

ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE FRENTE A INFECCIONES GENITALES COMO POTENCIAL CAUSA DE INFERTILIDAD

Cepeda Paula

Laboratorio de Inmunología Básica, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.

Área: Ciencias Biológicas

Sub-Área: Biotecnología

Grupo: X

Palabras clave: infertilidad, infecciones de transmisión sexual, citoquinas

INTRODUCCIÓN

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), un millón de personas contraen una infección de transmisión sexual (ITS) por día. Las ITS además de producir efectos inmediatos pueden conllevar a consecuencias graves entre ellas la infertilidad o la transmisión de infecciones de la madre al niño (OMS., 2016). La infección genital por *Chlamydia trachomatis* (Ct) es la causa más común de las ITS en todo el mundo teniendo un efecto significativo en la reproducción humana (Sarah y col., 2011). *Mycoplasma hominis* (Mh) y *Ureaplasma urealyticum* (Uu) son a menudo concomitantes de Ct (Castellano y col., 1996) y han sido estrechamente relacionados por diferentes autores con perturbaciones perinatales, enfermedad ginecológica y enfermedades que afectan la salud reproductiva de mujeres (Kong y col., 1999) y hombres (Wang y col., 2006).

El factor inmunológico más frecuentemente involucrado en infertilidad es la presencia de anticuerpos antiespermáticos (ASA, por sus iniciales en inglés), que se asocia con un 10–25% de los casos de infertilidad (Bronson., 1999). Estos anticuerpos pueden encontrarse tanto en la mujer como en el hombre, y pueden afectar diferentes eventos del proceso de fecundación. Las infecciones genitales, tanto en hombres como en mujeres, han sido propuestas como inductoras de ASA. Por otra parte, las infecciones en el tracto genital producirían un estado de inflamación que alteraría el ambiente tolerogénico pudiendo inducirse una respuesta inmune hacia antígenos espermáticos. Asimismo, se produciría un cambio en las poblaciones leucocitarias presentes en el tejido junto con la producción de mediadores inflamatorios, como citoquinas y quemoquinas, entre otros, que podría alterar la funcionalidad espermática y/o la receptividad uterina.

Por todo lo expresado anteriormente y teniendo en cuenta que no se conocen exactamente los mecanismos por los cuales las infecciones genitales contribuirían a la infertilidad es que se propone investigar el rol de los factores inmunológicos como potenciales causas de infertilidad.

OBJETIVOS

- Detectar infecciones por *Chlamydia trachomatis* (Ct), *Mycoplasma hominis* (Mh) y *Ureaplasma urealyticum* (Uu) en pacientes infértiles.

Proyecto: "Diseño y evaluación de un inmunógeno destinado a la inmunoprofilaxis de infecciones por *Chlamydia trachomatis*" (ASaCTel)

Director del proyecto: Carolina Veaute

Director del becario/tesista: Carolina Veaute

Co-Director del becario: Romina Russi

- Caracterizar la expresión de citoquinas y factores de transcripción de linfocitos T (LT) en muestras de semen y lavado vaginal de pacientes infértiles con y sin infecciones genitales
- Analizar la presencia de ASA en muestras de lavado vaginal y plasma seminal en pacientes infértiles con y sin infecciones
- Establecer posibles relaciones entre el perfil de respuesta inmune hallado en los pacientes con infecciones genitales y la infertilidad

METODOLOGÍA

Se realizó un estudio observacional transversal que consistió en la detección de *Ct*, *Mh* y *Uu* en 166 pacientes infértiles. Tanto la toma de muestra como los análisis bacteriológicos correspondientes fueron realizados en el Laboratorio Central del Hospital Iturraspe de la ciudad de Santa Fe. El diagnóstico de *Ct* se realizó mediante PCR y la detección de *Mh* y *Uu* se realizó mediante cultivos en medios adecuados.

