



**siicsalud**  
suscripciones

[Comprar este artículo](#)  
Extensión: 9.86 páginas impresas en  
papel A4



[Artículos seleccionados para su compra](#)



[Inicio](#) | [Hoy](#) | [Artículos](#) | [Novedades](#) | [Especialidades](#) | [Farmacología](#) | [Congresos](#) | [Praxis](#) | [Evaluaciones](#) | [Boletines](#) | [Inscripciones](#)

## IDENTIFICAN PROTEÍNAS ESPERMÁTICAS INVOLUCRADAS EN LA FECUNDACION HUMANA

(especial para SIIC © Derechos reservados)

Los anticuerpos presentes en fluidos foliculares humanos con capacidad de alterar la funcionalidad espermática constituyen una herramienta para la identificación de proteínas involucradas en la interacción de los gametos.

		<p>Autor: <a href="#">Clara Isabel Marín Briggiler</a> Columnista Experta de SIIC</p> <p>Institución: Instituto de Biología y Medicina Experimental, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Buenos Aires, Argentina</p> <p><a href="#">Artículos publicados por Clara Isabel Marín Briggiler</a></p>
---	---	---

participaron en la investigación

**María Fernanda González Echeverría\* Jorge Blaquier\*\* Jorge Guillermo Tezón\*\*\* Mónica Hebe Vázquez-Levin\*\*\*\***

\*Lic. en Ciencias Biológicas, Laboratorio de Reproducción Asistida, Centro Médico Fertilab, Argentina

\*\*Dr. en Ciencias Médicas, Centro Médico Fertilab, Argentina

\*\*\*Dr. en Ciencias Químicas, Instituto de Biología y Medicina Experimental, CONICET, Argentina

\*\*\*\*Dra. en Ciencias Químicas, Instituto de Biología y Medicina Experimental, CONICET, Argentina

Recepción del artículo: 11 de Abril, 2006

Aprobación: 2 de Mayo, 2006

Primera edición: 28 de Julio, 2006

### ► Resumen

La presencia de anticuerpos antiespermáticos en diferentes fluidos biológicos puede afectar la interacción entre el espermatozoide y el ovocito y causar infertilidad. En trabajos previos de nuestro grupo se demostró que los fluidos foliculares de pacientes participantes de un programa de fecundación *in vitro* contienen inmunoglobulinas (IgGFF) con capacidad de alterar la función espermática, esto es, tanto inhibir la unión de los espermatozoides a la matriz extracelular del ovocito como inducir la liberación de las enzimas acrosomales (Marín Briggiler et al, Am J Reprod Immunol, 2003). El objetivo del presente estudio fue utilizar dichos anticuerpos para identificar proteínas espermáticas involucradas en la interacción de los gametos humanos. Se llevaron a cabo ensayos de *Western immunoblotting* en los que proteínas extraídas de espermatozoides humanos incubados en condiciones capacitantes fueron separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida de una dimensión, transferidas a membranas de nitrocelulosa y expuestas a fluidos foliculares individuales y anticuerpos anti-IgG humana. Tres de las IgGFF capaces de alterar los eventos relacionados con la interacción de los gametos reconocieron proteínas espermáticas de  $78 \pm 1$ ,  $58 \pm 2$  y  $15 \pm 1$  kDa. La caracterización bioquímica y molecular de estos polipéptidos permitirá confirmar su participación en la interacción espermatozoide-ovocito. Estos estudios contribuirían a dilucidar las bases moleculares del proceso de fecundación y conducirían a proponer métodos alternativos para el diagnóstico y tratamiento de la infertilidad, así como nuevas estrategias para la regulación de la natalidad.

### ► Palabras clave

proteínas espermáticas, anticuerpos antiespermáticos, interacción de gametas, reproducción humana, fluido folicular

### Clasificación en siicsalud

► [Artículos originales](#) > [Expertos del Mundo](#) > página [www.siicsalud.com/des/des049/06727002.htm](http://www.siicsalud.com/des/des049/06727002.htm)

### Especialidades

- [Título español/](#)
- [Resumen](#)
- [Palabras clave](#)
- [Bibliografía](#)
- [Artículo](#)
- [Autoevaluación](#)
- [Tema principal en SIIC Data Base](#)
- [Especialidades](#)
- [English title](#)
- [Abstract](#)
- [Key words](#)
- [Autor](#)
- [Artículos](#)
- [Correspondencia](#)
- [Patrocinio](#)
- [Imprimir esta página](#)

Clasificado en  
► [Artículos originales](#) > [Expertos del Mundo](#)

Especialidad principal:  
► [Inmunología](#)

Relacionadas:  
► [Bioquímica](#),  
► [Diagnóstico por Laboratorio](#),  
► [Urología](#)

▶ **Principal:** [Inmunología](#)  
▶ **Relacionadas:** [Bioquímica](#), [Diagnóstico por Laboratorio](#), [Urología](#)

▶ **Enviar correspondencia a:**

Clara I. Marín Briggiler, Instituto de Biología y Medicina Experimental, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), C1428ADN, Buenos Aires, Argentina

▶ **Patrocinio y reconocimiento**

El estudio fue subsidiado con fondos de la Organización Mundial de la Salud (LID Grant # 97175), el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y la Agencia Nacional de Promoción de la Ciencia y Tecnología (PICT97, 00207) (Argentina).

