



**UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA**  
Institut de Biologia Fonamental  
Departament de Biologia Cel.lular, Fisiologia i Immunologia  
Unitat d'Immunologia

**Estudi de la capacitat de l'espermatozoide i com les  
interaccions embrió-endometri poden inhibir-se per la  
presència d'una resposta autoimmunitària**

Memòria presentada per adquirir el grau de Doctor en Ciències (Secció Biologia) per  
Antoni Iborra Obiols, llicenciat en Ciències secció Biologia.

Treball realitzat en l'Institut de Biologia Fonamental de la Universitat Autònoma de  
Barcelona sota la direcció de la Dra. Paz Martínez Ramírez.

Dra Paz Martínez Ramírez  
Directora de Tesi

Antoni Iborra Obiols

Nosaltres, ben mirat, no som més que paraules,  
si voleu, ordenades amb aliva arquitectura  
contra el vent i la llum,  
contra els cataclismes,  
en fi, contra els fenòmens externs  
i les internes rutes angoixoses.  
Ens nodrim de paraules  
i, algunes vegades, habitem en elles,  
així en els mots elementals de la infantesa,  
o en les acurades oracions  
dedicades a lloar l'eterna bellesa femenina,  
o, encara, en les darreres frases  
del discurs de la vida.  
Tot, si ho mireu bé, convergeix en nosaltres  
perquè ho anem assimilant,  
perquè ho puguem convertir en paraules  
i perduri en el temps,  
el temps que no és res més  
que un gran bosc de paraules.  
I nosaltres som els pobladors d'aquest bosc.  
I més d'un cop ens hem reconegut  
en alguna antiquíssima soca,  
com la reproducció estrafeta  
d'una pintura antiga,  
i hem restat indecisos  
com aquell que desconeix la ciutat que visita.  
Però la nostra missió és parlar.  
Donar llum de paraula  
a les coses inconcretes.  
Eleva-les a la llum amb els braços de l'expressió viva  
perquè triomfem en elles.  
Tot això, és clar, sense viure massa prop de les coses.  
Ningú no podrà negar que la tasca és feixuga.

Miquel Martí i Pol

# **INDEX**

<b>1.- Prefaci</b>	<b>1</b>
<hr/>	
<b>2.- Part I: Estudi de la capacitació de l'espermatozoide de mamífer.</b>	<b>3</b>
2.1- Morfologia de l'espermatozoide.	3
2.2.- Capacitació.	3
2.2.1.- Molècules reguladores no sintetitzades per l'espermatozoide.	6
2.2.2.- Canvis en la membrana dels espermatozoides.	6
2.3.- Estudi funcional de l'espermatozoide mitjançant anticossos monoclonals.	7
<b>3.- Objectius concrets: Part I</b>	<b>9</b>
<b>4.- Resultats: Articles referents a la Part I</b>	<b>13</b>
<b>5.- Discussió: Part I</b>	<b>29</b>
5.1.- Proteïnes de l'espermatozoide involucrades en la capacitació.	29
5.2.- Paper de la sortida del colesterol en la capacitació de l'espermatozoide.	33
<hr/>	
<b>6.- Part II: Estudi de l'esterilitat de causa immunològica en la dona.</b>	
<b>Aplicació a un model concret de patologia ginecològica: l'endometriosis.</b>	<b>39</b>
6.1.- L'aparell reproductor femení.	39
6.1.1.- Morfologia de l'úter.	40
6.1.2.- Regulació hormonal de l'endometri.	40
6.1.3.- Cicle menstrual.	41
6.1.4.- Patologies del tracte reproductiu femení causants d'esterilitat.	43
6.2.- Aparició de resposta immunitària contra estructures pròpies: Autoimmunitat.	45
6.2.1.- Esterilitat de causa immunitària.	46

6.3.- L'Endometriosi.	48
6.3.1.-Simptomatologia i classificació.	48
6.3.2.- Causes que originen l'Endometriosi.	49
6.3.3.- Diagnòstic de la patologia.	52
6.3.4.-	55
Autoimmunitat i fertilitat en Endometriosi.	55
<b>7.- Objectius concrets: Part II</b>	<b>60</b>
<b>8.- Resultats: Articles referents a la Part II</b>	<b>61</b>
<b>9.- Discussió: Part II</b>	<b>75</b>
9.1.- Determinació dels anticossos anti-endometri (AEA).	75
9.2.- Autoanticossos i esterilitat: Endometriosi.	77
9.3.- Anticossos anti-endometri i estrès oxidatiu.	81
<hr/>	
<b>10.- Aportacions d'aquesta Tesi</b>	<b>83</b>
<b>11.- Conclusions Part II</b>	<b>84</b>
<b>12.- Annex 1</b>	<b>86</b>
<b>13.- Bibliografia Part I i Part II</b>	<b>91</b>
<b>14.- Agraïments</b>	<b>110</b>
<hr/>	

## **1.- PREFACI**

Al llarg d'aquest treball de Tesi, hem investigat antígens involucrats directament en la reproducció humana. L'èxit reproductiu s'aconsegueix en el moment del part, quan el nadó comença el viatge de la seva vida. Per a que aquest viatge sigui possible, altres viatges han succeït prèviament. Viatges en els que el nostre grup de recerca està interessat.