Por otro lado, el estudio del perfil inmunológico se realizó sobre un total de 86 muestras, las cuales se clasificaron en 3 grupos:

- Infértiles sin infecciones (ISI) (grupo de pacientes con diagnóstico negativo para las tres infecciones: *Ct*, *Mh*, *Uu*): n=34, 17 femeninos (f) y 17 masculinos (m).
- Infértiles con infecciones (ICI) (grupo de pacientes cuyo diagnóstico fue positivo para al menos una de las tres infecciones (*Ct*, *Mh*, *Uu*): n= 35, 8 positivos para *Ct* (7f y 1m), 12 positivos para *Mh* (12 f), y 15 positivos para *Uu* (6f y 9m).
- Fértiles sin infección (FSI) (grupo de pacientes cuyo diagnóstico fue negativo para las tres infecciones (*Ct*, *Mh*, *Uu*) n=17 (17 f).

Las muestras fueron centrifugadas a 2000g por 5 minutos a temperatura ambiente. El pellet celular fue resuspendido en trizol™ y almacenado a -80°C para la determinación de citoquinas, mientras que el sobrenadante se conservó y almacenó a -20°C para análisis de ASA. A partir del pellet celular conservado a -80°C se purificó ARN con trizol™, según instrucciones del fabricante y luego se retrotranscribió utilizando la enzima M-MLV y hexanucleótidos al azar. Se amplificaron secuencias de interés a partir del ADNc obtenido mediante PCR en tiempo real, utilizando oligonucleótidos específicos. La cantidad de ARN se normalizó con el gen de expresión constitutiva, β -actina y la cuantificación se realizó en forma relativa respecto al grupo control.

Por otro lado se evaluó la presencia de anticuerpos antiespermáticos de tipo IgG, IgA, IgM mediante la optimización de un ELISA indirecto, empleando como antígeno un lisado de espermatozoides obtenidos de 5 pacientes con espermograma normal. Como controles positivos, se emplearon sueros de pacientes con ASA determinados previamente por la técnica de *immunobeads* indirecta. Los anticuerpos unidos fueron revelados mediante un anticuerpo (Ac) anti-IgA, IgM, IgG humano hecho en cabra conjugado a peroxidasa (Ab-Cam) y utilizando el sistema H₂O₂/TMB.

Por último se realizó una comparación entre la información clínica disponible de los pacientes (espermograma y exudado genital según corresponda) y los resultados obtenidos en relación al perfil inmunológico en presencia o ausencia de infecciones genitales.

Para el análisis estadístico se empleó el programa GraphPad versión 5.00 para Windows (San Diego California USA, www.graphpad.com). Los datos fueron comparados mediante pruebas no paramétricas de Mann-Whitney y de Kruskal-Wallis. Para las variables categóricas se utilizó la prueba exacta de Fisher. Para el análisis estadístico de los niveles de expresión se aplicó el método comparativo $\Delta\Delta CT$

empleando el software REST-2009 (Relative Expression Software Tool, Qiagen, Hilden, Germany, <http://www.REST.de.com>). Se consideró diferencia significativa cuando el $p < 0,05$.

RESULTADOS

Con respecto a la prevalencia de ITS en pacientes infértiles, se encontró que el 72% de los pacientes infértiles estudiados no estaban infectados con las ITS en estudio (*Ct*, *Mh* y *Uu*). El 3% de los pacientes poseen infecciones mixtas de las cuales hay 1 con *Mh-Uu*, y 2 con *Ct-Mh* y *Ct-Uu*. Del 5% de los pacientes que poseen *Ct*, 7 son femeninos y 1 masculino. El 9% de los pacientes que poseen *Mh* corresponde a un total de 15 femeninos y del 11% de pacientes que poseen *Uu* son 11 masculinos y 7 femeninos.

En la **Tabla 1** se presentan los valores obtenidos de expresión relativa (R) de las citoquinas analizadas: IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-17A, TGF- β 1, IL-6 e IL-8, así como de los factores de transcripción de LT: GATA3, ROR γ t, FOXP3 y Tbet, para los diferentes grupos de pacientes. Además se indica el valor p y el error estándar (SE). Las flechas indican un aumento o disminución significativa de la expresión de citoquinas o factores de transcripción.

