

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

Per Juan Martínez Heredia



5.- Discussió.

5.- Discussió.

5.1.- Preparació d'espermatozoides mitjançant centrifugació en gradient de Percoll i obtenció i purificació de caps per tal de procedir a l'extracció de les proteïnes nuclears i altres anàlisis.

5.1.1.- Preparació d'espermatozoides mitjançant centrifugació en gradient de Percoll.

Com ja s'ha explicat prèviament, el gradient de Percoll es el primer pas comú per a tots els experiments. Es realitza un gradient amb només un coixí de Percoll (al 50%) per que l'objectiu principal es estudiar la població total d'espermatozoides, i no només poblacions enriquides en un determinat tipus cel·lular. Existeixen estudis previs on analitzen espermatozoides aïllats en diferents interfases després d'un gradient de Percoll (al 50, 70 i 90%, normalment) (Mengual, 2003; Mengual et al., 2003). Aquests estudis han servit per a estudiar subpoblacions específiques d'espermatozoides separats en un gradient, i diferenciats per mobilitat a la part baixa del gradient. La nostra intenció, però, era estudiar la població sencera provinent d'un ejaculat, incloent-hi formes anòmales. Per poder realitzar això, no es podia fraccionar la mostra, però tampoc es podia treballar directament amb l'ejaculat. Per tal de prevenir la presència de cèl·lules rodones a la mostra (cèl·lules diploides, sense haver fet la transició nucleo-histona) i per tal d'eliminar el fluït seminal es va posar a punt el gradient de Percoll al 50%. Aquesta concentració és suficient per a evitar la presència de cèl·lules més grans que un espermatozoide al sediment.

Així, després del gradient de Percoll, s'obtenen espermatozoides altament purificats, útils per a realitzar estudis proteòmics, donat que la contaminació per a altres tipus cel·lulars és mínima o nul·la. Els resultats assolits permeten realitzar estudis proteòmics a on de la informació derivada després de l'estudi d'aquests espermatozoides provindrà dels espermatozoides, i no d'altres tipus cel·lulars.

5.1.2.- Obtenció i purificació de caps per tal de procedir a l'extracció de les proteïnes nuclears i altres anàlisis.

Mètode físic mitjançant sonicació.

La decapitació utilitzant el mètode descrit per Van Blerkom (Van Blerkom et al., 1995) consisteix en sonicar la mostra de tal manera que les vibracions sòniques trenquin la unió entre cap i cua. Per tal de trobar quin temps de sonicació era el més correcte, es van realitzar tota una sèrie de proves (Taula 4.1). Tot i que 4 minuts de sonicació ens asseguraven una taxa de decapitació pràcticament total, també es veritat que les cues quedaven trencades en trossos molt petits que dificultaven després la separació de caps i cues. Així, es va decidir que 90 segons de sonicació serien suficients per a assolir una taxa de decapitació raonable. A més, es va dividir en dos tandes de 45 segons cadascuna, separades per 30 segons en gel, per tal de no escalfar massa la mostra i no produir danys a nivell proteic.

No obstant els bons valor mitjos, la tècnica era molt variable, tenint purificacions entre el 80 i el 95% degut sobre tot a les diferències entre mostres (viscositat, concentració, etc), a més de diferents graus de contaminació per restes de les cues. Aquest fet va desaconsellar la seva utilització com a eina per a trobar el proteoma del nucli de l'espermatozoide humà, degut a que no es podria estar segur de si el proteoma que s'observaria seria degut només al nucli o a contaminacions procedents de les cues.

A més, sempre quedava una petita proporció d'espermatozoides amb cua a les mostres, independentment del temps de sonicació.

Mètode químic mitjançant detergents.

Un mètode alternatiu desenvolupat consistia en l'afebliment químic de les estructures de membrana, per tal de separar la cua del cap. L'afebliment de les estructures de membrana s'aconsegueix incubant la mostra amb detergents, i deixant el temps suficient perquè aquests actuïn. El principal problema que planteja aquest mètode és que depèn molt del tipus de mostra, com s'observa a la Taula 4.2. A més, en condicions normals es triga en decapitar la pràctica totalitat de la mostra de 10 a 60 minuts. Comparat amb els 90 segons que es necessiten si s'utilitzava la sonicació, es va decidir deixar aquest mètode com a poc viable.

Caracterització de proteïnes nuclears extretes de gels monodimensionals àcids.

Després de decapitar els caps (per qualsevol dels dos mètodes previs), es van extreure les proteïnes dels nuclis purificats i es van córrer en gels de poliacrilamida àcids (ja que en un gel normal de SDS les protamines, per exemple, no es poden separar), i volíem poder caracteritzar el màxim de proteïnes diferents. Es va utilitzar, a més, un gel de 17 cm d'ample i 20 cm de llargada, per tal de tenir un elevat nivell resolutiu.

En aquest aspecte, els gels van ser tot un èxit, permetent la separació d'unes 25 bandes independents (Fig 4.4).

