunización local en el tracto genital femenino de animales (rata y mono) se ha demostrado la capacidad de respuesta inmune celular a nivel local, observando una gran respuesta inmune de tipo secretoria en el cérvix, el endometrio y las trompas de Falopio. De igual forma la inmunización gastrointestinal y pélvica dio como resultado la acumulación de anticuerpos en secreciones del tracto genital: la administración oral de *Chlamydia psittaci* en ratón, produjo la aparición en la vagina de anticuerpos de tipo IgAs anti-*Chlamydia psittaci*. La inmunización de ratas con LDH-C4 *in útero*, produjo una respuesta específica de anticuerpos de tipo IgA e IgG en secreciones vaginales y en saliva (8).

La respuesta inmune celular y humoral en el aparato reproductor femenino está íntimamente relacionada con el sistema endocrino. En los últimos años se ha estudiado extensamente esta asociación, demostrando que la concentración de inmunoglobulinas y componente secretor en secreciones uterinas durante el ciclo menstrual son controladas por el estradiol y la progesterona (92,94,95).

Al parecer la respuesta inmune depende del estradiol y de los estímulos directos de los antígenos presentes en el ambiente genitourinario; en estudios experimentales hechos en ratas

ovariectomizadas, al ser estimuladas con estradiol se produjo una movilización de las inmunoglobulinas de la sangre hacia los tejidos, y una producción por las células epiteliales de componente secretor y receptores responsables del transporte de la pIgA en los tejidos de secreción, con la posterior migración de linfocitos y células presentadoras de antígeno. Al administrar progesterona a las mismas ratas se observa un efecto inmunosupresor, disminuyendo las concentraciones de IgA e IgG en el tejido vaginal (89).

Se ha demostrado que durante la fase folicular, la concentración de IgAs en saliva de parótida aumenta paralelamente con la concentración de estradiol durante todo el ciclo menstrual: ambos alcanzan su máxima concentración hacia los días 16 y 24 del ciclo menstrual y descienden después de la fase post-ovulatoria y antes de la siguiente menstruación (33).

Estos estudios indican que la respuesta inmune puede ser inducida o inhibida en el tracto reproductor femenino por la acción del estradiol y progesterona, y que las interacciones entre los sistemas endocrino e inmune de la mucosa del tracto reproductor, pueden ser útiles como un importante método inmunoprolifático en la regulación de la fertilidad y control de las enfermedades que son transmitidas sexualmente (33,37).

7. Efecto de la presencia de AAEsp en la fertilidad.

7.1. Autoinmunidad.

En el tracto reproductor masculino, la espermatogénesis no comienza sino hasta la pubertad, por lo que los espermatozoides pueden ser reconocidos como extraños por el sistema inmunológico. Sin embargo, la presencia de la BIT impide la inducción de una respuesta inmune por las células inmunocompetentes además de que las inmunoglobulinas, los macrófagos y otros leucocitos están ausentes en los túbulos seminíferos, por lo que durante la producción y transporte normal del espermatozoide no se produce una respuesta de tipo autoinmune.

Esta forma de infertilidad inmunológica se manifiesta de 3 maneras:

a) En la actualidad se ha descrito que existen ciertos individuos con genotipos particulares que los hacen especialmente susceptibles a padecer obstrucción del flujo testicular por lo que el transporte del espermatozoide es desviado hacia los nódulos linfáticos abdominales, donde se activa una producción sistémica de anticuerpos anti-espermatozoide.

b) Por homosexualismo. La inoculación intrarectal y gastrointestinal con espermatozoides puede provocar el desarrollo de anticuerpos antiesperma (AAEsp). Este tipo de respuesta inmune se ha encontrado en aproximadamente un 76% de homosexuales que practican frecuentemente sexo oral-genital-anal (14).

c) Vasectomía y vasovasostomía. La vasectomía consiste en la ligadura bilateral de los conductos deferentes para bloquear el paso de los espermatozoides, de esta manera durante la eyaculación los espermatozoides están ausentes en el semen (azuospermia). En un 50 a 80% de los casos de vasectomía con una posterior vasovasostomía (restauración de la permeabilidad a los espermatozoides en los conductos deferentes) desarrollan AAEsp, debido a la extravasación de los espermatozoides hacia el exterior del tracto genital. En muestras de semen se ha observado aglutinación espermática (cabeza-cabeza, cola-cabeza) que pueden interferir con el movimiento o penetración del óvulo durante el proceso de fertilización (4,39,40,41,42,68).

7.2. Isoinmunidad.

Los espermatozoides que se encuentran dentro del tracto reproductor femenino y cavidad peritoneal raramente inducen la respuesta inmune por coito natural, sin embargo, existen mujeres susceptibles que al estar en constante exposición a antígenos espermáticos y del plasma seminal durante su actividad sexual, pueden originar el desarrollo de isoanticuerpos dirigidos contra el espermatozoide, en los fluidos del tracto genital y en el suero.

El mecanismo exacto por el cual se lleva a cabo este tipo de infertilidad no se conoce; algunos autores proponen la hipótesis de que la activación de la respuesta inmune se inicia por el bloqueo de el moco cervical al paso de los espermatozoides, interferencia en su capacitación, reacción acrosomal y penetración del óvulo.

Otra forma de inducción de isoinmunidad, son las lesiones provocadas en el cérvix por infecciones, el uso de fármacos y de dispositivos intrauterinos (DIU) que producen cambios en la permeabilidad de la mucosa uterina y vaginal, facilitando el paso de proteínas del semen o del espermatozoide al torrente circulatorio, induciendo una respuesta inmune a nivel local en tracto genital (IgAs) o bien sistémico (IgG e IgM) que inhibe la fusión del óvulo con el espermatozoide (14).

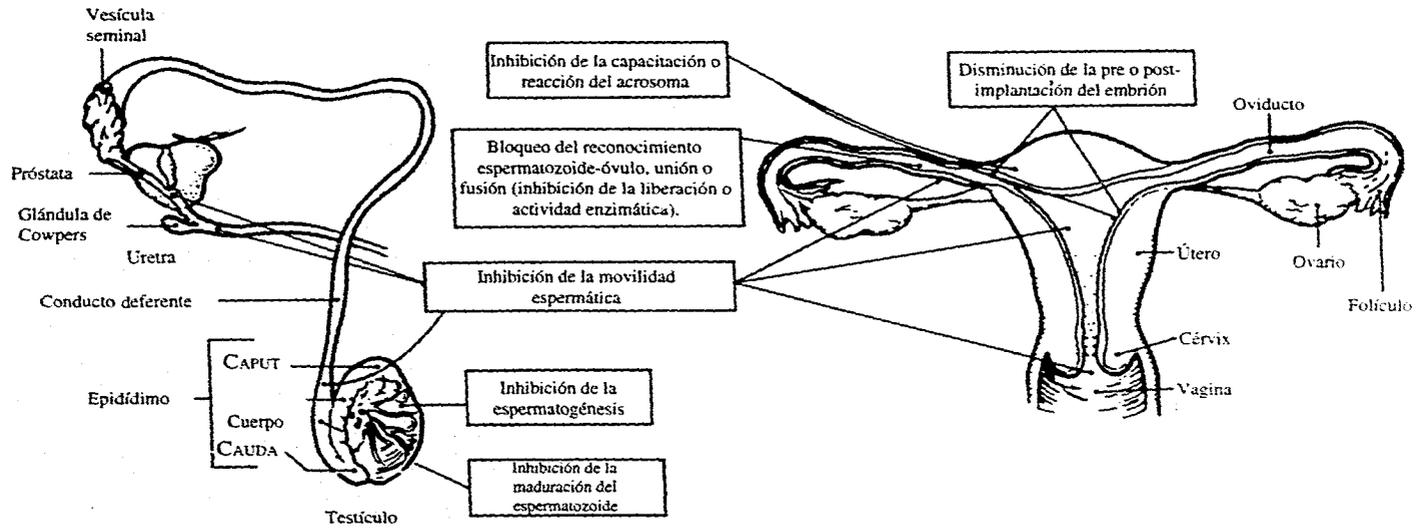


Figura 7. Mecanismos inmunológicos que afectan la fertilidad en los tractos reproductores femenino y masculino.

Los mecanismos por los cuales los AAEsp pueden afectar la fertilidad en el tracto reproductor femenino y masculino se muestran en la figura 7.

7.3. Métodos para la detección de AAEsp.

Las técnicas usadas para la detección de AAEsp han tenido una evolución lenta, desde las técnicas simples de aglutinación directa, hasta las más recientes de radioinmunoanálisis (RIA) y las inmunoenzimáticas (ELISA), la mayoría de ellas diseñadas para detectar AAEsp en muestras de suero. Algunas pruebas generalmente requieren de espermatozoides móviles frescos, tales como las pruebas de aglutinación en placa, inmovilización espermática, citotoxicidad dependiente de complemento e inmunofluorescencia (14,66).

7.3.1 Aglutinación espermática.

Flanklin-Dukes (aglutinación en placa o tubo) y Kilbrick (aglutinación en gelatina) conocidas como TAT (Tray Agglutination), MAT (microagglutination test). Son pruebas simples pero inespecíficas que consisten en colocar muestra de semen y suero en una placa, para observar la aglutinación espermática directamente. La reactividad de los anticuerpos presentes en el suero, depende de los sitios antigénicos disponibles en el espermatozoide, aunque también es probable que se presente entrecruzamiento entre las inmunoglobulinas con material amorfo que se encuentre en el semen, por lo que la interpretación de la prueba puede ser incorrecta (54,66,79,87,88,91).

7.3.2 Reacción de aglutinación mixta (Test IgG MAR).

Esta es una técnica cualitativa y semicuantitativa que consiste en mezclar semen fresco con partículas de látex o con eritrocitos de carnero revestidos de anti-IgG humana. La formación de aglutinados mixtos entre las partículas y los espermatozoides, demuestra la presencia de anticuerpos IgG, cuando el 10-40% o más de espermatozoides tienen partículas adheridas a su superficie se da la prueba como positiva. Este método está considerado por la OMS como el mejor método para el diagnóstico rápido de infertilidad de origen inmunológico (44,73).

7.3.3 Inmunoesferas (Immunobead).

Este método es cualitativo y semicuantitativo y permite la detección, directa en semen e indirecta en suero y moco cervical, de AAEsp. La detección directa consiste en la incubación de la muestra con esferas de poliacrilamida recubiertas con anti-inmunoglobulinas humanas (anti-IgG, anti-IgA, anti-IgM) obtenidas en conejo, unidas mediante enlaces covalentes; los anticuerpos adheridos a los espermatozoides móviles se unen a las anti-inmunoglobulinas unidas a las esferas de poliacrilamida. La reacción se puede observar en un microscopio de contraste de fase, lo cual permite no solamente calcular un porcentaje de espermatozoides recubiertos con inmunoglobulinas, sino también identificar a que porción del espermatozoide se une.

La modalidad indirecta de detección de AAEsp con este método, requiere de espermatozoides normales, los cuales se incuban con la muestra de suero o moco cervical. Los anticuerpos presentes en la muestra se unen a la superficie del espermatozoide y al adicionar las inmunoesferas se forma un complejo que se observa al microscopio de la misma forma que la técnica directa (23,32).

7.3.4 Citotoxicidad dependiente de complemento.

Se basa en la inmovilización del espermatozoide por los anticuerpos citotóxicos capaces de activar el complemento presentes en la muestra (principalmente IgG e IgM), por lo que el resultado de esta prueba depende del tipo de inmunoglobulina presente en la muestra.

7.3.5 Inmunofluorescencia.

Las anti-inmunoglobulinas humanas de tipo IgG e IgM obtenidas en conejo son conjugadas con fluoresceína, la reacción se lleva a cabo en forma directa al mezclar las antiglobulinas marcadas con la muestra de semen en donde los anticuerpos que se unieron al espermatozoide reaccionan con las anti-inmunoglobulinas, la forma indirecta de la reacción consiste en mezclar los anticuerpos presentes en el suero con espermatozoides y después de haberse formado el complejo antígeno-anticuerpo se adiciona la anti-inmunoglobulina marcada y finalmente la preparación se observa en un microscopio fluorescente. Al igual que las técnicas de aglutinación espermática esta técnica puede dar falsos positivos.

7.3.6 Radioinmunoanálisis (RIA).

Las anti-inmunoglobulinas principalmente de tipo IgG son marcadas con un isótopo radiactivo y posteriormente al mezclarse con la muestra de semen (forma directa) reaccionan con el complejo antígeno- anticuerpos, en una muestra de suero (forma indirecta) las inmunoglobulinas presentes se incuban con el antígeno específico y posteriormente al adicionar la anti-inmunoglobulina marcada con el isótopo radiactivo los complejos antígeno-anticuerpo que reaccionaron con las anti-inmunoglobulinas marcadas se cuantifican midiendo la radiactividad.

7.3.7 Ensayo inmunoenzimático (ELISA) indirecto.

Existen de 2 tipos:

a) con extracto de proteínas de membrana de espermatozoide, obtenido por solubilización con detergentes.

b) espermatozoides completos.

Ambos métodos utilizan anti-inmunoglobulinas marcadas con una enzima (peroxidasa, fosfatasa alcalina o glucosa oxidasa), por lo que al adicionar el sustrato de la enzima se forma un producto coloreado que puede ser medido espectrofotométricamente ó pueden obtenerse resultados cualitativos porque la reacción enzimática puede ser evaluada como positiva ó negativa a simple vista.

Aunque la técnica de RIA permite el análisis de numerosas muestras en un día al igual que el ELISA, requiere de medidas especiales de seguridad, debido a su potencial de daño por radiación, así como por el manejo de desechos, por lo que la técnica de ELISA a sustituido al RIA en la mayoría de los laboratorios (5).

IV. MATERIALES Y METODOS.

Este trabajo se realizó en los departamentos de Fisiología de la Nutrición y Biología de la Reproducción del INNSZ. El protocolo de este proyecto fue previamente aceptado para su realización por el Comité de Investigación Biomédica en Humanos (CIBH) del mismo Instituto (anexo 3).

