

*Caracterització proteòmica de l'espermatozoide  
humà. Proteïnes diferencials trobades en pacients  
astenozoospèrmics.*

*Per Juan Martínez Heredia*



## 1.- Introducció

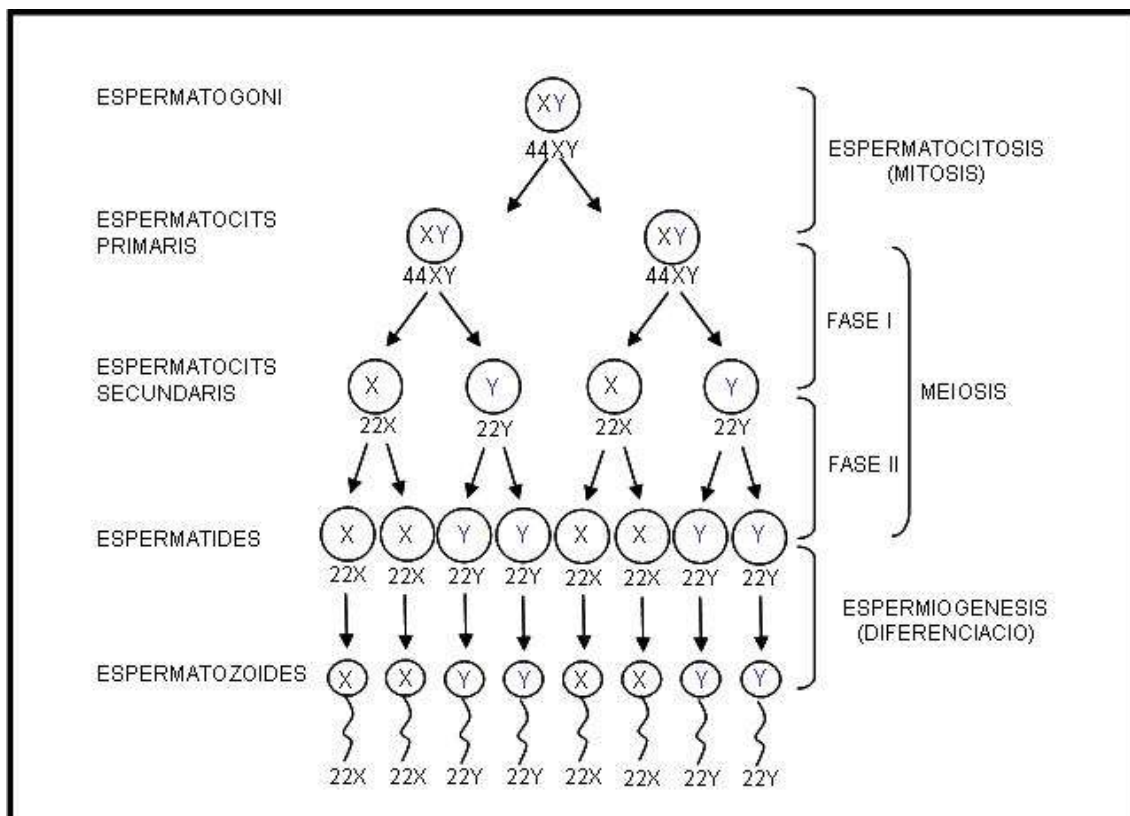


## 1.- Introducció.

### 1.1.- Espermatogènesis.

L'espermatogènesi és el procés a través del qual els espermatogonis experimenten una diferenciació cel·lular per donar lloc als espermatozoides (Fig 1.1). Els espermatozoides, en les espècies amb fertilització interna, seran alliberats als conductes femenins. Allà, un d'ells s'unirà amb l'òocit, fertilitzant-lo i transmetent el genoma patern a la descendència.

Els passos que componen l'espermatogènesi són la **mitosi**, la **meiosi** i l'**espermiogènesis** (Fig 1.1).



**Fig 1.1** Esquema dels diferents passos de la espermatogènesis. D'un únic espermatogoni es passa finalment a 8 espermatozoides haploides, portadors del codi genètic masculí.

Durant la **mitosi**, les espermatogonis (cèl·lules mare de la línia germinal) es divideixen en dos cèl·lules equivalents. Una d'aquestes cèl·lules mantindrà la funció de cèl·lula mare, mentre que l'altre donarà lloc als espermatòcits primaris (precursors de la meiosi).

Aquests espermatòcits es divideixen per **meiosi**. La primera divisió meiòtica donarà lloc

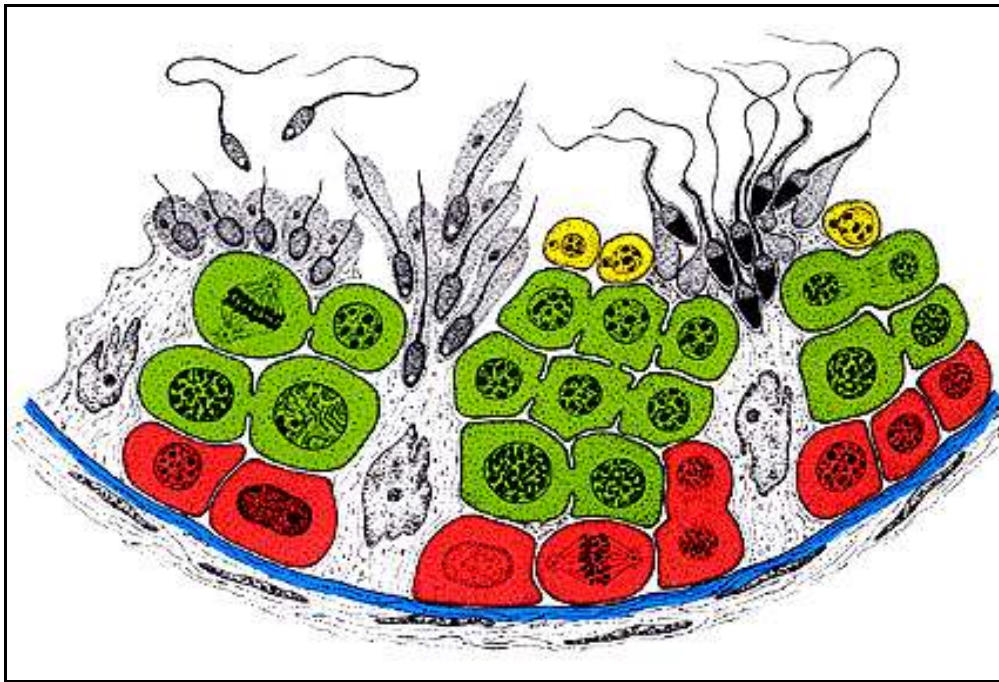
als espermatòcits secundaris, mentre que la segona divisió acabarà originant les espermatides rodones, que són les primeres cèl·lules haploides del procés. Aquesta fase es caracteritza per l'aparellament cromosòmic i la recombinació genètica.

Finalment, les espermatides rodones són sotmeses a un procés de diferenciació cel·lular conegut com **espermioogènesis**. Durant l'espermioogènesis, es passa de les espermatides (cèl·lules rodones, amb el nucli en posició central) a l'espermatozoide, una cèl·lula allargada, mòbil, amb un nucli condensat i allargat que ha perdut la seva posició central. També es forma l'acrosoma gràcies a la fusió de les vesícules de l'aparell de Golgi, i la cua, un llarg flagel format per un sistema de microtúbuls i mitocòndries (que proporcionen l'energia necessària per moure'l). Finalment, es perd la major part del citoplasma. En resum, l'espermatozoide es una cèl·lula haploide i amb una morfologia hidrodinàmica.

Tot el procés dura, a la espècie humana, uns 70 dies, més dues setmanes de trànsit a través del testicle i l'epidídim (Jaffe and Jewelewicz, 1991). A més, a mamífers el procés no està sincronitzat, i en qualsevol moment es poden trobar en els túbuls seminífers els diferents estadis de diferenciació cel·lular simultàniament (Fig 1.2) (Dym and Fawcett, 1971).

Un dels canvis més important que esdevé durant l'espermioogènesis és el canvi de la dotació proteica del nucli. Es passa del sistema nucleohistona (propi de totes les cèl·lules somàtiques) a un nucli condensat amb protamines (Mezquita, 1985; Oliva and Mezquita, 1986; Oliva, 2006). El canvi nucleohistona-protamina és pràcticament total, ja que únicament romanen un 15% de les histones prèvies. Aquest canvi permet una major compactació del nucli, fet que permetrà (entre d'altres canvis) disminuir la resistència hidrodinàmica del espermatozoide.

