

11262
9
E2

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA..

IDENTIFICACION DE UNA PROTEASA DE
INMUNOGLOBULINA "A" EN SEMEN HUMANO.

T E S I S
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS MEDICAS.

P R E S E N T A :
ANGEL SERGIO OLIVARES MORALES.

México D.F., Enero de 1993.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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 está 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.

I N D I C E.

I. RESUMEN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	2
A. INMUNOLOGIA DEL SEMEN HUMANO.....	2
B. INMUNOLOGIA DEL TRACTO GENITAL FEMENINO.....	7
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	12
IV. HIPOTESIS.....	13
V. OBJETIVOS.....	14
VI. MATERIAL Y METODOS.....	15
A. MUESTRAS BIOLÓGICAS.....	15
B. CRITERIOS DE INCLUSIÓN.....	15
C. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS.....	16
1. Semen humano.....	16
2. Inmunoglobulina A.....	17
3. Proteasa bacteriana.....	18
4. Anticuerpos contra IgA.....	19

D. ACTIVIDAD ENZIMATICA CONTRA IGA.....	19
1. Inmunoelectroforesis.....	20
2. Electroforesis en poliacrilamida.....	20
3. Inmunotransferencia.....	22
4. Identificación de los productos de degradación.....	23
E. CARACTERIZACION PARCIAL DE LA PROTEASA.....	23
F. RECOLECCION DE DATOS.....	24
G. CONSIDERACIONES ETICAS.....	25
VII. RESULTADOS.....	26
VIII. DISCUSION.....	30
IX. CONCLUSIONES.....	40
X. TABLAS.....	41
XI. FIGURAS.....	42
XII. BIBLIOGRAFIA.....	49

ABREVIATURAS.

ATCC	American Type Culture Colection.
AT	Amortiguador de transferencia.
BHI	Infusión cerebro corazón.
CS	Componente secretor.
DEAE	Dietyl-amino-etil.
EC	Enzyme Commission of the International Union of Biochemistry.
EDTA	Acido etilen-diamino-tetra-acético.
ELISA	Análisis inmunoenzimático.
HLA	Antigenos de histocompatibilidad.
IgA-S	Inmunoglobulina A de tipo secretor.
IgG	Inmunoglobulina G.
IgM	Inmunoglobulina M.
kDa	Kilodalton.
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad.
NEM	N-etilen-maleimida.
PBS	Amortiguador de fosfatos.
PMSF	Fenil-metil-sulfonil-fluoruro.
PS	Plasma seminal.
SDS	Dodecil sulfato de sodio.
Sp	Streptococcus pneumonie.
SSI	Solución salina isotónica.
TEMED	Tetrametil-etilen-diamino.
ul	Micrólitros.
um	Micrómetros

I. RESUMEN

Los factores que el semen humano emplea para bloquear la respuesta inmune humoral a nivel del cuello uterino no se conocen. Esta respuesta esta representada principalmente por la inmunoglobulina A de tipo secretor (IgA-S). Un mecanismo posible, seria la hidrólisis de IgA-S en forma análoga como ha sido descrito para algunas bacterias patógenas que colonizan los epitelios humanos e hidrolizan a la IgA-S.

El objetivo de este trabajo fue investigar la presencia de una proteasa para IgA-S en semen humano, plasma seminal y espermatozoides, empleando inmunoelectroforesis en agarosa y electroforesis en poliacrilamida, realizando posteriormente inmunotransferencia en membrana de nitrocelulosa.

Fue posible identificar una proteasa en la fracción espermática, que hidroliza a la IgA-S, produciendo dos fragmentos, el primero con peso molecular entre 66 y 70 kDa, el segundo con peso molecular entre 40 y 45 kDa. Su actividad enzimática fue óptima a las 24 hs, pH 7.5, a 37^o C. Se trata de una metaloproteasa (inhibida por EDTA). Su actividad fue específica para IgA-S, no afectando otras inmunoglobulinas (IgG e IgM). La actividad enzimática del espermatozoide demostrada en este estudio, puede ser uno de factores necesarios, empleados para bloquear la respuesta inmune humoral en el tracto genital femenino y permitir al espermatozoide lograr la fecundación del ovocito humano.

II. ANTECEDENTES.

La inmunología de la Reproducción plantea problemas difíciles de comprender a pesar de los avances realizados en los últimos años. La fecundación del ovocito se desarrolla en un ambiente inmunológico relativamente hostil, puesto que involucra la asociación íntima del espermatozoide y el óvulo que no son histo-compatibles. La implantación del embrión humano con su complemento total de genes paternos y maternos, es un proceso complejo que involucra la interacción de dos epitelios antigénicamente distintos: el endometrio y el trofoblasto, estos tejidos se toleran inmunológicamente durante la gestación. En teoría, debería provocarse una respuesta inmunitaria materna de rechazo, sin embargo, la gestación es un fenómeno que parece trasgredir las leyes del trasplante (1,2).

A. INMUNOLOGIA DEL SEMEN HUMANO.

1. Antígenos del espermatozoide humano.

Desde 1899 se demostró que los espermatozoides humanos tenían capacidad antigénica. Actualmente se conoce por estudios de inmunización heteróloga que los espermatozoides humanos, sus células precursoras y el plasma seminal (PS), contienen antígenos activos (3-5). Durante la meiosis, se expresan en las células germinales del testículo moléculas diferenciadas únicas, las cuales persisten durante la espermiogénesis; posteriormente

aparecen en la membrana plasmática y al terminar la espermatogénesis se agregan otros a la superficie del espermatozoide cuando pasan por el epidídimo (6,7). Se ha demostrado mediante inmunización activa que los antígenos de las células germinales pueden estimular la producción de autoanticuerpos (8,9). Con el inicio de la pubertad, principia la producción de espermatozoides dentro del tracto reproductivo del hombre, estas células son extrañas al organismo porque se forman mucho tiempo después del reconocimiento de lo propio y extraño en el organismo, por esta razón, las células germinales son protegidas por la barrera hematotesticular, ésta es formada por las células de Sertoli y su función es impedir el paso de linfocitos, inmunoglobulinas y componentes del complemento (10,11). También impiden que sustancias transportadas por la sangre penetren y lesionen a las células germinales (12). En algunas ocasiones la barrera hematotesticular se llega a romper como resultado de un proceso infeccioso, traumático o quirúrgico, originando la formación de anticuerpos contra los espermatozoides (13-15).

Los sitios donde se han identificado los antígenos de los espermatozoides, han sido el acrosoma (con 2 fracciones antigénicas, Ac1 y Ac2); la región ecuatorial, la pieza intermedia y la parte principal de la cola (13,16,17). Algunos de los antígenos que se expresan en la superficie del espermatozoide son: La hialuronidasa, una enzima que se encuentra en el acrosoma del espermatozoide, cuya función esta relacionada

con la penetración de la corona radiada del ovocito (18,19); la acrosina, que favorece la penetración de la zona pelúcida (20); la deshidrogenasa láctica, producida en grandes cantidades por las células germinales del testículo (21); la escaferina (SCA), antígeno de cubierta del espermatozoide, que es una beta globulina producida en las vesículas germinales (22,23). La expresión de antígenos de histocompatibilidad (HLA) en el espermatozoide humano, ha sido motivo de controversia, debido a los distintos métodos de análisis. Estudios iniciales sugirieron la expresión de HLA en el espermatozoide humano empleando inmunofluorescencia (24,25), pero estudios posteriores no apoyaron estos resultados (26,27). Recientemente se han empleado técnicas más sensibles, como radioinmunoanálisis (26,27) y análisis inmunoenzimático (ELISA), con anticuerpos monoclonales específicos para moléculas de MHC clase I y clase II (28,29). Con estas técnicas se ha demostrado en los espermatozoides humanos, la expresión de niveles bajos de moléculas MHC de la clase II y de las subclases DP, DQ y DR, no se identificaron moléculas de la clase I (29). Los antígenos de los grupos sanguíneos ABO, se encontraron en los espermatozoides de los individuos únicamente como secretores, y éstos se absorben del PS (30). Existen otros estudios donde se han identificado en la superficie del espermatozoide otros antígenos, que solamente han sido caracterizados en forma parcial, a los cuales se les ha designado, de acuerdo a sus propiedades, por medio de siglas

(RSA, MA, FA, SO). Falta determinar cuál es su composición y su función (17,31).

2. Factores inmunosupresores del semen humano.

El organismo femenino durante la vida sexual activa es inoculado constantemente con antígenos que contiene el semen humano, que son extraños en la mujer, sin embargo, en la mayoría de los casos no se produce la respuesta inmune local a pesar del estímulo persistente; esta falta de respuesta, probablemente se debe a la estructura histológica de la pared vaginal, que está revestida con epitelio plano estratificado, el cual evita el paso del espermatozoide a la circulación sistémica (32,33), además, la mayor parte del semen es expulsado de la vagina poco tiempo después de terminada la relación sexual. Otro mecanismo que probablemente interviene en evitar la manifestación de la respuesta inmune contra los antígenos sexuales durante la vida reproductiva de la mujer es el plasma seminal (PS), ya que se ha demostrado que es capaz suprimir tanto "in vitro" como "in vivo" algunas funciones inmunológicas (34-38). Esta supresión tendría como finalidad, evitar la sensibilización al semen humano en el tracto genital femenino, tomando en consideración, que el aparato genital de la mujer no es un sitio libre de la respuesta inmune (39,40). Algunas de las actividades de inmunosupresión demostradas en el PS son:

- 1). Linfotóxicidad a altas concentraciones (41,42). Este efecto es intensificado cuando se agrega suero fetal de ternera, que

contiene grandes cantidades de poliamina-oxidasa, enzima que oxida a la espermina y a la espermidina (presentes en grandes cantidades en el semen humano), produciéndose complejos de aldehídos lábiles, que son extremadamente citotóxicos (43).

2). Inhibición de la proliferación de linfocitos ante el estímulo por antígenos o mitógenos potentes (34,36). Se ha demostrado que las prostaglandinas (44), las poliaminas (45), y la proteína A plasmática asociada al embarazo (46), que se encuentran en el PS, son capaces de suprimir la proliferación de linfocitos, cuando se agregan purificados, en diversos ensayos inmunológicos.

3). Inhibición de la generación de células T citotóxicas en el cultivo mixto de linfocitos. Este mecanismo evita la destrucción de células infectadas por citomegalovirus (35).

4). Inhibición de las células asesinas naturales (NK). Estas son la primera línea de defensa del huésped para destruir células neoplásicas o infectadas por virus sin previa exposición (47-49). Este efecto está en relación con prostaglandinas del tipo 19-OH-PGE₁ y 19-OH-PGE₂ (50,51), las cuales se encuentran en el plasma seminal en concentraciones de 100⁻¹ ug/mL (52).