No obstant això, a l'hora d'utilitzar aquests gels per a poder identificar el proteoma del nucli de l'espermatozoide humà, aquest enfoc va resultar no ser tan profitós com s'esperava. A l'hora de retallar bandes per tal d'identificar-les es va demostrar que moltes d'elles eren isoformes de la mateixa proteïna.

De 23 bandes retallades, només es van identificar tres proteïnes diferents: el precursor de la P2, i les formes precursoras de la SEMG1 i 2. La presència de tantes formes precursoras al llarg d'un gel àcid (que no discrimina per pes, si no per càrrega), ens indica, segurament, que aquestes proteïnes tenen un processat en diversos passos, i que pateixen diverses modificacions post-translacionals.

Addicionalment, una altra possible explicació per a l'enorme abundància de semenogelina podria ser la redistribució d'aquesta proteïna extracel·lular durant el procés de preparació i aïllament de caps.

Així, els gels monodimensionals no es van permetre identificar prou proteïnes com per a començar a descriure el proteoma del nucli humà, així que es va abandonar aquest enfoc i ens vam centrar en els gels bidimensionals, amb un poder resolutiu molt més gran.

5.2.- Descripció del proteoma total de l'espermatozoide humà mitjançant 2D i identificació de les proteïnes utilitzant la tecnologia MALDI-TOF.

Per tal de descriure el proteoma de l'espermatozoide humà, es van utilitzar gels bidimensionals, amb un poder resolutiu teòric de 7000 punts (O'Farrell, 1975), molt superior a la capacitat resolutiva d'un gel monodimensional. Gràcies a aquests tipus de gel, i utilitzant les tècniques ja descrites, s'han pogut identificar 98 proteïnes com a part del treball experimental d'aquesta tesi (Martínez-Heredia et al., 2006).

Es va utilitzar un gel 2D assolit amb una primera dimensió per IEF (rang de pH de 5 a 8) seguida d'un gel de SDS amb un 12% d'acrilamida. En aquestes condicions es van poder identificar 98 proteïnes, corresponents a les proteïnes més abundants i reconeixibles en un gel bidimensional. Aquestes proteïnes són només un 10%, aproximadament, de les proteïnes presents en un gel d'acrilamida. A més, el 96% dels punts analitzats són constants en els 11 gels estudiats, i la variació entre les tres rèpliques d'un mateix gel es només d'un 1%, fet que és consistent amb treballs previs (Pixton et al., 2004).

Es van utilitzar gels d'aquestes característiques després de comprovar que en un gel de rang de pH de 3 a 10 i havia poques proteïnes fora de la zona mitja. Així, per tal d'aconseguir una major separació de les proteïnes amb un pI intermedi es va utilitzar una tira amb un rang de pH de 5 a 8. Amb aquesta decisió es van deixar fora de l'anàlisi una minoria de les proteïnes a estudiar, però va ser una decisió conscient i meditada. Així, sabem que no es podria estudiar pràcticament cap de les proteïnes de la família de les AKAPs, una de les famílies de proteïnes més importants de l'espermatozoide. No obstant, les avantatges d'utilitzar un rang de pH més estret superaven aquests petits inconvenients.

La distribució funcional d'aquestes 98 proteïnes es mostra a la Fig 5.1. El grup més abundant correspon a aquelles proteïnes relacionades amb la producció d'energia (23%, Fig 5.1A). Dins d'aquest grup, les proteïnes del Cicle de Krebs i la beta oxidació dels àcids grassos són un 67% del total, seguides de les proteïnes relacionades amb la glicòlisi i la gluconeogènesis. Aquesta dada és consistent amb el fet que un 20% de les proteïnes es troben localitzades a la mitocòndria (Fig 5.1B).

L'abundància de proteïnes relacionades amb la producció d'energia no ens ha d'estranyar, donats els elevats requeriments energètics que necessita la cua de l'espermatozoide.