## USE OF NATURALLY OCCURRING ANTISPERM ANTIBODIES FOR THE IDENTIFICATION OF PROTEINS INVOLVED IN HUMAN GAMETE INTERACTION

▶ **Abstract**

Presence of antisperm antibodies in biological fluids can alter sperm-egg interaction and cause infertility. Previous studies from our group have demonstrated that follicular fluids obtained from patients participating in an in vitro fertilization program contain immunoglobulins (FFIgG) with the ability to affect sperm function, i.e. to inhibit sperm binding to the egg extracellular matrix and/or to induce the release of acrosomal enzymes (Marín Briggiler et al, Am J Reprod Immunol, 2003). The objective of the present study was to use these antibodies to identify sperm proteins involved in human gamete interaction. Western immunoblot assays were carried out in which proteins extracted from human sperm previously incubated under capacitating conditions were separated by one dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, transferred to nitrocellulose membranes and exposed to individual follicular fluids and anti human IgG antibodies. Three of the FFIgG with the capacity of altering gamete interaction-related events recognized sperm proteins of  $78 \pm 1$ ,  $58 \pm 2$  and  $15 \pm 1$  kDa. Biochemical and molecular characterization of these polypeptides will confirm their participation in sperm-egg interaction. These studies would contribute to elucidate the molecular basis of the fertilization process, and would lead to propose alternative methods for infertility diagnosis and treatment, as well as new strategies for fertility regulation.

▶ **Key words**

, sperm proteins, antisperm antibodies, gamete interaction, human reproduction, follicular fluid

Artículo completo

### IDENTIFICAN PROTEINAS ESPERMATICAS INVOLUCRADAS EN LA FECUNDACION HUMANA

(especial para SIIC © Derechos reservados)

#### Introducción

La fecundación es un fenómeno complejo que involucra la interacción entre los gametos masculino y femenino. El espermatozoide, una célula sumamente especializada, es producida en el testículo, sufre un proceso de maduración durante su estadía en el epidídimo y completa la adquisición de su capacidad fecundante en el tracto femenino, mediante un proceso conocido como capacitación espermática. Una vez capacitado, el espermatozoide puede unirse a la matriz extracelular del ovocito o zona pelúcida (ZP), interacción que desencadena la exocitosis del contenido acrosomal (exocitosis acrosomal). La liberación de las enzimas acrosomales, junto con la movilidad hiperactivada, permiten que el espermatozoide penetre la ZP y se fusione con la membrana plasmática del ovocito u oolema.<sup>1</sup>

El reconocimiento e interacción de los gametos se basa en la complementariedad de los componentes de la ZP y de las moléculas presentes en la membrana plasmática del espermatozoide. La unión espermatozoide-ZP es específica de especie y la exocitosis acrosomal se desencadena cuando ligandos de la matriz extracelular del ovocito provocan la agregación de receptores en el espermatozoide. A pesar de que numerosos estudios se orientaron a la caracterización de las moléculas espermáticas involucradas en estos eventos, aun no se determinó con certeza la identidad de éstas.<sup>2</sup> Se ha propuesto que en la superficie del espermatozoide podría existir un receptor de ZP multivalente (con más de un sitio activo), o varios sitios receptores, que contribuirían a la especificidad y complejidad en la interacción de los

[Suscripción a siicsalud](#)

[Comprar este artículo](#)

Extensión: ±  
9.86 páginas impresas  
en papel A4



[Artículos seleccionados para su compra](#)



gametos.<sup>3</sup>

El proceso de fecundación puede ser afectado por la presencia de anticuerpos dirigidos contra antígenos espermáticos u ovocitarios. Estos anticuerpos (inmunoglobulinas de los tipos A, G y M) fueron detectados en el suero y en secreciones del tracto reproductor masculino (plasma seminal) y femenino (moco cervical, fluidos folicular y tubario). Se ha descrito que la infertilidad por causa inmunológica afecta de un 9% a un 36% de las parejas en consulta médica por dificultades para concebir.<sup>4,5</sup>

Los anticuerpos antiespermáticos pueden interferir en la movilidad y en la penetración de los espermatozoides a través del moco cervical, así como afectar la interacción de los gametos y el desarrollo embrionario temprano.<sup>6,7</sup> Estudios previos de nuestro grupo indicaron que los fluidos foliculares (FF) provenientes de pacientes participantes de un programa de fecundación asistida contienen inmunoglobulinas de tipo G (IgG) capaces de inducir la exocitosis acrosomal de los espermatozoides humanos;<sup>8</sup> un análisis individual permitió identificar fluidos con IgG que, además de desencadenar la exocitosis del acrosoma, inhiben la unión de los espermatozoides a la ZP.<sup>9</sup> Teniendo en cuenta el efecto de estos anticuerpos sobre la funcionalidad del espermatozoide, es posible proponer que éstos estén dirigidos contra entidades espermáticas que participan en la interacción con el ovocito. El objetivo del presente trabajo fue utilizar estas IgG del FF como herramientas para avanzar en la identificación de proteínas espermáticas involucradas en eventos tempranos de la fecundación humana.