1. Selección de las pacientes.

Se estudiaron 30 pacientes ($x=31$ años, intervalo 23 a 39 años) que asistían a la Clínica de Salud Reproductiva del Departamento de Biología de la Reproducción del INNSZ con problemas de infertilidad y en quienes después de un estudio sistematizado de diagnóstico se estableció que la causa probable eran fenómenos de isoimmunidad, de acuerdo con los siguientes criterios:

1.1 Criterios de inclusión:

- pacientes con infertilidad inexplicable por un período mínimo de 2 años, con historial clínico y examen médico normales.
- pacientes con ciclos menstruales regulares y sin alteraciones endocrinológicas (LH, FSH, prolactina, testosterona, progesterona y estradiol normales)
- pacientes sin problemas de tipo inflamatorio o infeccioso del tracto reproductivo al momento del estudio.
- pacientes sin alteraciones de tipo anatómico (oclusión tubaria, miomas uterinos, etc.), por laparoscopia o histerosalpingonografía.
- pacientes con una adecuada consistencia del moco cervical y que tuvieron un resultado negativo en la prueba de penetración espermática (PPE) (anexo 2), como principal parámetro de evaluación.
- pacientes que aceptaron voluntariamente participar en el estudio (anexo 4).

1.2 Criterios de exclusión: se excluyeron del estudio a aquellas pacientes que presentaban cualquiera de los siguientes características:

- infertilidad atribuible a problemas de tipo infeccioso en el tracto genital (cuello uterino, vagina), de tipo anatómico o endócrino.

- pacientes que cumplieran los criterios de inclusión previamente descritos y que estuvieran recibiendo algún tipo de terapia hormonal (progesterona, estradiol) o con glucocorticoides (cortisona).
- pacientes con problemas de infertilidad atribuible a su pareja, tales como azoospermia, oligozoospermia, astenozoospermia u oligoastenozoospermia.

La selección de las pacientes se resume en la figura 8 que se muestra a continuación:

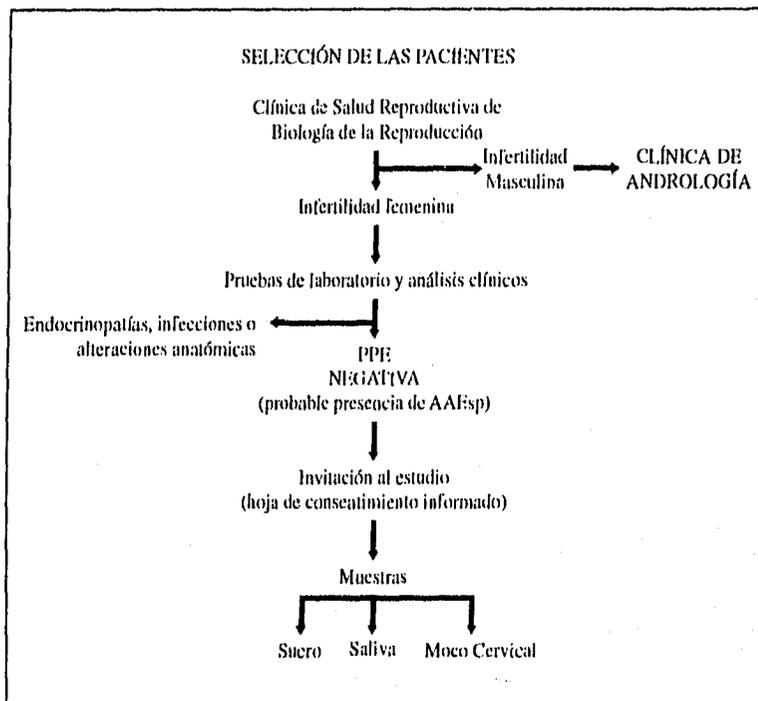


Figura 8. Selección de las pacientes.

2. Número de pacientes.

El número de pacientes incluídas en este estudio, dependió básicamente del total de pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión descritos, durante el periodo de ejecución del proyecto (18 meses).

3. Grupo testigo.

El grupo testigo estuvo integrado por 12 pacientes con las mismas características que el grupo experimental (\bar{x} =27 años, intervalo 25 a 36 años), pero en quienes la causa de su infertilidad era el factor masculino (parejas con azoospermia u oligoastenozoospermia severa), de quienes se obtuvo muestras de suero, saliva y moco cervical como se describirá mas adelante.

Dentro del grupo testigo también se incluyeron a 23 mujeres y a 7 hombres adultos clínicamente sanos (\bar{x} =29 años, intervalo 25 a 36 años), miembros del personal del INNSZ, sin problemas de fertilidad (algunos con fertilidad probada), quienes voluntariamente aceptaron participar en el estudio.

4. Obtención y procesamiento de las muestras.

Una vez seleccionadas las pacientes que conformaron el grupo experimental, así como los pacientes del grupo testigo, se obtuvieron muestras simultáneas de suero, de saliva y de moco cervical, en la fase periovulatoria (días -2 a +2, figura 2) de un ciclo menstrual promedio de 28 días. Para el caso de los voluntarios sanos (hombres y mujeres), sólo se obtuvieron muestras de suero y de saliva de la glándula parótida.

4.1. Obtención de suero sanguíneo.

El suero se obtuvo de una muestra de 10 ml de sangre venosa por venopunción directa y se dejó coagular a temperatura ambiente. La muestra se centrifugó a 3000 rpm por 15 minutos y el suero se separó y se guardó a -20°C hasta el momento de su análisis.

4.2. Obtención de saliva de la glándula parótida.

Las muestras de saliva de la glándula parótida se obtuvieron empleando el dispositivo de Curby (21). Este dispositivo se colocó sobre la "papila parotídea", la cual constituye la desembocadura del conducto parotídeo (conducto de Stenon); ésta se localiza de manera bilateral a la altura del segundo molar superior. El dispositivo se adhirió al carrillo por la aplicación de un pequeño vacío suministrado por un bulbo de goma y se estimuló la secreción de saliva colocando 3 gotas de una solución de ácido cítrico al 10% directamente en la boca de los pacientes. La muestra de saliva se recibió en tubos Eppendorf nuevos (mínimo 0.5 ml) y se congelaron a -20°C hasta el momento de su análisis.

4.3. Obtención del moco cervical.

La obtención del moco cervical se realizó de acuerdo a lo descrito en el Manual de Laboratorio de la OMS, "Examen del semen y el moco cervical" (64).

El cuello uterino se expuso con la ayuda de un espéculo (espejo vaginal) y el orificio externo se limpió de contaminantes vaginales pasando suavemente un hisopo de algodón. El moco cervical se recogió del endocérnix aspirando suavemente con una jeringa para tuberculina (aproximadamente 0.5 ml) y éste se depositó en un tubo Eppendorf nuevo. La obtención del moco cervical se realizó en la fase periovulatoria, debido a que su "filancia" es mayor lo que hace más fácil su obtención, además de ser más receptivo al espermatozoide. La muestra de moco cervical se congeló a -20°C, hasta el momento en que se procesó como se describe a continuación.

A las muestras de moco cervical se añadió un volumen igual de una solución de bromelina (1 mg/ml en PBS) (EC 3.4.22.4, Sigma Chemical Co.) con objeto de hidrolizar los mucopolisacáridos y volverla más fluida. Las muestras se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente y posteriormente la bromelina fue inactivada por calentamiento a 56°C durante 30 minutos (82). La dilución final de la muestra de moco cervical fue 1:2 (17).

4.4. Obtención de muestras de semen.

Para la realización del sistema inmunoenzimático (ELISA) indirecto, se requería de muestras de semen frescas para el aislamiento de células espermáticas completas y usarlas como

antígeno en la fase sólida. Estas muestras de semen se obtuvieron de voluntarios adultos sanos, con un período de abstinencia sexual de 3 a 7 días, sin alteraciones en el espermograma (anexo 5). (13,45).

La muestra de semen se obtuvo por masturbación y se recibió en un frasco de plástico limpio con tapa y se dejó licuefactar 1 hora a temperatura ambiente. La muestra se diluyó en 5 veces su volumen original con amortiguador de fosfatos-glucosa pH=7.0 (anexo 6) y se incubó a 37°C por 15 minutos. La muestra se centrifugó a 400 G (\approx 1500 rpm) durante 15 minutos. El plasma seminal diluido se desechó y el paquete celular se lavó una vez con 10 ml de amortiguador de fosfatos (PBS, 0.1 M, pH=7.3) (anexo 6) y se resuspendió en 10 ml de PBS. Esta suspensión se estratificó sobre 5 ml de Ficoll ($\delta=1.077$ g/ml) y se centrifugó a 400 G (\approx 1500 rpm) durante 30 minutos para eliminar a los linfocitos, los monocitos y las células epiteliales que se encontraban en la interfase Ficoll/PBS. El botón de espermatozoides se resuspendió y se lavó 3 veces con 10 ml de PBS cada vez; después del último lavado, se realizó la cuenta espermática en una cámara de Neubauer tomando una alícuota de 10 μ l de la suspensión celular y se diluyó con 190 μ l (dilución 1:20) de la solución de conteo (Formol-carbonatos-fosfatos, anexo 6) y la densidad celular se ajustó a 5×10^5 espermatozoides/ml para sensibilizar las placas de ELISA.

5. ELISA indirecto para la detección de AAEsp en las muestras de suero, saliva y moco cervical.

La detección de AAEsp en las muestras de suero, saliva y moco cervical se realizó utilizando un sistema inmunoenzimático ELISA de tipo indirecto (anexo 7).

5.1. Sensibilización de las placas de ELISA.

Se usaron placas de poliestireno de 96 pozos con fondo plano (NUNC-F, Dinamarca) como fase sólida. Las placas se sensibilizaron de acuerdo a la técnica descrita por Alexander (5,30), añadiendo 100 μ l de una suspensión de 5×10^5 espermatozoides/ml en PBS (5×10^4 espermatozoides/pozo) y se incubaron a 4°C durante toda la noche. Terminado el tiempo de incubación se desechó el exceso de la suspensión de la placa y se añadieron 100 μ l de metanol absoluto. Las placas se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente para fijar las células

a la placa y el exceso de metanol se desechó por inversión. Enseguida se añadieron 100 μ l de PBS-Tween (Tween 20 al 0.05%, Sigma Chemical Co.) en cada pozo y se incubó la placa durante 3 minutos, con el objeto de eliminar las células que no se fijaron a los pozos. Posteriormente se añadieron 100 μ l de una solución de glicina 0.5 M y la placa se incubó 30 minutos a temperatura ambiente para bloquear los sitios libres en los pozos. El exceso de glicina se eliminó por inversión y las placas se lavaron 3 veces con PBS-Tween dejando reaccionar 3 minutos en cada lavado. Después del último lavado, el PBS-Tween se eliminó por inversión y las placas se dejaron secar al aire a temperatura ambiente.

Las placas así sensibilizadas se usaron inmediatamente para la detección de los AAEsp o bien fueron almacenadas a 4°C cubiertas con parafilm, hasta por 2 semanas.

5.2. Detección de AAEsp de clase IgG e IgA en las muestras de suero, de saliva y de moco cervical.

Para la detección de los AAEsp en las muestras de suero, de saliva y de moco cervical, se emplearon las placas de ELISA sensibilizadas con las células espermáticas como se describió anteriormente.

Para la detección de AAEsp de clase IgG en las muestras de suero, éstas se diluyeron 1:5 en PBS-Tween, de acuerdo a un ensayo previo para determinar la dilución óptima del suero. Para la detección de los AAEsp de clase IgA en las muestras de suero, de saliva y de moco cervical, éstas se usaron sin diluir, es decir 1:1. Cabe recordar que la dilución del moco cervical después del tratamiento con la bromelina, fue de 1:2.

En cada pozo de la placa de ELISA previamente sensibilizada, se añadieron 100 μ l de las muestras por analizar (suero, saliva de parótida y moco cervical) en las diluciones indicadas previamente. Las placas con las muestras se incubaron 1 hora a 37°C y posteriormente se lavaron 3 veces con PBS-Tween.

Para determinar el isotipo de AAEsp en cada una de las muestras, se añadieron 100 μ l de cada uno de los siguientes conjugados: anti-IgG humana preparada en cabra, conjugada con peroxidasa (goat anti-human IgG, γ -chain specific, affinity purified antibody peroxidase conjugate, KPL, Inc.), y un conjugado anti-IgA humana, específico para cadena α y componente secretor, preparado en cabra conjugado con peroxidasa (goat anti-human secretory IgA, α -chain

and secretory component specific, peroxidase conjugate, USB). Ambos conjugados se utilizaron diluidos 1:50,000 en PBS-Tween. Las placas se incubaron 1 hora a 37 °C y se lavaron 4 veces con PBS-Tween en la forma descrita anteriormente.

Posteriormente se adicionaron 100µl de la solución del sustrato de la peroxidasa (H₂O₂, o-fenilendiamina) en amortiguador de fosfatos-citratos (anexo 8) y la reacción se dejó transcurrir a temperatura ambiente durante 15 minutos exactos (con cronómetro).

La reacción enzimática se detuvo adicionando 50µl de una solución de H₂SO₄ 2.5 M y la absorbancia se leyó a 492 nm utilizando un lector de placas de ELISA MR 600 (Dynatech Laboratories, Inc.).

Como control positivo de este ensayo se utilizó un suero humano con anticuerpos anti-esperma de clase IgG, donado por el Dr. John Herr de la Universidad de West Virginia U.S.A. (anexo 11) Como control negativo se usaron el suero y la saliva de los voluntarios sanos, y el moco cervical de las pacientes cuyo problema de infertilidad era atribuible a su pareja.

La especificidad del sistema ELISA se determinó mediante la inclusión de "blancos" o "controles" en diferentes pozos de la placa de microtitulación. Estos "blancos" se diseñaron con el fin de determinar las uniones inespecíficas que pudieran ocurrir entre las proteínas que constituyeron el sistema de detección, es decir, las células espermáticas, la glicina, las proteínas presentes en las muestras (suero, saliva, moco cervical) y los conjugados anti-IgG y anti-IgA humanas; dichos pozos "control" se prepararon adicionando o eliminando, una a la vez, cada una de las proteínas o las células espermáticas que se usaron en el sistema de detección (35).