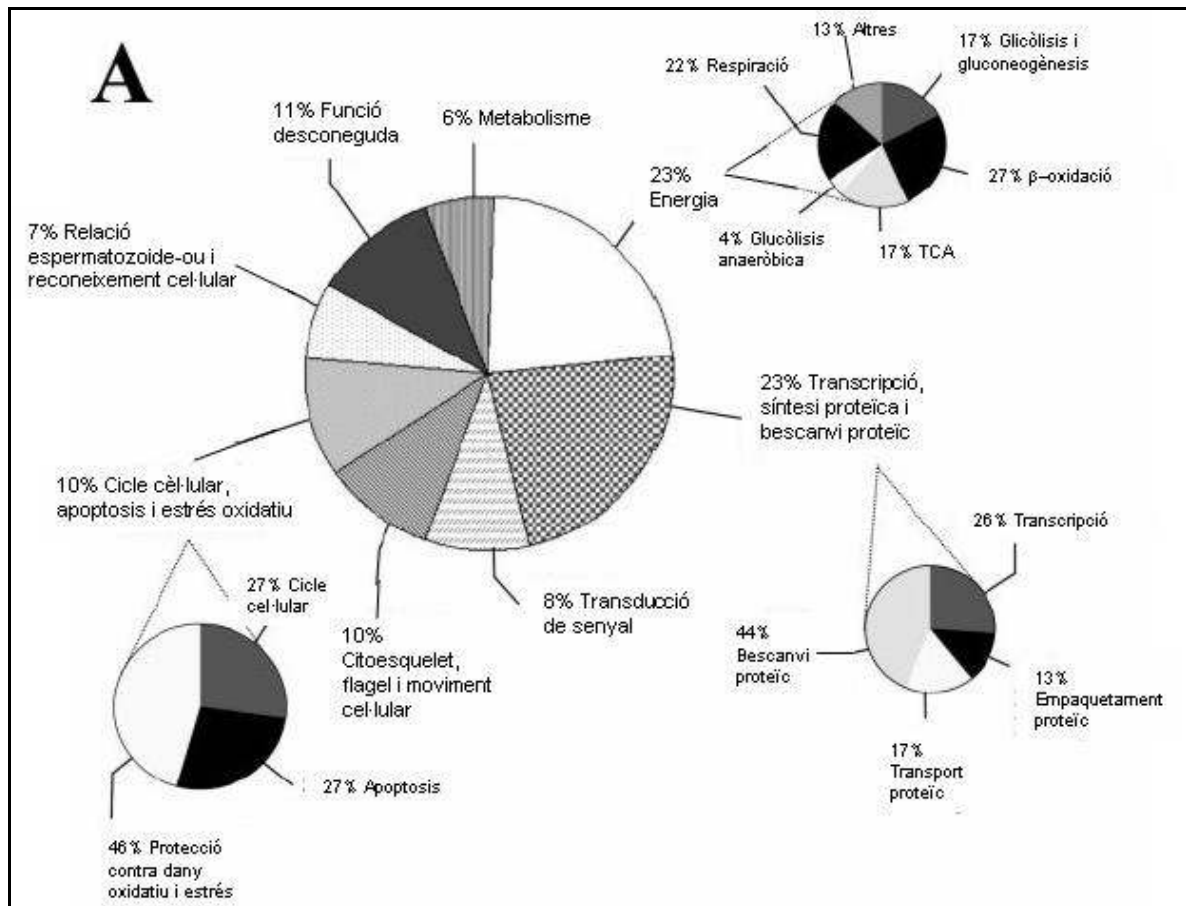


Fig 5.1A. Distribució funcional de les 98 proteïnes analitzades.

El següent grup en abundància correspon a aquelles proteïnes amb una funció relacionada amb la transcripció, la síntesi i el bescanvi proteic, el transport de proteïnes i el seu assemblatge. Aquest grup ocupa el 23% del total. Aquest fet és lleugerament intrigant, ja que fins fa poc es pensava que l'espermatozoide era una cèl·lula inert, sense cap tipus de transcripció, amb l'únic propòsit de portar el nucli masculí, condensat amb les protamines i teòricament inactiu fins l'ou femení. En aquest escenari és interessant saber quina és la funció de MYCBP, una proteïna descrita com un estimulador de la transcripció dependent de E-box del proto-oncogen C-myc. La mateixa pregunta ens la podem fer respecte a PARK7, una subunitat reguladora de la unió a RNA de l'oncogen DJ1.

Des de que es va descobrir que l'espermatozoide també porta RNAs que deixa a l'òvul, la idea clàssica de "cèl·lula mòbil que només porta DNA condensat" comença a canviar (Ostermeier et al., 2005). També s'ha demostrat que proteïnes com aquelles que es troben al centrosoma de l'espermatozoide humà són essencials per una singàmia i un desenvolupament embrioní normal. Recentment, s'ha descobert que els espermatozoides de mamífer tradueixen proteïnes codificades al nucli amb ribosomes mitocondrials (Gur and Breitbart, 2006). Així, hi ha moltes explicacions possibles per les proteïnes identificades en el nostre treball que estan relacionades amb la unió a RNA i la transcripció. Una és que algunes d'aquestes proteïnes poden ser restes del procés d'espermatogènesis. Un altra és que puguin tenir una funció normal en la fisiologia de l'espermatozoide. Finalment, poden tenir una important, però encara desconeguda, funció en la fertilització i etapes inicials del desenvolupament embrionari.

Entre les proteïnes involucrades en el bescanvi proteic, cinc corresponen a diferents subunitats del proteosoma (Taula 4.2). Aquesta observació és consistent amb treballs anteriors que ja localitzaven el proteosoma a l'espermatozoide (Pizarro et al., 2004). Fins i tot utilitzant una aproximació proteòmica diferent les subunitats del proteosoma han sigut identificades en l'espermatozoide humà (Johnston et al., 2005).

Un altre grup important és el de les proteïnes relacionades amb el reconeixement cel·lular i la transducció de senyals (Fig 5.1A). Aquestes proteïnes són coherents amb els requeriments de l'espermatozoide per a la capacitació, la interacció amb la zona pel·lúcida, la reacció acrosomal i la penetració de l'oòcit. A més, s'han detectat dos proteïnes específiques de l'acrosoma: la proteïna d'unió a l'acrosoma ACRBP i el precursor de la proteïna d'unió a la proacrosina sp32 (Taula 4.2 i Fig 5.1).