## **Materiales y métodos**

Las muestras de semen humano utilizadas en el presente estudio fueron obtenidas con el consentimiento informado de los donantes y el protocolo experimental fue aprobado por el Comité de Ética de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (Buenos Aires, Argentina).

### *Obtención y procesamiento de las muestras de semen*

Las muestras de semen fueron obtenidas de donantes voluntarios, luego de 2 a 5 días de abstinencia sexual. Dentro de la primera hora de obtención de las muestras se determinaron los parámetros seminales de acuerdo con los lineamientos de la Organización Mundial de la Salud.<sup>10</sup> Sólo se utilizaron las muestras de semen que presentaron una concentración de  $20 \times 10^6$  espermatozoides/ml o mayor, con más de 50% de espermatozoides con movilidad progresiva, un porcentaje de formas normales mayor del 14% y que carecían de anticuerpos antiespermáticos, según el análisis por el ensayo de *Immunobeads* directo.<sup>10</sup>

Los espermatozoides móviles fueron seleccionados por filtración por columnas de lana de vidrio y la capacitación espermática se llevó a cabo por incubación a 37°C, durante 6 h en medio HSM suplementado con 26 mg/ml de albúmina sérica bovina (BSA, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU.).<sup>11</sup> Luego de esta incubación, se determinó el porcentaje de espermatozoides con movilidad progresiva, descartándose aquellas muestras que presentaban menos de 75% de células móviles.

### *Obtención y preparación del fluido folicular humano*

Las muestras de fluido folicular se obtuvieron de pacientes participantes en un programa de fecundación *in vitro* (Centro Médico Fertilab, Buenos Aires), sin realizar una selección previa de acuerdo con la causa de infertilidad.

El desarrollo folicular múltiple se obtuvo utilizando un protocolo largo de inducción con análogos de la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH, LUPRON, Lab. Abbot) y gonadotrofinas recombinantes (GONAL, Serono, Buenos Aires, Argentina).<sup>12</sup> Los folículos fueron aspirados mediante ecográfica transvaginal; los complejos *cumulus oophorus*-ovocito fueron transferidos a cápsulas de cultivo y los fluidos foliculares correspondientes a cada paciente fueron centrifugados durante 15 min a 1500 xg para eliminar los restos celulares, calentados a 56°C, filtrados y posteriormente almacenados a -20°C hasta su utilización.

### *Extracción, separación electroforética y electrotransferencia de las proteínas espermáticas*

Los espermatozoides, luego de la incubación en condiciones que promueven la capacitación, fueron lavados 2 veces con *buffer* fosfato salino (PBS; pH 7.4),

conteniendo p-aminobenzamidina 1 mM y resuspendidos en *buffer* de extracción (Tritón X-100 1% y desoxicolato de Na<sup>+</sup> 1% en PBS suplementado con inhibidores de proteasas: p-aminobenzamidina 2 mM, fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) 1 mM, aprotinina 10 µg/ml y leupeptina 10 µg/ml). La extracción proteica se llevó a cabo por incubación en hielo durante 2 h con agitación; posteriormente las muestras se trataron con ultrasonido durante 10 min y se centrifugaron a 6 000 xg por 5 min.<sup>13</sup> Los sobrenadantes fueron suplementados con *buffer* "muestra" de Laemmli 4x y fueron calentados a 100°C en presencia de beta-mercaptoetanol 70 mM durante 5 min.<sup>14</sup> Después de una centrifugación, los sobrenadantes fueron guardados a -20°C hasta su uso. Los extractos proteicos provenientes de 7 donantes diferentes fueron mezclados y sometidos a separación electroforética. Se utilizaron geles preparativos de poliacrilamida al 10% y SDS 0.1%, preparados siguiendo la técnica de Laemmli.<sup>14</sup> Se sembraron alícuotas de los extractos proteicos correspondientes a 300 x 10<sup>6</sup> espermatozoides, paralelamente con los estándares de peso molecular (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EE.UU.) y la corrida electroforética se realizó a corriente constante (25 mA por gel). La transferencia de las proteínas a membranas de nitrocelulosa fue realizada de acuerdo con el método de Towbin y col.,<sup>15</sup> a un voltaje constante de 35 V, por 18 h a 4°C. Las membranas fueron teñidas con rojo Ponceau (2 mg/ml en ácido acético 0.5%) hasta obtener la coloración deseada y posteriormente fueron cortadas en secciones a lo largo del sentido del desarrollo de la electroforesis.

#### *Inmunodetección*

Los sitios de unión no específicos de la membrana de nitrocelulosa fueron bloqueados por incubación con leche descremada 5% en PBS-Tween 20 0.1% durante 1 h. Posteriormente, cada sección de nitrocelulosa fue incubada con los fluidos foliculares individuales (diluidos 1:25 en solución de bloqueo), durante toda la noche a 4°C. Luego de 4 lavados de 5 min con PBS-Tween 20 0.1%, se agregó el segundo anticuerpo (anti-IgG humana desarrollado en conejo, unido a peroxidasa, Sigma Chemical Co.) diluido 1:5 000, incubándose por 1 h. La nitrocelulosa se lavó como se indicó anteriormente y las bandas reactivas se detectaron mediante quimioluminiscencia (ECL kit, Amersham Life Science Inc., Oakville, ON, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Todas las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente. La determinación de los pesos moleculares aparentes se llevó a cabo mediante interpolación en la recta obtenida por regresión lineal, utilizando los valores de movilidad electroforética en función del peso molecular de los estándares de proteínas.