6. Detección de AAEsp dirigidos contra el extracto de proteínas de membrana de espermatozoide (EPME) por la técnica de "Western Blot" en las muestras de suero, de saliva y de moco cervical.

Además de la detección de AAEsp en las muestras de suero, saliva y moco cervical, usando espermatozoides completos como antígeno, se realizó una caracterización parcial de los antígenos espermáticos contra los cuales estaban dirigidos los AAEsp. Dicha caracterización consistió en extraer las proteínas de membrana del espermatozoide mediante solubilización con detergentes, su separación mediante electroforesis y su transferencia a membranas de

nitrocelulosa (NC). Posteriormente las membranas de NC se incubaron con las muestras que resultaron positivas en el análisis hecho por ELISA.

6.1 Obtención del extracto de proteínas de membrana de espermatozoide (EPME), mediante solubilización con detergentes.

Para obtener el extracto de proteínas de la membrana de los espermatozoides (EPME), se recolectaron muestras de semen de voluntarios sanos como se describió anteriormente, previa aceptación por escrito (anexo 5). La extracción de las proteínas de membrana se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Zaneveld, en la cual después del aislamiento y la purificación de los espermatozoides con el gradiente de Ficoll, el paquete celular (aproximadamente 60×10^6 células/muestra), se lavó 3 veces con una solución 10mM de PMSF (fenil metil sulfonil fluoruro, Sigma Chemical Co.) en PBS, con objeto de inhibir a las proteasas presentes en la muestra de semen (11,56,78).

Después del último lavado, el paquete celular se resuspendió en 0.5 ml de PBS con PMSF y Tritón X-100 al 0.01% (Sigma Chemical Co) y se incubó toda la noche con agitación a 4°C para extraer las proteínas de la membrana de los espermatozoides. Después de esta incubación, la suspensión se centrifugó a 1500 G por 15 minutos; el paquete celular se desechó y en el sobrenadante se determinó su concentración total de proteínas por el método de Lowry, usando albúmina sérica bovina (BSA, Sigma Chemical Co) como proteína de referencia (anexo 9). Esta solución se esterilizó por filtración en membranas Millipore de 0.22 μm de poro y constituyó el **Extracto de Proteínas de Membrana de Espermatozoide (EPME)** (3,12, 18,50,56,60,80,100). El EPME se guardó en congelación a -20°C hasta el momento del análisis.

6.2. Electroforesis del EPME en geles de poli(acrilamida) (PAGE).

Las proteínas contenidas en el EPME fueron separadas por electroforesis en geles discontinuos de poli(acrilamida) al 5% (gel concentrador) y al 10% (gel separador) en condiciones semidesnaturalizantes (con SDS, con β -mercaptoetanol y sin calentamiento) de acuerdo a las técnicas descritas en la literatura (15,34,56,86) (anexo 10).

La cantidad de proteína que se aplicó en los geles del EPME fue de 20 μg /carril, en un volumen de 20 μl de solución amortiguadora de la muestra (Tris-SDS-glicerol, anexo 10),

usando azul de bromofenol al 0.1% como marcador del frente de corrida. En el mismo gel se depositaron 2 μ l de marcadores de bajo peso molecular (Low molecular weight markers, Bio-Rad Laboratories, USA) en 10 μ l del amortiguador de la muestra. Los marcadores de bajo peso molecular fueron las siguientes proteínas: fosforilasa B (92.5 KD), albúmina sérica bovina (BSA, 66.2 KD), ovoalbúmina (OVA, 45.0 KD), anhidrasa carbónica (29.0 KD), inhibidor de tripsina (20.1 KD) y lisozima (14.3 KD).

La electroforesis se realizó en una cámara vertical Mini-Protean II (Bio-Rad Laboratories, USA) con un voltaje de 100 V y una corriente de 8 mA, durante 2 horas a temperatura ambiente. El amortiguador de corrida fue una solución de Tris-glicina 0.1 M pH= 8.3 con SDS (anexo 10). El EPME se aplicó por duplicado en los geles de poliacrilamida, ya que la mitad del mismo se tiñó con azul brillante de Coomassie R-250 (Sigma Chemical Co.) al 0.025%, y la otra mitad del gel se usó para realizar el Western Blot.

6.3. Western Blot del EPME con las muestras de suero, de saliva y de moco cervical.

Después de la electroforesis, las proteínas del EPME se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (NC) de 0.45 μ m de poro (Bio-Rad Laboratories, USA), en una cámara vertical para transferencia (Mini Trans-blot electrophoretic transfer cell, Bio-Rad Laboratories, USA) con una solución de Tris-SDS-metanol como amortiguador de transferencia (anexo 10). La transferencia se realizó con un voltaje de 100V y una corriente de 250 mA, por 1 hora a 4°C y con agitación magnética constante (10,63,90).

Después de la transferencia de las proteínas, el resto de la membrana de nitrocelulosa se bloqueó con una solución de leche descremada "Svelty" (Nestlé-México) al 10% en PBS-Tween, por 1 hora a temperatura ambiente y con agitación constante. Después de la incubación la membrana se lavó 3 veces con PBS-Tween en la forma descrita anteriormente.

Para la detección de los AAEsp dirigidos contra el EPME, la membrana de NC se incubó con 2 ml de las muestras de suero, de saliva y de moco cervical por separado, de la siguiente manera:

- Para la detección de los AAEsp de clase IgG en el suero humano, éste se diluyó 1:5 en PBS-Tween, mientras que para la detección de los AAEsp de clase IgA, el suero se utilizó sin diluir (1:1).
- Para la detección de los AAEsp de clase IgA en las muestras de saliva, éstas se aplicaron sin diluir (1:1).
- Para la detección de los AAEsp de clase IgA en las muestras de moco cervical, éstas se aplicaron diluidas 1:2 (por el tratamiento previo con la bromelina).
- Como **control positivo** del Western Blot se usó el suero AAEsp de clase IgG (donado por el Dr. John Herr, Univ. de West Virginia, USA), diluido 1:5 en PBS-Tween.
- Como **controles negativos** se usaron las siguientes muestras:
 - suero y saliva de los voluntarios sanos y de las mujeres cuyo problema de infertilidad era debido a su pareja.
 - moco cervical de las mujeres cuyo problema de infertilidad era debido a su pareja.

Las membranas de NC con las diferentes muestras, se incubaron por 2 horas a temperatura ambiente y con agitación constante. La membrana se lavó 3 veces con PBS-Tween en la forma descrita anteriormente.

Después del último lavado las membranas de NC se incubaron con 2 ml de cada uno de los siguientes conjugados, durante 1 hora a temperatura ambiente y con agitación constante:

- anti-IgG humana preparado en cabra, conjugado con peroxidasa (goat anti-Human IgG, γ -chain specific, peroxidase conjugate, KPL) diluido 1:500 en PBS-Tween.
- anti-IgA humana específico para cadena α y componente secretor preparado en cabra, conjugado con peroxidasa (goat anti-human secretory IgA, α -chain and secretory component-specific, peroxidase conjugate, USB), diluido 1:500 en PBS-Tween.

Las membranas de NC se lavaron 5 veces con PBS-Tween como se describió previamente.

Para revelar el sitio donde había ocurrido la reacción antígeno-anticuerpo entre las proteínas del EPME y los anticuerpos presentes en las muestras, las membranas de NC se sumergieron en la solución reveladora de la peroxidasa (4-cloro-1-naftol y H_2O_2 , anexo 10), hasta la aparición de las bandas (10 a 15 minutos).

La reacción enzimática de la peroxidasa se detuvo sumergiendo la membrana de NC en una caja Petri con H_2O destilada. Las membranas se secaron a temperatura ambiente y se guardaron en bolsas de plástico selladas para su conservación.

7. Análisis estadístico

Con los valores de absorbancia para los AAEsp de clase IgG e IgA en las muestras de suero y saliva de los sujetos voluntarios sanos, y de clase IgA en el moco cervical de las mujeres con infertilidad atribuible a su pareja, se calcularon el promedio (\bar{x}), la desviación estándar (DE) y el error estándar de la media (EEM). Con estos datos se calcularon los intervalos de confianza (IC) al 95% ($IC_{95\%}$) y al 99% ($IC_{99\%}$) del promedio del grupo testigo para cada clase de anticuerpo (IgG e IgA), en las diferentes muestras estudiadas (22).

Con los valores de la media y la DE del grupo testigo, se calcularon -además- los límites de especificidad del ensayo, es decir, los "puntos de corte" para establecer si las muestras de las pacientes (suero, saliva o moco cervical), eran "positivas" o "negativas" para la presencia de AAEsp de clase IgG o IgA.

Las diferencias en la proporción de los pacientes de ambos grupos estudiados (con infertilidad isoimmune y con infertilidad de origen "desconocido") que presentaron AAEsp de clase IgG e IgA, se analizaron mediante el cálculo del "puntaje Z" y la prueba "t de Student".

La asociación entre la presencia simultánea de AAEsp de clase IgG o IgA en las muestras de suero, saliva y moco cervical, se realizó construyendo tablas de contingencia de 2x2, las cuales se analizaron con la prueba Chi-cuadrada (χ^2) y con corrección de Yates. En los casos en que el número de pacientes fue menor de 20, o se presentaron celdas con un número de casos inferior a 5, se aplicó la prueba exacta de Fisher. Con estas tablas también se calcularon la razón de momios (RM) y el riesgo relativo (RR), cada uno con sus respectivos $IC_{95\%}$, utilizando el paquete estadístico EPIINFO, versión 5.01.

La posible utilidad de la detección de los isotipos de AAEsp (IgG o IgA) para el diagnóstico de infertilidad femenina de tipo inmunológica, se determinó calculando la especificidad, la sensibilidad, el valor diagnóstico, la tasa de falsos positivos y la tasa de falsos negativos, para el sistema ELISA que se desarrolló en el presente estudio (que utiliza células espermáticas completas como antígeno).

V. RESULTADOS Y DISCUSION

I. Especificidad del ELISA indirecto para la detección de AAEsp.

Antes de analizar las muestras obtenidas de las pacientes se realizó un ensayo inmunoenzimático con un suero control positivo humano, el cual se sabía que contenía anticuerpos anti-esperma de clase IgG, para probar la especificidad del sistema de detección. Este anticuerpo fue donado por el Dr. John C. Herr, de la Universidad de West Virginia, USA (anexo 11). El ensayo se realizó en placas de ELISA sensibilizadas con espermatozoides humanos y en las condiciones que se describieron en los Materiales y Métodos. El suero control positivo se analizó por triplicado haciendo 8 diluciones seriadas, cada vez al doble, a partir de una dilución 1:25 hasta una dilución 1:3200.

Los valores de absorbancia obtenidos con el suero control positivo para este ensayo, se muestran en el cuadro 1.

CUADRO 1. Valores de absorbancia ($\lambda=490$ nm) del ELISA indirecto para la detección de AAEsp, con el suero control positivo humano.

Dilución del suero	Promedio (n=3)	Desviación Estándar
1:25	2.0	0
1:50	1.88	0.028
1:100	1.29	0.042
1:200	0.959	0.003
1:400	0.685	0.007
1:800	0.518	0.003
1:1600	0.381	0.009
1:3200	0.325	0.007

En la figura 9 se observa que al realizar las diluciones del suero control positivo, se presenta un comportamiento sigmoideal, típico de estos ensayos (15.35). En el caso de que se obtenga cualquier otro tipo de curva, diferente a una sigmoide, esto sugiere que se presentan

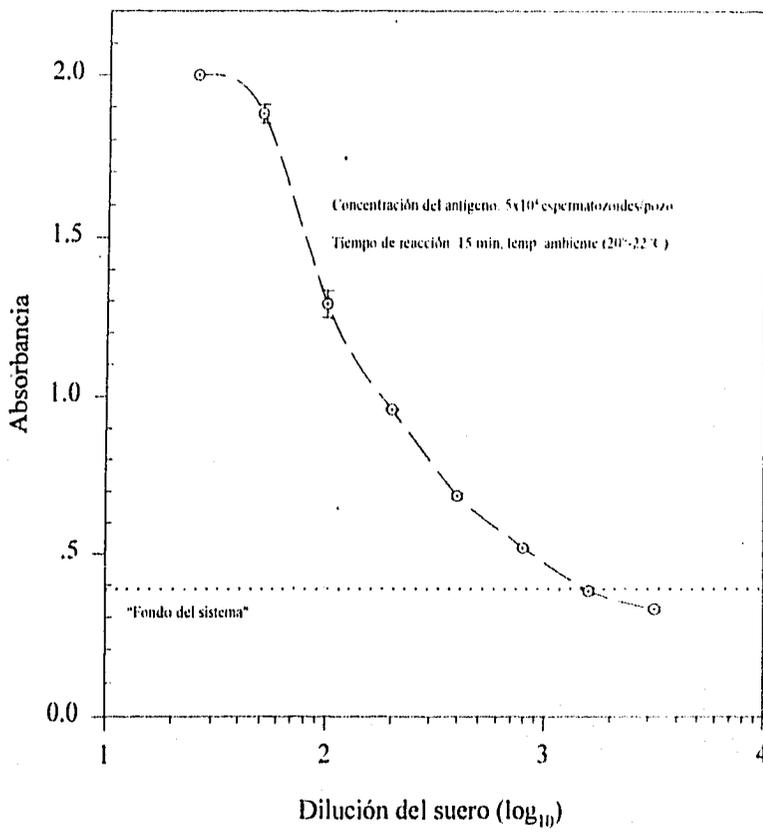


Figura 9. Titulación de AAEsp de clase IgG en el suero control positivo.

problemas inmunoquímicos tales como impedimento estérico o falta de antígeno adsorbido a la fase sólida. Esto se puede resolver determinando el efecto de las células (espermatozoides) y las proteínas que constituyen el sistema de detección sobre la especificidad del sistema (cuadro 2).

CUADRO 2. Efecto de las proteínas usadas en el sistema de detección en la especificidad del ELISA para AA Esp de clase IgG.