5). Supresión de la fagocitosis acoplada a la opsonización. Este fenómeno se realiza por los leucocitos polimorfonucleares ante las bacterias gram negativas. Un posible mecanismo sería el evitar la unión de los anticuerpos a receptores Fc de

las células fagocíticas (53).

En resumen, se puede afirmar que por lo menos una parte de la actividad inmunosupresora del PS se encuentra principalmente en las fracciones de bajo peso molecular, como son las prostaglandinas o poliaminas, las cuales se encuentran en grandes cantidades en el PS (54-56).

B. INMUNOLOGIA DEL TRACTO GENITAL FEMENINO.

En el aparato genital femenino, como en otros aparatos del organismo humano, existen las respuestas inmunes humoral y celular. Las propiedades inmunosupresoras del semen humano para bloquear la respuesta celular ya fueron descritas, sin embargo, hasta la fecha, no se conocen los mecanismos que el semen emplea para bloquear la respuesta inmune humoral en el aparato genital femenino de tal manera que le permita al espermatozoide llegar al óvulo y lograr la fecundación. En las superficies mucosas de los epitelios humanos existe un sistema secretor inmune humoral (57) Así, las mucosas son los sitios principales de exposición a los antígenos externos. Las secreciones bañan a estas superficies, forman la barrera inmunológica que interviene en la defensa del huésped. La respuesta de anticuerpos en las superficies mucosas, se regula independientemente de la respuesta sérica (57), La inmunoglobulina que predomina en las mucosas, es la inmunoglobulina A (IgA); en contraste, la concentración del resto de inmunoglobulinas (IgG e IgM) se encuentran en cantidades mínimas (58), por lo que puede afirmarse

que éstas, son una respuesta diferente de la respuesta inmune humoral sistémica.

Existen 2 subclases o isotipos de IgA: la IgA1 y la IgA2. Ambas se encuentran tanto en el suero como en las secreciones de los epitelios, y ambas están presentes en todas las personas normales. Su estructura primaria es similar (58), excepto por un segmento de la estructura primaria de la IgA1 en la región de la bisagra, rico en prolina, que establece diferencia antigénica entre las subclases (59). También difieren en el número de enlaces disulfuro intercatenarios y en sus propiedades metabólicas (60-62). La IgA que se encuentra en las secreciones, se conoce como inmunoglobulina A de tipo secretor (IgA-S), está formada por dos unidades de IgA, que pueden ser cualquiera de los isotipos arriba mencionados (61), unidas por un glucopéptido, la cadena "J" con peso molecular (PM) de 15 kDa, el cual se incorpora a las 2 unidades de IgA antes de ser secretadas (60,63). La molécula de IgA-S también consta de un componente secretor (CS), el cual tiene un PM de 70 kDa. Este componente se extiende del fragmento Fc de una inmunoglobulina al fragmento Fc de la otra inmunoglobulina. El CS permite la endocitosis y el transporte al exterior, ayuda a estabilizar a la molécula y la hace menos susceptible al ataque de diversas enzimas proteolíticas (63). La molécula completa tiene un peso molecular de 385 kDa y un coeficiente de sedimentación de 11 S (61,62). La IgA-S es sintetizada por las

células plásmáticas de la submucosa de los epitelios, es internalizada por endocitosis en las células epiteliales (por medio del CS), es transportada en forma de vesículas al través del citoplasma, y finalmente es liberado en la superficie de los epitelios del aparato digestivo (saliva, secreciones intestinales, etc.); respiratorio, genital, mamario, lagrimal (61,64-66); esta inmunoglobulina se une a bacterias, virus, toxinas microbianas y antígenos de los alimentos (60). Se ha demostrado empleando técnica de inmunohistoquímica, que las células plasmáticas de la lámina propia de la trompa uterina, endometrio, cuello y vagina contienen IgA-S (63). El cuello uterino es el sitio donde se producen los cambios bioquímicos que intervienen en la receptividad del espermatozoide (67), también es el sitio donde se manifiesta la principal actividad inmunológica humoral, que es a base de IgA-S, el endometrio y las trompas manifiestan una menor actividad (68). La concentración de IgA-S en el moco cervical varía durante el ciclo menstrual, encontrándose su nivel más bajo (0.5 a 1.4 mg/mL) durante la ovulación, probablemente para facilitar el paso del espermatozoide (69).

Se ha demostrado que dentro de los mecanismos de invasión de los epitelios humanos, algunas bacterias patógenas expresan actividad proteolítica capaz de romper a la IgA en la región de la bisagra, originando disminución del potencial de respuesta humoral a nivel de los epitelios (70-72). Esta actividad

proteolítica esta dada por una proteasa, que es un producto comunmente encontrado en varias especies bacterianas patógenas, que colonizan los epitelios humanos (73-75). Algunas de las infecciones producidas por estos gérmenes son: meningitis, sinusitis, otitis media, bronquitis, neumonitis, enfermedades venéreas y endocarditis bacterina (73-75). En la actualidad, se han reportado 8 géneros que poseen actividad enzimática contra IgA: *Streptococcus*, *Neisseria*, *Haemophilus*, *Bacteroides*, *Capnocytophaga*, *Gemmella*, *Pseudomonas* y *Ureaplasma* (72-76). Los organismos que producen la proteasa para IgA son patógenos, los que no la producen, no lo son (72,77,78). La mayoría de las proteasas que son producidas por las bacterias patógenas, solamente tienen actividad enzimática contra IgA1 y raramente contra IgA2 o IgG (79,80). El sitio de hidrólisis es a nivel de la bisagra, donde existe un segmento de 13 aminoácidos ya mencionado anteriormente, el cual es rico en prolina-serina o prolina-treonina; las proteasas tienen actividad solamente contra el péptido de unión que contenga prolina (79,80). El resultado de la hidrólisis de IgA1 es la liberación de 2 fragmentos, de distinto peso molecular: Fab y Fc. Los sitios de ruptura de las distintas proteasas fueron identificados analizando la secuencia de los residuos de aminoácidos de los fragmentos purificados (70,73,81,82). También se ha demostrado que la IgA-S es hidrolizada en la región de la bisagra, en los mismos péptidos de unión en donde se realiza la hidrólisis de IgA sérica (83). Los sitios donde las enzimas bacterias producen la ruptura de IgA1,

son distintos, originando variación del peso molecular de los fragmentos liberados (Fab, Fc), que pueden ser identificados empleando electroforesis en geles de poliacrilamida (84-86). Esta técnica ha permitido el reconocimiento de diferentes proteasas para IgA1, inclusive dentro de un mismo género (84-86). Al producirse la ruptura, la inmunoglobulina pierde sus funciones inmunológicas, como sería el evitar la colonización de los epitelios por bacterias patógenas, ya que no pueden realizarse fenómenos como la aglutinación. Además el fragmento Fab al permanecer unido a los antígenos de la superficie microbiana, los protege de alguna interacción posterior con elementos del sistema inmune (61,62,72). Algunos estudios han demostrado que existen proteasas bacterianas que además de tener actividad enzimática sobre IgA1, también tienen actividad contra IgA2 e IgG. La proteasa aislada de *Clostridium ramosum*, produce hidrólisis sobre IgA1 e IgA2, el sitio de ruptura es en el péptido prolina-valina a nivel de la bisagra, que es común para ambas inmunoglobulinas (87). Cepas de *Bacteroides gingivalis* e *intermedius*, *Proteus mirabilis* y *Serratia marcescens*, producen hidrólisis de IgA1, IgA2 e IgG (88-91). *Capnocytophaga* y otras especies de bacteroides producen hidrólisis de IgA1 e IgG, pero no degradan a IgA2 (90). El papel de las proteasas de IgG en el campo de los procesos patológicos, no se ha caracterizado tan completamente como ha sido el caso en las proteasas de IgA1 y solamente se conoce su actividad en forma parcial (92).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

El espermatozoide humano expresa antígenos de superficie, capaces de producir una respuesta inmune de rechazo, tanto humoral como celular. Los factores que el semen humano emplea para bloquear la respuesta inmune celular ya se han descrito, pero los mecanismos que el semen humano emplea para bloquear la respuesta humoral en el tracto genital femenino, que es, principalmente a base de la IgA de tipo secretor, se desconocen. Un posible mecanismo sería la inactivación de la IgA por una enzima, como ha sido descrito para algunas bacterias patógenas que colonizan los epitelios humanos, produciendo hidrólisis de IgA a nivel de la bisagra. La inactivación de IgA por el semen humano, permitiría al espermatozoide su ascenso por el aparato genital femenino para lograr la fecundación.

IV. HIPOTESIS GENERAL.

El semen humano contiene una proteasa que hidroliza a la inmunoglobulina A de tipo secretor obtenida de calostro humano, esta proteasa puede encontrarse en el plasma seminal o en los espermatozoides.

HIPOTESIS NULA.

El semen humano o alguno de sus componentes no contienen una proteasa que hidroliza a la inmunoglobulina A de tipo secretor obtenida de calostro humano.

V. OBJETIVO GENERAL.

Investigar si el semen humano, el plasma seminal o los espermatozoides contienen una proteasa para la inmunoglobulina A de tipo secretor obtenida de calostro humano.

A. OBJETIVOS SECUNDARIOS.

1. Investigar si esta proteasa es específica para la inmunoglobulina A de tipo secretor o tiene actividad contra otras inmunoglobulinas (IgG, IgM).
2. Una vez identificada la existencia de la actividad enzimática propuesta, realizar la caracterización parcial de la proteasa.

DISEÑO DE LA INVESTIGACION

Ensayo experimental biomédico.

VI. MATERIAL Y METODOS.

A. MUESTRAS BIOLÓGICAS EMPLEADAS EN ESTA INVESTIGACION.

1. Semen humano.
2. Inmunoglobulina A de tipo secretor obtenida de calostro humano.
3. Proteasa bacterina para la inmunoglobulina A.
4. Anticuerpos específicos contra la inmunoglobulina A.

B. CRITERIOS DE INCLUSION.

1. Semen humano.
 - a. Varones con fertilidad comprobada.
 - b. Sin tratamiento con antibióticos.
 - c. Sin ninguna enfermedad agregada.
 - d. Que acepten participar en el estudio.
 - e. Con semen normal, según los criterios de la Organización Mundial de la Salud (93).
 - f. Con espermocultivo negativo, incluyendo la búsqueda de *Ureaplasma urealyticum* (76).
2. Obtención de calostro humano.
 - a. Pacientes que se encontraban entre el segundo y tercer día postparto.
 - b. Sin ninguna enfermedad agregada.

- c. Que no recibieron antibióticos durante el parto.
- d. Sin ningún proceso infeccioso al momento de la toma de la muestra.
- e. Con cultivo de la secreción negativo, incluyendo la búsqueda de Ureaplasma urealyticum.
- f. Que aceptaron participar en el estudio.