La fecundació és el resultat de la fusió d'un espermatozoide amb l'òcit. En el moment de l'ejaculat, milions d'espermatozoides són dipositats a la vagina, d'aquests, uns milers viatgen al llarg del tracte reproductor femení fins a les trompes de Fal·lopi, on exclusivament un sol d'ells podrà fecundar l'òcit. Es tracta d'un viatge llarg, per el que els espermatozoides s'han preparat amb antel·lació al seu inici. Com?. Amb l'ejaculat, diferents molècules del plasma seminal s'adhereixen a la membrana plasmàtica de l'espermatozoide. Aquestes molècules confereixen protecció, es van desprenent al llarg del camí, i finalment poden actuar com a primers receptors en la interacció amb l'òcit, possibilitant una fecundació exitosa. Però, com i quan es desprenen aquestes proteïnes?, com i on s'eliminen? Què passa amb la capacitat fecundant de l'espermatozoide si aquestes proteïnes no es disocien de la membrana?, quina relació existeix entre la sortida d'aquestes proteïnes i l'estat fusogènic de la membrana de l'espermatozoide? Experiments realitzats en aquesta Tesi, ens han permès conèixer millor aquest tipus de molècules i la seva importància en la fecundació, en estudis realitzats in vitro així com en condicions in vivo.

Una fecundació exitosa, garanteix una gestació a terme? Una vegada realitzat el procés de la fecundació comença un nou viatge. En aquesta nova aventura el personatge principal és l'embrió que anirà dividint-se fins arribar a l'estat de blastocist, moment en que haurà d'implantar-se a l'úter. Està demostrat que algunes patologies del tracte reproductor femení poden resultar en una disminució de la taxa d'implantació. Les cèl·lules endometrials que han d'acollir l'embrió, presenten molècules de superfície involucrades a tal efecte. Podem pensar en una alteració, o en un bloqueig, d'aquestes estructures com a responsables de la mala o nul·la implantació de l'embrió? En aquest treball de Tesi ens hem qüestionat la possible participació d'una resposta autoimmunitària contra estructures pròpies de l'endometri. La presència d'autoanticossos, units a antígens endometrials, podria explicar la inhibició de la implantació per el bloqueig físic de receptors?. Si fos així, això explicaria per que trobem una taxa d'implantació baixa en dones amb patologies en estadis molt incipients. Podem pensar que, prèviament al procés autoimmunitari, existeix una modificació d'antígens propis capaç d'alterar la seva funcionalitat? Vol dir això que la resposta autoimmunitària contra estructures pròpies del tracte genital femení és una conseqüència del desenvolupament d'una

patologia ginecològica?. La baixa implantació pot explicar-se per la pèrdua de funcionalitat o per la unió d'autoanticossos a estructures de l'endometri modificades. Si això és així, quin tipus de modificacions serien?. Els resultats obtinguts en aquest treball de Tesi obren en proper futur noves qüestions a resoldre.

## 2.- PART I: Estudi de la capacitat de l'espermatozoide de mamífer

L'espermatozoide és el producte final de la gametogènesi, que té lloc en els túbuls seminífers del testicle. Abans d'arribar a l'estat d'espermatozoide tenen lloc una sèrie de divisions de les espermatogònies i espermatòcits, diferents canvis morfològics de les espermatides al llarg de l'espermiogènesi per finalment, alliberar el gàmete a la llum del túbul seminífer<sup>1</sup>.

### 2.1.- Morfologia de l'espermatozoide

L'espermatozoide de mamífer té dos components principals: El cap i la cua tal com es veu a la Figura 1, on podem observar els principals components morfològics, així com l'aspecte de l'acrosoma de diferents espècies de mamífer.