Un nombre important de proteïnes (11%) està involucrada en la protecció enfront estrès i dany oxidatiu, o l'apoptosis o el cicle cel·lular (Fig 5.1A). Una proteïna interessant d'aquest grup és la peroxiredoxina 6 (PRDX6). Aquesta proteïna pot reduir el peròxid d'hidrogen (H_2O_2) i d'altres hidroperòxids cel·lulars i pot jugar un paper en el dany oxidatiu (Manevich and Fisher, 2005). Ara es tenen prou evidències de que el dany per estrès oxidatiu en espermatozoides de pacients infèrtils pot augmentar el dany en el genoma (Suganuma et al., 2005). Una altra proteïna, també d'aquest grup, és el producte del gen PARK7. Aquesta proteïna també ha estat inclosa a la categoria de síntesis proteica. A més d'aquesta funció, pot actuar com una chaperona sensitiva a les

condicions redox de la cèl·lula, i com un sensor per l'estrès oxidatiu. També ha estat relacionada amb el Parkinson (Honbou et al., 2003).

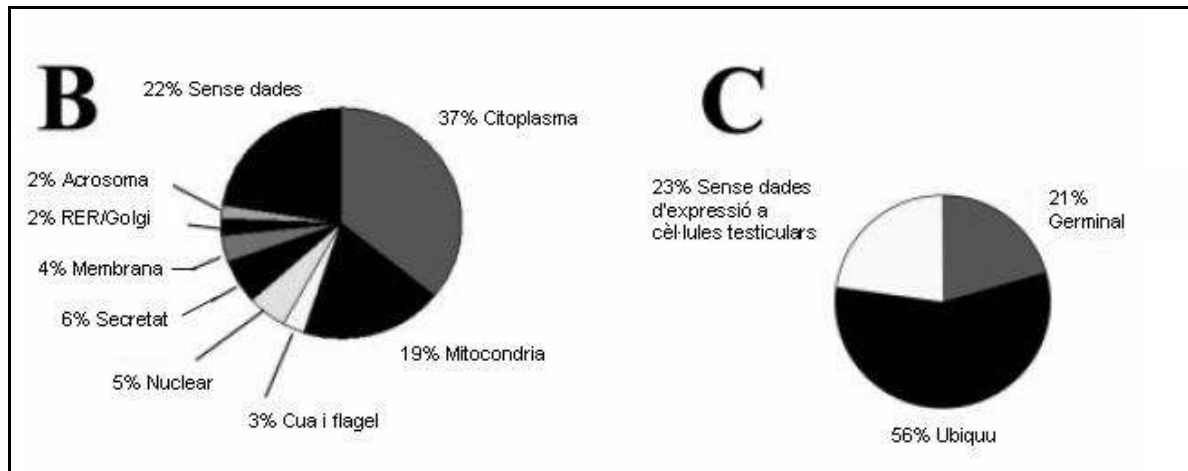


Fig 5.1 (continuació) Distribució per organel·les (B) i per tipus cel·lular (C) de les 98 proteïnes estudiades.

Les proteïnes flagel·lars i del citoesquelet (proteïnes relacionades amb el moviment cel·lular) corresponen a un 10% del total (Fig 5.1A). La presència d'aquestes proteïnes és consistent amb la molt especialitzada forma de l'espermatozoide i el seu llarg flagel.

S'han detectat també un parell d'histones (H2A i H4) (Taula 4.2). Tot i que la majoria del ADN de l'espermatozoide està acomplexat amb protamines, els últims treballs afirmen que hi ha un màxim d'un 15% de histones acomplexades amb el ADN (Rousseaux et al., 2005; Churikov et al., 2004). Tot i que ja no es qüestiona la presència d'histones, encara no es comprèn quina pot ser la seva funció al nucli de l'espermatozoide. La detecció d'histones mitjançant espectrometria de masses proporciona, ara, una evidència inequívoca de la seva presència al nucli de l'espermatozoide.

Com esperàvem, no s'han detectat protamines, a més de que no era part dels nostres objectius. Les protamines humanes contenen aproximadament un 50% de residus d'arginina, essent la proteïna més bàsica coneguda a la natura (Oliva and Dixon, 1991). Degut a la seva elevada càrrega positiva, s'enfoquen en un extrem de la tira d'isoelectroenfoc, fora del rang de pI que ha sigut objecte d'estudi. A més, les protamines