No. de Blanco	Antígeno (espermatozoides)	Glicina	Muestra (suero)*	Conjugado (anti-IgG-HRP)	Sustrato (OPD)	Absorbancia 490 nm**
1	-	-	-	-	+	0.001
2	+	+	-	+	+	0.394
3	-	+	-	+	+	0.008
4	+	+	+	-	+	0.004
5	-	+	+	+	+	0.035

* se usó el suero control positivo con anticuerpos anti-esperma de clase IgG.

** promedio de n=3

Como se puede observar en el cuadro 2, los valores de absorbancia de los blancos elaborados para este sistema inmunoenzimático, apoyan la especificidad del mismo:

- no existe actividad enzimática en la fase sólida (blanco No.1), ni en los espermatozoides o las proteínas empleadas en el sistema de detección (blanco No. 4).
- el conjugado anti-IgG-HRP es específico para los anticuerpos AA Esp que pudieran estar presentes en la muestra de suero, ya que éste no reaccionó con la glicina que se empleó para "bloquear" los sitios libres en los pozos (blanco No. 3).
- la glicina bloqueó totalmente los pozos ya que al adicionar la muestra de suero, no hubo ninguna unión inespecífica entre las proteínas del suero y la fase sólida (blanco No. 5).
- únicamente se presentaron uniones inespecíficas entre el conjugado anti-IgG-HRP y el complejo formado por las células espermáticas adsorbidas a la fase sólida y la glicina (blanco No. 2); la absorbancia que se obtuvo con este blanco (0.394) puede considerarse

como el "fondo" del sistema (figura 9), y correspondería a una dilución *ad infinitum* de una muestra de suero. El efecto de este blanco en el sistema de detección, se puede eliminar restándolo a todos los valores de absorbancia que se obtengan de las muestras de suero analizadas con este ensayo.

Con base en los resultados obtenidos con los diferentes "blancos" elaborados para este sistema ELISA, los blancos No.1 y 2 siempre fueron incluidos en todos los ensayos para la detección de los AAEsp en las muestras de suero, de saliva y de moco cervical. Cabe recordar que la detección de los AAEsp de clase IgA, se hizo utilizando el conjugado anti-IgA-SC-HRP, el cual se añadió en el blanco No.2 de estos ensayos.

2. Valores del grupo testigo en el ELISA indirecto para la detección de AAEsp.

Con las muestras de suero, de saliva y de moco cervical que se obtuvieron del grupo testigo (hombres y mujeres sanos, y mujeres infértiles cuyo problema era atribuible a su pareja), se realizaron diferentes ensayos para la IgG y la IgA de estas muestras en las mismas condiciones que se utilizaron para la IgG del suero control positivo, con el propósito de calcular la \bar{x} , la DE y el error estándar de la media (EEM). Los resultados de estos ensayos se muestran en el cuadro 3.

CUADRO 3. Valores de absorbancia del suero, la saliva y el moco cervical del grupo testigo.

	IgG en suero	IgA en suero	IgA en saliva	IgA en moco cervical
n	30	30	30	12
\bar{x}	1.06	0.075	0.213	0.183
DE	0.216	0.058	0.123	0.096
EEM	0.039	0.011	0.022	0.028

Con los valores de absorbancia de cada clase de anticuerpo en las muestras de suero, de saliva y de moco cervical del grupo testigo, se calcularon los intervalos de confianza (IC) de la media al 95% y al 99% de la siguiente manera:

* Ejemplo del cálculo del IC_{95%} para la IgG en suero:

$$IC_{95\%} = (\bar{x}) \pm (\text{valor crítico al 95\% para la prueba "t"})(EEM)$$

$$IC_{95\%} = (1.06) \pm (2.042)(0.0394)$$

$$IC_{95\%} = 0.979 \text{ a } 1.140$$

* Ejemplo del cálculo del IC_{99%} para la IgG en suero:

$$IC_{99\%} = (\bar{x}) \pm (\text{valor crítico al 99\% para la prueba "t"})(EEM)$$

$$IC_{99\%} = (1.06) \pm (2.750)(0.0394)$$

$$IC_{99\%} = 0.951 \text{ a } 1.168$$

Los IC al 95% y al 99% de la media para la IgA del suero, de la saliva y del moco cervical, se calcularon de la misma manera que para la IgG y se muestran en el cuadro 4.

CUADRO 4. Intervalos de confianza al 95% y al 99% de la media de las absorbancias ($\lambda=490$ nm) del grupo testigo.

Intervalo de confianza	IgG en suero	IgA en suero	IgA en saliva	IgA en moco cervical
95 %	0.979 a 1.140	0.053 a 0.097	0.190 a 0.235	0.121 a 0.244
99 %	0.952 a 1.168	0.046 a 0.104	0.151 a 0.275	0.096 a 0.270

Con los valores de la media (\bar{x}) y la desviación estandar (DE) obtenidos del grupo testigo para cada clase de inmunoglobulina, se calcularon los límites superiores ($\bar{x} + 1DE$ y $\bar{x} + 2DE$) para establecer "puntos de corte" y poder determinar cuáles muestras de las pacientes eran "positivas" o "negativas" para la presencia de AAEsp.

Para la IgG en el suero y para la IgA en el moco cervical, se consideraron positivas las muestras cuya absorbancia fuera mayor o igual al promedio más una desviación estándar ($\geq \bar{x} + 1DE$). Esto se decidió debido a que en el caso de la IgG en el suero, la media de las absorbancias del grupo testigo es muy alta ($\bar{x} = 1.06$) y ésta se encuentra a la mitad del valor máximo de la escala de absorbancia que es de 2.0, por lo que si se utiliza el valor del $\bar{x} + 2DE$ (1.494) como punto de corte, únicamente se tendría la cuarta parte superior de la escala para determinar las muestras que serían positivas. Por lo anterior el valor de absorbancia que se consideró como punto de corte fue el del $\bar{x} + 1DE$ (1.276).

Para el caso de la IgA en moco cervical el valor promedio de absorbancia que se obtuvo del grupo testigo fue de 0.183, por lo que al sumarle 1DE (0.096) el valor que se usó como punto de corte fue de 0.279. Esto se hizo así porque el número de muestras de moco cervical que se usaron fueron 12, por lo que la dispersión de los datos era más alta.

Para la IgA en suero y en saliva, las muestras con valores de absorbancia mayores o iguales al valor del promedio del grupo testigo más dos desviaciones estándar ($\geq \bar{x} + 2DE$) se consideraron positivas para la presencia de AAEsp, el cual para el caso de la IgA en suero fue de 0.192 y para la IgA en saliva fue de 0.459; todas las absorbancias de las muestras que estuvieron por abajo de estos valores se consideraron como negativas.

Los valores de absorbancia que se usaron como "puntos de corte" para cada clase de inmunoglobulina se muestran en el cuadro 5.

CUADRO 5. Puntos de corte establecidos a partir de la absorbancia ($\lambda = 490$ nm) del grupo testigo

Límite superior	IgG en suero	IgA en suero	IgA en saliva	IgA en moco cervical
$\bar{x} + 1DE$	1.276	0.133	0.336	0.279
$\bar{x} + 2DE$	1.494	0.192	0.459	0.375

- los números **sombreados** corresponden a los valores de absorbancia que se utilizaron como "puntos de corte" para cada clase de inmunoglobulina.

3. Detección de AAEsp en las muestras de suero, de saliva y de moco cervical de las pacientes.

Con los puntos de corte establecidos para definir como positivas o negativas las muestras de suero, saliva y moco cervical de las 30 pacientes con problemas de infertilidad, se obtuvieron los resultados que se muestran en el cuadro 6 y en las figuras 10 a 13.

Se detectaron AAEsp en 21 de las 30 pacientes (70%) en al menos, una de sus muestras estudiadas. Es importante señalar que de las 9 pacientes restantes, en 5 de ellas no se detectó la presencia de AAEsp en ninguna de sus muestras (pacientes Nos. 5, 17, 18, 19 y 23), mientras que en las otras 4 (pacientes Nos. 20, 21, 22 y 30), no se detectaron AAEsp en sus muestras de suero ni saliva, pero no se contó con una muestra adecuada de moco cervical para realizar el estudio (por contaminación con sangre).

El isotipo de AAEsp que se detectó con mayor frecuencia fue la IgA en el suero (19 pacientes, 63.3%, figura 10), después la IgG en el suero (16 pacientes, 53.3%, figura 11), le siguió la IgA en la saliva (15 pacientes, 50.0%, figura 12) y por último la IgA en el moco cervical (4 pacientes, 19.0%, figura 13).

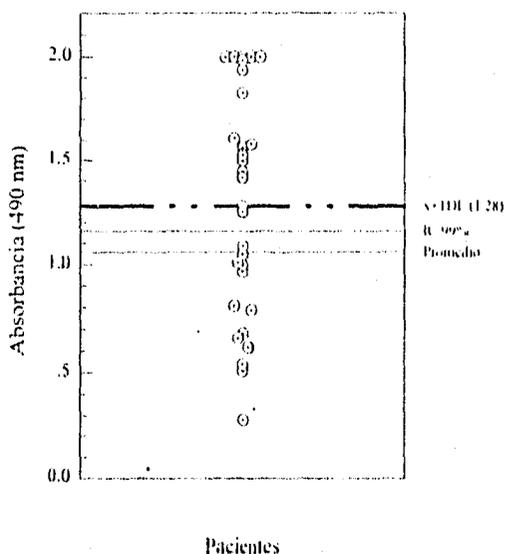


Figura 10. AAEsp de clase IgG en suero.

CUADRO 6. Detección de AAEsp en las muestras de las pacientes estudiadas.

Paciente	IgG en suero	IgA en suero	IgA en saliva	IgA en moco cervical
1	+	+	+	+
2	-	+	+	-
3	+	+	+	+
4	+	+	+	+
5	-	-	-	-
6	+	+	+	-
7	+	+	-	NSM*
8	+	+	+	-
9	+	+	+	NSM
10	-	+	-	-
11	+	+	-	-
12	+	-	-	NSM
13	-	+	-	NSM
14	+	+	+	-
15	+	+	+	-
16	-	+	+	NSM
17	-	-	-	-
18	-	-	-	-
19	-	-	-	-
20	-	-	-	NSM
21	-	-	-	NSM
22	-	-	-	NSM
23	-	-	-	-
24	+	+	+	-
25	+	+	+	-
26	+	+	-	-
27	-	+	+	-
28	+	-	+	-
29	+	+	+	+
30	-	-	-	NSM
No. de casos positivos	16	19	15	4
No. Total de pacientes	30	30	30	21

*NSM. No se midió por contaminación de la muestra con sangre.

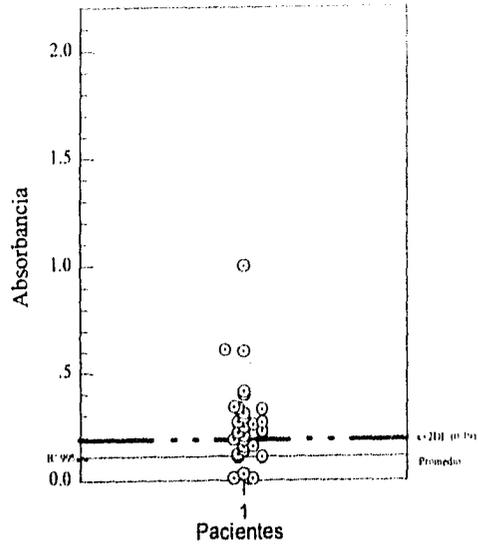


Figura 11. AAEsp de clase IgA en suero.

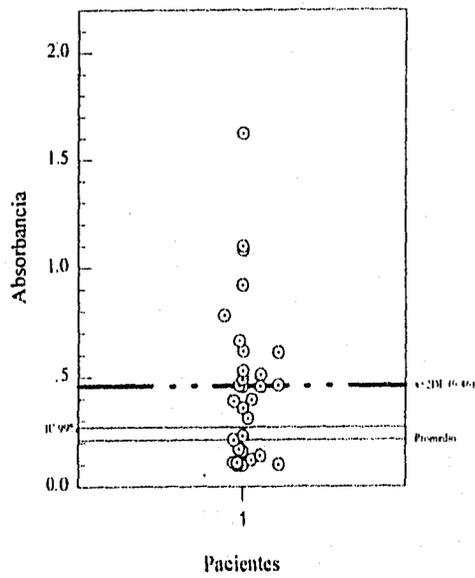


Figura 12. AAEsp de clase IgA en saliva.

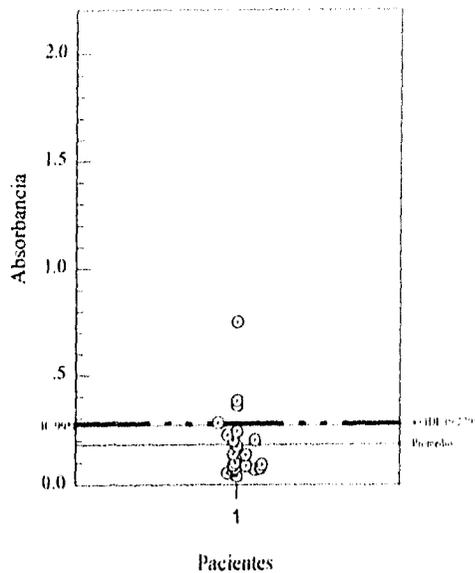


Figura 13. AAEsp de clase IgA en moco cervical.

4. Asociación entre la presencia simultánea de AAEsp en las muestras de suero, de saliva y de moco cervical.

Con objeto de conocer la posible asociación entre la presencia simultánea de AAEsp de clase IgG o IgA en las muestras de suero, saliva y moco cervical, se realizó un análisis estadístico construyendo tablas de contingencia de 2x2 como se muestra en los cuadros 7 a 12.