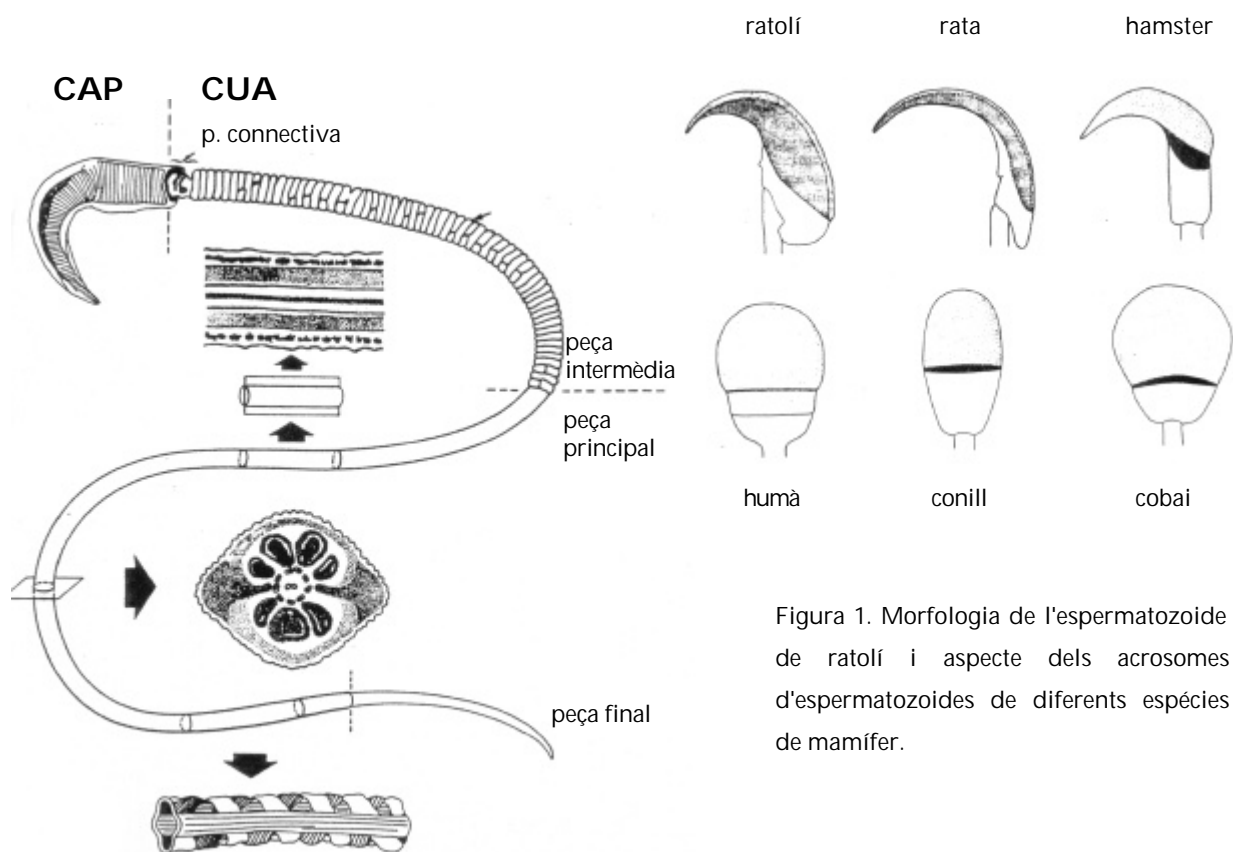


Figura 1. Morfologia de l'espermatozoide de ratolí i aspecte dels acrosomes d'espermatozoides de diferents espècies de mamífer.

El **cap** dels espermatozoides de mamífer és ocupat majoritàriament pel **nucli** i l'**acrosoma**, però també conté components del citoesquelet presents en una mínima porció de citosol. L'acrosoma es presenta a la porció anterior del cap, limitat per la membrana plasmàtica i el

nucli que, en moltes espècies dóna forma a l'acrosoma. Els components del citoesquelet presents es troben en els espais que resten entre la membrana acrosomal interna i el nucli.

El **nucli** dels espermatozoides és menor que el d'altres cèl.lules somàtiques, però ocupa la pràctica totalitat de tot el cap de l'espermatozoide, la seva cromatina és molt condensada. El nucli dels espermatozoides és diferent al de la resta de cèl.lules de l'organisme humà, tant en la quantitat de DNA present com en la composició de les seves nucleoproteïnes. Les dues divisions meiótiques que tenen lloc al llarg de l'espermatogènesi produeixen un genoma haploid, en el que només hi trobem un cromosoma de cadascuna de les parelles.

Moltes de les estructures del citoesquelet presents en els espermatozoides s'han identificat en el cap. Aquestes depenen del nucli i de l'acrosoma i això permet descriure tres porcions de citoesquelet: subacrosomal, postacrosomal i paraacrosomal. La Taula 1 presenta alguns dels elements de cadascuna d'aquestes porcions de citoesquelet<sup>2</sup>.

**Taula 1: Components del citoesquelet dels espermatozoides**

---

- Cap
    - \* Citoesquelet subacrosomal (perforatorium)
    - \* Citoesquelet postacrosomal (envolta postacrosomal, envolta postnuclear, làmina densa postacrosomal, extrem postnuclear, cos postnuclear).
    - \* Citoesquelet paraacrosomal (Complexe filamentós del citoesquelet).
  - Peça connectiva
    - \* Capitulum
    - \* Columnes segmentades
  - Cua
    - \* Axonema
    - \* Fibres denses externes
    - \* Fibres satèl.lit
    - \* Fibres d'envolta
- 

L'**acrosoma** està format a partir de l'aparell de Golgi de les espermatides i conté els enzims necessaris per que l'espermatozoide pugui penetrar i fusionar-se amb la membrana de l'oòcit. L'acrosoma és una vesícula que es localitza a la part anterior del cap de l'espermatozoide i està format per diferents membranes: La més interna és la membrana acrosomal interna (IAM), aquesta membrana recobreix la membrana nuclear i tan sols queda externalitzada quan ha tingut lloc la reacció acrosòmica, moment en que l'espermatozoide perd les altres dues membranes que formen l'acrosoma. Aquestes altres membranes són la membrana acrosomal externa (OAM) i la membrana plasmàtica (PM) que és la membrana més externa de l'espermatozoide. Entre la OAM i la PM hi ha una petita àrea de citosol que conté una ampla varietat d'enzims acrosomals. Al llarg de la capacitació i quan té lloc la reacció acrosòmica, les membranes OAM i PM es fusionen i formen vesícules, el contingut acrosomal és alliberat a l'exterior, deixant la IAM completament externalitzada, tal com podem observar a la Figura 2, extreta del review de Morros i Martínez<sup>3</sup>.