Objectiu	Tipus d'enfoc	Resultats	Referència
Descripció del proteoma d'un pacient que no pot concebre amb IVF	2D seguida de MALDI-TOF	Identificació de 20 proteïnes amb una expressió diferenciada entre pacient i controls fèrtils	Pixton et al., 2004
Anàlisi del proteoma de l'espermatzoide humà	1D seguida de nano-LC-MS/MS	Identificació de 1760 proteïnes de l'espermatzoide humà	Johnston et al., 2005
Anàlisi del proteoma de l'espermatzoide humà i creació d'un mapa proteic	2D seguida de MALDI-TOF	Identificació de 98 proteïnes i creació d'un mapa proteic de l'espermatzoide humà	Martínez-Heredia et al., 2006
Estudi del proteoma del cap de l'espermatzoide	1D seguida de HPLC microcapil·lar	Identificació de 85 proteïnes responsables de la interacció cap-oòcit	Stein et al., 2006
Anàlisi del proteoma de l'espermatzoide humà	1D seguida de LC-MS/MS	Identificació de 1093 productes gènics	Baker et al., 2007
Comparació entre diferents tipus de mostres i ampliació del proteoma de l'espermatzoide humà	2D seguida de MALDI-TOF	Identificació de 33 proteïnes i ampliació del mapa proteic de l'espermatzoide humà	De Mateo et al., 2007
Identificació de proteïnes responsables de la motilitat de l'espermatzoide	2D seguida de MALDI-TOF	Identificació de 10 proteïnes amb una expressió diferenciada entre astenozoospermics i normozoospermics	Zhao et al., 2007
Creació d'un mapa proteic de l'espermatzoide humà	2D amb diferents rangs de pH	Identificació de 3872 punts en el mapa proteic	Li et al., 2007
Identificació de proteïnes que poden ser S-nitrosilades	Assaig de canvi de biotina seguit de MS/MS	Identificació de 240 proteïnes que són S-nitrosilades	Lefievre et al., 2007

Taula 5.1 Estudis proteòmics sobre l'espermatzoide humà. Cal destacar que, bàsicament, hi ha dos enfocaments diferents a l'hora d'abordar l'estudi proteòmic: gels d'una dimensió seguits de anàlisi MS/MS o gels bidimensionals seguits d'anàlisi MALDI-TOF.

són insolubles en presència de SDS. Per tant, molt poca quantitat de proteïna es podria esperar trobar dins la segona dimensió. També s'ha de tenir en compte que la identificació i anàlisi de les protamines s'han estudiat profundament tant en pacients infèrtils com a l'espermatogènesi normal (Balhorn et al., 1988; Chevaillier et al., 1987; Bach et al., 1990; Blanchard et al., 1990; de Yebra et al., 1993a, b; de Yebra et al., 1998; Mengual et al., 2003; Aoki et al., 2005). Recentment, una aproximació específica

per extreure, separar i identificar protamines humanes per espectrometria de masses ha sigut descrita (Yoshii et al., 2005).

Una altra proteïna que no hem trobat al nostre estudi, tot i ser de les més abundants de l'espermatozoide han sigut les proteïnes de la família de les AKAPs (*A Kinase anchoring protein*), segurament degut a que el seu pes molecular es troba fora del rang estudiat.

Dintre de les proteïnes nuclears identificades, una sorpresa ha sigut trobar la proteïna RuvB like 1. D'aquesta proteïna se sap que té activitats ATPasa i DNA helicasa, com a part del complex NuA4 histona acetiltransferasa. Se sap que una hiperacetilació de les histones té lloc durant la transició histona-protamina a l'espermatogènesi (Oliva and Mezquita, 1982; Marcon and Boissonneault, 2004). A més, durant la fertilització una nova onada d'hiperacetilació té lloc a la vegada que la formació del nucleosoma patern. Aquesta proteïna RuvB like 1 també es coneguda per interactuar amb la nucleoporina 62 i Ran, per tal de facilitar el transport proteic de fora a dins del nucli (Levesque et al., 2006). Per tant, la identificació d'aquesta proteïna a l'espermatozoide humà obre la possibilitat de determinar la seva funció en aquesta cèl·lula i si es troba implicada en les primeres etapes nuclears després de la fertilització.

Un altre grup de proteïnes nuclears identificades són els diferents membres de la família de les SPANX (Zendman et al., 2003; Salemi et al., 2004). Aquestes proteïnes estan presents al cap de l'espermatozoide, però també s'han identificat com a proteïnes associades al càncer. La funció d'aquestes proteïnes encara no se sap.

Una proteïna no nuclear identificada és el precursor del component P del sèrum amiloide (APCS). Aquesta proteïna interacciona amb DNA i histones i es troba involucrada en la neteja de material nuclear alliberat per cèl·lules circulants danyades. Hi ha evidència de que existeixen mecanismes de detecció i eliminació de espermatozoides danyats durant l'espermatogènesi. La APCS pot intervenir en aquest procés.

Finalment, s'han identificat un 11% de proteïnes de funció desconeguda (Fig 5.1A). Per a la família de les SPANX, com a mínim la seva expressió al testicle i l'espermatozoide ha sigut ben descrita (Zendman et al., 2003; Salemi et al., 2004). Per a la resta de proteïnes, molta menys informació hi ha disponible. La proteïna ES1 o HES1 es troba codificada cromosoma 21 i s'ha trobat augmentada al cervell de malalts de síndrome de

Down fetal (Shin et al., 2004). Hem detectat diferents EST IMAGE clons al testicle (4/533) a la base de dades GeneCards, que són consistents amb la identificació per masses del nostre treball. Una altra proteïna desconeguda és la HSPC142, que és una proteïna predita al projecte de seqüenciació del genoma. D'aquesta proteïna hem trobat també clons EST (10/623) a les bases de dades. Una altra proteïna de funció desconeguda per a la qual hem trobat ESTs (2/45) és la CTCL antigen tumoral se57. La identificació al nostre treball d'aquestes proteïnes pot estimular nous treballs per tal d'intentar determinar la seva funció.