#### **Resultados**

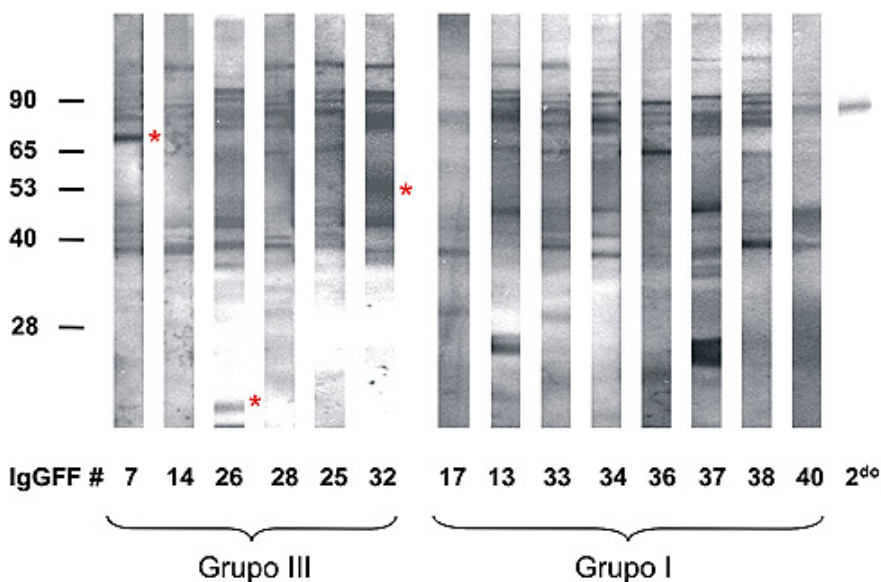
En un estudio anterior, nuestro grupo describió que inmunoglobulinas presentes en los fluidos foliculares (IgGFF) de pacientes en tratamiento por infertilidad son capaces de inducir la exocitosis acrosomal en espermatozoides humanos; en el mismo estudio se determinó que cuando las incubaciones se realizaron en condiciones que previenen la inducción de la exocitosis acrosomal (en medio de capacitación conteniendo iones Sr<sup>2+</sup> en reemplazo de iones Ca<sup>2+</sup>),<sup>11</sup> la presencia de estas inmunoglobulinas conducía una disminución en la capacidad de los espermatozoides de unirse a la ZP homóloga.<sup>9</sup> Estos resultados indicarían que algunas IgGFF son capaces de reconocer y producir la agregación de receptores espermáticos para la ZP, y por lo tanto, se constituyen en herramientas valiosas para la identificación y caracterización de entidades espermáticas que participan en la interacción de los gametos humanos.

En el presente estudio se llevaron a cabo ensayos de *Western immunoblotting* a fin de identificar las proteínas espermáticas reconocidas por las IgGFF analizadas en el trabajo anterior. Los extractos de proteínas se prepararon utilizando espermatozoides incubados en condiciones que promueven la capacitación. Los componentes proteicos extraídos fueron separados por electroforesis en geles de poliacrilamida, seguida de electrotransferencia e inmunorrevelado con FF individuales conteniendo IgG previamente seleccionados por su alta capacidad de inducir la exocitosis acrosomal, que inhiben o no afectan la unión de los espermatozoides a la ZP (clasificadas como Grupo III).<sup>9</sup> Como control se utilizaron FF con IgG con capacidad baja o nula de provocar la liberación de las enzimas acrosomales, que no bloquean la

interacción de los gametos (Grupo I).<sup>9</sup> En los ensayos se incluyeron 6 fluidos del Grupo III y 7 del Grupo I, seleccionados al azar.

El análisis del patrón de bandas mostró que cada inmunoglobulina elegida reconoció de manera específica entre 5 y 10 proteínas espermáticas con peso molecular aparente (PM) entre 130 y 11 kDa (figura 1, tabla I). A fin de identificar las proteínas detectadas por las IgGFF con capacidad de afectar la funcionalidad espermática se siguieron varias estrategias de análisis. En una de ellas se procedió a la búsqueda de bandas inmunorreactivas para alguna de las IgGFF del Grupo III que no estuvieran presentes en los perfiles inmunorreveados con IgGFF del Grupo I; en este caso, se discriminó entre las IgGFF del Grupo III con capacidad de inducir la exocitosis acrosomal e inhibir la unión de los espermatozoides a la ZP (IgGFF # 7, 14, 26 y 28) y las IgGFF del Grupo III sólo inductoras de la exocitosis acrosomal (IgGFF # 25 y 32). Como resultado de esta búsqueda se identificaron tres bandas inmunorreactivas específicas: una de  $78 \pm 1$  kDa, reconocida por la IgGFF # 7, una de  $15 \pm 1$  kDa, reconocida por la IgGFF # 26 y una de  $58 \pm 2$  kDa, detectada por la IgGFF # 32. Estas proteínas no fueron reactivas con otras de las IgGFF evaluadas (figura 1 y tabla I).