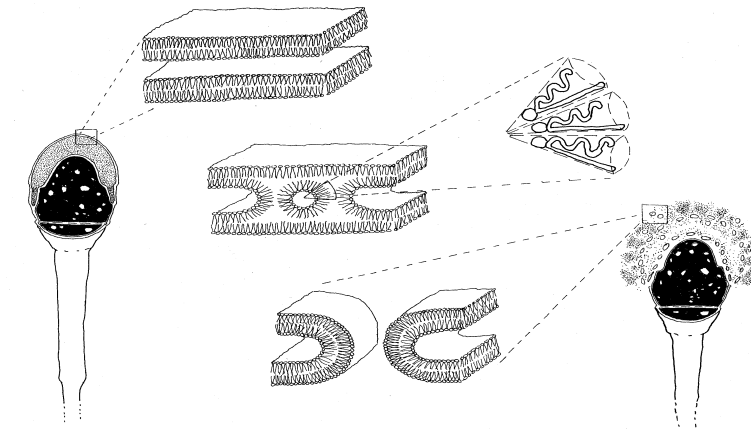


Figura 2. Augment de fusogenicitat de les membranes de l'espermatozoide que dona lloc a la fusió de les membranes plasmàtica i acrosomal externa, amb alliberament d'enzims acrosomals i externalització de la membrana acrosomal interna.

A l'interior de l'acrosoma trobem diferents enzims que juguen un paper molt important en el procés de la fecundació. Molts dels enzims que conté són comuns als lisosomes, però n'hi ha d'altres exclusius dels espermatozoides: l'acrosina i la hialuronidasa, que són els components majoritaris de l'acrosoma. La Taula 2 presenta diferents enzims acrosomals descrits en els espermatozoides de mamífer. Molts estudis defineixen l'acrosina, un dels enzims acrosomals més estudiats, com a una proteïna essencial per la fecundació. L'acrosina té diferents funcions en la unió de l'espermatozoide a la zona pel·lúcida, en la penetració de la zona pel·lúcida i també en la reacció acrosòmica.

**Taula 2.** Alguns dels enzims descrits en l'acrosoma.

<b>Enzim</b>	<b>Referència</b>
$\beta$ -N-Acetylglucosaminidase	4
Acid phosphatase	5
Acrosin	6
Arylamidase	7
Arylsulfatase A	8
Aspartylamidase	9
Calpain II	10
Cathepsin-D-like protease	11
Collagenase-like peptidase	12
Esterases, nonspecific	13
$\beta$ -glucuronidase	14
Hyaluronidase	15
Neuraminidase	16
Phospholipase A	17

La **cua** dels espermatozoides de mamífer està dividida en quatre regions: la zona de connexió, la peça intermitja, la part principal i la part final. La cua proporciona la força motil necessària a l'espermatozoide, a partir de vigorosos moviments del flagel, que permetran penetrar la zona pel·lúcida de l'oòcit.

## **2.2.- La Capacitació**

Des de fa temps es coneix que per poder fecundar a l'òvit, els espermatozoides necessiten residir diferents hores segons l'espècie, en el tracte genital femení. Aquest fenomen és el que coneixem com a capacitació<sup>18</sup>. Fins avui, diferents autors han intentat definir la capacitació. Una que podríem acceptar com a més correcta seria la de Moore i Bedford<sup>19</sup>, que de manera resumida, s'expressaria com el procés que té lloc en el tracte genital femení, o en condicions in vitro, i que prepara als espermatozoides per a la reacció acrosòmica, i que també contribuïx a desenvolupar la hiperactivitat de l'espermatozoide prèvia a la fecundació de l'òvit<sup>20</sup>.

La funció dels espermatozoides és l'alliberament de DNA a l'interior de l'òvit. Dels millions de cèl·lules presents a l'ejaculat tan sols uns centenars arriben als voltants de l'òvit. Els espermatozoides necessiten travessar varies cobertes oocitàries com són el cumulus oophorus, zona pel·lúcida i oolema. La matriu de les cèl·lules està composta principalment per àcid hialurònic. La zona pel·lúcida està formada per diferents glicoproteïnes, i l'oolema és la membrana plasmàtica que envolta l'òvit. Tan sols quan aquestes membranes són intactes, els espermatozoides que les travessen poden fecundar l'òvit. Per aquest fi, els espermatozoides es valen de la velocitat progressiva del seu batec (hiperactivitat) i d'enzims lítics que estan dins la porció anterior del cap, en l'acrosoma.