Quan considerem els patrons d'expressió de les proteïnes identificades trobem que un 21% de les proteïnes són expressades específicament a les cèl·lules germinals, que un 56% són ubiqües i que no existeixen dades d'expressió a cèl·lules germinals per a un 23% d'elles (Fig 5.1C). Per tant, la identificació d'aquests 23% de proteïnes proporciona els primers valors d'expressió en espermatozoide d'elles.

5.3.- Determinació de les proteïnes presents en menor o major abundància en mostres de semen de pacients mitjançant l'anàlisi de mostres independents i tinció argèntica.

Una vegada es tenia un mapa proteic de l'espermatozoide humà, el següent pas era realitzar comparacions assistides per ordinador entre els diferents grups. Per tal d'aconseguir el màxim d'informació dels diferents tipus de mostres, es va procedir a fer un anàlisi comparatiu entre pacients i donants, diferenciant entre els dos tipus de pacients i els dos tipus de donants dels que es disposava: astenozoospermics i normozoospermics per una banda, i donants de semen de fertilitat provada i sense provar.

5.3.1.- Astenozoospermics en comparació amb donants de semen.

Per tal de comparar els mapes 2D de les proteïnes de l'espermatozoide dels pacients astenozoospermics i els mapes 2D dels donants de semen, es van analitzar 20 pacients astenozoospermics i 10 donants de semen, fent tres rèpliques de cada mostra i calculant el valor mig per a cada punt. La informació que ens proporciona aquest tipus d'anàlisi té relació amb la motilitat dels espermatozoides; s'espera trobar proteïnes que expliquin en part el procés o processos afectats en els pacients astenozoospermics.

Així, al realitzar mitjançant un test U de Mann-Whitney una comparació entre els mapes 2D per tal de comparar l'abundància relativa de les diferents proteïnes identificades en els pacients astenozoospermics i els donants de semen, s'obtenen com a resultat 17 proteïnes amb diferències significatives (Taula 4.5 i Fig 4.11).

Per tal de facilitar el seu anàlisi, es van agrupar les proteïnes en grups concret. Catorze de les disset proteïnes es poden classificar en tres grans grups: *producció d'energia*, *estructura i moviment* i *senyalització cel·lular i regulació*. Les proteïnes COX6B, DLDpre, FHpre i ECH1pre constitueixen el grup de *producció d'energia*. El grup d'*estructura i moviment* està constituït per les proteïnes ACTB, H2A, PIP, PIPpre i SEMG1. Per últim, el grup de *senyalització cel·lular i regulació* està format per les proteïnes ANXA5, S100A9 i IMPA1.

És sorprenent la gran quantitat de formes precursoras que s'han trobat. Així, 6 de les 17 proteïnes analitzades (PIPpre, CLUpre, DLDpre, FHpre, ECH1pre i SEMG1pre) són

precursors; es pot hipotetitzar que una acumulació de precursors en pacients astenozoospermics ens indica l'existència d'un problema generalitzat en els processos post-translacionals. Com ja s'ha indicat, existeixen evidències que relacionen l'acumulació de precursors de protamina 2 en els espermatozoides de pacients infèrtils (de Yebra et al., 1998; Torregrosa et al., 2006). L'acumulació de formes precursors pot resultar, igualment, en la desregulació dels processos situats més avall de les vies implicades.

Producció d'energia

Dins del grup *producció d'energia*, s'ha identificat la proteïna COX6B. Se sap que existeixen isoformes específiques de testicle (Huttemann et al., 2003). La citocrom c oxidasa és l'enzim terminal (i limitant) de la cadena respiratòria, i catalitza la transferència d'electrons a l'oxigen; aquest pas es troba acoblat a la translocació de protons i es necessari per a la síntesis d'ATP. Així doncs, un descens de la COX6B pot estar relacionat amb una baixa producció d'ATP, fet que provocaria un descens en la mobilitat dels espermatozoides (i per tant, astenozoospermia).