**Figura 1**



**Figura 1.** Proteínas espermáticas reconocidas por inmunoglobulinas del fluido folicular. Los espermatozoides móviles fueron incubados en condiciones que promueven la capacitación por 6 h, en medio HSM, y las proteínas fueron extraídas utilizando un *buffer* con detergentes. Se realizaron geles preparativos (desnaturalizantes) y se sembró una alícuota del extracto correspondiente a  $300 \times 10^6$  espermatozoides. Luego de la transferencia, la membrana de nitrocelulosa fue dividida en secciones a lo largo del sentido del desarrollo de la electroforesis, que fueron incubadas con los fluidos foliculares individuales como primer anticuerpo y anti-IgG humana como segundo anticuerpo. Como control, una sección fue incubada solamente con segundo anticuerpo (2do). Los marcadores de peso molecular ( $\times 10^{-3}$ ) se indican en el margen izquierdo de la figura. Se muestran los resultados de un experimento típico. El ensayo fue repetido tres veces obteniéndose resultados similares. Los asteriscos indican bandas reconocidas selectivamente por IgGFF del Grupo III (con alta capacidad de inducir la exocitosis acrosomal).<sup>9</sup>

[tabla I](#)

## Discusión

Los anticuerpos presentes en los fluidos de hombres y mujeres inmunoinfértiles han sido ampliamente usados para la identificación de

proteínas que participan en los distintos eventos del proceso de fecundación. Mediante diferentes técnicas como *Western immunoblotting*, inmunoprecipitación, análisis de bibliotecas de ADN complementario o evaluación proteómica avanzada en combinación con anticuerpos provenientes de fluidos de pacientes inmunofértiles o anticuerpos monoclonales, se describieron, entre otras, las proteínas espermáticas LDH-C4, HSA-63, CS-1, SP 1U, SAGA-1, YWK-II, BE-20, rSMP-B, BS-63, BS-17, HED-2, GNPDA, SP22, Ag 1F10, PH-20, FA-1, FA-2, gp20, NASP, TSA-1, SP-10, NZ-1, NZ-2, SPAN-X, AgX-1, CV, CABYR, SAMP14, SAMP32, SP-17, SPAG9, etc.; la mayor parte de estos estudios se basaron en una caracterización inicial bioquímica o molecular o de ambos tipos, y en el análisis posterior de la relevancia funcional de las proteínas de interés (para revisión, véanse referencias 16-19). En el presente estudio, los fluidos foliculares que contenían anticuerpos de importancia funcional por su capacidad de inhibir la unión de los espermatozoides a la ZP y su efecto inductor de la exocitosis acrosomal<sup>9</sup> fueron utilizados para la identificación de proteínas espermáticas involucradas en la interacción con el ovocito. En el análisis por *Western immunoblotting*, las IgGFF reconocieron un conjunto de proteínas espermáticas de variados PM. Una complejidad similar fue descrita en los perfiles de proteínas reactivas a inmunoglobulinas del suero de pacientes inmunofértiles,<sup>20-24</sup> resultados que sugieren que la infertilidad de tipo inmunológica sería la consecuencia de la acción combinada de diferentes anticuerpos sobre antígenos espermáticos múltiples.

La estrategia de análisis del presente estudio se basó en la comparación de las proteínas inmunorreactivas a las IgGFF con capacidad de afectar la funcionalidad espermática (Grupo III) respecto de las detectadas por las IgGFF del grupo control (Grupo I). La búsqueda de entidades reconocidas específicamente por las IgGFF del Grupo III condujo a la identificación de tres bandas de  $78 \pm 1$ ,  $58 \pm 2$  y  $15 \pm 1$  kDa. Si se considera el efecto biológico de las IgGFF determinado en el trabajo previo,<sup>9</sup> se podría proponer la participación de las proteínas espermáticas de  $78 \pm 1$  y  $15 \pm 1$  kDa tanto en la unión a la ZP como en la inducción de la exocitosis acrosomal, mientras que la proteína de  $58 \pm 2$  kDa podría estar involucrada sólo en la inducción de la exocitosis del contenido acrosomal.