C. OBTENCION DE LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS.

1. Semen humano.

La muestra de semen fue obtenida una hora antes del ensayo, se incubó durante 30 minutos en baño maria a 37°C., para permitir la licuefacción; se tomó una muestra para realizar el análisis preliminar de acuerdo a los criterios de la Organización Mundial de la Salud (OMS), (93); y para efectuar espermocultivo incluyendo la búsqueda de Ureaplasma urealyticum. Posteriormente la muestra fue centrifugada para separar el plasma seminal de los espermatozoides. El procedimiento se realizó a 450xg, durante 15 minutos, a una temperatura de 25 °C. Los espermatozoides fueron lavados dos veces con solución salina isotónica (SSI) y resuspendidos con 1 mL de la misma solución, a continuación fueron homogenizados, por periodos de 15 segundos, en baño de hielo, empleando un aparato Polytron (Brinkman Co.). El semen total también fue sometido a homogenización con la metodología antes mencionadas. La concentración de proteínas de las muestras fue determinada por el método de Bradford (94) y se ajustó su

concentración a 1 mg/mL, para su empleo en la reacción de proteasa. El pH de las muestras fue ajustado a 7.5 (27).

2. Obtención de inmunoglobulina A.

La IgA de tipo secretor fue obtenida a partir de calostro humano, de pacientes que se encontraban en el puerperio inmediato (95). Las muestras colectadas, fueron reunidas y centrifugadas a 16,500xg por 30 minutos, 4 °C., separando con este procedimiento los lípidos. Para retirar la caseína del sobrenadante se agregó ácido acético glacial lentamente y con agitación constante, hasta alcanzar pH de 4.6; se centrifugó a 16,500xg por 15 minutos, el sobrenadante se separó y se ajustó el pH con TRIS (hidroximetil) aminometano, pH 8.3. Para precipitar las gamma globulinas del sobrenadante, se agregó lentamente, sulfato de amonio saturado, pH 6.8; al 50 % de saturación; centrifugándose posteriormente a 16,500xg por 15 minutos; el precipitado obtenido se disolvió en amortiguador de TRIS 1 mM pH 8.3; después se agregó sulfato de amonio al 33 % de saturación, para centrifugar posteriormente a 16,500xg durante 15 minutos, recuperando el sedimento con TRIS 1 mM pH 8.3. La muestra fue dializada contra el mismo amortiguador para eliminar el sulfato de amonio. Terminada la diálisis, la muestra fue pasada por una columna de cromatografía de intercambio iónico con dietil-amino-etil (DEAE Sepharosa), la columna fue equilibrada con TRIS 0.01 M, pH 8.3, se midió absorbancia a 280 nm. Para separar la muestra de IgA de la columna, se pasó un gradiente de 0.1 M a 0.4 M de NaCl

a pH 8.3 en TRIS 0.01 M. La pureza de la IgA fue comprobada por inmunodifusión radial simple, empleando anticuerpos específicos contra cada una de las inmunoglobulinas (95). La determinación de proteínas se realizó empleando el método de Bradford (94). También se obtuvo IgA de tipo secretor, aislada de calostro humano de una fuente comercial (Dakopatts, Dinamarca), las dos IgA obtenidas fueron empleadas indistintamente en los ensayos.

3. Obtención de la proteasa bacteriana para IgA.

Se resembró una cepa de *Streptococcus pneumoniae* (Sp), la ATCC (American Type Culture Collection) 6301, esta cepa es productora de proteasa para IgA (62), en placas de gelosa sangre de carnero (96), y después de obtener crecimiento bacteriano, se tomó una asada de Sp y se inoculó en 5 mL de caldo infusión cerebro corazón (BHI), incubándose a 37 C en una jarra de microaerofilia (5% CO₂) por 24 horas. El medio con crecimiento bacteriano, fue inoculado en un litro de BHI, incubándose a 37 C., durante 24 hs en presencia de CO₂ al 5 %; la muestra fue centrifugada a 4 C., durante 20 minutos, a 16,500xg. El sobrenadante se recuperó y se ajustó el pH a 7.0 con NaOH 1 M; las proteínas se precipitaron agregando lentamente sulfato de amonio hasta una concentración final de 39 %; el precipitado obtenido se disolvió en amortiguador de fosfatos (PBS) 0.1 M, a pH 7.4, y se dializó contra el mismo (96). La determinación de proteínas se realizó por el método de Bradford (94), la

concentración se ajustó a 1 mg/mL para su empleo en la reacción de proteasa.

4. Anticuerpos contra IgA de tipo secretor.

Los anticuerpos utilizados fueron adquiridos comercialmente:

- a. Anti-IgA-S de calostro humano, obtenidos en conejo. Laboratorios Dakopatts (No.de código 262).
- b. Anti-cadenas pesadas (alfa) de IgA de calostro humano, obtenidos en conejo. Laboratorios Cappel (Organon Teknika Corporation, no. de código 0201-0012).
- c. Anti-Fab de las inmunoglobulinas humanas, obtenidos de conejo, (Hyland, Costa Mesa, Calif., lote 8258R002A1).
- d. Anticuerpo secundario marcado con peroxidasa, anti-IgG de conejo obtenidos en chivo (Dakopatts no. de código P-399), empleado cuando se realizó inmunotransferencia.

D. ACTIVIDAD ENZIMATICA CONTRA IgA.

Para demostrar la hidrólisis de IgA-S se incubaron en tubos de 1 mL, cantidades constantes (50 ug) de plasma seminal, espermatozoides y semen humano, con concentraciones variables de IgA-S (10 a 100 ug), con el fin de encontrar la concentración donde la actividad proteolítica fuera máxima. La temperatura de incubación fue de 37 C., en baño maria. El tiempo de incubación varió, de 4 a 24 horas, tratando de encontrar el tiempo ideal de la actividad proteolítica (89,97). posteriormente para observar

la hidrólisis de IgA-S se realizó inmunolectroforesis en agarosa y electroforesis en poliacrilamida seguida de inmunotransferencia en nitroceluosa.

1. Inmunolectroforesis.

Después de terminar el periodo de incubación, se realizó inmunolectroforesis en laminillas de vidrio de 2.5 X 8 cms; preparadas con agarosa al 1 %, disuelta en amortiguador de barbituratos, 0.1 M; pH de 8.8; con grosor de 1.5 mm; ancho del carril central de 1.0 mm; diámetro de las perforaciones en la agarosa de 1.5 mm, con separación de 3 mm del carril central. volúmenes constantes de las muestras (30 ul), se colocaron en las perforaciones de la agarosa, después se sometieron a corrimiento durante 120 minutos, con voltage de 100 volts, intensidad variable. Las proteínas migraron del polo negativo, al polo positivo, posteriormente se realizó inmunodifusión, agregando al carril central volúmenes constantes (50 ul) del anticuerpo específico para cadenas pesadas alfa y el fragmento Fab. Las muestras se incubaron por 48 horas, a 4 C., al término de la incubación, las laminillas se lavaron con SSI y posteriormente fueron teñidas con azul brillante de Coomassie R-250 para su lectura (98). Como control positivo se empleó proteasa de Sp, y como control negativo se empleó solución salina isotónica (SSI).

2. Electroforesis en poliacrilamida.

Después de terminar la incubación de las muestras, se

realizó electroforesis en geles de poliacrilamida, en un sistema discontinuo, preparados de una solución que contenía 30 % de acrilamida (Bio-Rod, Laboratories), 0.8 % de N,N-bisacrilamida (99), con dodecil sulfato de sodio (SDS), la concentración final del gel concentrador fue del 4 %, y la del gel separador fue del 10%. Los geles fueron polimerizados por la adición de 0.25 % de tetrametil-etilen-diamino (TEMED) y persulfato de amonio. Después de terminar las incubaciones, las muestras fueron hervidas por 3 minutos para su desnaturalización. En cada carril se colocaron 15 ul de las muestras en estudio. Cada gel contenía un carril para marcadores de peso molecular: Fosforilasa B, 92 kDa; albúmina bovina, 66 kDa; ovoalbúmina, 45 kDa; pepsina, 34 kDa; tripsinógeno, 24 kDa. El amortiguador de corrida, fue preparado con TRIS 0.025 M, glicina 0.192 M y SDS 0.1 %, pH:8.3. Se emplearon separadores de 10 carriles, en un aparato LKB:2050 (Bromma Sweden). La electroforesis se inició con una intensidad de corriente de 10 mA., hasta que las muestras alcanzaron el gel de separación, después se incrementó el voltaje, hasta alcanzar la intensidad de 20 mA, permaneciendo así hasta que el colorante alcanzó el borde inferior del gel. La temperatura fue mantenida a 4 °C., mediante cámara de refrigeración. El tiempo de corrimiento fue de 4 horas. Después los geles fueron removidos del aparato y preparados para realizar inmunotransferencia o tefidos directamente para su lectura (99).

3. Inmunotransferencia.

Las proteínas, separadas de acuerdo a su peso molecular por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida, se transfirieron a la membrana de nitrocelulosa, con tamaño del poro de 0.2 μ m (100). Después de terminar la electroforesis, el gel se quitó del aparato y se colocó durante 30 minutos en amortiguador de transferencia (AT): Tris, 25 mM; glicina, 192 mM; pH 8.3; posteriormente se puso en contacto íntimo con la membrana de nitrocelulosa, colocando 2 hojas de papel Whatman 3 MM a ambos lados, y por último se colocó una lámina porosa de polietileno también a cada lado. Todos los elementos se colocaron a presión en soportes de plástico específicos (LKB) para inmunotransferencia. El aparato empleado fue LKB 2002 (Bromma, Sweden). El tiempo ideal de transferencia fue de 22 hs, con corriente constante de 40 mA y voltaje variable, el procedimiento se realizó en una cámara de refrigeración a 4 C. Después de terminar la transferencia, el gel de poliacrilamida fue teñido para observar si existía alguna banda que no hubiera sido transferida. La membrana de nitrocelulosa se colocó en AT durante 10 minutos, y después durante 30 minutos en amortiguador de bloqueo (albúmina al 1 %, diluido en AT). El anticuerpo primario diluido en amortiguador de bloqueo (1:1500), se aplicó a la nitrocelulosa por 24 horas a 4 C. El segundo anticuerpo marcado con peroxidasa se aplicó diluido 1:3000. El tiempo de incubación fue de 4 hs en la oscuridad, a 4 C.

Al término, se procedió a revelar con 4-cloronaftol en metanol (100 ml AT, 20 mL de 0.3 % de 4-cloronaftol en metanol, 60 ul de 30 % de H₂O). Al finalizar el revelado, solamente se observaron las bandas de IgA-S, o sus productos de degradación (101).

4. Identificación inmunológica de los productos de degradación.

La identificación de cada uno de los productos, obtenidos por la hidrólisis de IgA-S, cuando se colocó con semen humano o con cada uno de sus componentes, se basó en el empleo por separado de anticuerpos dirigidos contra las cadenas pesadas (alfa) de IgA, y anticuerpos dirigidos contra el fragmento Fab de la inmunoglobulina.

E. CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE LA PROTEASA.

Una vez identificada la existencia de la actividad enzimática propuesta, se procedió a su caracterización parcial, lo cual permitió conocer algunas características útiles en su definición y manipulación posterior.

1. Localización del origen.

Esta fase se inició con el fraccionamiento del semen humano, en espermatozoides, y plasma seminal.

2. Caracterización bioquímica.

Incluyó la identificación del tipo de proteasa, de que se trataba, de acuerdo a la clasificación del residuo catalítico

que contenía el sitio activo. Para ello se utilizaron métodos ya establecidos, empleándose diferentes inhibidores, con especificidad definida (102), (Sigma Chemical Co.).

a. Acido etilen-diamino-tetra-ácetico (EDTA), 80 mM.

b. N-etil-maleimida (NEM), 20 mM.

c. Fenil-metil-sulfonil-fluoruro (PMSF), 10 mM.

Los inhibidores se agregaron a la incubación con IgA-S, agregando posteriormente cantidades constantes de la proteína producto de la producto de la homogenización de los espermatozoides, incubándose a 37 °C., por 24 horas; después se realizó electroforesis en poliacrilamida seguida de inmunotransferencia.

3. Especificidad enzimática.

La especificidad enzimática se demostró empleando como sustratos otras inmunoglobulinas, como IgG e IgM. El procedimiento fue similar al realizado con IgA-S.

F. RECOLECCION DE DATOS.

La metodología aplicada en cada ensayo realizado en el laboratorio, y los resultados obtenidos fueron anotados en una libreta para laboratorio. Cuando se realizó electroforesis e inmunotransferencia se emplearon formas especiales. Las laminillas donde se realizó el procedimiento de inmunotransferencia, así como las membranas de nitrocelulosa,

fueron fotografiadas para su presentación.

G. CONSIDERACIONES ETICAS.

En cuanto a los principios éticos sobre estudios en seres humanos, se siguió lo indicado en los tratados internacionales y en guías de investigación en humanos (103,104).

VII. RESULTADOS.

Solamente se encontró la proteasa contra IgA-S en la fracción espermática. El semen total y el plasma seminal no manifestaron actividad proteolítica contra IgA-S humana.

Para establecer la concentración adecuada de enzima y sustrato al probar la actividad de proteasa, se utilizaron cantidades constantes (50 ug) de la fracción espermática contra cantidades variables de IgA-S (10 a 100 ug), la actividad enzimática óptima se obtuvo con 50 ug. El tiempo ideal de incubación fue de 24 horas a 37 ° C. La determinación de proteínas de las muestras empleadas, se muestra en la tabla 1.

A. ACTIVIDAD DE PROTEASA.

Se demostró la hidrólisis de IgA-S cuando se incubó con la fracción espermática (Fig.1), empleando inmunoelectroforesis en laminillas con agarosa al 1%. La hidrólisis se observó por la formación de 2 bandas, con movilidad electroforética distinta, esta ruptura también se observó cuando se incubó IgA-S con proteasa de Sp, el cual fue el control positivo. El control negativo fue IgA-S con SSI, donde la banda de IgA-S permaneció íntegra. Después de observar la hidrólisis de IgA-S con inmunoelectroforesis, que es un procedimiento cualitativo, se realizó electroforesis en geles de poliacrilamida al 10%, que es un procedimiento cuantitativo, donde las proteínas se desplazaron de acuerdo a su peso molecular (Fig.2). En el carril, donde se

colocó IgA-S con SSI (control negativo), se observó una sola banda continua (92 kDa), que correspondió a la inmunoglobulina íntegra, en el resto de los carriles donde se colocó semen total, plasma seminal o espermatozoides con IgA-S o SSI, se observó la formación de varias bandas, que corresponden a las distintas proteínas que forman parte del semen, plasma seminal o espermatozoides.

Empleando electroforesis en geles de poliacrilamida, no fue posible determinar cuáles eran las bandas específicas de la hidrólisis de IgA-S por la enzima, ya que se forman varias bandas en cada carril, motivo por el cual, después de terminar este procedimiento, se realizó inmunotransferencia empleando una membrana de nitrocelulosa. La figura 3, muestra en la parte superior, el gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie, donde se observa el desplazamiento de las proteínas (bandas) de acuerdo a su peso molecular, antes de ser transferidas a la membrana de nitrocelulosa; en la parte inferior de la figura, se observa el gel después de transferir las proteínas (bandas) a la membrana, y se comprueba que todas las bandas fueron transferidas a la membrana de nitrocelulosa.

La hidrólisis de IgA-S por una proteasa, encontrada en la fracción espermática del semen humano, se puede observar en la figura 4, que es el resultado de la electroforesis en poliacrilamida seguida de inmunotransferencia; en los carriles donde se colocó IgA-S con la fracción espermática, se formaron dos bandas con movilidad distinta, esta movilidad es de acuerdo a

su peso molecular. La primera banda, con peso molecular entre 66 y 70 kDa; la segunda con peso molecular entre 40 y 45 kDa. En los carriles donde se colocó semen total más IgA-S y plasma seminal más IgA-S, no se observó la formación de las 2 bandas encontradas con los espermatozoides más IgA-S. El control negativo fue IgA-S con SSI, aquí solamente se observó una banda, que correspondió a IgA-S integra visualizándose en el borde superior de la membrana de nitrocelulosa sin ningún desplazamiento. El control positivo correspondió a IgA-S con la proteasa de Sp, se observó la formación de dos bandas semejantes a las obtenidas con la fracción espermática.

La hidrólisis de IgA-S por la fracción espermática de 4 pacientes se observa en la figura 4, en los carriles donde se colocó la IgA-S más la fracción espermática, se observó la degradación de IgA-S, en forma similar a lo encontrado en la figura 3; en el control negativo, solamente se observó una banda en la parte superior, que correspondió a IgA-S no degradada. En el control positivo (Sp más IgA-S), también se observaron las dos bandas de degradación.

La identificación de cada una de las bandas, producto de la hidrólisis de IgA-S (Fig.6), se realizó aplicando por separado, anticuerpos específicos contra la cadena alfa, identificándose las 2 bandas antes mencionadas (Fig.6, lado A). Cuando se aplicó el anticuerpo específico contra el fragmento Fab, solamente se observó una banda, con peso molecular entre 40 y 45 kDa

(Fig.6, lado B), esta última banda correspondió al fragmento Fab de IgA-S, porque el anticuerpo empleado solamente reconoce a este fragmento de las inmunoglobulinas.

B. INHIBICION DE LA ACTIVIDAD PROTEOLITICA.

La actividad proteolítica se inhibió totalmente con EDTA (80 mM), que es un agente quelante de Ca^{2+} , identificándose a esta enzima como metalo-proteasa; los inhibidores de proteasas de serina (PMSF) y de cisteína (NEM) no tuvieron efecto sobre la actividad de la proteasa. El EDTA también inhibió la actividad del control positivo (IgA-S con Sp), a la concentración antes mencionada (Fig. 7).

C. ESPECIFICIDAD DE SUBSTRATO.

Se emplearon inmunoglobulina G e inmunoglobulina M, para conocer si la actividad proteolítica encontrada en la fracción espermática, tenía algún efecto en otras inmunoglobulinas. Los ensayos se realizaron en las mismas condiciones descritas para IgA-S, no se observó actividad enzimática de la fracción espermática contra IgG ó IgM.

VIII. DISCUSION

Los resultados de este estudio muestran que el espermatozoide humano contiene una proteasa que hidróliza a IgA-S obtenida de calostro humano. En los ensayos iniciales de este trabajo, se emplearon espermatozoides separados del plasma seminal por medio de centrifugación, en estas condiciones no se observó actividad proteolítica sobre IgA-S después de realizar el procedimiento varias veces. Solamente se observó actividad al homogenizar los espermatozoides bajo las condiciones ya mencionadas. Cuando se empleó semen total, no se observó actividad a pesar de haber homogenizado la muestra en las mismas condiciones empleadas que para la fracción espermática, este fenómeno se debe probablemente a la existencia, en el plasma seminal, de algunas sustancias inhibidoras de proteasas. Estas proteasas inician su actividad cuando el plasma seminal se separa de los espermatozoides, un ejemplo de este proceso lo constituye la reacción acrosomal, que se inicia cuando el plasma seminal se separa de los espermatozoides (105).

La acción de la proteasa del espermatozoide, se efectúa probablemente en un solo péptido de la cadena pesada (alfa), sin embargo, en este estudio no se determinó el sitio específico de hidrólisis. Se pudo observar que el peso molecular de los fragmentos producidos por la ruptura es similar a los obtenidos con la acción de la proteasa de Sp. Por ello se podría sugerir que el sitio de ruptura puede ser muy semejante al lugar donde

produce hidrólisis esta enzima bacteriana, es decir entre el aminoácido 227-228 (70,106), sin embargo, como se mencionó, falta determinar el sitio específico de ruptura.

La identificación de los productos de degradación, se realizó empleando anticuerpos específicos. La banda que se formó entre los 40 y 45 kDa, correspondió al fragmento Fab, ya que el anticuerpo empleado que la identifica solo reconoce esta parte de la inmunoglobulina. Nuestros resultados coinciden con algunos estudios previos donde se muestra la movilidad electroforética del fragmento Fab, así como su identificación (101,107,108). Se ha demostrado que cuando la IgA está intacta, se une por el fragmento Fab a la superficie de los espermatozoides (97), evitando su progresión, pero cuando ha sufrido hidrólisis, el espermatozoide sigue su progresión aun con el fragmento Fab adherido, evitando así el reconocimiento por las moléculas intactas (97). La otra banda observada, con peso molecular entre 66 y 70 KDa, probablemente corresponda al fragmento Fc o a una parte del mismo (85,86,100); con los datos de nuestro estudio no puede conocerse si la enzima afecta al componente secretor o a la cadena "J", ambos componentes de la IgA-S y si estas estructuras permanecen unidas al fragmento Fc, que es reconocido por el anticuerpo, o se encuentran separadas.

La enzima es altamente sensible a la inhibición por agentes quelantes de cationes divalentes y pierde su actividad con la presencia de EDTA, por lo que se puede catalogar como una enzima metalodependiente. El tipo del ión metálico necesario, es

desconocido, y probablemente se trate de zinc o calcio, los que se encuentran en el plasma seminal en mayor concentración que otros.

La proteasa manifestó actividad proteolítica para la IgA-S como sustrato, pero no determinamos si tenía actividad específica contra cada uno de los subtipos de IgA (IgA1 o IgA2), probablemente su actividad sea solamente contra IgA1, como la mayoría de las proteasas descritas para IgA. Esta enzima no presentó actividad contra otro tipo de inmunoglobulinas, como IgG o IgM.

La localización de esta proteasa en el espermatozoide, probablemente sea en la membrana interna, como otras metaloproteasas, tomando en consideración que su actividad solamente se demostró cuando las células fueron homogenizadas, por lo tanto no está en la membrana externa. Otra probabilidad remota es que la enzima sea intracitoplásmica (109-111).