Després de l'ejaculació, el transport de l'esperma en el tracte genital femení és molt ràpid (15-20 minuts en humana), però en canvi, la capacitació requereix un temps superior (3-4 hores en humana), s'especula que els espermatozoides entren gradualment en el procés de capacitació una vegada arriben a les rodalies de l'òvit. Això ajudaria a conferir un sistema de protecció a l'espermatozoide ja que el fa incapaç de respondre a senyals que podrien induir la reacció acrosòmica abans d'entrar en contacte amb la zona pel·lúcida, prevenint així una reacció acrosòmica prematura.

### **2.2.1.-Molècules reguladores no sintetitzades per l'espermatozoide**

La membrana plasmàtica de l'espermatozoide consisteix en una bicapa lipídica en la que hi han nombroses proteïnes disperses. Els lípids predominants són fosfolípids, colesterol i glicolípid. Moltes de les proteïnes contingudes a la membrana són glicoproteïnes que juguen un paper important com a transportadores d'ions o en l'activació de receptors. Aquest alt contingut de glicolípid i glicoproteïnes a la membrana plasmàtica, fa que l'espermatozoide estigui envoltat d'una capa de sucres que anomenem glicocàlix, al que s'hi acostuma a trobar associades glicoproteïnes i polisacàrids units de manera no covalent i que no estan inclosos en la bicapa lipídica, i que no són sintetitzades per l'espermatozoide. L'origen d'aquestes proteïnes és divers, els espermatozoides al llarg de la seva maduració en el tracte genital masculí absorbeixen components del testicle, de l'epidídim i en el moment de l'ejaculació poden absorbir, en la seva membrana, proteïnes presents en el plasma seminal.

Les estructures associades a la membrana plasmàtica, inhibeixen la reacció acrosòmica, no permeten la unió de l'espermatozoide a la zona pel·lúcida i juguen un paper important de protecció, bloquejant receptors i el transport de proteïnes. L'eliminació d'aquestes estructures, associades a la membrana, és un requisit indispensable per l'inici de la reacció acrosòmica, i és un aspecte essencial de la capacitació. Quan incubem els espermatozoides en presència de plasma seminal, els espermatozoides capacitats perden la seva capacitat de tenir la reacció acrosòmica o d'unir-se a l'oòcit<sup>21</sup>.

S'han descrit diferents proteïnes associades a la membrana d'espermatozoides en diferents espècies de mamífer, com rata<sup>22,23,24</sup>, conill<sup>25,26,27</sup>, cobai<sup>28</sup>, brau<sup>29</sup>, porc<sup>30,31,32,33</sup>. També s'han trobat en espermatozoide humà. La Taula 3 mostra alguns dels antígens humans descoberts en els darrers anys.

Taula 3. Antígens del plasma seminal humà descrits com proteïnes d'adhesió a la superfície de l'espermatozoide després de l'ejaculat.

<b>Denominació de l'antigen</b>	<b>Referència</b>
Ferrisplan	34
gp12	35
2C6	36
Inhibin	37
MHS-T	38
84 kDa protein	39
gp20	40
GZS-1	41
Sem-12	42
CD52	43
gp17	44
1G2	45

### **1.2.3.- Canvis en la membrana dels espermatozoides.**

La capacitació és un fenomen dependent de calci<sup>46</sup>, que comporta una sèrie de canvis que afecten a la permeabilitat de la membrana de l'espermatozoide. Els canvis bioquímics que regulen l'estructura i la fluïdesa de la membrana al llarg de la capacitació i la reacció acrosòmica poden afectar a la càrrega superficial neta dels espermatozoides, els nivells de colesterol a la membrana i a l'estructura dels fosfolípids de membrana.

La **càrrega de la superfície dels espermatozoides** ve determinada pel transit d'aquests per l'epidídim, i les molècules que s'adhereixen a ells a l'entrar en contacte amb el plasma seminal. La maduració epididimal comporta un augment de la càrrega negativa neta, deguda a l'augment de sialilglicoproteïnes, sulfoglucolípid i sulfats esteroides<sup>47</sup>. La capacitació en canvi, comporta una disminució de la càrrega negativa neta<sup>48</sup>. Aquesta disminució s'ha postulat que pot ser deguda a l'eliminació de l'àcid siàlic i de residus sulfats per part d'hidrolases presents en el tracte genital femení.

Un altre tipus de canvis que poden afectar a la membrana és la **concentració de colesterol en la membrana**. La capacitació és, fins a l'inici de la reacció acrosòmica, un procés completament reversible. Aquesta reversibilitat s'associa a canvis estructurals de la membrana dels

espermatozoides. Com descriu Parks<sup>49</sup>, la relació colesterol/fosfolípid és molt important per l'estabilitat de la membrana. Una pèrdua de colesterol, o un augment en el número de fosfolípids, causen desestabilització de la membrana i augmenten la seva permeabilitat<sup>50</sup>. Això s'ha corroborat en condicions in vitro, quan s'indueix la reacció acrosòmica en presència d'acceptors de colesterol, o afegint fosfolípids.