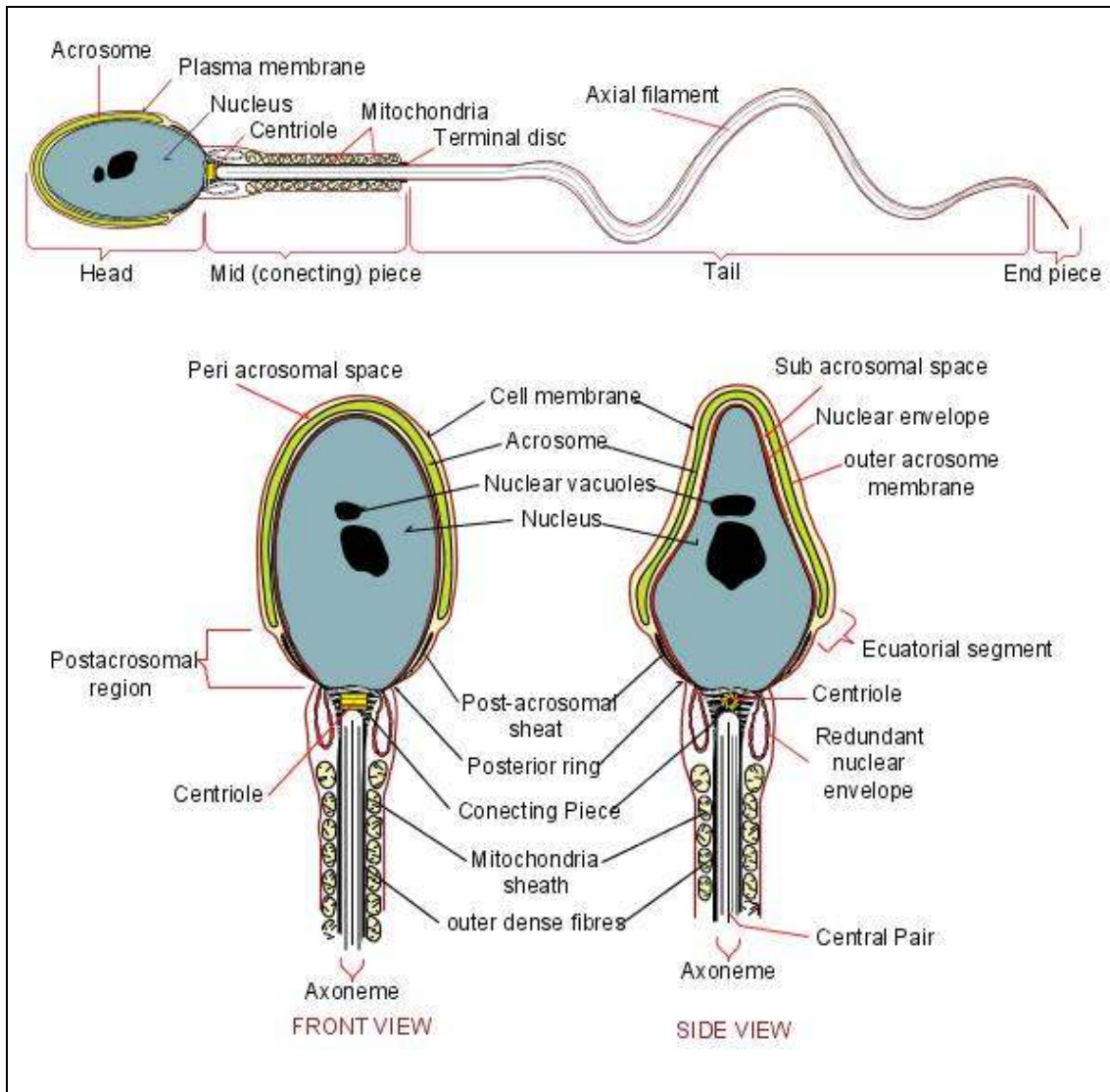
Durant l'espermatogènesi, les cèl·lules germinals no completen la seva divisió citoplasmàtica, de manera que totes les cèl·lules "germanes" es troben unides per ponts citoplasmàtics fins la seva diferenciació en espermatozoide madur (Phillips, 1970). La presència d'aquest pont explica el sorgiment sincronitzat al lumen del túbul seminífer de grups d'espermatozoides. Aquest ponts, a més, permeten a cada espermatozoide compartir citoplasma, de manera que poden gaudir de les avantatges d'un genoma diploide sencer. Això permet la supervivència dels espermatozoides amb cromosoma Y, donant-li'n accés a productes gènics essencials que només es troben al cromosoma X.



**Fig 1.2** Secció transversal de túbul seminífer, on s'observen els diferents estadis de l'espermatogènesi. Diferenciades per colors, espermatogonis (vermell), espermatòcits (verds) i espermatòides (groc). *Extreta de la web de la Facultat de Medicina de la Universitat de Milà (<http://users.unimi.it/esamanat/RISP180.htm>).*

Així, espermatozoides genèticament diferents són equivalents fenotípicament, gràcies a que comparteixen una mateixa dotació molecular (a nivell de RNAm o de proteïnes). Això implicaria la inexistència de subpoblacions d'espermatozoides més avantatjats o dotats que altres per a la fecundació. És doncs important la recerca d'anomalies moleculars que influeixin en l'activitat dels espermatozoides i especialment, en el seu poder fecundant per tal de poder establir un diagnòstic més clar dels casos d'infertilitat.

En finalitzar el procés, s'obtenen espermatozoides madurs. L'espermatozoide madur és una cèl·lula altament especialitzada, preparada per a assolir grans velocitats en medi aquós. Per a això disposa de la cua, una estructura flagel·lar formada per elements del citoesquelet que batega donant direcció i força al moviment; la peça intermèdia, on es disposen totes les mitocondries que donaran energia al moviment; i, finalment, el cap, amb una forma hidrodinàmica per tal d'oferir el mínim de resistència al moviment. A la part final del cap tenim, a més, l'acrosoma, on s'acumulen tots els enzims que faran possible penetrar a l'òocit (Fig 1.3).



**Fig 1.3** Esquema d'un espermatozoide humà madur. A la part superior s'observa l'espermatozoide sencer, mentre que a les imatges inferiors, es mostra una imatge frontal i lateral del mateix espermatozoide. *Extret de la Wikipedia (<http://en.wikipedia.org/wiki/Spermatozoon>)*

## 1.2.- Infertilitat Masculina.

### 1.2.1.- Definició, freqüència i etiologia.

La fertilitat és defineix com a la capacitat que tenen els éssers vius de reproduir-se. L'esterilitat és la pèrdua d'aquesta capacitat (Vanrell, 1992).

Existeix una forta controvèrsia en l'ús dels vocables *infertilitat* i *esterilitat*. En principi, són considerats sinònims (per la Real Academia de la Lengua, per exemple), tot i que alguns autors consideren estèril a la parella que no pot concebre fills, i infèril a la que avorta repetidament (Vanrell, 1992). D'altres (l'*American College of Obstetrics and Gynecologist*, per exemple) considera l'esterilitat com la incapacitat irreversible de concepció, mentre que la infertilitat seria l'absència o disminució de la concepció, però sense caràcter irreversible. Donat els continus avanços en el camp de la Reproducció Assistida, aquesta definició no és de molta ajuda, ja que s'han de redefinir contínuament els criteris de irreversibilitat.

Altres autors utilitzen el terme *subfertilitat*, referint-se a una disminució de la capacitat fecundant. Aquest problema es pot solucionar si l'altre membre de la parella és d'elevada fertilitat. Tant la subfertilitat com la infertilitat són un problema de la parella, ja que pot donar-se el cas que qualsevol dels membres de la parella pugui tenir fills amb una nova parella, tot i haver-li detectat alguna anomalia en les proves diagnòstiques bàsiques (Ballescà, 2002).

Tot i això, es considera a una parella estèril (com a sinònim d'infèril) aquella que no pot concebre després d'un any de relacions sexuals regulars amb finalitat procreadora. No obstant, entre un 20 i un 30% ho aconsegueixen superat aquest temps (Jaffe and Jewelewicz, 1991). La última definició del terme per l'*American Society for Reproductive Medicine (The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, 2006)* considera la infertilitat una malaltia, sempre i quan la parella no hagi pogut concebre en un període mínim de 12 mesos.

La infertilitat és un problema que afecta a un 15% de les parelles en edat reproductora, i aproximadament la meitat dels casos tenen el seu origen a l'home; un 30% és problema exclusiu masculí, i en un altre 30% és problema de la parella (Isidori et al., 2006). A més, en un 10% de les parelles no es pot trobar cap causa d'infertilitat (*infertilitat inexplicada*) (Sherins, 1995).



Els problemes d'infertilitat masculina tenen un ampli origen: aberracions cromosòmiques, anomalies gèniques, tòxics ambientals, varicocele... Una descripció més acurada es pot veure a la Taula 1.1.

Causes
• Deficiència de gonadotrofines
• Aberracions cromosòmiques
• Anomalies gèniques
• Malalties Autoimmunes
• Tòxics ambientals
• Alcohol/drogues
• Medicacions /quimioteràpia/ radiacions
• Malalties sistèmiques
• Malalties infeccioses (sistèmiques i genitals)
• Desordres neurològics
• Varicocele
• Obstruccions de les vies seminals
• Impotència

**Taula 1.1** Causes conegudes d'infertilitat humana.

### 1.2.2.- Anàlisi bàsica del semen.

Un estudi d'infertilitat s'inicia amb un seminograma. Aquesta anàlisi bàsica té el propòsit d'avaluar els paràmetres clàssics de l'ejaculat, a saber: olor, líquüefacció, viscositat, pH, volum, concentració espermàtica, mobilitat, vitalitat i morfologia. També permet detectar la presència de detritus, altres cèl·lules o la existència d'aglutinació entre espermatozoides. Els valors de referència es poden trobar a la Organització Mundial de la Salut (OMS) i resumits a la Taula 1.2.(WHO, 1999).

#### *Examen Macroscòpic.*

Abans de precedir a l'estudi en detall de les característiques dels espermatozoides, s'han

d'avaluar tota una sèrie de característiques macroscòpiques de l'ejaculat. Primer de tot, s'ha de comprovar que la liqüefacció i la viscositat siguin correctes. La liqüefacció ha de ser complerta en 20-30 minuts a temperatura ambient. No es poden avaluar la concentració ni la velocitat espermàtiques fins que aquest procés no sigui complet. La viscositat és una senyal de la fluïdesa de la mostra.

Està definit que l'aspecte i l'olor són altres factors a tenir en compte tot i que donat el caràcter subjectiu que tenen no tenen un caràcter predictiu. Els valors considerats normals per l'aspecte són, però, un color blanc-grogós, i un aspecte opalescent.

El volum de l'ejaculat també és una dada que es mesura, mitjançant un tub graduat. El pH de la mostra líquida es mesura amb tires de paper reactiu, sent els seus valor normals entre 7.2 i 8.2 (Gómez et al., 2000; WHO, 1999).

De tots aquest paràmetres, el més important a l'hora de trobar un possible motiu per a la infertilitat és el volum. El nom que reben les diferents alteracions del volum de l'ejaculat són les següents:

-*Aspèrmia*. Absència d'ejaculat.

- *Hipospèrmia*. Disminució del volum de l'ejaculat (per sota de 1.5 mL).

-*Hiperespèrmia*. Augment del volum de l'ejaculat (per sobre de 6 mL). Hi apareix una excessiva dilució del semen, amb una disminució del poder fecundant.