La revisión de la literatura indica que existen varios informes sobre la identificación de proteínas espermáticas de PM similar a las encontradas en el presente estudio. Proteínas de PM cercano a 78 kDa fueron descritas en estudios que usaron anticuerpos del suero de mujeres<sup>25-27</sup> y hombres infértiles,<sup>28,29</sup> así como anticuerpos monoclonales dirigidos contra proteínas de espermatozoides humanos.<sup>30,31</sup> Entidades espermáticas de un PM similar a 58 kDa fueron identificadas luego de la comparación de los perfiles proteicos de espermatozoides provenientes de muestras con parámetros seminales normales y las correspondientes a hombres infértiles<sup>32</sup> y mediante el uso de inmunoglobulinas presentes en fluidos de pacientes inmunofértiles<sup>20,21,23,29,33-39</sup> o de anticuerpos monoclonales<sup>31</sup> o policlonales desarrollados contra espermatozoides y plasma seminal.<sup>40</sup> En particular, una de las proteínas espermáticas mejor caracterizadas como receptor para la ZP en humanos es la denominada FA-1, de 51 kDa.<sup>41,42</sup> Con respecto a proteínas de alrededor de 15 kDa, éstas también fueron reconocidas por anticuerpos presentes en fluidos de pacientes inmunofértiles.<sup>38,43-45</sup> Entre ellas figuran los antígenos denominados CS-1,<sup>46</sup> BS-17,<sup>47</sup> y P18,<sup>48</sup> así como SAGA-1 y SOB2-SOB3 que fueron identificados por anticuerpos monoclonales dirigidos contra proteínas de espermatozoides humanos.<sup>49-51</sup> Cabe mencionar que proteínas espermáticas de PM entre 14 y 18 kDa son reconocidas por componentes de la ZP, lo que sugeriría su participación en la interacción de los gametos.<sup>52,53</sup>

Durante el análisis no se detectaron bandas inmunorreactivas a todas IgGFF del Grupo III evaluadas. Esto podría explicarse por el hecho de que estos anticuerpos, capaces de reconocer antígenos que se localizan sobre la superficie del espermatozoide en su conformación nativa no sean reactivos contra las proteínas espermáticas luego del tratamiento al que fueron sometidas para el ensayo de *immunoblotting*. Por otra parte, si se considera que se propuso que la interacción espermatozoide-ZP requeriría la participación de más de un sitio receptor en la superficie espermática,<sup>3</sup> es posible que las IgG de distintos fluidos foliculares reconozcan diferentes

proteínas, todas involucradas en este evento y en la posterior inducción de la exocitosis acrosomal.

En nuestro conocimiento, éste es el primer estudio en el que los anticuerpos del fluido folicular fueron utilizados para identificar proteínas de espermatozoides capacitados, involucradas en una respuesta funcional. Si se considera que los anticuerpos presentes en el suero pueden ser diferentes de los contenidos en las secreciones del tracto femenino<sup>26</sup> la identificación de estas proteínas aportaría información adicional a la existente a partir de estudios que utilizan suero u otra fuente de anticuerpos. Su secuenciación permitirá determinar su identidad y estudios adicionales contribuirán a confirmar su importancia funcional.