Únicamente se encontró una asociación significativa entre la IgG del suero con la IgA del suero (cuadro 7, $p=0.0033$) y entre la IgA de la saliva con la IgA del suero (cuadro 8, $p=0.0006$). La presencia simultánea de AAEsp de clase IgG en suero y de clase IgA en saliva, presentó una tendencia a ser significativa (cuadro 9, $p=0.0654$), mientras que para el caso de los AAEsp de clase IgA en el moco cervical, no se encontró ninguna asociación significativa con las muestras de suero o saliva por el número de casos positivos que resultaron para esta muestra. Sin embargo, en las 4 pacientes que fueron positivas en la muestra de moco cervical también se detectaron AAEsp de clase IgG e IgA en el suero y de clase IgA en la saliva.

CUADRO 7. Asociación de AAEsp de clase IgG en suero con IgA en suero.

		IgA en suero		
		+	-	
IgG en suero	+	14	2	16
	-	5	9	14
		19	11	30

$\chi^2=8.62$ **p=0.0033**
 χ^2 (Yates)=6.54 p=0.0105
 RM=12.6 (IC_{95%} = 1.61 a 143.86)
 RR= 2.45 (IC_{95%} = 1.18 a 5.07)

CUADRO 8. Asociación de AAEsp de clase IgA en saliva con IgA en suero.

		IgA en suero		
		+	-	
IgA en saliva	+	14	5	19
	-	1	10	11
		15	15	30

$\chi^2=11.63$ **p=0.00065**
 χ^2 (Yates)=9.19 p=0.0024
 RM=28.0 (IC_{95%} = 2.47 a 1298.61)
 RR= 8.11 (IC_{95%} = 1.23 a 53.54)

CUADRO 9. Asociación de AAEsp de clase IgG en suero con IgA en saliva.

		IgA en saliva		
		+	-	
IgG en suero	+	9	4	13
	-	6	11	17
		15	15	30

$\chi^2=3.39$ $p=0.0654$
 χ^2 (Yates)=2.17 $p=0.140$
 RM=4.13 (IC_{95%} = 0.71 a 25.90)
 RR= 1.96 (IC_{95%} = 0.94 a 4.11)

CUADRO 10. Asociación de AAEsp de clase IgG en suero con IgA en moco cervical.

		IgA en moco cervical		
		+	-	
IgG en suero	+	4	9	13
	-	0	8	8
		4	17	21

$\chi^2=3.04$ $p=0.081$
 χ^2 (Yates)=1.37 $p=0.24$
 RM= indefinido
 RR= indefinido

CUADRO 11. Asociación de AALisp de clase IgA en suero con IgA en moco cervical.

		IgA en moco cervical		
		+	-	
IgA en suero	+	4	11	15
	-	0	6	6
		4	17	21

$\chi^2=1.98$ $p=0.159$
 χ^2 (Yates)=0.63 $p=0.429$
 RM = indefinido
 RR = indefinido

CUADRO 12. Asociación de AAEsp de clase IgA en saliva con IgA en moco cervical.

		IgA en moco cervical		
		+	-	
IgA en saliva	+	4	9	13
	-	0	8	8
		4	17	21

$\chi^2=3.04$ $p=0.081$
 χ^2 (Yates)=1.37 $p=0.24$
 RM = indefinido
 RR = indefinido

Es importante destacar que el número de pacientes con AAIs_{sp} de clase IgA en el moco cervical (4 pacientes), fue menor a lo que se hubiera esperado. Esto pudo deberse a la acción de las hormonas sexuales esteroides (principalmente E₂ y P₄) sobre el sistema inmune secretor en el aparato reproductor femenino.

Diferentes estudios realizados en animales han mostrado que las hormonas sexuales femeninas tienen un gran efecto sobre la respuesta inmune secretora, ya que tanto la concentración de inmunoglobulinas (IgG, IgA) como del CS en las secreciones uterinas, están controladas por estrógenos y progesterona.

Actualmente se sabe que el E₂ tiene un efecto dual sobre la síntesis de IgAs por los linocitos presentes en el cérvix: en bajas concentraciones el E₂ estimula la síntesis de IgAs, mientras que en altas concentraciones (dosis experimentales) tiene un efecto supresor. Por el otro lado, la P₄ solo ejerce un efecto supresor de la síntesis de IgA (37,93,94,96).

De manera similar, la síntesis y la secreción del CS por las células epiteliales que recubren el tracto reproductor femenino, están controlados por la acción de las hormonas sexuales femeninas principalmente por estrógenos: la concentración de CS en las secreciones uterinas de ratas, aumenta durante el proestro (similar a la fase folicular en humanos), así como también aumenta por la adición exógena de E₂ en animales castrados. También se ha demostrado que la concentración de CS en las secreciones uterinas aumenta durante la fase folicular del ciclo menstrual en la mujer (83).

El aumento observado en la concentración de IgAs en los fluidos uterinos, se debe a un aumento en el transporte de IgA mediado por CS, el cual es estimulado por los estrógenos, más que a un efecto directo sobre la producción de IgA por las células plasmáticas localizadas bajo el epitelio uterino (81,93).

Con base en lo anterior, es posible que el tiempo al que se obtuvieron las muestras de moco cervical de las pacientes, sea un factor que no debe dejar de considerarse: las muestras de moco cervical se obtuvieron en la fase periovulatoria (días -2 a +2, de un ciclo menstrual promedio de 28 días), en donde tanto el E₂ como la P₄ se encuentran en bajas concentraciones en el suero. Esto pudo producir que la concentración de IgAs en el moco cervical se encuentre en bajas concentraciones, ya que todas las pacientes tenían un perfil endocrinológico normal.

Este comportamiento de la IgAs también se ha demostrado en el ciclo menstrual de la rata y en la saliva de glándula parótida en humanos (33,87,90-94).

Una posible solución a este problema, sería el tomar la muestra de moco cervical durante la fase folicular del ciclo menstrual. Por un lado, la concentración de IgAs en el moco cervical contiene una mayor concentración de anticuerpos IgAs por el efecto estimulador del estradiol, aunque por el otro, debido a la gran viscosidad del moco cervical, su obtención únicamente podría realizarse mediante lavados uterinos con solución salina, lo cual a su vez podría producir una disminución en la concentración de los anticuerpos presentes en el moco cervical.

Otra posible explicación del reducido número de pacientes que presentaron AAEsp de clase IgA en el moco cervical, puede encontrarse en el tratamiento de la muestra. Como se describió anteriormente, los mucopolisacáridos de las muestras de moco cervical fueron parcialmente hidrolizados por la adición de un volumen igual de una solución de bromelina, lo que al final resultó en una dilución 1:2 de la muestra y en una reducción de la concentración de IgAs en el moco cervical (32,82).

5. Proporción de las pacientes que presentaron AAEsp.

De acuerdo al resultado positivo o negativo para la presencia de AAEsp en las muestras de suero, de saliva y de moco cervical de las 30 pacientes (cuadro 6), se realizó una revaloración acerca de la probable causa de su infertilidad, confrontando su historial clínico con el resultado de la prueba ELISA.

Con base en lo anterior se determinó que en 15 de las pacientes existía un factor de tipo isoimmune (PPE negativa y presencia de AAEsp en, al menos, una de sus muestras analizadas), mientras que en las 15 pacientes restantes, se determinó que su problema de infertilidad era de "causa no determinada" (no obstante que algunas de ellas presentaran una PPE negativa, con o sin la presencia de AAEsp en alguna de sus muestras)

Por lo anterior las pacientes fueron divididas en dos grupos: en el grupo I se incluyeron a las 15 pacientes con infertilidad "isoimmune", mientras que en el grupo II se incluyeron a las 15 pacientes restantes con infertilidad de "causa no determinada". El análisis de los resultados se realizó, posteriormente, considerando la existencia de estos dos grupos de pacientes.

Se realizó un análisis para determinar la proporción de las pacientes que presentaron AAEsp de clase IgG o IgA en sus muestras analizadas, de acuerdo con el origen de su problema de infertilidad; el resultado de este análisis se muestra en el cuadro 13.

CUADRO 13. Proporción de los isotipos de AAEsp en las pacientes con infertilidad de origen "isoimmune" y con infertilidad de "causa no determinada".

Isotipo de AAEsp	Grupo I (n=15) Infertilidad de origen isoimmune	Grupo II (n=15) Infertilidad de causa no determinada	p**
IgG en suero	13*	3	p<0.01
IgA en suero	12	7	p<0.05
IgA en saliva	11	4	p<0.01
IgA en moco cervical	4	0	ns

* se informa el número de pacientes que fueron positivas para la detección de AAEsp del isotipo indicado, en cada grupo.

** se realizó un análisis para determinar si existían diferencias en la proporción de pacientes de cada grupo, con cada isotipo de inmunoglobulina.

La proporción de pacientes del grupo I que presentaron AAEsp de clase IgG en el suero fue significativamente mayor ($p < 0.01$) que la proporción de pacientes del grupo II para la misma clase de inmunoglobulina; lo mismo ocurrió para el caso de la IgA en el suero ($p < 0.05$) y para la IgA en la saliva ($p < 0.01$). Por otro lado, la proporción de pacientes del grupo I que presentaron AAEsp de clase IgA en el moco cervical no fue estadísticamente significativa, lo cual como se discutió anteriormente, puede deberse al efecto producido por las hormonas sexuales, a la dilución de la muestra, o a ambas.

6. Validez de la detección de los isotipos de AAEsp para el diagnóstico de infertilidad femenina de origen isoimmune.

Para realizar la validación de una técnica de diagnóstico de aplicación clínica, es necesario que dentro de dicha técnica estén comprendidas las mediciones de su sensibilidad (S) y de su especificidad (E), así como el valor diagnóstico (VD), la tasa de falsos positivos (TFP)

y la tasa de falsos negativos (TFN) para considerar que la prueba tiene utilidad clínica, sobre todo si la prevalencia de una enfermedad no se conoce (22).

El cálculo de estos indicadores se realizó analizando la asociación entre el tipo de infertilidad (isoimmune o de causa no determinada) con el isotipo de AAEsp en las muestras analizadas; los resultados se muestran en los cuadros 14 a 17 y se resumen en el cuadro 18.

CUADRO 14. Validez de la detección de AAEsp de clase IgG en suero.

		IgG en suero		
		+	-	
Infertilidad de origen isoimmune	+	13	2	15
	-	3	12	15
		16	14	30

Sensibilidad=81.3%

Especificidad=85.7%

Valor diagnóstico=86.6%

TFP=13.3%

TFN=20.0%

CUADRO 15. Validez de la detección de AAEsp de clase IgA en suero.

		IgA en suero		
		+	-	
Infertilidad de origen isoimmune	+	12	3	15
	-	7	8	15
		19	11	30

Sensibilidad=63.0%

Especificidad=72.7%

Valor diagnóstico=80.0%

TFP=20.0%

TFN=46.6%

CUADRO 16. Validez de la detección de AAEsp de clase IgA en saliva.

		IgA en saliva		
		+	-	
Infertilidad de origen isoimmune	+	11	4	15
	-	4	11	15
		15	15	30

Sensibilidad = 73.0%

Especificidad = 73.0%

Valor diagnóstico = 73.0%

TFP = 27.0%

TFN = 27.0%

CUADRO 17. Validez de la detección de AAEsp de clase IgA en moco cervical.

		IgA en moco cervical		
		+	-	
Infertilidad de origen isoimmune	+	4	10	14
	-	0	7	7
		4	17	21

Sensibilidad = 100.0%

Especificidad = 41.2%

Valor diagnóstico = 28.6%

TFP = 71.4%

TFN = 0.0%

CUADRO 18. Valores de sensibilidad, especificidad, valor diagnóstico, tasa de falsos positivos y tasa de falsos negativos, para la detección de los diferentes isotipos de AAEsp.

Isotipo de AAEsp	S(%)	E(%)	VD(%)	TFP(%)	TFN(%)
IgG en suero	81.3	85.7	86.6	13.3	20.0
IgA en suero	63.0	72.7	80.0	20.0	46.6
IgA en saliva	73.0	73.0	73.0	27.0	27.0
IgA en moco cervical	100.0	41.2	28.6	71.4	0.0

La validez de este sistema ELISA indirecto, que utiliza espermatozoides completos como antígeno, fue mejor para los AAEsp de clase IgG en suero ya que se obtuvieron la mayor sensibilidad (81.3%), especificidad (85.7%) y valor diagnóstico (86.6%).

Por otro lado, aunque los AAEsp de clase IgA en suero fueron el isotipo que se presentó con mayor frecuencia en la población analizada (cuadros 6 y 13), la validez de su determinación para el diagnóstico de infertilidad de origen isoimmune es bastante cuestionable. Esto se debe a que aunque la sensibilidad y la especificidad de esta determinación tuvieron valores aceptables (63.0% y 72.7%, respectivamente), la TFN fue la más alta (46.6%).

Cabe resaltar que, de acuerdo con los resultados obtenidos, la detección de los AAEsp de clase IgA en saliva es una prueba con gran potencial de utilidad clínica, ya que la validez de la detección de esta clase de AAEsp fue bastante buena. Esto está apoyado en los valores de sensibilidad (73.0%), especificidad (73.0%) y de valor diagnóstico (73.0%).

Por último, la validez de la prueba para detectar AAEsp de clase IgA en el moco cervical fue muy pobre: aunque la prueba tiene un 100% de sensibilidad, su especificidad y valor diagnóstico fueron los más bajos (41.2% y 28.6%, respectivamente). Esto puede explicarse por el reducido número de pacientes que presentaron este isotipo de AAEsp.

Es importante recordar que este estudio se realizó en una población seleccionada, por lo que estos resultados, aunque bastante promisorios, deben ser considerados con precaución. Una prueba con un alto valor diagnóstico desarrollado dentro de un servicio hospitalario, como en el caso del presente estudio (Clínica de Salud Reproductiva del departamento de Biología de la Reproducción, INNSZ), en donde la prevalencia de la enfermedad se espera que sea alta, podría

no tener aplicación real para el caso de la población en general (22). La utilidad de las pruebas diagnósticas depende también de la prevalencia de la condición bajo estudio y en cualquier evaluación de un procedimiento diagnóstico nuevo, se deben calcular el valor diagnóstico y la tasa de falsos negativos para que sea evaluada adecuadamente.

8. Análisis electroforético del EPME.

Después de su extracción con Tritón X-100, el EPME fue analizado en geles de poliacrilamida (PAGE), en las condiciones que se describieron en Materiales y Métodos. El patrón electroforético del EPME se muestra en la figura 14.