### *Examen Microscòpic.*

És molt important el conèixer exactament la concentració exacta dels espermatozoides en l'ejaculat. Hi ha diversos mètodes per calcular aquesta concentració, tot i que un dels més emprats és la cambra de Makler. Aquesta cambra serveix tant per estudiar la mobilitat com la concentració, ja que utilitza mostra en fresc. Consta d'una quadrícula d' $1\text{mm}^2$  dividida en 100 quadres amb una profunditat de 10  $\mu\text{L}$  (Figura 1.4).

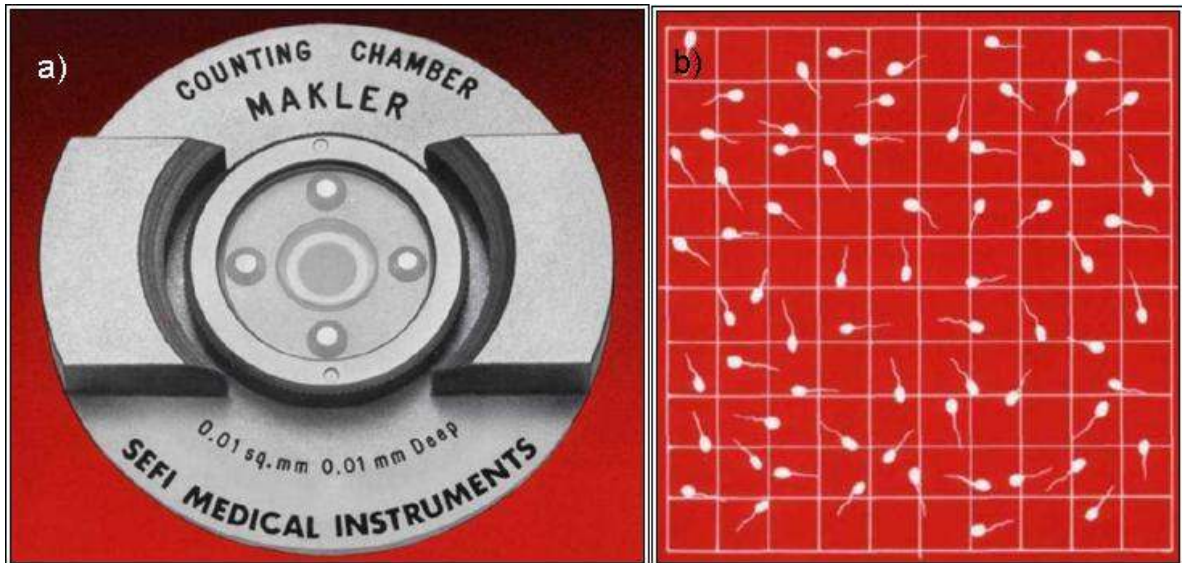
Segons la seva concentració, els pacients es divideixen en:

- *Azoospèrmia*: absència total d'espermatozoides.

- *Oligozoospèrmia* (oligospèrmia): concentració espermàtica inferior a 20 milions d'espermatozoides/mL. És severa si és inferior a 10 milions d'espermatozoides/mL, o moderada si és entre 10 i 20.

- *Normozoospèrmia*. Valors superiors a 20 milions d'espermatozoides/mL.

- *Polizoospèrmia*: concentració espermàtica superior a 250 milions d'espermatozoides/mL



**Fig 1.4.** Càmera de Makler: a) fotografia b) representació de la graella. La graella està formada per 10 fileres de deu quadres cadascuna. Es contenen 10 quadres (una filera) i el nombre resultant ens dona la concentració en milions per mil·lilitres. *Extret de full de documentació de SEFI Medical Instruments.*

Aquesta cambra també ens ajuda a calcular la mobilitat dels espermatozoides lliures. Existeixen quatre tipus d'espermatozoides segons la mobilitat, segons la OMS (WHO, 1999):

- 1) **Mòbils progressius ràpids**: es desplacen de forma rectilínia i ràpida amb velocitat igual o superior a 25  $\mu\text{m}/\text{seg}$ . (tipus +++ o A).
- 2) **Mòbils progressius lents**: es desplacen més lentament, de forma rectilínia o curvilínia, sempre amb velocitat de progressió entre 10 i 25  $\mu\text{m}/\text{seg}$ . (tipus ++ o B).
- 3) **Mòbils no progressius**: es mouen, però no canvien de posició. Tenen una velocitat inferior a 10  $\mu\text{m}/\text{seg}$ . (tipus + o C).
- 4) **Immòbils**: no es mouen en absolut (tipus 0 o D).

L'estimació de la mobilitat requereix de personal qualificat, i és, tot i això, molt subjectiva. Per això s'ha implementat l'ús de sistemes informatitzats (CASA, o Computer Assisted Semen Analyser). Aquest sistemes eliminen la subjectivitat de

l'anàlisi, tot i que és necessària la supervisió humana.

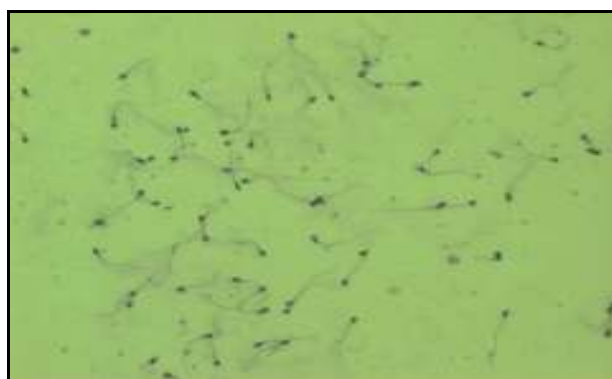
Segons el percentatge de mobilitat, podem tenir pacients *astenozoospèrmics*. Aquest pacients són aquells que tenen una mobilitat de tipus A inferior al 25% o una mobilitat de tipus A+B inferior al 50%.

La vitalitat espermàtica reflexa el percentatge d'espermatozoides vius. Aquest percentatge no ha de concordar necessàriament amb el percentatge d'espermatozoides mòbils. Així, s'ha de diferenciar entre una astenozoospèrmia total (100% d'espermatozoides immòbils, de classe 0 o D) i una *necrospèrmia* (100% d'espermatozoides morts). Per calcular la vitalitat, es poden utilitzar dos proves: la tinció vital amb eosina o la prova hiposmòtica. Es considera normal un individu amb més del 50% dels espermatozoides vius.

Com a part final de l'examen microscòpic, s'ha de comprovar la presència o absència d'aglutinació (espermatozoides mòbils units entre sí) i d'altres components cel·lulars, com poden ser cèl·lules germinals immadures, cèl·lules de descamació o leucòcits (Gómez et al., 2000; WHO, 1999).

### *Morfologia espermàtica.*

L'estudi de la morfologia és un altre punt important a tenir en compte a l'hora d'analitzar una mostra de semen. La morfologia s'estudia amb preparacions tenyides i visualitzades al microscopi òptic. Hi ha diferents maneres de tenyir una mostra: Giemsa, Papanicolau, Hemacolor, Diff-Quik, etc.



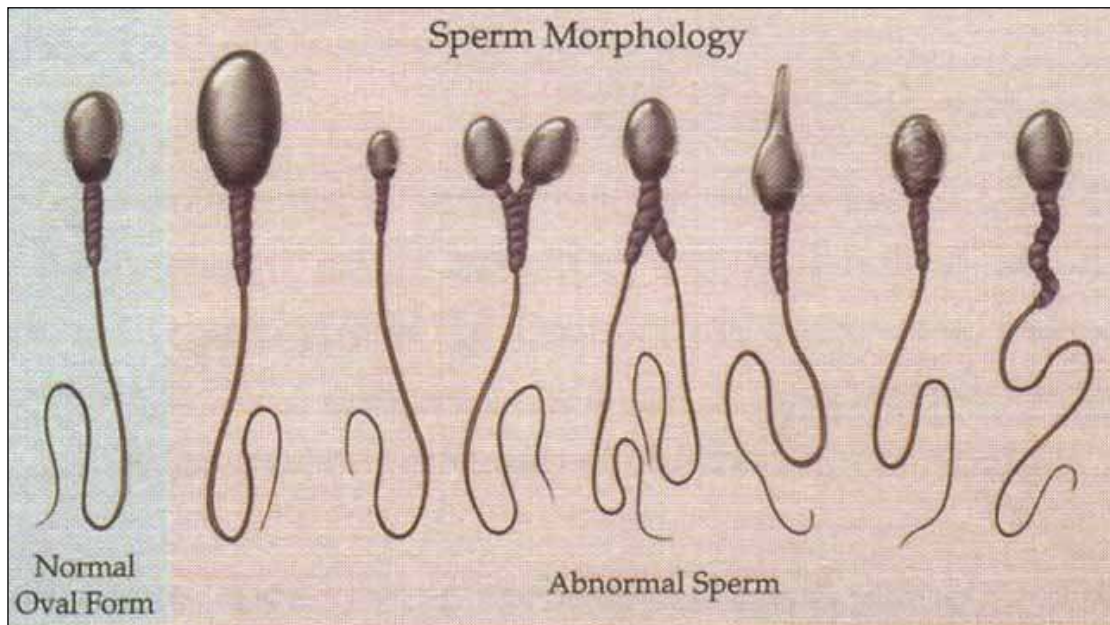
**Fig 1.5** Imatge de microscòpia òptica (40x), corresponent a una extensió d'espermatozoides tenyida amb Diff-Quik. S'observen els espermatozoides com un punt negre amb una línia (el flagell) a continuació.

Es considera que una mostra és normal si un 15% dels espermatozoides presenta una morfologia normal. Les principals anomalies es classifiquen segons la zona de

l'espermatozoide que afecten:

- *Anomalies de cap.* Gran, petit, piriforme, cònic, amorf, doble, amb acrosoma petit, etc.
- *Anomalies de coll i peça intermèdia.* Absent, angulada, distesa, irregular, molt fina, inserció asimètrica, etc.
- *Anomalies de cua.* Absent, curta, múltiple, trencada, ampla, cargolada, etc.
- *Anomalies de gota citoplasmàtica.* Es considera anomalia si la gota és major que un terç de l'àrea normal del cap de l'espermatozoide.