#### ► Bibliografía del artículo

1. Yanagimachi R. Mammalian fertilization. In Knobil E, Neill JD (eds), *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press, Ltd. 1994:189-317.
2. Wassarman PM, Jovine L and Litscher ES. A profile of fertilization in mammals. *Nature Cell Biology* 2001; 3:E59-E64.
3. Thaler C. Defining the biochemical mechanisms of sperm-zona pellucida binding. In Gagnon C (ed), *The male gamete: From basic science to clinical applications*. Cache River Press, 1999:196-203.
4. Bronson R. Antisperm antibodies: a critical evaluation and clinical guidelines. *J Reprod Immunol* 1999; 45:159-83.
5. Naz RK. Modalities for treatment of antisperm antibodies mediated infertility: novel perspectives. *Am J Reprod Immunol* 2004; 51(5):390-7.
6. Matson PL. Sperm antibodies: formation and significance. In Grudzinskas JG, Yovich JL (eds), *From Gametes: The Spermatozoon*. Cambridge University Press 1995:237-49.
7. Ohl DA, Naz RK. Infertility due to antisperm antibodies. *Urology* 1995; 46:591-602.
8. Saragüeta P, Lanuza G, Miranda PV, Tezón JG, Barañao JL. Immunoglobulins from human follicular fluid induce the acrosome reaction in human sperm. *Mol Reprod Dev* 1994; 39:280-8.
9. Marín Briggiler CI, Vazquez-Levin MH, Gonzalez Echeverría F, Blaquier J, Miranda PV, Tezón JG. Effect of antisperm antibodies present in human follicular fluid upon the acrosome reaction and sperm-zona pellucida interaction. *Am J Reprod Immunol* 2003; 50:209-19.
10. World Health Organization: WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm cervical mucus interaction. New York, Cambridge University Press 1999.
11. Marín Briggiler CI, Vazquez-Levin MH, Gonzalez Echeverría F, Blaquier J, Tezón JG, Miranda PV. Strontium supports human sperm capacitation but not follicular fluid-induced acrosome reaction. *Biol Reprod* 1999; 61:673-80.
12. Ron-El R, Herman A, Golan A, Nachum H, Soffer Y, Caspi E. Gonadotropins and combined gonadotropins-releasing hormone agonist--gonadotropins protocols in a randomized prospective study. *Fertil Steril* 1991; 55(3):574-8.
13. Zahn A, Furlong LI, Biancotti JC, Ghiringhelli PD, Marín Briggiler CI, Vazquez-Levin MH. Evaluation of the proacrosin/acrosin system and its mechanisms of activation in human sperm extracts. *J Reprod Immunol* 2002; 54/1-2:43-63.
14. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-5.
15. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76:4350-54.
16. Naz RK. Application of sperm antigens in immunocontraception. *Front Biosci* 1996; 1:e87-95.
17. Bohring C, Krause W. Immune infertility: towards a better understanding of sperm (auto)immunity. The value of proteomic analysis. *Hum Reprod* 2003; 915-24.
18. Domagala A, Kurpisz M. Identification of sperm immunoreactive antigens for immunocontraceptive purposes: a review. *Reprod Biol Endocrinol* 2004; 2:11.
19. Suri A. Sperm specific proteins-potential candidate molecules for fertility control. *Reprod Biol Endocrinol* 2004; 2:10.
20. Mathur S, Chao L, Goust JM y col. Special antigens on sperm from autoimmune infertile men. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 1988; 17:5-13.
21. D'Cruz OJ, Haas GG, Jr., Lambert H. Heterogeneity of human sperm surface antigens identified by indirect immunoprecipitation of antisperm antibody bound to biotinylated sperm. *J Immunol* 1993; 151:1062-74.
22. Auer J, Pignot-Paintrand I, De Almeida M. Identification of human sperm surface glycoproteins by sperm membrane-specific autoantibodies. *Hum Reprod* 1995; 10:551-7.
23. Shetty J, Naaby-Hansen S, Shibahara H, Bronson R, Flickinger CJ, Herr JC. Human sperm proteome: immunodominant sperm surface antigens identified with sera from infertile men and women. *Biol Reprod* 1999; 61:61-9.
24. Koide SS, Wang L, Kamada M. Antisperm antibodies associated with infertility: properties and encoding genes of target antigens. *Proc Soc Exp Biol Med* 2000; 224(3):123-32.
25. Haneji T, Koide SS. Identification of the sperm antigen interacting with antibodies in serum from an infertile woman. *Andrologia* 1990; 22:473-7.
26. Shai S, Naot Y. Identification of human sperm antigens reacting with antisperm antibodies from sera and genital tract secretions. *Fertil Steril* 1992; 58:593-8.
27. Bandivdekar AH, Vernakar VJ, Moodbidri SB, Koide SS. Characterization of 80 kDa human sperm antigen responsible for immunoinfertility. *Am J Reprod Immunol* 2001; 45(1):28-34.
28. de Beer PM, Windt ML, Bouic PJD. Analysis of human sperm membrane antigens reacting with sera from antisperm antibody positive and negative patients by Western blotting. *Andrologia* 1993; 25:149-52.
29. Paradisi R, Bellavia E, Pession A, Venturoli S, Flamigni C. Characterization of human sperm antigens reacting with sperm antibodies from autologous serum and seminal plasma in an infertile population. *Biol Reprod* 1996; 55:54-61.
30. Yoshiki T, Johnin K, Kuo CH, Chou MC, Lai B, Lee CY. Molecular nature of a sperm acrosomal antigen recognized by HS-13 monoclonal antibody. *J Reprod Immunol* 1997; 36:61-75.
31. Batova IN, Ivanova MD, Mollova MV, Kyurkchiev SD. Human sperm surface glycoprotein involved in sperm-zona pellucida interaction. *Int J Androl* 1998; 21:141-53.
32. Rajeev SK, Reddy KVR. Sperm membrane protein profiles of fertile and infertile men: identification and characterization of fertility-associated sperm antigen. *Hum Reprod* 2004; 19(2):234-42.
33. Snow K, Ball GD. Characterization of human sperm antigens and antisperm antibodies in infertile

patients. Fertil Steril 1992; 58:1011-19.

34. Diekman AB, Goldberg E. Characterization of a human antigen with sera from infertile patients. Biol Reprod 1994; 50:1087-93.

35. Liu QY, Wang LF, Miao SY, Catterall JF. Expression and characterization of a novel human sperm membrane protein. Biol Reprod 1996; 54:323-30.

36. Bohring C, Krause W. Differences in the antigen pattern recognized by antisperm antibodies in patients with infertility and vasectomy. J Urol 2001; 166(3):1178-80.

37. Bohring C, Krause E, Habermann B, Krause W. Isolation and identification of sperm membrane antigens recognized by antisperm antibodies, and their possible role in immunological infertility disease. Mol Hum Reprod 2001; 7(2):113-8.

38. Chiu WWC, Chamley LWC. Use of antisperm antibodies in differential display Western blotting to identify sperm proteins important in fertility. Hum Reprod 2002; 17(4):984-9.

39. Shibahara H, Sato I, Shetty J y col. Two-dimensional electrophoretic analysis of sperm antigens recognized by sperm immobilizing antibodies detected in infertile women. J Reprod Immunol 2002; 53(1-2):1-12.

40. Mathur S, Chao L, Schulte BA y col. Sperm and seminal plasma antigens from autoimmune men induce immunological infertility. Arch Andrology 1987; 19:161-75.

41. Naz RK, Alexander N, Isahakia M, Hamilton MS. Monoclonal antibodies to a human germ cell membrane glycoprotein that inhibits fertilization. Science 1984; 225:342-4.

42. Naz RK, Brazil C, Overstreet JW. Effects of antibodies to sperm surface fertilization antigen-1 on human sperm-zona pellucida interaction. Fertil Steril 1992; 57:1304-10.

43. Saji F, Ohashi K, Kamiura S, Negoro T, Tanizawa O. Identification and characterization of a human sperm antigen corresponding to sperm-immobilizing antibodies. Am J Reprod Immunol Microbiol 1988; 17:128-33.