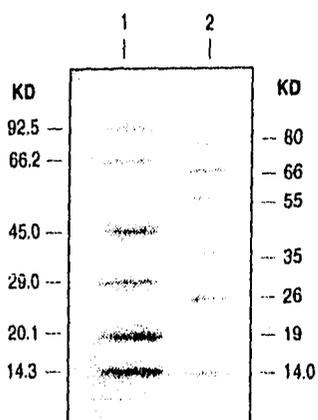


Figura 14. Patrón electroforético del EPME.

Gel de poliacrilamida al 10%. En el carril 1 se colocaron los marcadores de bajo peso molecular y en el carril 2 se colocaron 20 μ g del EPME. La electroforesis se realizó en amortiguador TRIS-glicina 0.1M, pH=8.3, con un voltaje de 100V y una corriente de 8 mA durante 2 horas. Tinción con azul brillante de Coomassie R-250.

Como se puede observar en la figura 14, el EPME está compuesto por 7 proteínas con pesos moleculares de 80, 65, 55, 35, 26, 19 y 14 KD.

Los pesos moleculares observados para las proteínas con 65, 55 y 26 KD corresponden con los reportados en la literatura para la hialuronidasa (60-65 KD), la acrosina (49-55 KD), y la FA-1 (26 KD), respectivamente (47,72,98). Se desconoce cuales serían las proteínas cuyos pesos moleculares son de 80, 35, 19 y 14 KD.

9. Western Blot del EPME.

Con las muestras de suero, de saliva o de moco cervical, de las pacientes que tuvieron un resultado positivo en el ELISA, se realizó el Western Blot del EPME.

De las 21 pacientes en las que se detectaron AAEsp en alguna de sus muestras mediante ELISA, sólo en el suero de una de las pacientes (paciente 1, cuadro 6) se observó una reacción positiva con el EPME. En esta muestra se encontraron AAEsp de clase IgG contra 5 de las 7 proteínas del EPME, cuyos pesos moleculares fueron de 80, 65, 55, 35 y 26 KD (figura 15).

A pesar de la alta proporción de pacientes (70%) que dieron un resultado positivo para los AAEsp por ELISA, sólo en una paciente se encontraron anticuerpos anti-EPME de clase IgG en el suero. Debido a la cantidad de muestra con que se contaba se realizó un único ensayo de Western Blot, por lo tanto no fue posible demostrar la positividad de las muestras por esta técnica (15).

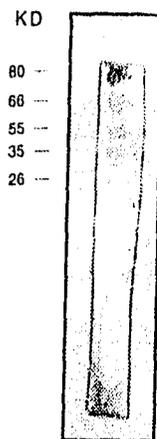


Figura 15. Western Blot del EPME.

Después de su separación electroforética, las proteínas del EPME se transfirieron a una membrana de NC (0.45 μ m poro) con una solución de Tris-SDS-metanol como amortiguador de transferencia (100V, 250 mA, 1 hora a 4°C). El suero humano se añadió a una dilución de 1:5 en PBS-Tween. El segundo anticuerpo (anti-IgG humana preparado en cabra conjugado con peroxidasa) se añadió a una dilución de 1:500 en PBS-Tween. El revelador (sustrato de la enzima) fue el 4-cloro-1-naftol.

VI. CONCLUSIONES.

1. De las pacientes que asistieron a la Clínica de Salud Reproductiva del Departamento de Biología de la Reproducción del INNSZ durante la realización del estudio (18 meses), únicamente 30 de ellas cumplieron con los criterios de inclusión establecidos.

2. Se desarrolló un sistema inmunoenzimático (ELISA indirecto), con células espermáticas completas como antígeno, con el cual fue posible la detección de AAEsp de clase IgG en suero y de clase IgA en suero, en saliva y en moco cervical. La especificidad del sistema quedó apoyado por la elaboración de diferentes "blancos", los cuales se incluyeron en todos los ensayos que se realizaron.

3. Con las muestras de suero, de saliva y de moco cervical que se obtuvieron del grupo testigo, se obtuvo el promedio (\bar{x}) y la desviación estándar (DE) de la absorbancia para cada clase de inmunoglobulina, así como los intervalos de confianza al 95% y 99%.

4. Con los valores de la \bar{x} y la DE del grupo testigo, se calcularon los límites superiores ($\bar{x} + 1DE$ y $\bar{x} + 2DE$) para establecer "puntos de corte" para la detección de AAEsp. Los valores obtenidos fueron los siguientes:

- para la IgG en suero, el valor usado como punto de corte fue el valor promedio del grupo control (1.06) más una desviación estándar (0.216) ($\bar{x} + 1DE$), el cual fue de 1.276.
- para la IgA en suero el valor usado como punto de corte fue el valor promedio (0.075) más dos desviaciones estándar (0.116) ($\bar{x} + 2DE$), el cual fue de 0.192.
- para la IgA en saliva, el valor usado como punto de corte fue el valor promedio (0.213) más dos desviaciones estándar (0.123), el cual fue de 0.459.
- para la IgA en moco cervical, el valor usado como punto de corte fue el valor promedio (0.183) más una desviación estándar (0.246), el cual fue de 0.279.

5. Una vez establecidos los puntos de corte para cada clase de inmunoglobulina, se detectaron AAEsp en 21 de las 30 pacientes (70%) en al menos, una de sus muestras estudiadas. En las 9 pacientes restantes, en 5 de ellas no se detectó la presencia de AAEsp en ninguna de sus muestras, mientras que en las otras 4, no se detectaron AAEsp en sus muestras de suero ni saliva, y no se contó con una muestra adecuada de moco cervical para realizar el estudio.

6. El isotipo de AAEsp que se detectó con mayor frecuencia fue la IgA en el suero (en 19 pacientes, 63.3%), después la IgG en el suero (en 16 pacientes, 53.3%), le siguió la IgA en la saliva (en 15 pacientes, 50.0%) y por último la IgA en el moco cervical (únicamente en 4 pacientes, 19.0%).

7. Se encontró una asociación significativa entre la presencia simultánea de la IgG del suero con la IgA del suero ($p=0.0033$) y entre la IgA de la saliva con la IgA del suero ($p=0.0006$); la presencia de AAEsp de clase IgG en suero y de clase IgA en saliva, presentó una tendencia a ser significativa ($p=0.0654$) y para el caso de los AAEsp de clase IgA en el moco cervical, no se encontró ninguna asociación significativa con las muestras de suero ni de saliva.

8. Con los datos obtenidos del análisis por el sistema ELISA indirecto de las muestras de las 30 pacientes, se realizó una revaloración con los datos clínicos y la probable causa de su infertilidad y se concluyó que en 15 de ellas concordaban los resultados obtenidos con una causa de origen isoimmune. En las 15 pacientes restantes, su diagnóstico de infertilidad fue de "causa no determinada".

9. La validez de este sistema ELISA indirecto, que utiliza espermatozoides completos como antígeno, fue la siguiente:

- para los AAEsp de clase IgG en suero se obtuvo la mayor sensibilidad (81.3%), especificidad (85.7%) y valor diagnóstico (86.6%).
- aunque los AAEsp de clase IgA en suero fueron el isotipo que se presentó con mayor frecuencia en la población analizada, la validez de su determinación para el diagnóstico de infertilidad de origen isoimmune es bastante cuestionable, debido a que aunque la

sensibilidad y la especificidad de esta determinación tuvieron valores aceptables (63.0% y 72.7%, respectivamente), la TFN fue la más alta (46.6%).

- la detección de los AAEsp de clase IgA en saliva es una prueba con gran potencial de utilidad clínica, ya que la validez de la detección de esta clase de AAEsp fue bastante buena; esto está apoyado en los valores de sensibilidad (73.0%), especificidad (73.0%) y de valor diagnóstico(73.0%).

- la detección de AAEsp de clase IgA en el moco cervical fue muy pobre, ya que aunque la prueba tuvo un 100% de sensibilidad, su especificidad y su valor diagnóstico fueron los mas bajos (41.2% y 28.6%, respectivamente). Esto se debió al reducido número de pacientes que presentaron este isotipo de AAEsp.

10. De las 21 pacientes que tuvieron un resultado positivo con el ELISA, únicamente en una de ellas se encontraron anticuerpos anti-EPME de clase IgG por análisis de Western Blot: se encontró reactividad contra 5 proteínas del EPME, 3 de las cuales corresponden por su peso molecular a la hialuronidasa (65 KD), la acrosina (55 KD) y la FA-I (26 KD).

VII. BIBLIOGRAFIA.

1. Acosta Altamirano G, Cruz Lopez M. Inmunología de las mucosas. Distribuidora y Editora Mexicana, SA de CV. México 1992.
2. Aguilar Cardenas AE. Investigación de anticuerpos antiesperma humano por el método de hemaglutinación indirecta. Tesis. Facultad de Química. UNAM. 1986.
3. Aitken J, Hulme MJ, Henderson CJ, Hargreave TB and Ross A. Analysis of the surface labelling characteristics of human spermatozoa and the interaction with anti-sperm antibodies. *J Reprod.* 1987; 80: 473-485.
4. Aitken RJ, Parslow JM, Hargreave TB and Hendry WF. Influence of antisperm antibodies of human sperm function. *Br J Urol.* 1988; 62: 367-373.
5. Alexander NJ. and Bearwood BS. An immunosorption assay for antibodies to spermatozoa: Comparison with agglutination and immobilization tests. *Fertil Steril.* 1984; 41: 270-276.
6. Alexander NJ. Contraceptive Vaccines. Contraceptive Development Branch. Center for Population Research National Institute of Child Health and human Development. 1992. USA. pp. 1-22.
7. Alexander NJ. Treatment for antisperm antibodies: voodoo or victory?. *Fertil Steril.* 1990; 53: 602-603.
8. Alexander NJ, Fulgham DL and Goldberg E. Contraceptive vaccine development: secretory immune response in mice and monkeys. *Vaccine Research.* 1992; 1: 331-346.
9. Anderson RA, Mack SR, Beyler SA and Zaneveld LJD. Comparison of human acrosin, a trypsin-like sperm proteinase, with human pancreatic trypsin: temperature stability and effect of cations. *Comp Biochem Physiol.* 1984; 4: 707-713.
10. Ben K, Halminton MS and Alexander NJ. Vasectomy-induced autoimmunity: monoclonal antibodies affect sperm function and *in vitro* fertilization. *J Reprod Immunol.* 1988; 13: 73-84.
11. Beynon RJ and Bond JS. Proteolytic enzymes. A practical approach. IRL Press. Oxford University. 1989. pp. 241-248.

12. Blackwell J, Kaminski J, Bielfeld P, Mack SR, Zaneveld LJD. Human sperm acrosin. Further studies with the clinical assay and activity in a group of presumably fertile men. *J Androl.* 1992; 13: 571-577.
13. Blackwell JM and Zaneveld LJD. Effect of abstinence on sperm acrosin, hypoosmotic swelling, and other semen variables. *Fertil Steril.* 1992; 58: 798-801.
14. Bronson R, Cooper G. and Rosenfeld D. Sperm antibodies: their role in infertility. *Fertil Steril.* 1984; 42: 171-183.
15. Butler JE, Peterman JH, Suter M and Dierks J. The immunochemistry of solid-phase sandwich enzyme-linked immunosorbent assays. *Federation Proc.* 1987;46: 2548-2556.
16. Carballada R and Esponda P. Electrophoretic pattern of rodent seminal vesicle proteins as revealed by silver staining. *Int J Androl.* 1991;14: 52-57.
17. Chen C and Warren RJ. Application of a sperm micro-immobilization test to cervical mucus in the investigation of immunologic infertility. *Fertil Steril.* 1991; 35: 542-545.
18. Churg A, Zaneveld LJD and Schumacher GFB. Detergent treatment of human and rabbit spermatozoa: ultrastructural changes and release of midpiece enzymes. *Biol Reprod.* 1974; 10: 429-437.
19. Collins WP, Branch CM and Collins PO. Biochemical indices of the fertile period in women. *Int JFertil.* 1981; 26: 196-202.
20. Cuenca Moreno IG. Investigación de anticuerpos anti-esperma en pacientes vasectomizados y parejas infértiles. Comparación de métodos. Tesis. Facultad de Química, UNAM. 1981.
21. Curby WA. Device for collection of human parotid saliva. *J Lab Clin Med.* 1953; 41: 493-496.
22. Daly LE, Bourke GJ, McGiluray J. Interpretation and uses of medical statistics. Fourth edition. Blackwell Scientific Publications. Oxford. 1991. pp. 102-115, 304-308.
23. Daru J. and Mathur SA. Comparison of sperm antibody assays. *Am J Obstet Gynecol.* 1990; 163: 1622-1629.
24. Dawson EB, Harris WA, Teter CM and Powell CL. Effect of ascorbic acid supplementation on the sperm quality of smokers. *Fertil Steril.* 1992; 58: 1034-1039.

25. De Jonge CJ, Mack SR and Zaneveld LJD. Synchronous assay for human sperm capacitation and the acrosome reaction. *J Androl.* 1989; 10: 232-238.
26. Doe WF. The intestinal immune system. *Gut.* 1989; 30: 1679-1685.
27. Eggert-Kruse W, Gerhard I, Tilgen W and Runnebaum B. Clinical significance of crossed sperm-cervical mucus penetration test in infertility Investigation. *Fertil Steril.* 1989; 52: 1032-1040.
28. Eggert-Kruse W, Köhler A Rohr G, and Runnebaum B. The pH as an important determinant of sperm-mucus interaction. *Fertil Steril.* 1993; 59: 617-628.
29. Flores Lozano F, Cabeza de Flores A. Endocrinología. Ed. Francisco Mendez Cervantes. 3a. ed. México. 1990. pp. 359-365.
30. Fulgham DL and Alexander NJ. Antigens and Antibodies 1. Methods of enzymatic analysis. VCH. Federal Republic of Germany. Volumen X. Third edition. 1986; 5: 201-213.
31. Ganong W F. Fisiología Médica. Undécima Edición; Editorial El Manual Moderno. México, D.F. 1988. Cap. 23.
32. Goldberg J M, Haering P L, Friedman C I, Dodds WG and Kim M H. Antisperm antibodies in women undergoing intrauterine insemination. *Am J Obstet. Gynecol.* 1990; 163: 65-68.
33. Gómez E, Ortiz V, Saint-Martín B, Boeck L, Díaz-Sánchez V and Bourges H. Hormonal regulation of the secretory IgA (sIgA) system: estradiol- and progesterone- induced changes in sIgA in parotid saliva along the menstrual cycle. *Am J Reprod Immunol.* 1993; 29: 219-223.
34. Gómez Rodríguez E. Efecto de las lectinas de dos variedades de frijol sobre la respuesta inmune intestinal en ratas. Tesis de Maestría. Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM. 1992.
35. Gomez FE, Villegas J and Bourges H. An enzyme-linked immunosorbent assay for human secretory immunoglobulin A in parotid saliva. *Rev Invest Clin.* 1991; 43: 351-358.