Es considera que hi ha *teratozoospermia* si hi ha més d'un 50% de formes anormals en l'ejaculat.



**Fig 1.6** Anomalies presents a l'espermatozoide i espermatozoide normal. A l'esquerra, forma ovalada normal. A la dreta, alteracions més habituals a l'espermatozoide, a saber: macrocefàlia, microcefàlia, cap doble, cua doble, acrosoma anòmal, anomalia de citoplasma, excés de peça intermèdia. *Extreta de la web de Pittsburg Cryobank (<http://www.pittsburghcryobank.com/glossary.html>).*

### *Factors predictius de la capacitat fecundant de l'espermatozoide.*

De tota la llarga llista de paràmetres seminals estudiats (concentració, mobilitat, morfologia,...), la morfologia sembla ser la que millor prediu el potencial fecundador d'una mostra de semen, tant *in vivo* (Aitken et al., 1982; Bostofte et al., 1982; Bonde et al., 1998, Guzick et al., 2001) com *in vitro* (Kruger et al., 1986; Kruger et al., 1988;

Oehninger et al., 1988; Hinting et al., 1990; Ombelet et al., 1994; Eggert-Kruse et al., 1995). Per això existeix una llarga llista de criteris utilitzats per determinar la normalitat morfològica d'una mostra (David et al., 1975; Hofmann et al., 1985; Eliasson, 1971; Fredricsson, 1979; Freund, 1966; Kruger et al., 1986, 1987; Menkveld et al., 1990; Williams, 1964; WHO, 1980, 1987, 1992, 1999).

Respecte al tipus de criteri, existeixen treballs que afirmen que els criteris estrictes (Kruger et al., 1986) tenen una capacitat de predicció superior al criteri establert per l'OMS als 1987 (WHO, 1987) (Menkveld and Kruger, 1995; Coetzee et al., 1998). En el criteri estricte de Kruger, més del 30% de la mostra ha de tenir una morfologia normal, mentre que al criteri de la OMS, només un 15% de formes normals són suficients.

L'estimació de la morfologia espermàtica és un valor subjecte a moltes variacions (Franken et al., 2000; Ombelet et al., 1998). Aquestes variacions poden ser degudes a la utilització de diferents tècniques de preparació, fixació i tinció; a possibles diferències en la interpretació dels protocols; a la utilització de diferents sistemes de classificació i, finalment, al nivell d'experiència de l'observador. Per tal de reduir aquestes fonts de variabilitat al mínim, s'han desenvolupat eines d'anàlisi per ordinador, com el mòdul *Sperm Class Analyser* (SCA), que presenta uns nivells de precisió i repetició satisfactoris si s'analitzen més de 50 espermatozoides en dos preparacions diferents (Soler et al., 2003). Aquests sistemes, però, no estan a l'abast de tothom, i la valoració subjectiva continua sent una eina important en molts laboratoris. Aquest factor subjectiu fa disminuir el valor predictiu d'aquesta característica.

### 1.2.3.- Causes primàries de la infertilitat masculina.

Un estudi dels diferents orígens de la infertilitat masculina ens permet agrupar aquestes causes en diferents categories. Deixant de banda els problemes mecànics (disfunció erèctil o ejaculatòria), aquestes categories són:

#### *Malalties i altres alteracions de l'individu.*

**Varicocele:** El varicocele són formacions varicoses de les venes tot al llarg del cordó espermàtic (que sosté els testicles). Entre un 8 i un 23% de la població presenta aquesta alteració; un 17% és, però, fèrtil. Del 19 al 41% dels problemes reproductius masculins s'atribueixen a un varicocele (Peng et al., 1990).

El procés que condueix a una varicocele és el mateix que provoca varius a les cames. Al testicle, però, pot provocar problemes addicionals. El problema sembla que s'origina a nivell d'alteracions en l'espermatogènesi, que acostumen a desembocar en una alteració en la mobilitat. Els possibles orígens són una disminució de l'oxigenació del testicle; un augment de la temperatura escrotal., o una influència de catecolamines i esteroides provinents de la glàndula adrenal.

Peng (Peng et al., 1990), va proposar que un varicocele pot requerir cofactors, com ara gonadotoxines, per tal de causar infertilitat. Una d'aquestes possibles gonadotoxines és la nicotina del tabac.

**Obstrucció de la via seminal.** Si trobem azoospermia, tamany testicular normal i valors de FSH en sèrum normals, estem parlant d'una azoospermia obstructiva. El tamany testicular i el valor de FSH ens indiquen que l'espermatogènesi és normal, i que el problema es troba situat en algun altre punt de la via.

L'obstrucció es pot trobar a diferents nivells, des dels tubs rectes intratesticulars fins als conductes ejaculadors, sent l'epidídim l'òrgan afectat amb més freqüència. L'absència bilateral congènita de vasos deferents és responsable d'un 1% aproximadament dels casos d'infertilitat en l'home (Jequier et al., 1985). S'ha trobat una relació entre aquesta alteració i mutacions en el gen de la fibrosi quística, localitzada normalment en una sola de les còpies (Anguiano et al., 1992; Casals et al., 1995; Chillón et al., 1995).

**Infeccions de l'aparell genital.** La valoració d'una infecció de l'aparell genital és difícil. Normalment, al semen ja es troben leucòcits. Si es troben, però, en una concentració superior a un milió de leucòcits/mL, i són neutròfils, poden indicar una possible infecció. Aquesta dada, però, no és sempre indicativa d'una infecció. Altres indicatius d'infecció són una concentració espermàtica normal amb una mobilitat reduïda com única alteració, o bé un augment de l'aglutinació del semen.

Si es tracta d'una infecció aguda, es poden arribar a produir lesions testiculars importants, obstruir l'epidídim o inclús causar un bloqueig de l'espermatogènesi.

Segons Vanrell, els agents infecciosos més comuns són (Vanrell, 1992):

- a) Bacteris, com *E. coli*, *Proteus mirabilis* i *P. morgagni*, *N. gonorrhoeae*, *K. pneumoniae*, *Pseudomonas*.
- b) Altres, com *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma*

*hominis*, Virus d'herpes simple i citomegalovirus, *Trichomonas vaginalis*.

D'aquesta llista, els més freqüents a les parelles estèrils són *C. trachomatis* i *M. hominis* (Samra et al., 1994).

**Dèficit de secreció de gonadotrofines.** Un dèficit aïllat en la secreció de gonadotrofines pot ser congènit o adquirit. Els dèficit adquirits poden ser conseqüència de qualsevol afecció que destrueixi la funció de la hipòfisi anterior (com ara un tumor hipofisari). El tractament sol ser l'administració de les hormones principals deficitàries (FSH i LH).

**Síndrome de Klinefelter.** Aquests pacients poden aparèixer en diversos graus de mosaïcisme, sent el més habitual la trisomia 47 XXY. Donat aquesta variabilitat, no sempre tenen els mateixos signes clínics, però acostumen a ser diagnosticats com azoospermics i amb anomalies de la funció sexual.

**Altres alteracions cromosòmiques.** Existeixen altres tipus d'alteracions cromosòmiques, ja sigui dels cromosomes sexuals o dels autosòmics, que poden conduir a una infertilitat total o parcial (Taniuchi et al., 1991; De Braekeleer and Dao, 1991). En aquests casos, la infertilitat pot originar-se de diferents maneres.

- 1) Per bloqueig del procés meiótic conduint a oligospermia o azoospermia. Té el seu origen en: anomalies sinàptiques (alteracions de l'aparellament de cromosomes homòlegs), sobre tot de tipus asinàptic i desinàptic (Navarro et al., 1990; Templado et al., 1990); o blocatges meiótics de causa desconeguda, no associats a anomalies cromosòmiques (Egozcue et al., 2005).
- 2) Donant lloc a gàmetes inviàbles.
- 3) Formant gàmetes viàbles que donen lloc a zigots desequilibrats (avortaments, anomalies congènites, etc)

**Aplàsia i bloqueig de les cèl·lules germinals.** Aquesta alteració es troba a un 10% dels individus fèrtils. A l'ejaculat trobem azoospermia o oligospermia greu, encara que els pacients no presenten trastorns de la funció sexual ni del desenvolupament. Aquests trastorns no tenen una distribució uniforme per tot el testicle. Si es fa una biòpsia, es poden observar túbuls només tapissats per cèl·lules de Sertoli, al costat d'altres en els quals l'espermato-genèsi es desenvolupa normalment. Així, en casos d'oligospermia greu encara es podria assolir l'embaràs.



En principi, no hi ha cap tractament disponible per a aquests malalts, a no ser que el bloqueig sigui provocat indirectament per un altre tipus d'afecció (infeccions genitals, alteracions del sistema hormonal, ...).

### *Factors immunològics.*

S'han detectat, al sèrum d'alguns homes, anticossos contra els espermatozoides (Tsatsoulis and Shalet, 1991; Rousseaux-Prevost et al., 1992). Aquesta autoimmunitat pot ser conseqüència d'un trastorn de la barrera hematotesticular, que presentarà al sistema immunitari els possibles antigens presents als espermatozoides. Un cop generats, els anticossos poden donar lloc a l'aglutinació dels espermatozoides, tot i que aquesta aglutinació no acostuma a ser total. Així, l'autoimmunitat no pot assegurar una esterilitat total del pacient, però sí actuar com un factor de risc.

També s'han detectat anticossos contra espermatozoides al tracte reproductor femení (heteroimmunitat). La presència d'aquests anticossos pot ser més crítica a l'hora de permetre la fertilitat de la parella. L'heteroimmunitat pot destruir els gàmetes, pot inhibir el transport del semen a través de l'aparell reproductor de la dona, pot inhibir la interacció entre gàmetes i, fins i tot, impedir la implantació de l'embrió (Mahony and Alexander, 1991; Marshburn and Kutteh, 1994). Gràcies a la fecundació *in vitro*, on no s'utilitza sèrum dels pacients, aquest problema té fàcil solució.

Aquests factors immunològics s'han trobat en un 5-17% de les parelles infèrtils, i en més d'un 40% de les parelles d'infertilitat inexplicada (Jaffe and Jewelewicz, 1991).