La dihidrolipoamida deshidrogenasa (DLD) és una de les tres subunitats catalítiques del complex de la piruvat deshidrogenasa, que catalitza el pas de piruvat a acetil CoA. En aquest treball s'ha detectat un increment de la forma precursora (DLDpre), fet que podria implicar un descens de la quantitat de forma madura. S'ha descrit, a més, que una deficiència potencial de DLD pot conduir a diversos problemes metabòlics, incloent-hi acidèmia làctica, disfunció del cicle de Krebs, i una degradació anòmala d'aminoàcids (Robinson, 1995). En el cas concret de l'astenozoospermia, un malfuncionament del cicle de Krebs podria explicar la disminució de la mobilitat, ja que se sap que la freqüència de bategada

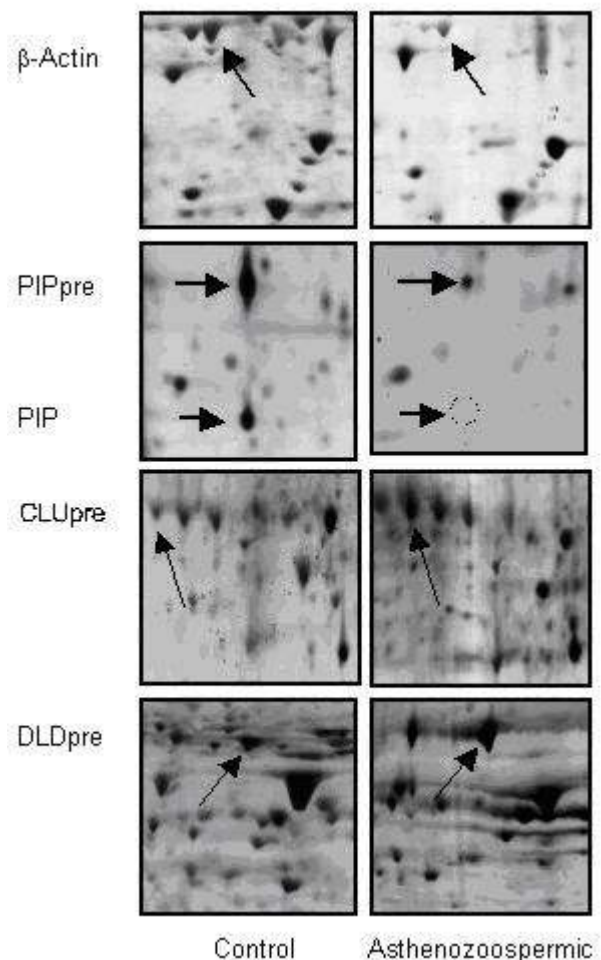


Fig 5.2 Alguns exemples de proteïnes amb expressió diferencial. 128

del flagell es troba directament relacionada amb la producció d'energia des de l'ATP (Cardullo and Balts, 1991).

Un altra proteïna detectada com a augmentada en els pacients astenozoospèrmics és el precursor de la fumarat hidratasa (FHpre). La fumarat hidratasa és un enzim involucrat en el cicle dels àcids tricarboxílics (també anomenat cicle de Krebs) (Coughlin et al., 1998). Novament, un increment de la forma precursora suggereix una davallada de la forma madura, que pot explicar perfectament la davallada de mobilitat dels espermatozoides, cèl·lules amb un elevat requeriments energètics.

Resumint, s'han trobat força proteïnes relacionades amb les principals fonts de producció d'ATP de l'espermatozoide, que poden estar relacionades amb la disfunció del moviment de la cua dels espermatozoides dels pacients astenozoospèrmics. Aquests resultats són consistents amb la identificació, utilitzant una aproximació diferent, d'algunes proteïnes amb una quantificació diferencial en mostres astenozoospèrmiques i relacionades amb la producció d'energia per un altre grup (Zhao et al., 2007). Tots aquests resultats, posats en conjunt, suggereixen l'existència d'una fallida general en les vies metabòliques involucrades en la producció d'energia en els pacients astenozoospèrmics.

Estructura i moviment

Dins d'aquest grup es troba l'actina (ACTB), que es una de les proteïnes majoritàries del citoesquelet i participa de moltes importants funcions cel·lulars, incloent-hi mobilitat cel·lular, citocinesis, moviment de vesícules i organel·les, senyalització cel·lular i l'establiment i manteniment de les unions i la forma cel·lular (Machesky and Install, 1999). La polimerització d'actina pot jugar un paper com a via reguladora associada a la fosforilació de tirosines en espermatozoides (Brenner et al., 2003; Seligman et al., 2004). En aquest marc, un descens en la quantitat d'actina pot explicar un descens en la mobilitat, ja que sense suport del citoesquelet la cua no pot batre correctament.

Com ja s'ha comentat anteriorment, poca informació hi ha disponible sobre la proteïna induïda per prolactina (PIP). La PIP es troba involucrada en algun tipus de funció d'unió a l'actina (Schaller et al., 1991; Caputo et al., 1999). La PIP es una aspartil proteïnasa amb especificat per a la fibronectina (Caputo et al., 2000). La seva funció a l'espermatozoide no es té clara, però s'ha trobat a la zona post-acrosomal, i es manté