36. Goodpasture JC, Polakoski KL and Zaneveld LJD. Acrosin, proacrosin, and acrosin inhibitor of human spermatozoa: extraction, quantitation, and stability. *J Androl.* 1979; 1: 16-27.
37. Griffin PD and Johnson PM. Local immunity in reproductive tract tissues. Scientific basis of fertility regulation. World Health Organization. Oxford University Press. 1993. 587 pp.
38. Hald J, Naaby-Hansen S, Egense J, Hjort T and Bjerrum OJ. Autoantibodies against spermatozoal antigens detected by immunoblotting and agglutination. A longitudinal study of vasectomized males. *J Reprod Immunol.* 1987; 10: 15-26.
39. Hargreave TB, Busuttill A, Elton A, Harvey J, Chan A and Chisholm GD. Studies of testicular and epididymal damage in relation to the occurrence of antisperm antibodies. *British J Urol.* 1982; 54: 769-773.
40. Hendry F. The significance of antisperm antibodies: measurement and management. *British J Urol.* 1992; 36: 219-221.
41. Hendry WF, Parslow JM, Stedronska J and Wallace MA. The diagnosis of unilateral testicular obstruction in subfertile males. *Br J Urol.* 1982; 54: 774-779.
42. Hendry WF. Vasectomy and vasectomy reversal. *Br J Urol.* 1994; 73: 337-344.
43. Howe SE, Grider SL, Lynch DM and Fink LM. Antisperm antibody binding to human acrosin: a study of patients with unexplained infertility. *Fertil Steril.* 1991; 55: 1176-1182.
44. Isojima S, Kameda K, Tsuji Y, Shigeta M, Ikeda Y and Koyama K. Establishment and characterization of a human hybridoma secreting monoclonal antibody with high titers of sperm immobilizing and agglutinating activities against human seminal plasma. *J Reprod Immunol.* 1987; 10: 67-78.
45. Jaffe SB and Jewelewicz R. The basic infertility investigation. *Fertil Steril.* 1991; 56: 599-613.
46. Jeyendran RS and Zaneveld LJD. Controversies in the development and validation of new sperm assays. *Fertil Steril.* 1993; 59: 726-728.

47. Joyce C, Jeyendran RS and Zaneveld LJD. Release, extraction, and stability of hyaluronidase associated with human spermatozoa. Comparisons with the rabbit. *J Androl.* 1985; 6: 152-161.
48. Katz D F. Human cervical mucus: research update. *Am J Obstet. Gynecol.* 1991; 165: 1984-1986.
49. Katz DF, Overstreet JW and Hanson FW. A new quantitative test for sperm penetration into cervical mucus. *Fertil Steril.* 1980; 33: 179-186.
50. Kennedy WP, Kaminski JM, Van Der Ven III, Jeyendran RS, Reid DS, Blackwell J, Bielfeld P and Zaneveld LJD. A simple, clinical assay to evaluate the acrosin activity of human spermatozoa. *J Androl.* 1989; 10: 221-231.
51. Kerr M A. The structure and function of human IgA. *Biochem J.* 1990; 271: 285-296.
52. Koff WC and Six IIR. *Vaccine Research and Developments.* Marcel Dekker, Inc. New York. 1992. Vol 1. Cap 5. pp 117-141 .
53. Kossakowski J, Stephenson M and Smith H. Intrauterine insemination with husband's sperm: comparison of pregnancy rates in couples with cervical factor, male factor, immunological factor and idiopathic infertility. *Am J Obstet.* 1993; 33: 183-186.
54. Koyoma K, Kameda K, Nakamura N, Kubota K, Shigeta M and Isojima S. Recognition of carbohydrate antigen epitopes by sperm-immobilizing antibodies in sera of infertile women. *Fertil Steril.* 1991; 56: 954-959.
55. Lane D. *Antibodies: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory. Ed. Harlow. 1988. Chapter 5.
56. Leslie K and Hay F. *Practical Immunology.* Blackwell Scientific Publications. 3a. ed. 1989. pp 15, 58, 59, 65-78.
57. Lipshultz LI. Infertility Diagnosis. *J. Urol.* 1993; 149: 1355-1356.
58. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193: 265-275.
59. Mack SR and Zaneveld LJD. Comparative activation studies with extracted and purified human proacrosin. *Comp Biochem Physiol.* 1986; 3: 537-543.

60. Mack SR, Everingham J and Zaneveld LJD. Isolation and partial characterization of the plasma membrane from human spermatozoa. *J Exp Zool.* 1986; 240: 127-136.
61. Maggio ET. Enzyme Immunoassay. CRC Press. USA. 1980. Cap. 8. pp 167-178.
62. Malacara JM. Fundamentos de Endocrinología. Ed. Salvat. 4a. ed. México, DF 1990. pp. 379-382.
63. Maniatis S F. Molecular Cloning. Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Second Edition. USA. 1989. pp. 18.47-18.75.
64. Manual de Laboratorio de la OMS para el examen de semen humano y de la interacción entre el semen y el moco cervical. Ed. Panamericana 1987. pp. 2 9.
65. Margalloth EJ, Sauter E, Bronson RA, Rosenfeld DL, Scholl GM and Cooper GW. Intrauterine insemination as treatment for antisperm antibodies in the female. *Fertil Steril.* 1988; 50: 441-446.
66. McClure RD, Tom RA, Watkins M and Murthy S. Sperm check: a simplified screening assay for immunological infertility. *Fertil Steril.* 1989; 52: 650-654.
67. Meinertz H and Hjort T. Detection of autoimmunity to sperm: mixed antiglobulin reaction (MAR) test or sperm agglutination? A study on 537 men from infertile couples. *Fertil Steril.* 1986; 46: 86-91.
68. Meinertz H, Linnet L, Andersen PF and Hjort T. Antisperm antibodies and fertility after vasovasostomy: a follow-up study of 216 men. *Fertil Steril.* 1990; 54: 315-321.
69. Menge AC, Medley NE, Mangiones CM and 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: 439-443.
70. Mestecky J. The common mucosal immune system and current strategies for induction of immune responses in external secretions. *J Clin Immunol.* 1987; 7: 265-276.
71. Mettler L, Czuppon AB, Buchheim W, Baihloh V, Glyczy M, Etschenberg J and Holstein AF. Induction of high titer mouse-antihuman spermatozoal antibodies by liposome incorporation of spermatozoal membrane antigens. *Am J Reprod Immunol.* 1983; 4: 127-132.

72. Naz RK and Bhargava K. Antibodies to sperm surface fertilization antigen (FA-1): their specificities and site of interaction with sperm in male genital tract. *Molecular Reproduction and Development* 1990; 26: 175-183.
73. Nikolaeva MA, Kulakov VI, Ter-Avanesov GV, Terekhina LN, Pshenichnikova TJ and Sukhikh GT. Detection of antisperm antibodies on the surface of living spermatozoa using flow cytometry: preliminary study. *Fertil Steril.* 1993; 59: 639-644.
74. Olivares S, Villanueva C, Hernández C, Arredondo JL y Vadillo F. Identification and partial characterization of an immunoglobulin A protease associated with human sperm. *Biol Reprod.* 1993; 49: 162-165.
75. Ortiz VM. Estudio morfológico y funcional de los efectos producidos por lectinas de frijol común (*Phaseolus vulgaris*) sobre la respuesta inmune intestinal en ratas. Tesis. Facultad de Química, UNAM. 1992.
76. Shaha C, Suri A and Talwar G. Identification of sperm antigens that regulate fertility. *Int J Androl.* 1988; 11: 479-491.
77. Shanis BS, Check JH and Bollendorf A. Interpretation and misinterpretation of semen parameters. *Archiv Androl.* 1989; 23: 213-227.
78. Shasha C, Suri A and Talwar G. Induction of infertility in female rats after active immunization with 24 KD antigens from rat testes. *Int J Androl.* 1990; 13: 17-25.
79. Shulman S. Human sperm antibodies and their detection, in "Manual of Clinical Laboratory Immunology". 3rd. Edition. Rose NR, Friedman H and Fahey JL. American Society for Microbiology. Washington DC. 1989. pp. 771-777.
80. Snow K and Ball DG. Characterization of human sperm antigens and antisperm antibodies in infertile patients. *Fertil Steril.* 1992; 58: 1011-1019.
81. Steele MG and Wira CR. IgA in uterine tissues: effect of estrous cycle, hormone treatment and intrauterine immunization. IV. Steroids and the immune system. *J Steroid Biochem.* 1984; 34: 229-234.
82. Stern JE, Dixon PM, Johnson BT and Manganiello PD. Antisperm antibodies in women: variability in antibody levels in serum, mucus, and peritoneal fluid. *Fertil Steril.* 1992; 58: 950-958.

83. Sullivan DA, Richardson GS, MacLaughlin DT and Wira DR. Variations in the levels of secretory component in human uterine fluid during the menstrual cycle. *J Steroid Biochem.* 1984; 20: 509-513.
84. Tan SL, Scammell G and Houang E. The midcycle cervical microbial flora as studied by the weighed-swab method, and its possible correlation with results of sperm cervical mucus penetration tests. *Fertil Steril.* 1987; 47: 941-946.
85. The American Fertil Society. Guidelines for human andrology laboratories. *Fertil Steril.* 1992; 58 (suppl): 11S-16S.
86. Towbin H, Staehelin T and Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 1979; 76: 4350-4354.
87. Tozzini RI. Esterilidad e infertilidad humanas. Ed. Panamericana S.A. 2a. ed. Ed Buenos Aires Argentina. 1992. pp 112-141.
88. Tsukui S, Noda Y, Yano J, Fukuda A and Mori T. Inhibition of sperm penetration through human zona pellucida by antisperm antibodies. *Fertil Steril.* 1986; 46: 92-96.
89. Usala SJ, Usala FB, Holt JA and Schumacher GB. IgG and IgA content of vaginal fluid during the menstrual cycle. *J Reprod Med.* 1989; 34: 292-294.
90. Walker JM. Methods in Molecular Biology. 1989. Vol 1. pp. 41-65, 165-179.
91. Wind ML, Bovic PJD, Lombard CJ, Menkveld R and Kruger TF. Antisperm antibody test: tradicional methods compared to ELISA. *Arch Androl.* 1989; 23: 139-145.
92. Wira CR and Rossoll RM. Glucocorticoid regulation of the humoral immune system. Dexamethasone stimulation of secretory component in serum, saliva, and bile. *Endocrinol.* 1991; 128: 835-842.
93. Wira CR and Sandoe CP. Specific IgA and IgG antibodies in the female reproductive tract: effects of immunization and estradiol on expression of this response in vivo. *J Immunol.* 1987;138: 4159-4164.
94. Wira CR and Stern JE. Endocrine regulation of the mucosal immune system in the female reproductive tract. Hormones and fetal pathophysiology. Marcel Decker, Inc. New York. 1992. pp. 343-367.

95. Wira CR, O'Mara B, Richardson J and Prabhala R. The mucosal immune system in the female reproductive tract: influence of sex hormones and cytokines on immune recognition and responses to antigen. *Vaccine Research*. 1992. Vol 1, pp. 151-167.
96. Wira CR and Sandoe CP. Effect of uterine immunization and oestradiol on specific IgA and IgG antibodies in uterine, vaginal and salivary secretions. *Immunology*. 1989; 68: 24-30.
97. Yi Lee SH and Polakoski KL. Proacrosin binding protein: immuno-comparative studies in boar, hovine, hamster, human and ram. *J Reprod Immunol*. 1992; 21: 309-320.
98. Zaneveld LJD and De Jonge CJ. Mammalian sperm acrosomal enzymes and the acrosome reaction. Comparative overview of mammalian fertilization. Edited by Bonnie S. And Michael G. Plenum Press, New York. 1991. pp. 63-79.
99. Zaneveld LJD and Jeyendran RS. Sperm function test. *Infertility Reprod Medicine Clinics North Am*. 1992; 2: 353-371.
100. Zaneveld LJD, De Jonge CJ, Anderson RA and Maek SR. Human sperm capacitation and the acrosome reaction. *Hum Reprod*. 1991; 6: 1265-1274.
101. Zaneveld LJD, Wagner L, Schlumbreger HD and Schumacher GFB. Immunological and biochemical studies on fractionated bull spermatozoa. *J Reprod Fert*. 1974; 38: 411-424.
102. Zouari R, Almeida MD, Rodríguez D and Jouannet P. Localization of antibodies on spermatozoa and sperm movement characteristics are good predictors of *in vitro* fertilization success in cases of male autoimmune infertility. *Fertil Steril*. 1993; 59: 606-612.

VIII. ANEXOS.

ANEXO I ESPERMATOBIOSCOPIA

Lo ideal es recoger la muestra de semen después de 3 días y no más de 7 días de abstinencia sexual, la muestra debe ser enviada al laboratorio antes de transcurrir una hora de la recolección. El coito interrumpido no es aceptable para hacer la recolección del semen, porque puede perderse la primera porción del eyaculado, que suele contener la mayor concentración de espermatozoides, además de aumentar el riesgo de contaminación celular y bacteriana.