### *Factors genètics.*

Estudis recents suggereixen que la infertilitat masculina té un important component genètic (Meschede et al., 2000). Els aspectes genètics de la infertilitat masculina es van descobrir després de l'establiment dels protocols de fecundació *in vitro* (FIV) amb espermatozoides aïllats d'homes amb azoospermia no obstructiva idiopàtica o oligozoospermia severa. L'estudi cromosòmic d'aquests pacients va mostrar una elevada incidència de defectes genètics transmissibles a les noves generacions. Aquests defectes podrien ser la causa de la infertilitat, a més d'alterar altres funcions somàtiques. Malgrat tot, el coneixement d'aquests gens és molt pobre. Se sap que hi ha uns 1000 gens responsables de regular la fertilitat (Kupker et al., 1999). Una simple mutació en un d'aquests gens pot provocar problemes de fertilitat, però també s'ha de tenir en compte que el desenvolupament de la línia germina, de la gònada masculina, i de les

característiques somàtiques masculines està regulat per interaccions complexes entre molts gens (Kupker et al., 1999). Així, tot i que es coneix la importància dels factors genètics en la infertilitat, encara no es troba ben establert el mecanisme exacte darrera d'aquest problema més enllà d'alguns pocs gens (per exemple, els gens AZF, responsables d'azoospermia (Krausz and Degl'Innocenti, 2006).

### *Factors externs.*

Existeix tota una sèrie de factors que afecten a la fertilitat humana i que tenen un origen extern. Aquests factors s'anomenen *gonadotoxines*, ja que tenen un efecte tòxic o supressor sobre la producció, motilitat o morfologia dels espermatozoides. Normalment, són d'efecte reversible, sobre tot si s'identifica el tòxic i es deixa d'estar exposat (Thompson, 1994).

Els factors externs més estudiats són:

**Tabac.** La nicotina i la cotinina (metabòlit de la nicotina) estan presents al mucus cervical de les dones fumadores i semblen ser tòxics pels espermatozoides (Phipps et al., 1987). Als homes, hi ha estudis que demostren que els homes fumadors tenen pitjor densitat, morfologia i motilitat (Stillman et al., 1986; Marshburn et al., 1989; Oates, 1991; Reina Bouvet et al., 2007). Estudis recents, a més, han trobat una major incidència de mutacions i dany en el DNA en homes fumadors (Yauk et al. 2007; DeMarini, 2004) i una menor concentració d'espermatozoides en homes fumadors respecte a no fumadors (Richthoff et al., 2007).

**Drogues.** S'han realitzat estudis en humans que demostren que es dona una disminució temporal del comptatge espermàtic mentre s'estan consumint determinades drogues. Una possible explicació relaciona determinats components psicoactius de les drogues amb les gonadotrofines. Es produiria una modificació del control hormonal sobre la reproducció, alterant el ritme normal., aquest ritme es restabliria al aturar-se el consum (Smith and Asch, 1987). Si ens centrem en la cocaïna (una de les drogues més comuns), treballs recents han demostrat un increment de l'activitat de la caspasa 3 a les cèl·lules germinals masculines de rata (Yang et al. 2006). A més, un consum crònic de cocaïna provoca una disminució de l'espermatogènesi i de les taxes de fecundació en rates (George et al., 1996). Així, el consum de drogues podria provocar oligospermia o, fins i tot, azoospermia en dosis prolongades.

**Alcohol.** A l'home, l'alcohol sembla afectar la síntesi testicular i la secreció de testosterona. Això pot resultar en una disfunció sexual i anormalitats en la morfologia espermàtica. L'alcoholisme crònic pot donar lloc a una impotència permanent (Kucheria et al., 1985; Nagy et al., 1986; Smith and Asch, 1987; Emanuele and Emanuele, 1997).

**Fenòmens ambientals.** S'ha descrit que determinats factors de l'ambient (ja sigui natural o artificial) poden afectar a la fertilitat. Factors com calor ambiental, vibracions, radiació ionitzant i nombrosos productes químics han estat associats amb alteracions en la morfologia dels espermatozoides i reducció de la producció espermàtica (Mueller et al., 1990).

Dins d'aquest grup hauríem d'incloure la infertilitat temporal de pacients que estan rebent tractaments anti-cancerígens (fàrmacs o radiació) (Rowley, 1974; Neumann, 1984; Parvinen et al., 1984).

**Infertilitat inexplicada.** En un 10% dels casos, la infertilitat de la parella no pot explicar-se per cap causa coneguda (Crazzolaro et al., 2007).

Per fer un diagnòstic d'infertilitat inexplicada s'han de complir tota una sèrie de requisits (Jaffe and Jewelewicz, 1991).

- Infertilitat durant 2 anys mínim.
- Historial i examen físic normal.
- Freqüència coital adequada.
- Tres anàlisis de semen normal.
- Cicles menstruals mensuals regulars.
- Mucus cervical i PCT (test postcoital) normals.
- Nivells corrents de LH, FSH, prolactina, testosterona i progesterona

Si es donen tots aquests requisits, podem parlar d'infertilitat inexplicada. En aquest punt, es continua la investigació, utilitzant altres tècniques que puguin ampliar la informació: estudis bacteriològics, proves immunològiques o estudis de penetració del semen, entre d'altres. Gràcies a aquestes dades addicionals, els casos de infertilitat inexplicada es redueixen considerablement; en un 40% dels casos, per exemple, el problema és d'origen immunològic.

Tot i això, encara queda un percentatge (8-10% del total de parelles infèrtils) on no es té

cap explicació per a la seva infertilitat. Per tant, la investigació sobre la infertilitat humana encara té moltes coses a dir, i nous enfoc (com les actuals tècniques proteòmiques) ens ajudaran a trobar explicació a aquestes “infertilitats desconegudes”.

## 1.3.- Proteòmica.

### 1.3.1.- Definició.

L'anàlisi proteòmic és una mesura directa de les proteïnes en termes de la seva presència i la seva abundància relativa (Wilkins et al., 1995). L'objectiu principal d'un estudi proteòmic és la identificació de les proteïnes pertanyents a una xarxa complexa de regulació cel·lular.

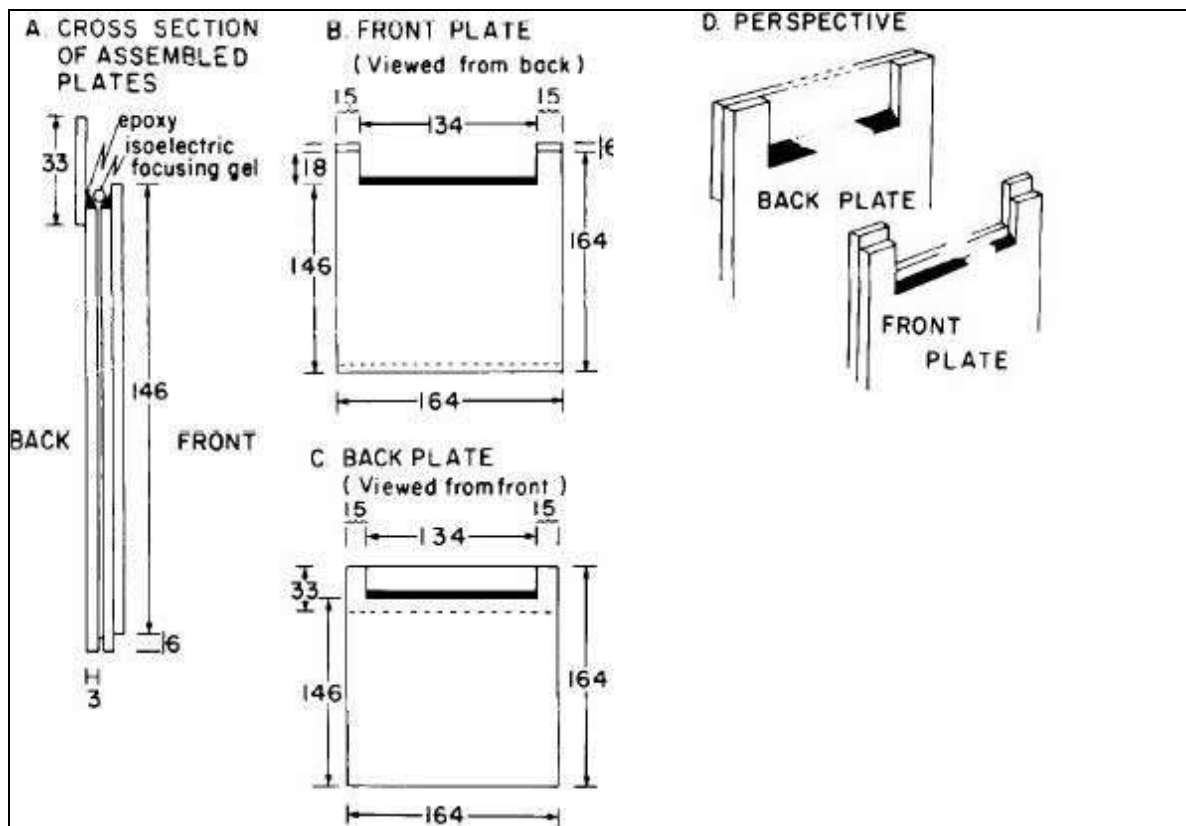
L'anàlisi proteòmic es necessita per determinar quines proteïnes han canviat el seu patró d'expressió, com d'intens ha sigut el canvi i qualsevol altre modificació post-transcripcional que ocorre. Dos o més estats d'una cèl·lula (per exemple, teixit sa *versus* teixit malalt) poden ser comparats i els canvis específics (qualitatius i quantitius) detectats.

Un dels reptes més apassionants de l'anàlisi proteòmic es el fraccionament reproduïble d'aquestes barreges proteiques complexes, mantenint les seves relacions qualitatives i quantitatives. Ara mateix, l'electroforesi bidimensional amb gels de poliacrilamida (2D-PAGE) és l'únic mètode que ho pot fer (Cutler et al., 1999; Fegatella et al., 1999; Görg et al., 2000). Una única electroforesi és capaç de resoldre sobre les 1800 proteïnes (Choe and Lee, 2000; Martínez-Heredia et al., 2006). A més, és l'eina principal quan es necessiten separacions proteiques per múltiples treballs: permet l'anàlisi simultani de centenars a milers de productes gènics. En combinació amb l'estudi d'imatges assistit per ordinador (per l'estudi de proteomes sencers, buscant canvis quantitius o qualitatius), aquesta tècnica electroforètica permet la classificació i comparació de dades entre grups diferents d'investigadors.