44. Naz RK, Gateva E, Morte C. Autoantigenicity of human sperm: molecular identities of sperm antigens recognized by sera of immunoinfertile men in the immunoprecipitation procedure. Arch Androl 1995; 35:225-31.

45. Pillai S, Wright D, Gupta A y col. Molecular weights and isoelectric points of sperm antigens relevant to autoimmune infertility in men. J Urol 1996; 155:1928-33.

46. Naz RK. Effects of antisperm antibodies on early cleavage of fertilized ova. Biol Reprod 1992; 46:130-9.

47. Wei SG, Wang LF, Miao SY, Zong SD, Koide SS. Fertility studies with antisperm antibodies. Arch Androl 1994; 32:251-262.

48. Auer J, Senechal H, De Almeida M. Sperm-associated and circulating IgA and IgG classes of antibodies recognise different antigens on the human sperm plasma membrane. J Reprod Immunol 1997; 34:121-36.

49. Diekman AB, Westbrook-Case VA, Naaby-Hansen S, Klotz KL, Flickinger CJ, Herr JC. Biochemical characterization of sperm agglutination antigen-1, a human sperm surface antigen implicated in gamete interactions. Biol Reprod 1997; 57:1136-44.

50. Lefevre A, Martin Ruiz C, Chokomian S, Duquenne C, Finaz C. Characterization and isolation of SOB2, a human sperm protein with a potential role in oocyte membrane binding. Mol Hum Reprod 1997; 3:507-16.

51. Martin Ruiz C, Duquenne C, Treton D, Lefèvre A, Finaz C. SOB3, a human sperm protein involved in zona pellucida binding: physiological and biochemical analysis purification. Mol Reprod Dev 1998; 49:286-97.

52. O'Rand MG, Matthews JE, Welch JE, Fisher SJ. Identification of zona binding proteins of pig, rabbit, human and mouse spermatozoa on nitrocellulose blots. J Exp Zool 1985; 235:423-8.

53. Naz RK, Ahmad K. Molecular identities of human sperm proteins that bind human zona pellucida: nature of sperm-zona interaction, tyrosine kinase activity, and involvement of FA-1. Mol Reprod Dev 1994; 39:397-408.



[Autoevaluación](#)

© Está expresamente prohibida la redistribución y la redifusión de todo o parte de los contenidos de la Sociedad Iberoamericana de Información Científica (SIIC) S.A. sin previo y expreso consentimiento de SIIC.

[← atrás](#)



[Suscripción a siicsalud](#)

[Bienvenidos a siicsalud](#)  
[Acerca de SIIC Estructura de SIIC](#)

[Sociedad Iberoamericana de Información Científica \(SIIC\)](#)

Av. Belgrano 430, (C1092AAR), Buenos Aires, Argentina  
[atencionallector@siicsalud.com](mailto:atencionallector@siicsalud.com); Tel: +54 11 4342-4901; Fax: +54 11 4331-3305.

Casilla de Correo 2568, (C1000WAZ) Correo Central, Buenos Aires.

Copyright siicsalud© 1997- 2006, Sociedad Iberoamericana de Información Científica(SIIC)



**Tabla I:** Pesos moleculares aparentes de las proteínas espermáticas identificadas en ensayos de “Western immunoblotting” por las inmunoglobulinas G de fluidos foliculares (IgGFF) pertenecientes a los Grupos III y I.<sup>9</sup>

PM (kDa)	IgGFF #														2 <sup>do</sup>		
	7	14	26	28	25	32	17	13	33	34	36	37	38	40			
130-126																	+
125-121					+												+
120-116		+		+		+		+	+	+	+	+	+				
115-111																	
110-106								+									
105-101					+				+	+							+
100-96			+	+	+	++			+		+			+	+	+	
95-91	+	+	+						+		+	+	+				+
90-86												+					
85-81			+			+											+
80-76	+																+
75-71									+	+							+
70-66														+			
65-61																	
60-56																	+
55-51	+										+						+
50-46		+	+		+					+		+			+	+	+
45-41		+		+		+				+	+	+	+				+
40-36	+	+	+	+	++	++			+	+	++	+	+	+	+	+	+
35-31			+														+
30-26				++		++			+								
25-21		+								+							+
20-16	+		+		+				+	+	+						+
15-11			+														

PM indica peso molecular aparente.

+ indica la presencia de una banda con un PM correspondiente a ese intervalo;

++ indica la presencia de dos bandas con un PM correspondiente a ese intervalo;

2<sup>do</sup> indica bandas reconocidas por el segundo anticuerpo.

En color azul se identifican las bandas reconocidas por las IgGFF pertenecientes al Grupo III, con alta capacidad de inducir la exocitosis acrosomal e inhibir la unión de los espermatozoides a la ZP.<sup>9</sup>

En color verde se identifican las bandas reconocidas por las IgGFF pertenecientes al Grupo III, con alta capacidad de inducir la exocitosis acrosomal pero incapaces de bloquear la unión a la ZP.<sup>9</sup>

En color rojo se identifican las bandas reconocidas solamente por las IgGFF del Grupo III.