Per altre banda, Cheetham<sup>51</sup> ha observat diferents tipus de colesterol en l'espermatozoide humà: el colesterol i el colesterol sulfat. Aquest segon tipus de colesterol dóna molta rigidesa a la membrana i podria inhibir la maduració final de l'espermatozoide si primer no es trenca la unió al grup sulfat que permeti una millor fluidificació de la membrana. Els esterol sulfats són potents inhibidors de la reacció acrosòmica.

In vivo, la pèrdua de colesterol de les membranes es deu a la presència de diferents molècules, presents als fluids biològics, que actuen com a acceptors del colesterol. Aquests acceptors poden ser de diferent natura: lipoproteïnes, apolipoproteïnes, albúmina, lecitina. En secrecions del tracte genital femení podem trobar algunes d'aquestes molècules, que s'inclueixen en els medis sintètics de capacitat per treballar en condicions in vitro. No queda molt clar quin és el mecanisme que utilitzen aquests acceptors per captar el colesterol. Existeixen dades contradictòries que tractarem més endavant, com per exemple el paper d'acceptor de colesterol de l'albúmina, ja que Davis<sup>52</sup> afirma que l'albúmina a més del seu paper d'acceptor, podria participar permetent l'addició de fosfolípids a la membrana.

La sortida del colesterol de la membrana contribueix a la disminució de la relació colesterol/fosfolípids, una disminució d'aquest valor implica una major fluidesa de la membrana. Existeixen moltes evidències que suggereixen que, a més de la sortida del colesterol, també hi ha una migració de proteïnes i lípids al llarg de la capacitat. Aquests processos originen, en la membrana plasmàtica, unes àrees inestables, molt fusogèniques i permeables. Aquestes àrees s'han proposat com les zones de fusió entre la membrana plasmàtica i la membrana acrosomal externa, fusió que es dóna a la reacció acrosòmica.

S'ha descrit un paper molt important de les fosfolipases en la capacitat i la reacció acrosòmica degut a la hidròlisi dels àcids grassos units als **fosfolípids de membrana**. Diversos autors<sup>53,54</sup> han observat en diferents espècies el paper de la fosfolipasa-A2. De fet, inhibidors de la fosfolipasa A2 són capaços de bloquejar la reacció acrosòmica in vitro, però altres lisofosfolípids i àcids grassos insaturats, producte de la fosfolipasa A2 són acceleradors, estimuladors o inductors de la reacció acrosòmica. Els canvis en la composició i disposició dels lípids de la membrana ajuden a la seva remodelació al llarg de la capacitat.

Els lípids s'organitzen en el cap de l'espermatozoide en forma de dominis, i això pot tenir la seva importància estructural i funcional en l'espermatozoide. Aquests dominis garanteixen la rigidesa necessària per evitar una capacitat prematura. Existeixen evidències que les mateixes proteïnes de

la membrana contribueixen a l'empaquetament dels lípids que les envolten mitjançant forces cooperatives<sup>55</sup>. Els dominis també poden ser creats per la segregació de lípids propis de la membrana, on el colesterol juga un paper molt important. Un petit canvi en la fluïdesa de la membrana, per la pèrdua de colesterol força a la membrana a reorganitzar-se, de manera que els dominis poden alterar-se<sup>56</sup>.

### **2.3.- Estudi funcional de l'espermatozoide mitjançant anticossos monoclonals .**

En un recent treball, realitzat en els Estats Units, s'ha descrit que una de cada cinc parelles, en edat reproductiva, és estèril<sup>57</sup>. Tot i que s'han fet examens exhaustius per averiguar les causes de l'esterilitat, aproximadament en un 15% de les parelles el diagnòstic clínic fou de esterilitat desconeguda. En molts d'aquests casos, la fertilitat pot estar regulada per la presència d'una resposta immunitària, per la presència/absència d'anticossos anti-espermatozoide (ASA). Els espermatozoides presenten antígens propis que no es presenten fins a la pubertat i es desenvolupen en un lloc immunològicament privilegiat, aïllats del sistema immunitari. Per aquesta raó poden existir, en l'individu, diferents clons de limfòcits autorreactius cap antígens de l'espermatozoide. Existeixen diferents hipòtesis que expliquen l'aparició d'ASA en l'home. Teòricament, la barrera hematotesticular pot ser trencada per diferents causes resultant totes elles en una exposició dels antígens immunogènics dels espermatozoides al sistema immunitari. Aquesta exposició pot iniciar una resposta immunitària, donant lloc a una resposta inflamatòria i a la formació d'ASA, com es pot observar a la Taula 4 té lloc en diferents patologies.