### 1.3.2.- Història i evolució.

El nom "proteoma" va ser emprat per primera vegada per Marc Wilkins al 1995 (Wilkins et al., 1995), i va ser definit com "el complement proteic del genoma". Pocs anys després, a l'estudi del proteoma se'l va conèixer com a "proteòmica".

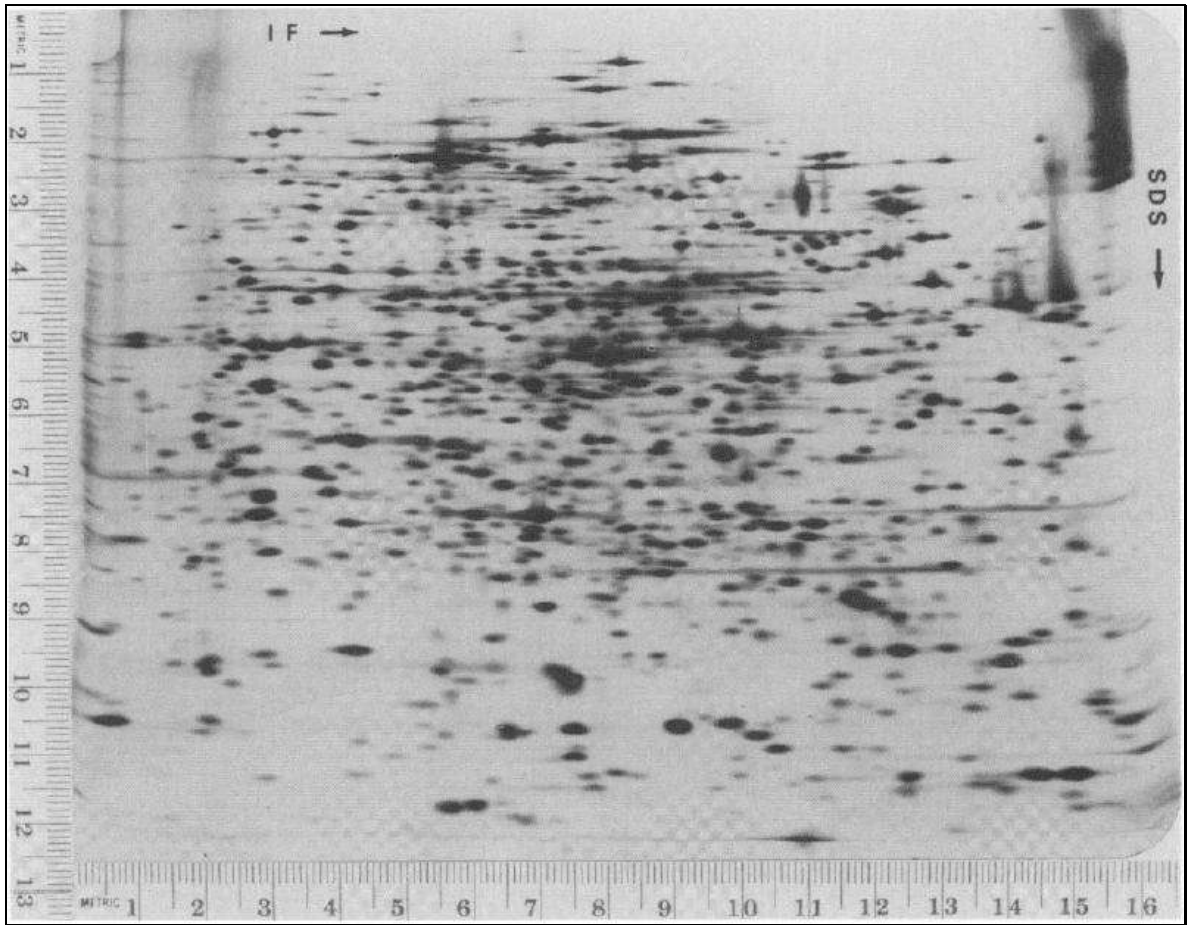
El germen d'aquesta nova tecnologia es troba a la separació electroforètica en dos dimensions, desenvolupada a mitjans de la dècada dels '70 (Scheele, 1975; Klose, 1975; O'Farrell, 1975).



**Fig 1.7** Esquema del muntatge dels vidres a 1975. La mecànica bàsica continua sent la mateixa: dos vidres de diferent tamany, amb un espai interior variable (entre 0,5 i 1,5 mm, normalment) on gelifica l'acrilamida. *Extret de O'Farrell, 1975.*

Aquesta tecnologia va sorgir per la necessitat d'analitzar sistemes més complexos que els bacteriòfags que analitzats prèviament (Laemmli, 1970; O'Farrell et al., 1973). La tecnologia prèvia (electroforesis d'una dimensió) servia per a analitzar sistemes simples (fins a un centenar de proteïnes). Aquest enfoc, combinat amb l'anàlisi genètic, havia donat molta informació sobre la morfogènesi i la regulació genètica del bacteriòfag. No obstant això, per a l'anàlisi de sistemes més complexos no es podia extreure informació rellevant a no ser que es limités molt el sistema d'estudi. Per a això es va desenvolupar el sistema actual de 2D, on la primera dimensió es una separació pel punt isoelèctric i la segona pel pes molecular. Per separat, aquestes tècniques resoldrien fins a 70 i 100 proteïnes respectivament (d'*E.coli* (O'Farrell, 1975)); així, combinades haurien de resoldre fins a 7000, tot i que l'usual és trobar de l'ordre de 1000 punts diferents

(O'Farrell, 1975; Martínez-Heredia et al., 2006). Encara que no s'arriba al límit teòric, aquest increment (d'un ordre de magnitud) va suposar una revolució.



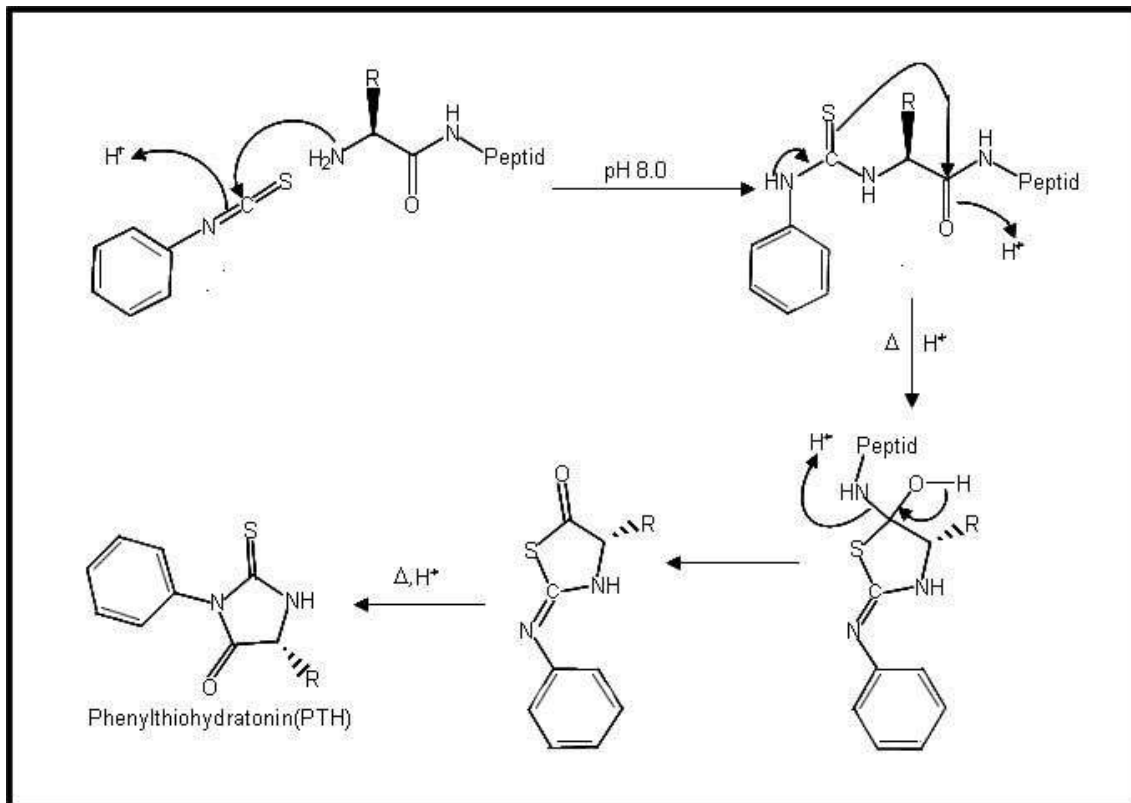
**Fig 1.8.** Separació electroforètica de les proteïnes de *E.coli*, de fa 30 anys. Extret de O'Farrell, 1975.

Ja als primers treballs va sorgir la idea de tenir una base de dades de totes les proteïnes que es podien identificar, com al “Human Protein Index” (Anderson and Anderson, 1982), i aplicar estratègies reverses, tal com les que s'estaven aplicant a la tecnologia de microarrays.

Així, moltes de les eines emprades avui dia es van desenvolupar llavors, en el context de les 2D-PAGE. No obstant, no es van aplicar als '80, donat sobre tot el fet que la 2DE és, sobre tot, una tècnica descriptiva, que no proporciona la identitat de les proteïnes separades.