Existe un número importante de proteasas en el semen humano, algunas son componentes del plasma seminal, predominantemente de la secreción prostática, mientras otras están asociadas con los espermatozoides. Estas proteasas son importantes porque con ellas, el espermatozoide logra la fertilización. La mayor actividad enzimática expresada por el espermatozoide es durante la reacción acrosomal. El acrosoma es una estructura localizada en la porción anterior de la cabeza del espermatozoide, confinada por una membrana interna y otra externa, contiene enzimas

hidrolíticas y no hidrolíticas. La reacción es un fenómeno de exocitosis que comprende la fusión de la membrana plasmática con la membrana acrosomal externa, produciéndose múltiples fenestraciones, con la concomitante liberación de las enzimas del acrosoma, este proceso le permite al espermatozoide penetrar al través de la zona pelúcida y fusionarse con la membrana plasmática del óvulo (105,112). Se han descrito en el espermatozoide grupos de enzimas responsables del proceso de la fecundación. Con respecto al grupo de las metaloproteasas se ha observado, en estudios realizados empleando geles de poliacrilamida, que la mayor actividad proteolítica se encuentra en las proteínas que migran entre los 47 y 55 kDa, y entre los 34 y 37 kDa; estas enzimas fueron metaloproteasas neutras y alcalinas, dependientes de zinc (113,114). Algunas de estas proteasas han sido caracterizadas en forma parcial, desde el punto de vista bioquímico, sin embargo, hasta la fecha no se conocen completamente sus funciones.

Otro grupo de enzimas que tiene el espermatozoide son las glicosil-transferasa, la enzima mejor estudiada es la galactosil-transferasa EC (Enzyme Commission of the International Union of Biochemistry) 2.4.1.22, es una proteína integral de la membrana plasmática, localizada en la región acrosomal del espermatozoide, con peso molecular de 55 kDa, interviene en la adhesión del espermatozoide con la zona pelúcida (115).

Otro grupo de enzimas son las galactosidasas, principalmente la alfa manosidasa (EC 3.2.1.24), como la anterior, también es

una proteína integral de la membrana plasmática localizada en la cabeza del espermatozoide. Es una proteína mediadora de la interacción del espermatozoide con la zona pelúcida (116).

Se han descrito también algunas proteínas con actividad de lectinas que intervienen en la fecundación, la más estudiada es la acrosina del espermatozoide de mamífero (EC 3.4.21.10), pertenece al grupo de las serino-proteasas, su peso molecular de 38 kDa. Esta enzima es sintetizada como pro-acrosina, es convertida por proteólisis en acrosina activa. Hidroliza la zona pelúcida del ovocito humano cuando el espermatozoide toma contacto con él (20,109). Otra enzima liberada es la hialuronidasa, hidroliza la corona radiada del ovocito (18,19).

Con los datos expuestos anteriormente no existe duda, que el espermatozoide humano expresa actividad proteolítica intensa, necesaria para poder lograr la penetración del tracto genital y realizar la fecundación (105,117).

La hidrólisis de IgA-S por una proteasa del espermatozoide, demostrada en este trabajo, probablemente sea necesaria para bloquear la respuesta inmune humoral del tracto genital femenino, que es la primera barrera con la que toma contacto el espermatozoide cuando es depositado en la vagina. Después de la hidrólisis, la IgA-S pierde sus funciones específicas, como se ha demostrado en la acción de algunos microorganismos patógenos que colonizan los epitelios. También se ha observado, que después de la hidrólisis de la inmunoglobulina, el fragmento

Fab queda fijo al microorganismo, evitado su reconocimiento posterior por otras IgA-S intactas o por los macrófagos (66), esto permite a las bacterias colonizar los epitelios. En el caso del espermatozoide, probablemente ocurra este fenómeno durante su permanencia en el cuello uterino o al través de su ascenso por el útero, evitado su reconocimiento y destrucción por macrófagos o leucocitos. También se debe tomar en consideración, que la actividad proteolítica del espermatozoide sobre la IgA-S, puede ser el efecto secundario de una enzima que tenga otra función principal.

El plasma seminal también manifiesta actividad proteolítica, principalmente por algunas enzimas de la próstata y vesículas seminales (118). Las siguientes razones señalan su importancia: en primer lugar para que se lleve a cabo los fenómenos de coagulación y licuefacción del semen; en segundo lugar para la adecuada motilidad de los espermatozoides (118,119). En un estudio realizado con plasma seminal humano (110), se encontró actividad proteolítica capaz de hidrolizar gelatina; en dicho estudio se detectaron tres bandas producto de la actividad proteolítica, con peso molecular entre los 60, 66 y 90 kDa; y bandas con menor actividad entre los 34, 37, 71, 82 y 105 kDa. Todas ellas requirieron la presencia de Ca^{2+} para lograr su actividad óptima. Cuando se agregó EDTA dicha actividad enzimática desapareció (110,120). Como se ha demostrado, el plasma seminal humano también manifiesta actividad proteolítica dependiente de algunas metaloproteasas, sin embargo, en nuestro

estudio no se observó ninguna actividad proteolítica del plasma seminal sobre la IgA-S, probablemente porque el substrato no es el adecuado.

El espermatozoide humano para poder colonizar el tracto genital femenino, tiene que evitar una serie factores específicos e inespecíficos que le son adversos. En condiciones normales, durante el coito, son depositados en la vagina de 200 a 500 millones de espermatozoides, pero la mayoría son expulsados por arrastre mecánico, y solamente asciende una parte (121). La vagina no ofrece condiciones óptimas para la supervivencia del espermatozoide, la acidez del líquido vaginal (pH 4-5) es nociva para los mismos, aun cuando la reacción alcalina del plasma seminal tiene efecto amortiguador. Por tal motivo, al término de la fase de licuefacción, el espermatozoide tiene que ascender inmediatamente a sitios con medio alcalino, ya que de lo contrario, pronto perderá movilidad iniciándose algunos procesos líticos (122). Posteriormente el espermatozoide llegará al cuello uterino, ascendiendo solamente los que presentan morfología normal, quedando atrapados en el moco cervical los que tienen alteraciones en su morfología (123). Los estudios con microscopía electrónica reticular han demostrado la formación de redes y canales a partir de filamentos de mucina del moco cervical, que impide o retarda el paso de los espermatozoides de configuración anormal (124).

Se ha demostrado que en el tracto genital femenino, como en

otros aparatos, existe respuesta inmune celular y humoral principalmente a nivel del cuello y útero. En sus secreciones se encuentran macrófagos, linfocitos y otros leucocitos; estas células fagocitan a los espermatozoides inmóviles y a las partículas extrañas que ingresan al tracto genital (125,126). De los millones de espermatozoides depositados en vagina, sólo entre 600 y 800 alcanzarán las trompas de Falopio y en la mayoría de los casos, solamente uno logrará penetrar al óvulo. La cantidad que llega a las trompas de Falopio da una impresión sobre el proceso de selección riguroso que sufren los espermatozoides. Cuando el número de espermatozoides está disminuido, las posibilidades de fecundación disminuyen, y en algunas ocasiones nunca se logrará el embarazo, probablemente porque las barreras que se oponen al paso del espermatozoide en el tracto genital, no son evadidas completamente (121). De lo expuesto anteriormente, se concluye, que la colonización del aparato genital femenino por el espermatozoide humano implica el paso de varios obstáculos que son hostiles en su recorrido para llegar al óvulo, siendo un proceso complejo y difícil, no entendido completamente hasta ahora.

En este estudio, un factor importante para evitar resultados falsos positivos con las muestras de semen obtenidas, fue el realizar espermocultivo para aerobios y anaerobios en las muestras de semen humano empleadas en los ensayos, rechazando aquellas donde los resultados fueron positivos. Como ya se ha demostrado, algunas bacterias patógenas que colonizan los

epitelios humanos producen una proteasa que hidroliza a la IgA-S (61,70-72). El epitelio del aparato reproductor masculino no esta libre de ser colonizado por estos gérmenes y originar resultados falsos positivos; este estudio también incluyó la búsqueda de Ureaplasma urealyticum, que también produce hidrólisis sobre IgA-S (76).

Para realizar los ensayos se empleó IgA-S obtenida de calostro humano. La razón fue que la concentración de esta inmunoglobulina en el calostro humano es abundante, y el procedimiento de obtención en el laboratorio está bien estandarizado (95). Lo ideal hubiera sido realizar los ensayos empleando IgA-S obtenida directamente de la secreción cervical, pero el procedimiento de obtención es difícil y la cantidad que se extrae de cada paciente es relativamente escasa, y se tendría que reunir un número muy grande de muestras. Tomando en consideración que la IgA-S que se encuentra en todos los epitelios humanos, tiene las mismas características en relación a su composición (66), se puede afirmar que este estudio realizado con IgA-S obtenida de calostro humano tiene la misma validez.

Es necesario realizar estudios en parejas con fertilidad comprobada, con el fin de observar si existe hidrólisis de IgA-S en las secreciones genitales después de las relaciones sexuales, en forma análoga como se ha demostrado en las secreciones obtenidas de los distintos aparatos del cuerpo humano, esta hidrólisis de IgA-S, es originada por las proteasas producidas

por las distintas bacterias patógenas que colonizan los epitelios humanos (61,62,72,79).

Es necesario determinar en estudios posteriores, el sitio de la unión péptidica donde se produce la hidrólisis de IgA-S, además si la proteasa hidroliza a IgA1 o IgA2, o si tiene actividad enzimática contra ambas.

IX. CONCLUSIONES

1. En este estudio se demostró que el espermatozoide humano, contiene una proteasa que hidroliza a la inmunoglobulina A de tipo secretor obtenida de calostro humano.
2. El resultado de la hidrólisis de la inmunoglobulina, es la formación de dos fragmentos, el primero, con peso molecular entre 40 y 45 kDa y el segundo con peso molecular entre 66 y 70 kDa.
3. La enzima es inhibida por agentes quelantes de cationes divalentes, por lo tanto es metaloproteasa.
4. Su actividad enzimática fue óptima a pH 7.5 a 37 grados centígrados.
5. Su actividad fue específica para IgA-S, y no mostró actividad proteolítica contra otro tipo de inmunoglobulinas (IgG ó IgM).
6. En el plasma seminal y semen entero no se encontró actividad proteolítica contra IgA-S.
7. La actividad enzimática del espermatozoide demostrada en este estudio, puede ser alguno de los mecanismos que el espermatoide humano emplea para bloquear la respuesta inmune humoral en el tracto genital femenino, y que le permita lograr la fecundación del ovocito humano.