**Taula 4:** Patologies que poden desencadenar l'aparició d'ASA i la seva prevalència.

Patologies	Prevalència ASA	Referències
- Obstrucció mecànica del tracte 58,59,60 (Anomalies congènites, vasectomia, trauma)	50-70	
- Oclusió del vas deferens (homes amb fibrosi quística)	54-75	61,62
- Varicocele	32	63
- Presència de resposta inflamatòria (Leucocitospèrnia, infeccions genitals)	15-40	64,65

Els pacients amb ASA presenten una resposta policlonal envers diferents antígens alhora, cosa que fa difícil poder esbrinar quin és l'antígen que dona lloc al bloqueig de la funcionalitat espermàtica o de la fecundació. La possibilitat de disposar d'anticossos amb una sola especificitat, cap a un sol antígen, permet estudiar en detall el paper funcional d'antígens de l'espermatozoide. En aquest sentit, la utilització de la tècnica d'obtenció d'anticossos monoclonals establerta per Kohler i Milstein a l'any 1975<sup>66</sup>, aplicada a antígens específics dels

espermatozoides o del plasma seminal, ens proporciona una eina de gran valor per l'estudi de la funcionalitat dels antígens espermàtics.

Aquesta tècnica s'ha aplicat per obtenir anticossos monoclonals contra un ampli ventall d'antígens d'espermatozoides de diferents espècies, per utilitzar-los com a eina de diagnòstic, per estudiar la presència d'un determinat antígen en un procés cel.lular concret, conèixer la presència de diferents tipus cel.lulars en una mostra, etc. L'any 1982, Prabhu<sup>67</sup>, Paul<sup>68</sup> i Lee<sup>69</sup>, publiquen diferents estudis realitzats amb espermatozoides humans aplicant, per primera vegada, anticossos monoclonals específics d'antígens de l'espermatozoide humà en els seus treballs. Des d'aleshores, s'han realitzat nombrosos estudis amb anticossos monoclonals anti-espermatozoide humà. En tots ells s'ha aconseguit conèixer millor diferents aspectes dels espermatozoides com la morfologia, la mobilitat, conèixer millor processos com la maduració epididimal, antígens no sintetitzats per l'espermatozoide presents a la seva membrana, la capacitació, la reacció acrosòmica, l'adsorció de molècules de l'espermatozoide en el tracte genital femení, la interacció amb l'òvit, la penetració de la zona pel.lúcida, la fecundació, la implantació de l'embrió, i el desenvolupament de l'embaràs. Els anticossos monoclonals han permès definir quins antígens, i de quina manera, participen en el procés reproductiu.

La gran aplicació dels anticossos monoclonals es reflexa en el número de treballs publicats al respecte. Si observem els treballs que utilitzen anticossos monoclonals per l'estudi de l'espermatozoide humà podem observar com des de 1982 s'han publicat 222 treballs (Segons cerca bibliogràfica en Medline, veure Annex 1). (Figura 3).

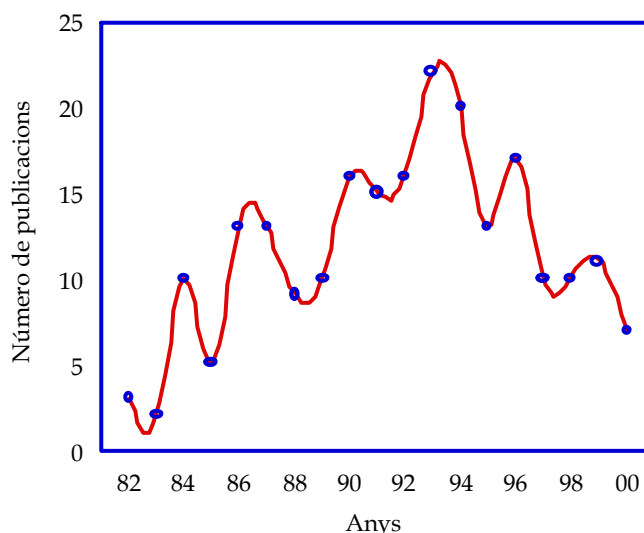


Figura 3. Evolució, des de l'any 1982 fins l'actualitat, del número de publicacions/any que reflexen la utilització d'anticossos monoclonals específics d'antígens de l'espermatozoide humà.

Amb aquests anticossos s'han abordat diferents estudis, predominant els articles on es descriu la caracterització d'antígens de l'espermatozoide humà (36,13%) i articles on s'utilitzen anticossos monoclonals en l'estudi de la reacció acrosòmica (18,07%), com es pot observar a la Figura 4. En aquest contexte, voldriem ressaltar una dada que certifica l'aportació científica del nostre grup, en la producció d'anticossos monoclonals específics de l'espermatozoide humà, aproximadament el 5% de tots els articles publicats des de 1993 en aquest camp, concretament publicacions on aparèixen anticossos monoclonals específics d'antígens de l'espermatozoide humà, són treballs realitzats amb anticossos monoclonals produïts en el nostre grup d'Immunologia de l'Institut de Biologia Fonamental.