Per poder assolir la identificació de les proteïnes, es haver de desenvolupar tota una nova tecnologia, l'espectrometria de masses; o, com a mínim, es va millorar per tal de poder respondre a la demanda. Abans de l'espectrometria de masses, la tècnica clàssica d'identificació era la seqüenciació d'Edman (Edman, 1950). Aquesta tècnica consisteix

en la unió d'un compost químic (el fenilisotiocianat) a l'extrem N-terminal (Fig 1.9). Aquesta unió modifica el reactiu i permet la seva excisió del polipèptid, identificant posteriorment l'aa mitjançant una cromatografia o una electroforesis. Aquest cicle es repeteix fins a tenir la seqüència completa del polipèptid, que no pot ser més gran de 50-60 aa, ja que la tècnica no és 100% eficient. No obstant, pèptids d'uns 30 aa són seqüenciats amb un 98% d'eficiència. A la figura 9, es pot veure un resum de les reaccions químiques del procés.



**Fig 1.9** Reaccions químiques de la Degradació d'Edman.

Així, tot i que aquesta tècnica estava plenament desenvolupada, era fiable i estava automatitzada, era massa lenta (1 hora per aa analitzat) i no servia per a proteïnes de gran tamany. Per tal de resoldre aquest problema, i gràcies a l'augment de les bases de dades de proteïnes i seqüències peptídiques, un nou enfoc va agafar força: potser no caldria seqüenciar **sempre** de nou la proteïna d'interès. Una cerca acurada a les bases de dades ens donaria una identificació positiva. I amb el projecte genoma en marxa, es va tenir en poc temps una base de dades molt important a nivell genòmic, que es podia utilitzar per a cerques peptídiques traduint la seqüència.



A més, gràcies a l'espectrometria de masses, s'obtenen mesures molt precises de la massa d'un pèptid. La mesura de la massa o, més aviat, de la relació massa/càrrega ( $m/z$ ) d'una molècula carregada es el que s'obté gràcies a l'espectrometria. Però poques molècules tenen càrrega elles mateixes, i han de ser ionitzades. Les proteïnes, com altres molècules d'elevat pes molecular, són difícils d'ionitzar sense ser destruïdes durant el procés.

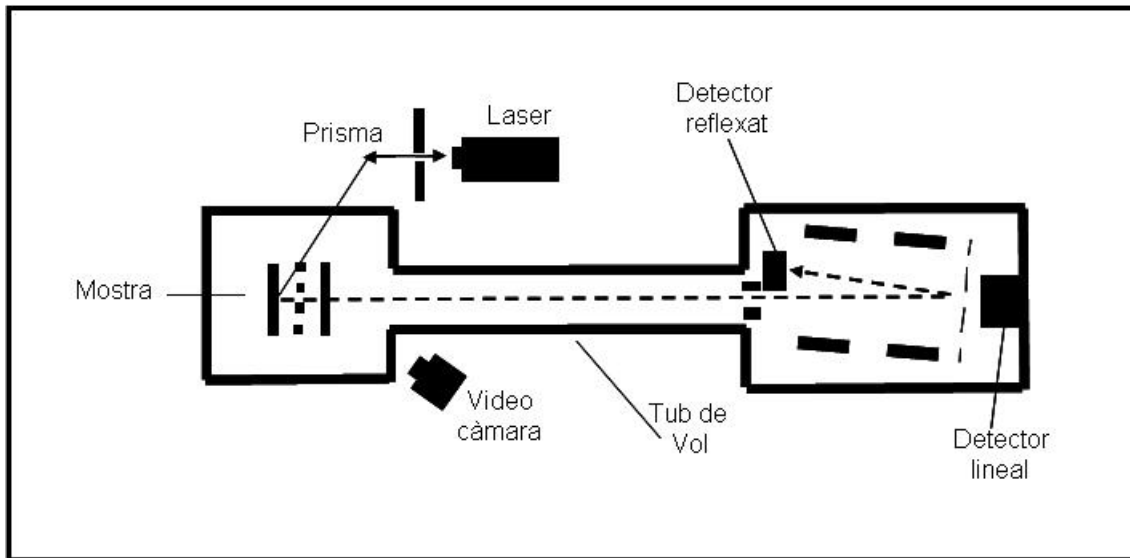
El procés d'ionització emprat als 80 s'anomena ionització per bombardejament ràpid d'àtoms (FAB o Fast Atom Bombardment), i consisteix en bombardejar amb àtoms ràpids (Ar o Xe de 3-8 keV) o ions ràpids ( $Cs^+$  per sobre de 35 keV) la mostra. Un cop està ionitzada, es passa a través d'un analitzador de masses. Es necessita força material per a obtenir una ionització correcta, i aquesta es una ionització força agressiva.

A finals dels '80, per tal de millorar els mètodes previs, es van desenvolupar dos mètodes nous més suaus, que permetien ionitzar les mostres sense danyar-les massa. Aquests mètodes són la ionització per electroesprai (Electro Spray Ionization, ESI) (Fenn et al., 1989) i l'espectroscòpia de massa amb ionització assistida per matriu mitjançant un laser (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization, MALDI) (Tanaka et al., 1988). L'èxit que van tenir va propiciar l'aparició comercial d'aparells per a l'anàlisi de masses, que van penetrar ràpidament a la comunitat científica.

De totes maneres, el que permeten aquestes tecnologies no és més que ionitzar la mostra. Es necessita un analitzador per tal de poder mesurar la massa acuradament. El MALDI se sol trobar associat a un analitzador tipus TOF (Time Of Flight), mentre que l'ESI té més diversitat d'analitzadors i s'utilitza en conjunt amb una trampa iònica, un TOF o un triple quadrupol.

El sistema MALDI TOF detecta la relació massa/càrrega de la manera següent: a la sortida de la font d'ionització els ions són accelerats en un camp elèctric (ca. 20 kV) i conduïts a una zona de deriva lliure de camps. Aquest voltatge d'acceleració proporciona a tots els ions la mateixa energia cinètica i, per tant, diferents velocitats en funció de les seves relacions massa-càrrega. Els ions més lleugers viatjaran a una velocitat superior al llarg de la zona de deriva i arribaran abans al detector, el qual registra els "temps de vol" dels diferents ions. A partir dels temps de vol poden derivar-se les relacions massa-càrrega dels ions. Aquesta massa dels ions (pèptids)

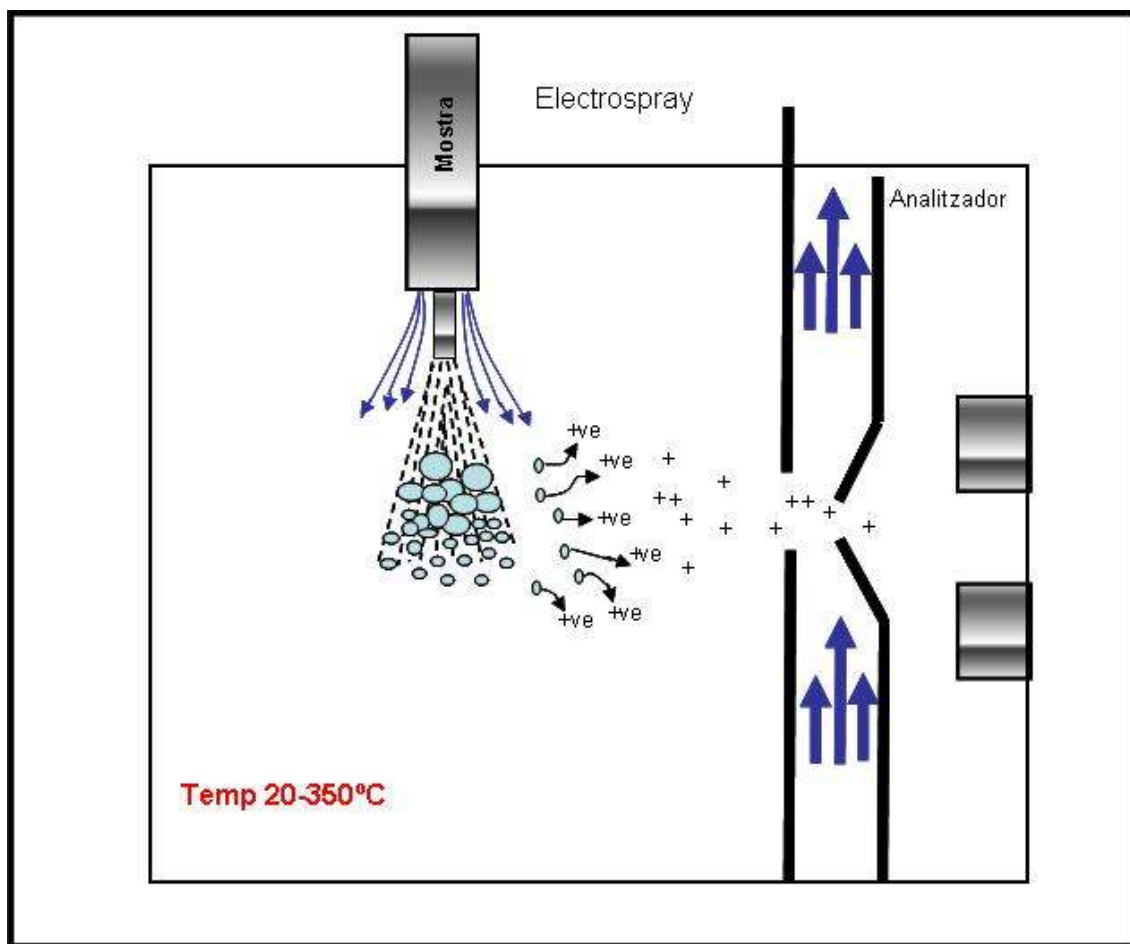
s'introdueixen a les bases de dades i ens proporcionen una identificació positiva de la proteïna.



**Fig 1.10** Esquema d'un MALDI-TOF. A l'esquerra de la imatge es pot veure el làser que incideix a la mostra, ionitzant-la. Aquests ions passen a través del túnel i el temps que triguen (el seu temps de vol) és calculat en quant són detectats pel reflector.