TABLA 1. CONCENTRACION DE PROTEINAS DE LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS EMPLEADAS EN LA REACCIÓN DE PROTEASA

MUESTRA	CONCENTRACION mg/mL.	DESVIACION ESTANDAR	ERROR ESTANDAR
SEMEN TOTAL	15.93	3.57	1.59
PLASMA SEMINAL	16.24	2.20	1.10
ESPERMATOZOIDES	4.43	1.86	0.75
INMUNOGLOBULINA "A" DE CALOSTRO HUMANO.	0.31	0.12	0.07
PROTEASA DE S. PNEUMONIAE	4.98	1.46	1.03

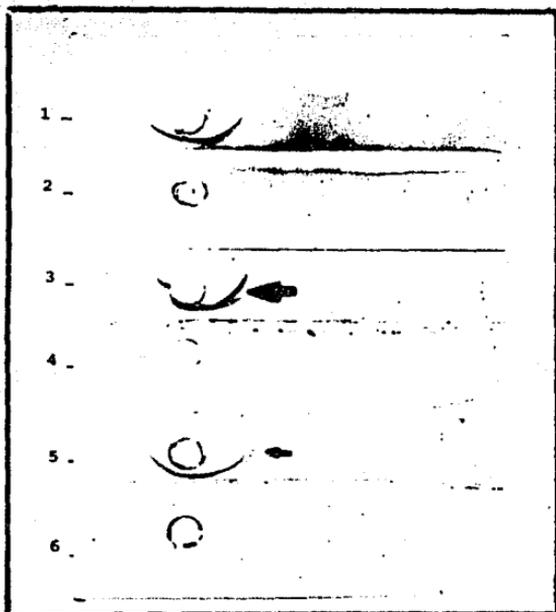


Figura 1. Inmunoelectroforesis en laminillas con agarosa al 1%. En los carriles centrales se colocó anticuerpo contra IgA-S. (1), IgA-S con SSI (control negativo). (2), SSI sola. (3), IgA-S con espermatozoides. (4), espermatozoides con SSI. (5), IgA-S con proteasa de Sp (control positivo). (6), proteasa de Sp -- con SSI. En (3 y 5), se observan dos bandas-producto de la hidrólisis por las proteasas.

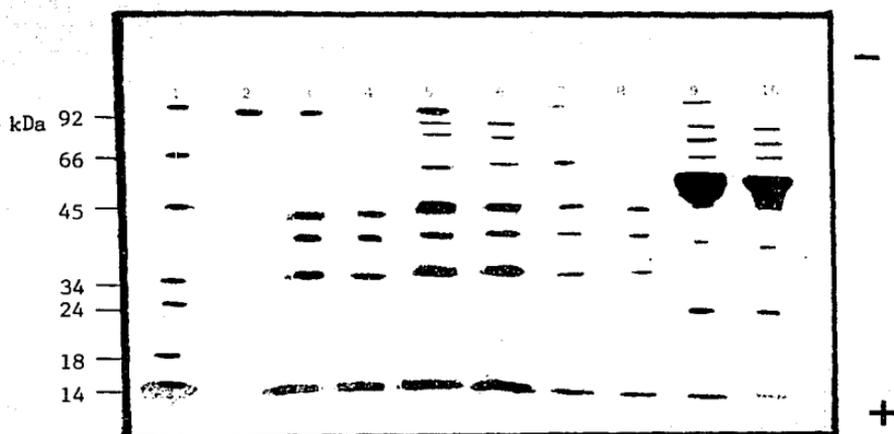


Figura 2. Electroforesis en poliacrilamida al 10 %.

(1), Marcadores de peso molecular. (2), IgA-S con SSI. (3), Semen con IgA-S. (4), Semen con SSI. (5), Plasma seminal con IgA-S. (6), Plasma seminal con SSI. (7), Espermatozoides con IgA-S. (8), Espermatozoides con SSI. (9), Proteasa de Sp con IgA-S. (10), Proteasa de Sp con SSI. Se observa que las proteínas que constituyen las muestras de estudio, se separan de acuerdo a su peso molecular.

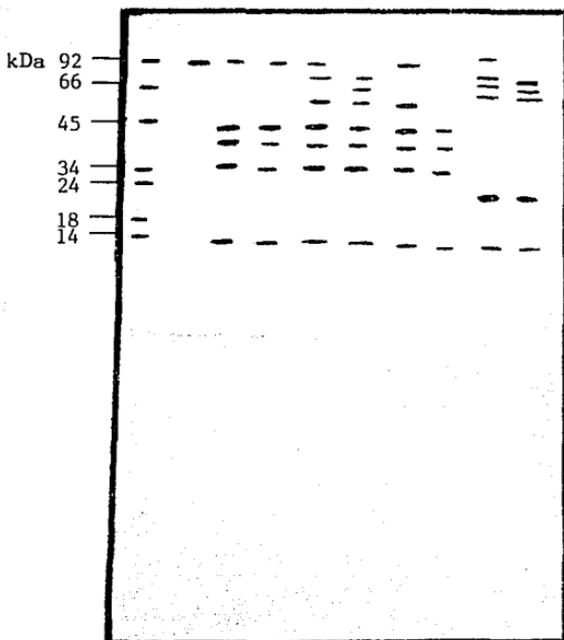


Figura 3. En la parte superior se --
 observa el gel de poliacrilamida al 10%,
 separación de las proteínas en relación
 a su peso molecular. En la parte infe--
 rior se observa el mismo gel después de
 transferir las proteínas a la membrana-
 de nitrocelulosa. Obsérvese que han de-
 saparecido las bandas.

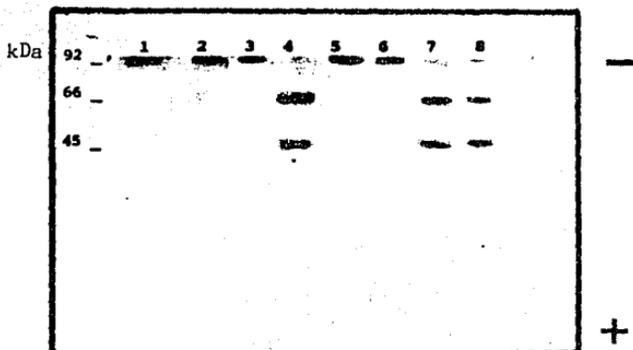


Figura 4. Inmunotransferencia en nitrocelulosa. (1), IgA-S con SSI (control negativo). (2 y 5), semen con IgA-S. (3 y 6), plasma seminal con IgA-S. (4 y 7), espermatozoides -- con IgA-S. (8), proteasa de Sp con IgA-S -- (control positivo). En (4, 7 y 8), se observa la hidrólisis de IgA-S con formación de dos bandas de distinto peso molecular.

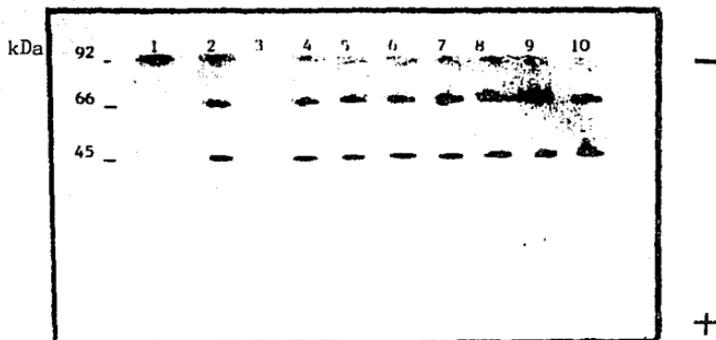


Figura 5. Inmunotransferencia en nitrocelulosa. (1), IgA-S con SSI (control negativo). (2), espermatozoides con IgA-S (control positivo). (3), espermatozoides del carril (2) con SSI. En los carriles (4 al 10) se colocó IgA-S con espermatozoides de 4 donadores, se observa la formación de dos --bandas de distinto peso molecular, resultado de -- la hidrólisis de IgA-S.

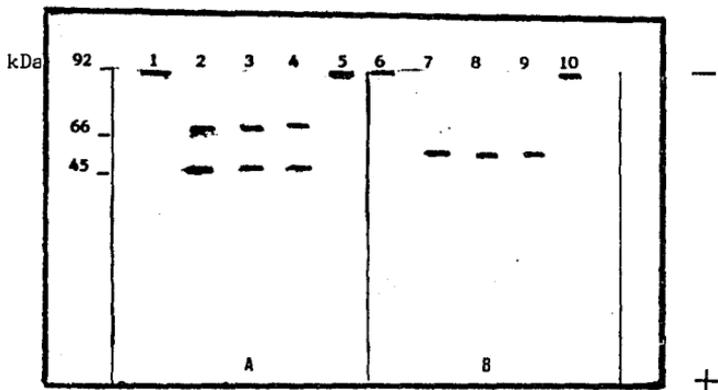


Figura 6. Inmunotransferencia en nitrocelulosa. (1,5,6 y 10), IgA-S con SSI (control negativo). (2,3,7 y 8). espermatozoides con IgA-S. (4 y 9), proteasa de Sp con IgA-S (control positivo). Lado A, se aplicó anticuerpo contra cadenas alfa, se formaron dos bandas. Lado B, se aplicó anticuerpo contra el fragmento Fab, se formó una sola banda.

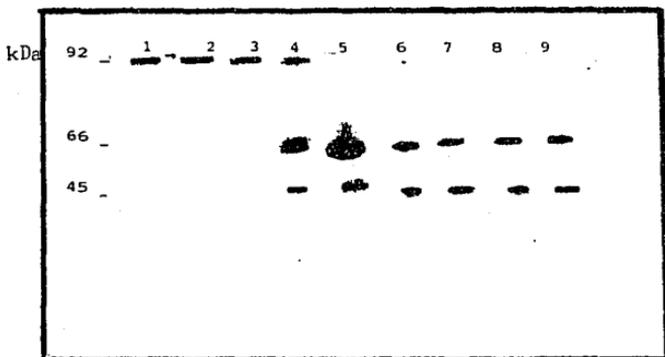


Figura 7. Inmunotransferencia en nitrocelulosa. (1), IgA-S con SSI (control negativo). (2 y 3), espermatozoides con IgA-S y EDTA (80 mM). (4 y 5), espermatozoides con IgA-S y NEM (20 mM). (6 y 7), espermatozoides con IgA-S y PMSF (10 mM). (8 y 9), espermatozoides con IgA-S (control positivo). En (2 y 3), se observa inhibición de la hidrólisis de IgA-S por un agente quelante, lo que no sucede con los otros inhibidores (4,5,6 y 7).