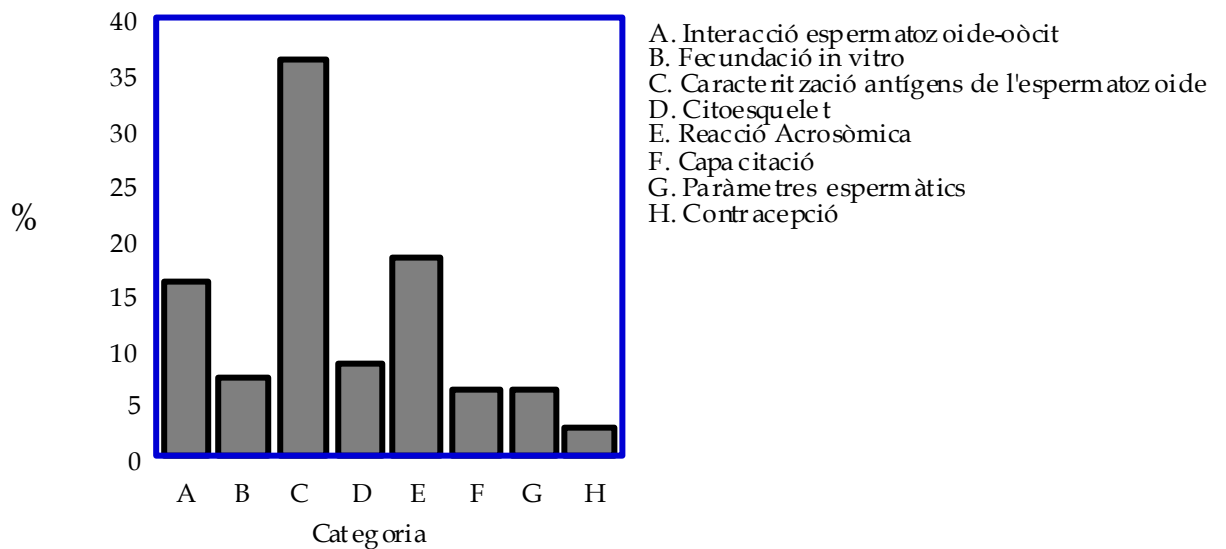


Figura 4. Tipus d'estudis abordats en les publicacions científiques, des de 1982, que utilitzen anticossos monoclonals específics d'antígens de l'espermatozoide humà.

### **3.- Objectius concrets: Part I.**

Els objectius concrets que ens hem proposat en la part I del treball han estat:

- Estudi de la capacitació de l'espermatozoide: Paper de les proteïnes del plasma seminal.
- Estudi funcional de l'espermatozoide: Bloqueig de la reacció acrosòmica per la unió d'anticossos monoclonals.
- Funció del colesterol en la capacitació i la reacció acrosòmica de l'espermatozoide.



#### **4.- Resultats: Articles referents a la Part I.**

Els següents articles realitzats pel doctorand proporcionen una part de la puntuació mínima obligatòria, pel seu índex d'impacte, per la presentació del present treball de Tesi:

- Human sperm coating antigen from seminal plasma origin. **A. Iborra**, C. Morte, P. Fuentes, V. García-Framis, P. Andolz, P. Martínez. American Journal of Reproductive Immunology 36:118-125 (1996)<sup>42</sup>.
- Cholesterol efflux promotes acrosome reaction in goat spermatozoa. **A. Iborra**, M. Companyó, P. Martínez, A. Morros. Biology of Reproduction 62: 378-383 (2000)<sup>70</sup>.

Aquests que s'esmenten a continuació, són articles en els que també ha participat de manera activa el doctorand al llarg del seu treball de recerca. Tots ells seran comentats i discutits en la propera secció de la Tesi.

- Characterization of monoclonal antibodies specific for human sperm: effect of CRL-10 on acrosome reaction. V. García-Framis, E. Martín-Lunas, **A. Iborra**, P. Andolz, MA. Bielsa, P. Martínez. Research in Immunology 145: 533-539 (1994)<sup>71</sup>.
- Monoclonal antibodies against boar sperm zona pellucida-binding protein AWN-1. Characterization of a continuous antigenic determinant and immunolocalization of AWN epitopes in inseminated sows. JJ. Calvete, M. Ensslin, J. Mburu, **A. Iborra**, P. Martínez, K. Adermann, D. Waberski, L. Sanz, E. Töpfer-Petersen, KF. Weitze, S. Einarsson, H. Rodríguez-Martínez. Biology of Reproduction 57: 735-742 (1997)<sup>72</sup>.
- Phosphorylation of Shc proteins in human sperm in response to capacitation and progesterone treatment. C. Morte, **A. Iborra**, P. Martínez. Molecular Reproduction and Development 50: 113-120 (1998)<sup>73</sup>.
- Immunoelectronmicroscopic imaging of spermadhesin AWN epitopes on boar spermatozoa bound in vivo to the zona pellucida. H. Rodríguez-Martínez, **A. Iborra**, P. Martínez, JJ. Calvete. Reproduction, Fertility and Development 10: 491-497 (1999)<sup>74</sup>.