Aspecto: la muestra normal tiene aspecto opalescente gris, es homogénea y se licua a los 60 minutos a temperatura ambiente. La muestra puede aparecer clara si la concentración de espermatozoides es demasiado baja o puede ser parda si el eyaculado contiene glóbulos rojos.

Consistencia: Una muestra de semen normal no debe tener filancia de mas de 2 centímetros de longitud después de 60 minutos de la recolección.

Valores normales del semen por eyaculado (46,63,82).

Volúmen	≥ 2.0 ml
Concentración de espermatozoides	$\geq 20 \times 10^6$ espermatozoides / ml
pH	7.2 a 7.8
Movilidad	50% o más con movimiento progresivo lineal rápido hacia adelante en el transcurso de una hora de la colección de la muestra.
Morfología	50% o más con morfología normal
Viabilidad	50% o más vivos
Células blancas	$< 1 \times 10^6$ células/ml
Zinc	2.4 μ M o más por eyaculado
Acido cítrico	52 μ M o más por eyaculado

ANEXO 2

PRUEBA DE PENETRACION ESPERMATICA (PPE).

La prueba de penetración espermática (prueba postcoital) es un método de diagnóstico clásico para evaluar la interacción moco cervical-semen in vivo que consta de los siguientes pasos:

1. Relaciones sexuales dirigida (RSD).

El hombre debe tener abstinencia sexual (coito o masturbación), por un periodo de 3 a 7 días. La pareja realiza el coito durante la fase periovulatoria del ciclo menstrual (días 12-14 de un ciclo menstrual de 28 días), aproximadamente 4 horas antes de la prueba, en la cual no deben usarse barreras mecánicas (preservativo ó diafragma) o químicas (jaleas ó espumas) y se evitan los lavados vaginales antes de acudir a la prueba. Posteriormente la paciente se presenta en la Clínica de Infertilidad el mismo día de el coito para la toma de la muestra de moco cervical.

2. Toma de muestra del moco cervical (de acuerdo al manual de la OMS).

Luego de colocar el espejo vaginal se recolecta el escurrido del fondo de saco, orificio cervical exterior, orificio cervical inferior y del endoútero y se coloca en un portaobjetos.

3. Observación al microscopio.

De la misma forma que una espermatobioscopia, se observa el movimiento (si es que lo hay), progresivo lineal de al menos 5 espermatozoides por campo, sin considerar a aquellos que se muevan en círculos o zig-zag. Si la prueba resulta positiva es recomendable realizar una segunda determinación para descartar que el resultado se deba a un coito deficiente.



ANEXO 3

Instituto Nacional de la Nutrición
Salvador Zubizarín
Calle Tuxtepec de Cuauhtémoc 15
Delegación Tlalpan
14000. México, D. F.

16 de febrero de 1993.

M. en C. Pco. Enrique Gómez
Depto. Fisiología de la Nutrición
P r e s e n t e .

El Comité de investigación en humanos ha analizado el proyecto de investigación: " Detección de Anticuerpos Anti IgA Antiesperma en el moco cervical en el suero y saliva de mujeres infértiles " (Ref. 304), según la versión enviada por Ud. el pasado 26 de enero.

La decisión del Comité es **APROBAR** dicho proyecto en las condiciones en las que se ha propuesto.

Los formatos de consentimiento informado, tanto para donadores de semen para la preparación de antígenos, así como para las mujeres participantes, también han sido **APROBADOS**.

Al término del estudio deberá enviarse un informe final.

A t e n t a m e n t e .

Dr. Sergio Ponce de León.
Coordinador del Comité
de Investigación en Humanos

c.c.p. Dr. Rubén Lisker.- Subdirector General de Investigación
Dr. Vicente Díaz Sánchez.- Depto. de Biología de la
Reproducción.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA



ANEXO 4

Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán
Subdirección de Nutrición Experimental y Ciencia de los Alimentos

Casco de Ameyu, No. 15
Ciudad de México, México, D.F.
Teléfono 675 10 76

FORMATO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo _____ acepto voluntariamente participar en la investigación "Detección de anticuerpos IgA antiesperma en el moco cervical, en el suero y en la saliva de mujeres infértiles".

Manifiesto además que se me informó la manera en que se llevará a cabo esta investigación, en qué consiste y que para la consecución de sus objetivos es necesaria la obtención de las siguientes muestras biológicas:

- una muestra de saliva, la cual se obtendrá con el dispositivo de Curby, del cual se me ha explicado su uso y aplicación sin que represente ningún riesgo para mi salud.
- una muestra de sangre venosa de 10 ml, para el análisis de hormonas.
- una muestra de moco cervical, la cual será obtenida al momento de mi exploración ginecológica.

Asimismo, entiendo que mi participación en esta investigación forma parte de un estudio integral sobre infertilidad femenina, por lo que los resultados obtenidos con estas muestras se usarán exclusivamente con fines diagnósticos y de manera confidencial.

Firma

Testigo: _____

Fecha: _____

Dirección: _____

Firma: _____



ANEXO 5

Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán
Subdirección de Nutrición Experimental y Ciencia de los Alimentos

Av. de Quince, No. 15
Cul. y Cely. Tlalpan 14000 México D.F.
Teléfono 635 11 76

FORMATO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO.

Yo _____ acepto donar, de manera libre y voluntaria, una muestra de semen la cual será empleada exclusivamente con fines de investigación, en el proyecto "Detección de anticuerpos IgA antiesperma en el moco cervical, en el suero y en la saliva de mujeres infértiles".

Entiendo que este proyecto se realiza de manera conjunta entre los Departamentos de Fisiología de la Nutrición y Biología de la Reproducción, del Instituto Nacional de la Nutrición, Salvador Zubirán. Asimismo, se me ha informado que, con excepción de mi consentimiento expresado en forma escrita en este documento, mi participación en dicho proyecto se mantendrá en la mas estricta confidencialidad.

Firma

Fecha: _____

ANEXO 6

REACTIVOS PARA LA OBTENCION DE CELULAS ESPERMATICAS

1. Solución para la cuenta espermática.

NaHCO ₃	50 g
NaH ₂ PO ₄	4 mg
Na ₂ HPO ₄	6 mg
Formaldehido al 37%	1 ml
Agua destilada c.b.p.	1000 ml

2. Amortiguador de fosfatos-glucosa (amortiguador de Baker) pH 7.0

α -D(+) Glucosa	30 g
Na ₂ HPO ₄	3.54 g
KH ₂ PO ₄	0.3 g
Agua destilada c.b.p.	1000 ml.

Antes de aforar se ajusta el pH con HCl 0.1N. Estable a 4°C durante 2 meses.

3. Solución stock de glicina 0.5 M

Glicina	37.54 g
Agua destilada c.b.p.	1000 ml

4. Ficoll-Radiolar δ 1.077 g/ml

Ficoll	45 g
Radialar	150 ml
(Diatrizoato de meglumina)	
Agua bidestilada	630 ml

5. Amortiguador de fosfatos salino, (PBS) 0.1 M, pH 7.3

NaCl	8.0 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
KCl	0.2 g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	2.8 g
Rojo de fenol	0.01 g
Agua destilada c.b.p.	1000 ml

Antes de aforar se ajusta el pH con HCl o NaOH 0.1N

ANEXO 7
SISTEMA INMUNOENZIMÁTICO ELISA DE TIPO INDIRECTO

Unión del antígeno a la fase sólida



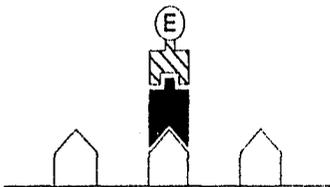
Lavado

Incubación con la muestra que contiene el anticuerpo



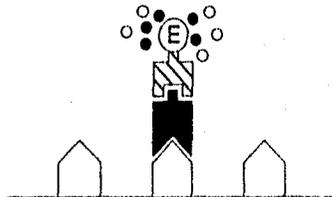
Lavado

Incubación con la antiglobulina conjugada con la enzima



Lavado

Incubación con el sustrato de la enzima



Elisa Indirecto con el anticuerpo

ANEXO 8

REACTIVOS PARA EL ELISA INDIRECTO.

1. Amortiguador de recubrimiento (carbonato-bicarbonato) 0.1M, pH 9.6

Na_2CO_3	1.59 g
NaHCO_3	2.93 g
Agua destilada c.b.p.	1000 ml

Ajustar el pH antes de aforar. Estable por dos semanas a temperatura ambiente.

2. Amortiguador de fosfatos salinos con Tween 20 al 0.05% (polioxietilensorbitan monolaurato de sodio) PBS-Tween, 0.1M, pH 7.2

NaCl	8.0 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	2.9 g
KH_2PO_4	0.2 g
KCl	0.2 g
Tween 20	0.5 ml
Agua destilada c.b.p.	1000 ml

El pH se ajusta antes de aforar.

3. Amortiguador para el sustrato de la peroxidasa (fosfato-citrato), pH 5.0.

Acido cítrico	0.511 g
Na_2HPO_4	1.841 g
Agua destilada c.b.p.	100 ml

4. Sustrato de la peroxidasa (o-fenilendiamina, OPD).

o-fenilendiamina	40 mg
H_2O_2 al 30 %	40 μl
Solución amortiguadora del sustrato	100 ml

Esta solución es sensible a la luz y debe prepararse justo antes de usarse. Se debe tener precaución al pesarla ya que es un carcinógeno que puede ser absorbido por la piel.

5. Fase sólida.

Se utilizan placas de poliestireno de 96 pozos con fondo plano, NUNC-F (Dinamarca).

6. Acido sulfúrico 2.5 M.

H_2SO_4 115.8 ml

H_2O destilada 500 ml

Añadir el ácido sulfúrico al agua, dentro de un baño de hielo, muy lentamente.

ANEXO 9
DETERMINACION DE PROTEINAS TOTALES.

Método de Lowry

FUNDAMENTO.

La determinación de proteínas totales por el método de Lowry se fundamenta en la reacción de las proteínas con el reactivo de fenol de Folin-Ciocalteu. El color que se forma es debido a la reacción del cobre alcalino con la proteína, tal como sucede en el método de Biuret, y la reducción de fosfomolibdato y fosfotungstato a azul de molibdeno y a azul de tungsteno respectivamente, por la tirosina y el triptofano presentes en la proteína (55).

REACTIVOS.

- A. Na_2CO_3 al 2% en NaOH 0.1 N.
- B. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 0.5% en tartrato de sodio y potasio al 1%.
- C. Solución de cobre alcalino: 50 ml del reactivo A y 1 ml del reactivo B
- D. Reactivo de Folin IN (Sigma Chemical Co).
- E. Solución estándar: se preparan estándares de Albúmina Sérica Bovina (Sigma Chemical Co) en NaOH 0.1 a concentraciones de 4, 2, 1, y 0.5 mg/ml.

El reactivo C (cobre alcalino) se prepara nuevo cada día de su uso.

METODO.

Se colocan 20 μl de muestra en tubo de ensaye, se añaden 200 μl de agua destilada y 1.0 ml de la solución de cobre alcalino. Se agita en vortex y se deja reaccionar 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se añaden 100 μl del reactivo de Folin, se agita, se deja reaccionar 30 minutos y se lee la absorbancia a 660 nm en un espectrofotómetro.

ANEXO 10

REACTIVOS PARA LA ELECTROFORESIS DE PROTEINAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

1. Solución TRIS inferior, pH 8.8

TRIS	18.17 g
EDTA	0.134 g
SDS al 10 %	4 ml
Agua destilada desionizada c.b.p.	1000 ml
Antes de aforar se ajusta el pH con HCl ó NaOH 0.1 N	

2. Solución TRIS superior, pH 6.8

TRIS	6.06 g
EDTA	0.134 g
SDS al 10 %	4 ml
Agua destilada desionizada c.b.p.	1000 ml
Antes de aforar se ajusta el pH con HCl ó NaOH 0.1 N	

3. Amortiguador para las muestras

Glicerol	1ml
β -mercaptoetanol	500 μ l
SDS al 10 %	3 ml
TRIS superior	1.25 ml
Azul de bromofenol	10 mg
Agua destilada desionizada c.b.p.	10 ml

4. Amortiguador para la electroforesis, pH 8.3 (4x)

TRIS	3 g
Glicina	14.37 g
SDS al 10 %	6 ml
Agua destilada c.b.p.	1000 ml

Antes de aforar se ajusta el pH con HCl ó NaOH 0.1 N

5. Persulfato de amonio al 10 %.
- | | |
|----------------------|-------|
| Persulfato de amonio | 0.1 g |
| Agua destilada | 1 ml |
6. Azul de bromofenol al 10 %
- | | |
|--------------------|-------|
| Azul de bromofenol | 1 g |
| Agua destilada | 10 ml |
7. Acrilamida al 30%
- | | |
|-----------------------------|--------|
| Acrilamida | 30 g |
| N-N'-metilen bis acrilamida | 0.8 g |
| Agua destilada cbp | 100 ml |
8. Gel separador de acrilamida al 10 %.
- | | |
|----------------------------|-------------|
| Acrilamida al 30 % | 3.3 ml |
| TRIS inferior, pH 8.8 | 2.5 ml |
| Persulfato de amonio | 100 μ l |
| TEMED | 4 μ l |
| H ₂ O destilada | 4.0 ml |
9. Gel concentrador (stacking) al 5%.
- | | |
|-----------------------|-------------|
| Acrilamida al 30 % | 500 μ l |
| Tris superior, pH 6.8 | 380 μ l |
| Persulfato de amonio | 30 μ l |
| TEMED | 3 μ l |
| H ₂ O | 2.1 ml |
10. Solución de tinción para geles de poliacrilamida
- | | |
|----------------------------|--------|
| Azul de Comassie R 250 | 1 g |
| Metanol absoluto | 180 ml |
| Acido acético | 40 ml |
| Agua destilada desionizada | 180 ml |

La solución se filtra en papel Whatman No. 1 y se guarda en frasco ambar. La solución es estable a temperatura ambiente durante 2 meses.

11. Solución de destinción para gel de poliacrilamida

Metanol absoluto	250 ml
Acido acético	250 ml
Agua destilada c.b.p.	500 ml