BIBLIOGRAFIA

1. Moller G. Immunology of feto-maternal relationship. *Immunol Rev* 1983;75:1
2. Hill JA. Immunonological mechanisms of pregnancy maintenance and failure: A critique of theories and therapy. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 1990;22:33.
3. Alexander NJ, Anderson DJ. Immunology of semen. *Fertil Steril* 1987;47:192.
4. Marthur S, Chao L, Schulte BA, Woodley-Miller C, Abdel-Latif A, Fredericks CM, Rust PF, Williamsen HO. Sperm and seminal plasma antigens from autoimmune men induce immunological infertility. *Arch Androl* 1987;19:161.
5. Wolf DP, Sokoloski JE, Dandekar P, Bechtol KB. Characterization of human sperm surface antigens with monoclonal antibodies. *Biol Reprod* 1983;29:713.
6. Feuchter FA, Vernon RB, Eddy EM. Analysis of the sperm surface with monoclonal antibodies: Topographically restricted antigens appearing in the epididymis. *Biol Reprod* 1981;24:1099.
7. Tezon JG, Ramella E, Cameo MS, Vazquez MH, Blaquier JA. Immunochemical localization of secretory antigens in the human epididymis and their association with spermatozoa. *Biol Reprod* 1985;32:591.
8. Brown PC, Holborow EJ, Glynn LE: The espermatogenic antigen in experimental allergic in guinea-pigs. *Immunology* 1965;9:255.
9. Mettler L, Czuppon AB, Tinneberg H-R. Immunization with spermatozoal antigens resulting in immuno-suppression of fertility rates in female rats. *Andrologia* 1983;15:670.
10. Gilula NB, Fawcett DW, Auki A. The Sertoli cell occluding junctions and gap junctions in mature and developing mammalian testis. *Dev Biol* 1976;50:142.
11. Haas GG, Beer EA. Immunologic influences on reproductive biology: Sperm gametogenesis and maturation in the male and female genital tracts. *Fertil Steril* 1986;46:753.

12. Johnson L, Petty CS, Neaves WB. Further quantification of human spermatogenesis: germ cell loss during postprophase of meiosis and its relationship to daily sperm production. *Biol Reprod* 1983;29:207.
13. Linnet L. Clinical immunology of vasectomy and vasovasostomy. *Urology* 1983;22:101.
14. Tung KSK, Yule TD, Mahi-Brown CA, Listrom MB. Distribution of histopathology and Ia positive cells in actively induced and passively transferred experimental autoimmune orchitis. *J Immunol* 1987;138:752.
15. Mancini RE, Andrada JA, Saraceni D, Bachmann AE, Lavieri JC, Nemirovsky M. Immunological and testicular response in man sensitized with human testicular homogenate. *J Clin Endocrinol Metab* 1965;25:859.
16. Menge AC, Shoultz GK, Kelsey DE, Rutherford P, Lee C-YG. Characterization of monoclonal antibodies against human sperm antigens by immunoassays including sperm function assays and epitope evaluation. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 1987;13:108.
17. Lee C-YG, Huang YS, Huang CHM, Hu PC, Menge AC. Monoclonal antibodies to human sperm antigens-II. *J Reprod Immunol* 1984;6:227.
18. Talbot P, Franklin LE. The release of hyaluronidase from guinea-pig spermatozoa during the course of the normal acrosome reaction in vitro. *J Reprod Fertil* 1974;39:429.
19. Triana LR, Babcock DF, Lorton SP, First NL, Lardy HA. Release of acrosomal hyaluronidase follows increased membrane permeability to calcium in the presumptive capacitation sequence for spermatozoa of the bovine and other mammalian species. *Biol Reprod* 1980;23:47.
20. Wincek TJ, Parrish RF, Polakoski KL. Fertilization: a uterine glycosaminoglycan stimulates the conversion of sperm proacrosin into acrosin. *Science* 1979;203:553.
21. Beylar SA, Wheat TE, Golber E. Binding of antibodies against antigenic domains of murine lactate dehydrogenase-C4 to human and mouse spermatozoa. *Biol Reprod* 1985;32:1201.
22. Li TS, Macajoux CE, Devanesan MM, Pelosi MA, Caterini H, Kaminetzky HA. Purification and characterization of sperm-coating antigen from human seminal plasma. *Fertil Steril* 1976;27:702.

23. Saji F, Minagawa Y, Negoro T, Nakamuro K, Tanizawa O. A human sperm coating isolated from sperm cell membrane. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 1985;8:132
24. Kerek G, Biberfeld P, Afzelius BA. Demonstration of HL-A antigens "species" and "semen" specific antigens on human spermatozoa. *Int J Fertil* 1973;18:145.
25. Arnaiz-Villena A, Festenstein H. HLA genotyping by using spermatozoa: Evidence for haploid gene expression. *Lancet* 1976;2:620.
26. Anderson DJ, Bach DL, Yunis EJ, De Wolf WC. Mayor histocompatibility antigens are not expressed on human epididymal sperm. *J Immunol* 1982;129:452.
27. Hass GG, Nahhas F. Failure to identify HLA, ABC and DR antigens on human sperm. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 1986;10:39.
28. Bishara A, Oksenberg JR, Frankel G, et al. Human leukocyte antigens (HLA) class I and class II on sperm cells studies at the serological, cellular, and genomic levels. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 1987;13:97.
29. Ohashi K, Saji F, Kato M, Wakimoto A, Fanizawa O. HLA expression on human ejaculated sperm. *Am J Reprod Immunol* 1990;23:29.
30. Haas GG, D Cruz JO. ABH blood group antigens in human semen. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 1988;16:28.
31. Naz RK, Alexander NJ, Isahakia M, Hamilton MS. Monoclonal antibody to human germ cell membrane glycoprotein that inhibits fertilization. 1984;225:342.
32. Shearer GM, Rabson AS. Semen and AIDS. *Nature* 1984;308:230.
33. Richards JM, Bedford JM, Witkin SS. Rectal insemination modifies immune responses in rabbits. *Science* 1984;224:390.
34. Stites DP, Erickson RP. Suppressive effect of seminal plasma on lymphocyte activation. *Nature* 1975;253:727.
35. Lord EM, Sensabaugh GP, Stites DP. Immunosuppressive activity of human seminal plasma. I. Inhibitor of in vitro lymphocyte activation. *J Immunol* 1977;118:1704.
36. Brooks GP, Lammel CJ, Petyersen BH, Stites DP. Human seminal plasma inhibition of antibody complement-mediated killing and opsonization of *Neisseria gonorrhoeae* and other gram negative organisms. *J Clin Invest* 1981;67:1523.

37. Anderson DJ, Tarter TH. Immunosuppressive effects of mouse seminal plasma components in vivo and vitro. *J Immunol* 1982;128:535.
38. Witkin SS. Mechanisms of active suppression of the immune response to spermatozoa. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 1988;17:61.
39. Price RJ, Roberts TK, Green D, Boettcher B. Anticomplementary in human semen and its possible importance in reproduction. *Am J Reprod Immunol* 1984;6:92.
40. Yang S, Schumacher GFB. Immune response after vaginal application of antigens in the rhesus monkey. *Fertil Steril* 1977;28:314.
41. Allen RD, Roberts TK. The relationship between the immunosuppressive and cytotoxic effects of human seminal plasma. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 1986;11:59.
42. Quan C, Roux C, Pillot J, Bouvet JP. Delineation between T and B suppressive molecules from human seminal plasma: II. Spermine is the major suppressor of T-Lymphocytes in vitro. *Am J Reprod Immunol* 1990;22:64.
43. James K, Hargreave TB. Immunosuppression by seminal plasma and its possible clinical significance. *Immunol Today* 1984;5:357.
44. Svanborg K, Bygdeman M, Eneroth P, Bendvold E. Quantification of prostaglandins in human seminal fluid. *Prostaglandins* 1982;24:363.
45. Byrd WJ, Jacobs DM, Amoss MS. Synthetic polyamines added to cultures containing bovine sera reversibly inhibit in vitro parameters of immunity. *Nature* 1977;267:621.
46. Birchof P, Martin-Du-Pan R, Lauber K, Girard JP, Herrmann WL, Sizonenko PC. Human seminal plasma contains a protein that shares physicochemical, immunochemical and immunosuppressive properties with pregnancy-associated plasma protein-A. *J Clin Endocrinol Metab* 1983;56:359.
47. Glater GB, Anderson DJ. Human seminal plasma inhibits the cytotoxic effect of natural killer (NK) cells (Abstr). *J Androl* 1985;6:57.
48. James K, Szymaniec S. Human seminal plasma is a potent inhibitor of natural killer cell activity in vitro. *J Reprod Immunol* 1985;8:61.

49. Rees RC, Vallely P, Clegg A, Potter CW. Suppression of natural and activated human antitumor cytotoxicity by human seminal plasma. *Clin Exp Immunol* 1986;63:687.
50. Tarter TH, Cunningham-Rundless S, Koide SS. Suppression of natural killer cell activity by human seminal plasma in vitro: Identification of 19-OH-PGE as the suppressor factor. *J Immunol* 1986;136:2862.
51. Chouaib S, Chatenoud L, Klatzmann D, Fradelizi D. The mechanism of inhibition of human IL2. II. PGE2 induction of suppressor T lymphocytes. *J Immunol* 1984;132:1851.
52. Taylor LP, Kelly WR. 19-hydroxylated E prostaglandins as the major prostaglandins of human semen. *Nature* 1974;250:665.
53. Witkin SS, Richards JM, Bongiovanni AM, Zelikowsky G. An IgG-Fc binding protein in seminal fluid. *Am J Reprod Immunol* 1983;3:23.
54. Labib RS, Tomasi TB. Enzymatic oxidation of polyamines relationship to immunosuppressive properties. *Eur J Immunol* 1981;11:266.
55. Quayle AJ, Kelly RW, Hargreave TB, James K. Immunosuppression by seminal plasma. *Clin Exp Immunol* 1989;75:387.
56. Honda M, Steinberg AD. Effects of prostaglandin E2 on responses of T-cell subsets to mitogen and autologous non T-cell stimulation. *Clin Immunol Immunopathol* 1984;33:111.
57. Mestecky J. The human mucosal immune system and current strategies for induction of immune responses in external secretions. *J Clin Immunol* 1987;7:265.
58. Mestecky J, McGhee JR. Immunoglobulin A (IgA): Molecular and cellular interactions involved in IgA biosynthesis and immune response. *Adv Immunol* 1987;40:153.
59. Delacroix DL, Elkon KB, Vaerman JP. IgA size and IgA subclass distribution in serum and secretions. *Ann NY Acad Sci* 1983;409:812.
60. Crago SS, Kutteh WH, Price SJ, Radl J, Haaijman JJ, Mestecky J. Distribution of IgA1 and IgA2 subclasses in human tissue: Correlation with the presence of J-chain. *Ann NY Acad Sci* 1983;409:803.