		ISI/FSI	ICI Ct/FSI	ICI Mh/FSI	ICI Uu (fem)/FSI	ICI Ct/ISI	ICI Mh/ISI	ICI Uu (fem)/ISI	ICI Uu (masc)/ISI
IFN- γ	p	0.011	0.52	0.121	0.015	0.151	0.228	0.878	0.155
	R	6.877	1.706	2.786	7.872	0.248	0.405	1.145	3.559
	SE	0,535-84,932	0,128-22,952	0,272-28,510	0,952-65,183	0,015-5,040	0,028-5,510	0,127-9,706	0,238-148,122
TNF- α	p	0.161	0.746	0.474	0.119	0.468	0.5	0.622	0.649
	R	2.416	1.321	1.561	3.688	0.547	0.646	1.526	0.642
	SE	0,161-28,858	0,153-21,278	0,146-14,389	0,445-29,62	0,059-5,545	0,054-6,741	0,224-11,253	0,120-6,944
IL-10	p	0.018	0.748	0.05	0.096	0.14	0.538	0.766	0.197
	R	4.768	1.285	3.215	3.706	0.269	0.674	0.777	2.142
	SE	0,392-51,410	0,146-18,352	0,449-20,343	0,590-22,666	0,023-3,7	0,084-4,535	0,112-6,302	0,508-14,841
IL-17A	p	0.034	0.93	0.84	0.252	0.073	0.047	0.58	0.444
	R	4.444	0.932	1.15	2.946	0.21	0.259	0.663	0.603
	SE	0,273-61,172	0,06-20,016	0,075-16,03	0,326-31,433	0,016-3,125	0,021-2,545	0,091-4,436	0,106-2,679
TGF- β 1	p	0.111	0.433	0.476	0.426	0.587	0.25	0.006	0.319
	R	0.323	0.466	0.579	2.324	1.443	1.793	7.2	0
	SE	0,023-8,555	0,033-13,138	0,04-13,979	0,207-56,08	0,176-5,825	0,366-10,219	0,997-28,492	0,111-67,649
IL-6	p	0.02	0.118	0.221	0.509	0.919	0.407	0.262	0.976
	R	5.911	5.41	3.075	2.101	0.916	0.52	0.356	1.03
	SE	0,279-107,580	0,318-133,099	0,113-92,010	0,075-35,554	0,052-12,807	0,029-9,797	0,032-4,032	0,033-37,802
IL-8	p	0.468	0.578	0.121	0.204	0.997	0.358	0.514	0.023
	R	1.683	1.668	3.723	3.313	0.991	2.213	1.969	8.589
	SE	0,102-32,770	0,081-26,069	0,135-96,974	0,275-42,114	0,037-20,869	0,061-64,019	0,128-26,8	0,338-198,48
GATA3	p	0.162	0.974	0.619	0.087	0.371	0.094	0.476	0.689
	R	3.4	1.037	0.638	8.523	0.304	0.187	2.498	0.587
	SE	0,123-102,075	0,013-94,386	0,014-19,941	0,250-256,167	0,003-22,753	0,005-6,269	0,079-79,478	0,02-7,047
ROR γ t	p	0.001	0.087	0.187	0.028	0.347	0.035	0.857	0.295
	R	12.289	5.919	2.904	10.723	0.483	0.236	0.873	2.412
	SE	1,333-143,014	0,514-77,694	0,277-54,808	1,203-116,304	0,028-7,466	0,023-2,996	0,08-13,028	0,227-27,581
FOXP3	p	0.009	0.765	0.255	0.003	0.271	0.147	0.334	0.392
	R	4.903	1.327	1.723	12.279	0.271	0.351	2.72	0.154
	SE	0,524-50,913	0,156-23,360	0,273-9,817	1,262-139,618	0,010-8,252	0,038-3,077	0,157-47,897	0,004-20,054
hTbet	p	0.004	0.802	0.829	0.2	0.068	0.032	0.31	0.847
	R	8.7	1.242	1.149	2.823	0.143	0.132	0.324	0.854
	SE	0,488-175,091	0,158-19,062	0,107-11,46	0,37-18,87	0,006-2,933	0,005-2,867	0,019-3,568	0,06-12,691

Tabla 1: Expresión relativa de citoquinas y factores de transcripción de LT.