Per altra banda, el sistema ESI es basa en la generació, a partir de la solució on està dissolta la mostra, d'un núvol ("spray") format per petites gotes carregades elèctricament. Aquest esprai es sotmès a l'acció d'un fort camp elèctric, que ionitzarà la mostra. Aquest ions poden ser captats per una trampa iònica o analitzats amb un triple quadrupol. En una trampa iònica es busca un rang de pes en concret. L'aplicació del camp elèctric (i canvis continus de polaritat) ens mantenen estables els ions. A mesura que augmenta el voltatge, els ions es desestabilitzen i van sortint de la trampa, fins que ens quedem amb l'ió d'interès. Aquest ió es trenca per un augment del voltatge excitador de ressonància. Un cop trenca, els ions fills surten de la trampa (novament, per un increment del voltatge) i són detectats, podent determinar així la seva relació massa/càrrega  $i$ , després de l'anàlisi pertinent, la seva seqüència. En un triple quadrupol la estratègia es semblant, amb el primer quadrupol actuant com a filtre i el segon i el tercer trencant i separant els ions resultants.

Així, aconseguim trobar la seqüència ( $i$ , per tant, identifiquem) una nova proteïna. Aquest, però, no és la principal funció del ESI-LCQ, si no detalls tals com trobar punts de fosforilació o quantificar la proteïna.



**Fig 1.11** Esquema d'un analitzador de masses tipus ESI. S'observa com la mostra passa a fase gasosa en forma d'esprai, i com els ions són captats per l'analitzador, que ens dirà la seva massa.

Un cop es tenia disponible aquesta tecnologia, es necessitava l'elaboració de cerques exactes a les bases de dades. A 1993, cinc publicacions independents van descriure la implementació d'uns algorismes que permetien fer aquestes cerques (Henzel et al., 1993; Mann et al., 1993; Pappin et al., 1993; James et al., 1993; Yates et al., 1993). Aquests algorismes, juntament amb l'espectrometria de masses, van constituir un mètode d'identificació proteica anomenat "emprentes peptídiques" (o *peptide mass fingerprinting*). La mecànica es força simple: la proteïna a analitzar (separada per 2D, HPLC o altres) és tripsinitzada. Els pèptids resultants són analitzats per espectrometria de masses, i el resultat es compara amb les bases de dades de proteïnes tripsinitzades. La proteïna amb més pèptids concordants serà (amb valor estadístic) la proteïna que s'estava buscant.

A partir d'aquest punt, la tecnologia no ha fet més que millorar, però, bàsicament, amb el mateix enfoc que fa 15 anys.

### 1.3.3.-Tincions clàssiques.

La tinció clàssica emprada (i utilitzada encara avui dia en nombrosos treballs) és la tinció amb plata. Aquesta tinció es basa en el mètode desenvolupat per Switzer (Switzer et al., 1979). En aquest mètode (i en totes les variants que van sorgir després), la tinció s'assoleix pel canvi de plata iònica a plata metàl·lica. En els protocols que utilitzen un enfoc fotogràfic (com el de Blum), el nitrat de plata reacciona amb la proteïna en condicions àcides. La reducció de la plata ocorre per la oxidació del formaldehid en condicions alcalines. El carbonat sòdic (o una altre base) tampona el àcid fòrmic produït per la oxidació del formaldehid, de tal manera que la reacció de reducció de la plata pot continuar fins que apareguin els punts al gel.

Utilitzant el mètode de Switzer com a base, diversos protocols es van dissenyar per tal de millorar-lo. De tots, el mètode desenvolupat per Blum (Blum et al., 1987) s'ha demostrat, amb el temps, com un dels mètodes més fiables per tal de quantificar proteïnes i poder realitzar estudis proteòmics (tals com l'anàlisi per MS de les proteïnes) (Winkler et al., 2007).

El mètode de Blum està format per diversos passos: un primer pas de fixació de les proteïnes al gel, seguit d'un pretractament de les proteïnes per afavorir la tinció. Després bé la tinció pròpiament dita, seguida del velat necessari per a revelar la tinció. Tot el procés dura, aproximadament, unes 3 hores.

La sensibilitat de la tinció argèntica ens permet detectar fins a 100 vegades més que una tinció amb Comassie (1 ng de límit inferior de detecció); no obstant aquest increment de sensibilitat, un dels principals problemes de la tinció de plata és que no té punt final, a no ser que s'aturi la reacció de manera externa. A més, només es semi-quantitativa, fet que dificulta el poder realitzar segons quin tipus d'anàlisi.

Tenint en compte, però, tan les avantatges com els inconvenients, la tinció de plata s'ha utilitzat de manera pràcticament universal per a la tinció de gels de poliacrilamida, per a la detecció de proteïnes i d'àcids nucleics.

### 1.3.4.-Tècniques actuals.

Actualment, encara s'utilitzen aquests enfoc per a identificar el proteoma de l'objecte d'estudi, tot i que s'han perfeccionat per a poder aconseguir millors resultats. Així, la tinció en les 2D ja no es per Comassie o plata, si no que existeixen tincions fluorescents

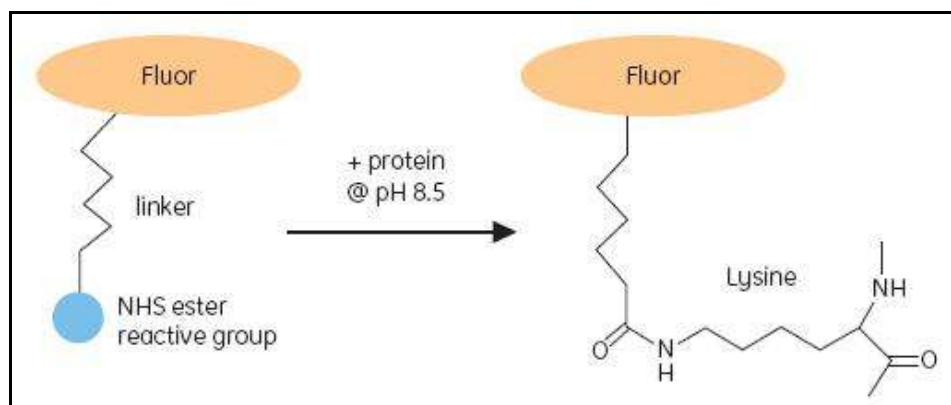
(com el sistema DIGE o el Pink Flamingo) amb una sensibilitat superior, que permeten treballar amb menor quantitat de mostra. A més, els sistemes de detecció de masses també s'han millorat (així, tenim el MALDI-TOF-TOF, o nanoESI), permetent identificar les petites quantitats que les millores en les 2D ens permeten separar.

També s'han posat a punt altres tècniques de separació/fraccionament de la mostra, com la cromatografia associada a un ionitzador, la tecnologia ICAT (Isotope-Coded Affinity Tag) i, en general, tot el que es coneix com a “shotgun proteomics”. A més dels anomenats “protein chips” (per analogia amb els DNACHIPS), i d'altres aplicacions per a analitzar la mostra, com el FT-ICR (Fourier Transform-Ion Cyclotron Resonance) (Maurya et al. 2007; Hellstrom et al., 2007). No obstant, en aquesta introducció ens centrarem únicament en les tècniques que han tingut rellevància per a la realització dels experiments descrits.

### 1.3.4.1- Tinció amb 2D-DIGE

La tecnologia de 2D-DIGE (two dimensional difference gel electrophoresis) és una poderosa eina per separar barreges complexes de proteïnes segons la seva càrrega i tamany, visualitzant en un mateix gel fins a 3 mostres diferents. A més, la possibilitat d'utilitzar el mateix estàndard intern en tots els gels de l'experiment redueix la variació gel a gel, augmentant la fiabilitat i la reproduïbilitat dels gels. (Gorg, 2004)

El sistema es basa en les propietats específiques dels marcadors fluorescents “CyDye DIGE”. Aquests marcadors s'utilitzen per marcar una mostra de manera mínima, marcant només una lisina de cada molècula. Si ho mirem a nivell molecular, veurem que els marcadors s'uneixen covalentment amb el grup amino èpsilon de les lisines, amb una unió tipus amida.



**Fig 1.12** Esquema de marcatge amb Dyes. El fluoròfor s'uneix a la proteïna a través d'una lisina, mitjançant el grup reactiu del que disposen. *Extret de Gorg, 2004.*

Els marcadors, a l'unir-se covalentment a la proteïna, afegixen la seva massa a la massa total de la proteïna. No obstant, la massa del marcador es mínima comparada amb la massa total de la proteïna. Es pot concloure, doncs, que el marcatge fluorescent no afecta al patró bidimensional de la mostra.

En una de les varietats de marcatge més habituals, la relació marcador/proteïna usada garanteix que només es marquen un 1-2% dels residus de lisina, per tant cada proteïna marcada només té un marcador fluorescent i es visualitza com un únic punt al gel.

La sensibilitat del marcatge ens permet detectar fins a 25 pg de proteïna, arribant fins a cinc ordres de magnitud superiors en una relació lineal. Com a dada addicional, la sensibilitat de la plata ens permet detectar d'un a 60 ng de proteïna, amb un rang dinàmic de menys de dos ordres de magnitud.

Per tot això, la tecnologia DIGE és de molta utilitat a l'hora de programar experiments que necessitin comparar patrons proteics de diferents mostres.

#### 1.3.4.2- Tinció amb "Flamingo Stain"

Les tincions fluorescentes es basen en l'habilitat dels fluorocroms d'unir-se a les proteïnes de manera inespecífica i canviant les seves propietats espectrals. A més, tenen un rang dinàmic elevat i una sensibilitat molt alta en comparació a mètodes clàssics com la tinció argèntica. Per tot això, s'utilitzen molt en aplicacions proteòmiques, com la utilització del Sypro Ruby o d'altres.

La tinció amb Flamingo es basa en la unió del marcador a la proteïna desnaturalitzada d'un gel de SDS. Així, en incidir una llum de baixa longitud d'ona, el marcador s'excita, donant un increment de senyal lluminós, detectable amb els filtres adequats. A més, aquesta senyal augmenta a mesura que augmenta la quantitat de proteïna del gel, fet que ens permet utilitzar aquesta tinció per a quantificar la proteïna d'interès del gel (Manual d'Instruccions de Flamingo, n° referència 161-0490).

A més, la tinció amb Flamingo s'ha demostrat que es compatible amb el sistema MALDI i les tecnologies relacionades amb la empremta peptídica, tenint més sensibilitat que sistemes previs, com el Sypro Rubi.