61. Kilian M, Mestecky J, Russell MW. Defense mechanisms involving Fc-dependent functions of immunoglobulins A and their subversion by bacterial immunoglobulins A proteases. *Microbiol Rev* 1988;52:296.
62. Plaut AG. The IgA1 proteases of pathogenic bacteria. *Annu Rev Microbiol* 1983;37:603.
63. Putnam FW, Liu YV, Low TLK. Primary structure of human IgA1 immunoglobulin. IV. Streptococcal IgA1 protease digestion, Fab and Fc fragments, and the complete amino acid sequence of the alpha 1 heavy chain. *J Biol Chem* 1979;254:2865.
64. Frangione B, Wolfenstein-Todel C. Partial duplication in the hinge region of the IgA1 myeloma proteins. *Proc Nat Acad Sci USA* 1972;69:3673.
65. Mestecky J, Russell MV. IgA subclasses. *Monogr Allergy* 1986;19:277.
66. Kutteh HW, Hatch DK, Blackwell ER, Mestecky J. Secretory immune system of the female reproductive tract: I. Immunoglobulin and secretory component-containing cells. *Obstet Gynecol* 1988;71:56.
67. Linford E. Cervical mucus: An agent or a barrier to conception? *J Reprod Fert* 1974;37:239.
68. Vaerman J, Ferin J. Local immunological response in vagina, cervix and endometrium. *Acta endocrinol* 1974;78:281.
69. Davis PK, Maciulla JG, Yannone EM, Gooch TG, Lox DC, Whetstone RM. Cervical mucus immunoglobulins as an indicator of ovulation. *Obstet Gynecol* 1983;62:338.
70. Plaut AG, Gilbert JV, Artenstein MS, Capra JD. Neisseria gonorrhoeae and meningitidis: Extracellular enzyme cleaves human immunoglobulins A. *Science* 1975;190:1103.
71. Plaut AG, Genco RJ, Tomasi TB. Isolation of an enzyme from *Streptococcus sanguis* which specifically cleaves IgA. *J Immunol* 1984;113:298.
72. Kilian M, Thomsen B, Petersen TE, Bleeg HS. Occurrence and nature of bacterial IgA proteases. *Ann NY Acad Sci* 1983;409:612.
73. Kilian M, Mestecky J, Schrohenloher RE. Pathogenic species of the genus *Haemophilus* and *Streptococcus pneumoniae* produce immunoglobulin A1 protease. *Infect Immun* 1979;26:143.

74. Male CJ. Immunoglobulin A1 protease production by *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 1979;26:254.
75. Kilian M, Mestecky J, Kulhavy R, Tomana M, Butler WT. IgA1 proteases from *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, and *Streptococcus sanguis*: Comparative immunochemical studies. *J Immunol* 1980;124:2596.
76. Robertson JA, Stemler ME, Stemke GW. Immunoglobulin A proteases activity of *Ureaplasma urealyticum*. *J Clin Microbiol* 1984;19:255
77. Mueller HE. Lack immunoglobulin A protease in *Neisseria lactamica*. *Eur J Clin Microbiol* 1984;2:153.
78. Mulks MH, Knapp JS. Immunoglobulin A1 protease types of *Neisseria gonorrhoeae* and relationship to autotype and serovar. *Infect Immun* 1987;55:931.
79. Kornfeld JS, Plaut AG. Secretory immunity and the bacterial IgA proteases. *Rev Infect Dis* 1981;3:521.
80. Musher DM, Goree A, Baughn RE, Birdsall HH. Immunoglobulin A from bronchopulmonary secretions blocks bactericidal and opsonic effects of antibody to nontypable *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* 1984;45:36.
81. Mulks MH, Kornfeld SJ, Frangione B, Plaut AG. Relationship between the specificity of IgA proteases and serotypes in *Haemophilus influenzae*. *J Infect Dis* 1982;146:268.
82. Mulks MH, Plaut AG, Feldman HA, Frangione B. IgA proteases of two distinct specificities are released by *Neisseria meningitidis*. *J Exp Med* 1980;152:1442.
83. Garcia-Pardo A, Lamm ME, Plaut AG, Frangione B. J chain is covalently bound to both monomer subunits in human secretory IgA. *J Biol Chem* 1981;256:11734.
84. Mulks MH, Kornfeld SJ, Plaut AG. Specific proteolysis of human IgA by *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*. *J Infect Dis* 1980;141:450.
85. Grudy JF, Plaut GA, Wright A. Localization of the cleavage site specificity determinant of *Haemophilus influenzae* immunoglobulin A1 protease genes. *Infect Immun* 1990;58:320.

86. Senior WB, Albrechtsen M, Kerr Am. *Proteus mirabilis* strains of diverse types have IgA protease activity. *J Med Microbiol* 1987;24:175.
87. Fujiyama Y, Kobayashi K, Senda S, Benno Y, Bamba T, Hosada S. A novel IgA protease from *Clostridium* Sp., capable of cleaving IgA1 and IgA2 A2m(1) allotype but no IgA2 Am(2) allotype paraproteins. *J Immunol* 1985;134:573.
88. Kilian M. Degradation of immunoglobulins A1, A2 and G by suspected principal periodontal pathogens. *Infect Immun* 1981;34:757.
89. Molla A, Kagimoto T, Masda H. Cleavage of immunoglobulin G (IgG) and IgA around the hinge region by protease from *Serratia marcescens*. *Infect Immun* 1986;56:916.
90. Frandsen EVG, Reinholdt J, Kilian M. Enzymatic and antigenic characterization of immunoglobulin A1 proteases from *Bacteroides* and *Capnocytophaga* spp. *Infect Immun* 1987;55:631.
91. Loomes LM, Senior BW, Kerr MA. A proteolytic enzyme secreted by *Proteus mirabilis* degrades immunoglobulins of the immunoglobulin A1 (IgA1), IgA2 and IgG isotypes. *Infect Immun* 1990;58:1979.
92. Lassiter MO, Kindle JC, Hobbs LC, Gregory RL. Estimation of immunoglobulin protease activity by quantitative rocket immunoelectrophoresis. *J Immunol Methods* 1989;123:63.
93. Aitken RJ, Comhaire FH, Eliasson R, et al. WHO Laboratory Manual for the examination of Human semen and semen-cervical mucus interaction, 2nd ed. Cambridge, England: Cambridge University Press, 1987.
94. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annal Biochem* 1976;72:248.
95. Cebra JJ, Robbins JB. A Immunoglobulin from rabbit colostrum. *J Immunol* 1966;97:12.
96. Totten PA, Amsel R, Hale J, Piot P, Holmes KK. Selective differential human blood by layer media for isolation of *Haemophilus vaginalis*. *J Clin Microbiol* 1982;15:141.
97. Bronson AR, Cooper WC, Gilbert VJ, Plaut GA. The effect of an IgA protease on immunoglobulins bound of the sperm surface and sperm cervical mucus penetrating ability. *Fertil Steril* 1987;47:985.

98. Burnette WN. Western blotting: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 1981;112:195.
99. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680.
100. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci* 1979;76:4350.
101. Brown AT, Leak GI. A solid-phase immunoassay for detection of IgA1 protease activity on agar plates. *J Immunol Meths* 1989;123:241.
102. Bond SJ, Butler EP. Intracellular proteases. *Ann Rev Biochem* 1987;56:333.
103. Proposed international guidelines for biomedical research involving human subjects. A joint projects of the World Organization and the Council for International Organizations of Medical Sciences, OIOMS, Genova 1982.
104. Acuerdo del Secretario de Salud acerca de las comisiones de investigación y ética en establecimientos médicos. *Diario Oficial*, tomo CCCLXX, 1982;17:16.
105. Yanagimachi R. Mammalian fertilization. In Knobil E, Neil J, eds. *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press, 1988:135.
106. Underdown BJ, Schiff JM. Immunoglobulin A: strategic defense initiative at the mucosal surface. *Annu Rev Immunol* 1986;4:389
107. Loomes ML, Senior WB, Kerr AM. A proteolytic enzyme secreted by proteus mirabilis degrades immunoglobulins of the immunoglobulin A1 (IgA2), and IgG isotypes. *Infect Immun* 1990;58:1979.
108. Reiholdt J, Tomana M, Mortensen BS, Kilian M. Molecular aspects of immunoglobulin A1 degradation by oral Streptococci. *Infect Immun* 1990;58:1186.

109. Jones R. Identification of carbohydrate-binding proteins in mammalian spermatozoa (human, bull, boar, ram, stallion and hamster) using I125 fucoidin and I125 neoglycoproteins probes. *Human Reprod* 1989;58:719.
110. Yin ZH, Vogel MM, Schneider M, Ercolet C, Zhang G, Sinha AA, Wilson MJ. Gelatinolytic proteinase activities in human seminal plasma. *J Reprod Fert* 1990;88:491.
111. Mulks HM, Kornfeld JS, Plaut GA. Specific proteolysis of human IgA by *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*. *J Infect Dis* 1980;141:450.
112. Garbers DL. Molecular basis of fertilization. *Ann Rev Biochem* 1989;58:719.
113. Hume EM, Siegel SM, Polakoski LK. Comparison between proteinase of human seminal plasma and of sperm origin. *J Androl* 1987;8:221.
114. Thomas P, Meizel S. Effects of metalloendoprotease substrates on the human sperm acrosome reaction. *J Reprod Fert* 1989;85:241.
115. Shur BD, Neely CA. Plasma membrane association, purification, and partial characterization of mouse sperm B-1,4-galactosyl transferase. *J Biol Chem* 1988;263:17706.
116. Cornwall GA, Tulsiani DR, Orgebin-Crist MC. Inhibition of the mouse sperm surface alpha-mannosidase inhibits sperm-egg binding in vitro. *Biol Reprod* 1991;44:913.
117. Meizel S. Molecules that initiate or help stimulate the acrosome reaction by their interaction with the sperm surface. *Am J Anat* 1985;174:285.
118. Lilja H, Laurell CB. The predominant protein in human seminal coagulate. *Scand J Clin Lab Invest* 1985;45:635.
119. Koren E, Lukac J. Mechanism of liquefaction of human ejaculate. I. Changes of the ejaculate proteins. *J Reprod Fert* 1979;56:493.
120. Seigel MS, Bechtold DS, Willard JL, Polakoski KL. Partial purification and characterization of human sperminogen. *Biol Reprod* 1987;36:1063.
121. Barros C, Vigil P, Herrera E, Arguello B, Malker R. Selection of morphologically abnormal sperm by human cervical mucus. *Arch Androl* 1984;12 (suppl):95.

122. Blasco L, Sokoloski JE, Wolf DP. A practical, objective approach to the evaluation of the sperm and cervical mucus in humans. *Fertil Steril* 1979;32:55.
123. Daunter B, Elstein M, Chantler E. Functional structure of human cervical mucus. *Brit J Obstet Gynaec* 1976;83:738.
124. Chrétien FC, Gernigon C, David G, Psychoyos A. The ultrastructure of human cervical mucus under scanning electron microscopy. *Fertil Steril* 1973;24:746.
125. Fordney-Settlage D. A review of cervical mucus and sperm interactions in humans. *Int J Fertil* 1981;26:161.
126. Hanson FW, Overstreet JW. The interaction of human spermatozoa with cervical mucus in vivo. *Am J Obstet Gynecol* 1981;140:173.