Se observó que en ausencia de infección las mujeres infértiles presentan niveles elevados de citoquinas (INF- γ , IL-10, IL-17A, IL-6) particularmente proinflamatorias, lo que se correlaciona con un aumento de la expresión de factores de transcripción Tbet, Foxp3, ROR γ t. Sorprendentemente, entre los pacientes infértiles, la infección con *Mh* disminuye significativamente la citoquina proinflamatoria IL-17A y los factores de transcripción ROR γ t y Tbet.

No se observan alteraciones en la expresión de citoquinas en pacientes femeninos infértiles con infección por *Ct* al compararlo tanto frente al grupo de FSI como a ISI. Con respecto al grupo femenino de ICI por *Uu*, se puede observar un incremento significativo de TGF- β 1 respecto al grupo control ISI femenino, lo cual no se observa para los masculinos que poseen la misma infección, los que muestran solo un incremento significativo de la citoquina proinflamatoria IL-8 respecto de su grupo control (ISI masculinos).

El análisis de ASA mediante ELISA indirecto arrojó que un 8% de las muestras de pacientes femeninos ICI posee ASA, así como también un 11% de las muestras del grupo ISI. Sorprendentemente se registró que un 17% de FSI-f presenta ASA. Con respecto a las muestras de masculinos, un 10% del grupo ICI presentó ASA, a diferencia del grupo de ISI que sólo arrojó un 5,88%.

El análisis estadístico no mostró correlación entre ASA e infertilidad o infecciones.

Respecto a las correlaciones realizadas, se observó una asociación significativa entre el tipo de infección y el sexo del paciente, particularmente entre las infecciones por *Mh* con el sexo femenino y las infecciones por *Uu* con el sexo masculino. No se observaron correlaciones significativas entre los parámetros espermáticos ni las características de los exudados vaginales respecto a las infecciones estudiadas.

Los resultados expuestos permiten inferir que la infertilidad se asocia con un incremento de varias citoquinas proinflamatorias, en ausencia de infección. Asimismo se observó que las infecciones tienden a disminuir los niveles de estas citoquinas en pacientes infértiles. Particularmente se observaron alteraciones significativas en la expresión de citoquinas en pacientes infértiles con infección por *Mh* y *Uu*. En conjunto estos resultados sugieren que la alteración de citoquinas en el tracto genital femenino y masculino puede estar asociada con infertilidad.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

Bronson RA., 1999. Antisperm antibodies: a critical evaluation and clinical guidelines. *J Reprod Immunol*, 45, 159-183.

Castellano M., Gallegos B., Gallegos L., Soto M., 1996. *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* y *Mycoplasma fermentans*: su relación con patologías del tracto genital humano. *Kasmera*, 24, 63-82.

Kong F., James G., Ma Z., Gordon S., Wang B., Gilbert G., 1999. Phylogenetic analysis of *Ureaplasma urealyticum*-support for the establishment of a new specie, *Ureaplasma parvum*. *Int J Syst Bacteriol*, 49, 1879-1889.

Organización Mundial de la Salud, 2016. Infecciones de transmisión sexual. Nota descriptiva N°110. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs110/es/>

Sarah EM., Howie SEM., Horner P.J., Horne AW., Entrican G., 2011. Immunity and vaccines against sexually transmitted *Chlamydia trachomatis* infection. *Curr Opin Infect*, 24, 56-61.

Wang Y., Liang CL., Wu JQ., Xu C., Qin SX, Gao ES., 2006. Do *Ureaplasma urealyticum* infections in the genital tract affect semen quality?. *Asian J Androl*, 8, 562-568.