unida a la superfície de l'espermatozoide després de la capacitació, així que es possible que tingui un paper en la fertilització (Bergamo et al., 1997). Treballs previs han trobat que la PIP degrada específicament la molècula de fibronectina (Caputo et al., 2000), que es una de les proteïnes majoritàries del coàgul seminal (Lilja et al., 1989); la PIP constitueix com a mínim un 1% de les proteïnes del plasma seminal (Autiero et al., 1991). Aquestes dades, en conjunt, suggereixen que la PIP pot contribuir al trencament de la fibronectina durant la liquèfacció. Així doncs, la baixada dels nivells d'expressió detectades en aquest treball permeten hipotetitzar que una liquèfacció incompleta de l'ejaculat pot conduir a un fluït seminal més viscos, representant una important trava per al moviment de l'espermatozoide. A més, s'ha descrit prèviament que la freqüència de bategada de la cua és inversament proporcional a la viscositat del medi que envolta la cèl·lula (Cardullo and Baltz, 1991). Els resultats aquí presentats són coherents amb les dades disponibles per a la proteïna SABP (un homòleg de PIP); per a aquesta proteïna, i utilitzant tècniques immunofluorescents, s'ha trobat un augment de la quantitat de proteïna en mostres astenozoospèrmiques comparades amb mostres normozoospèrmiques (Capkova et al., 2007).

Una altra proteïna d'aquest grup és la semenogelina. La SEMG1pre s'ha trobat augmentada en els pacients astenozoospèrmics comparat amb els donants de semen. S'ha descrit una funció inhibidora de la mobilitat per a fragments de la semenogelina (Yoshida et al., 2003). La identificació en aquest treball d'un fragment de 20 Kda de la semenogelina (Fig 4.11), també augmentat en pacients astenozoospèrmics, i no descrit prèviament suggereix que aquest fragment pot tenir també un efecte inhibidor en la mobilitat de l'espermatozoide.

Senyalització cel·lular i regulació

Dintre d'aquest grup es detecta augmentat en pacients astenozoospèrmics la proteïna IMPA1. IMPA1 és un dels enzims involucrat en la síntesis de mio-inositol i és essencial per al desenvolupament embrionari (Cryns et al., 2007). També se sap que la funció d'aquest enzim és molt elevada als testicles, i que la concentració de mio-inositol als túbuls seminífers és molt superior que la trobada al sèrum (Chauvin and Griswold, 2004). Una possible funció per al mio-inositol és la osmoregulació del fluït seminal. Tant medis hipo i hiperosmòtics s'han trobat que afecta (disminuint-la) a la mobilitat progressiva i a la velocitat mitja dels espermatozoides (Liu et al., 2006). Llavors, es possible que aquesta sobre expressió detectada en pacients astenozoospèrmics pugui

està relacionada, a través d'aquest mecanisme, en la reducció de la mobilitat espermàtica.

Altres proteïnes

Un dels punts analitzats correspon a dos proteïnes diferents (MPST/ECH1pre; Fig 4.1, Taula 4.5). En aquest cas no és possible atribuir els canvis d'expressió únicament a una de les proteïnes de manera inequívoca. Tot i això, aquest resultat permet especular sobre l'augment de MPST, una proteïna involucrada en la detoxificació i relacionada amb la producció d'espècies reactives d'oxigen, o l'augment del precursor de ECH1 (Iciek and Wlodek, 2001; Liang et al., 1999).

Sobre la MPST, un increment de tòxics ambientals podria explicar aquest augment; així, el que veuríem no seria una relació directa de la proteïna amb la mobilitat, si no els intents de la cèl·lula per protegir-se.

I ECH1pre és la forma precursora d'una proteïna involucrada en la β -oxidació dels àcids grassos. Es podria especular, doncs, que l'increment de la forma precursora portaria associat un descens de la forma madura, i un possible malfuncionament del cicle, disminuint així l'aportació energètica de la cèl·lula.

Entre les proteïnes no incloses en cap grup trobem a les proteïnes HSPA2 i TEX12. HSPA2 ha estat identificada com la primera chaperona de les proteïnes de transició TP1 i TP2 (Govin et al., 2007). També s'ha trobat una desregulació del gen Hspa2 als espermatozoides d'homes infèrtils (Cedenho et al., 2006). La proteïna HSPA2 es un component del complex sinaptonèmic. S'ha trobat una relació entre l'expressió de HspA2 i diferents successos relacionats amb els passos finals de l'espermioogènesis, com l'extrusió citoplasmàtica i el remodelatge de la membrana plasmàtica (Huszar et al., 2006). Així doncs, l'augment de HSPA2 detectada en les mostres astenozoospermiques pot estar relacionada amb la disfunció de la mobilitat a traves de l'alteració a qualsevol d'aquests nivells. A més, es interessant fer notar que la proteïna TEX12, també identificada, es troba també involucrada amb el complex sinaptonèmic (Hamer et al., 2006). Totes dues es troben augmentades en pacients astenozoospermics, i es pot especular sobre una possible relació entre totes dues, l'astenozoospermia i la meiosi.

Novament, trobem augmentat el precursor de la clusterina. Tot i que ja s'ha parlat d'aquesta proteïna prèviament en aquest treball, es tornarà a analitzar en aquesta secció per poder tenir una visió general de les proteïnes afectades.

Com ja s'ha dit, la funció del precursor de la clusterina no es té clara. L'àmplia distribució i l'elevat grau de conservació de la seqüència suggereixen que aquesta proteïna té una funció de fonamental importància tan dins com fora de la cèl·lula. Si es miren només les funcions relacionades amb la fertilitat, la clusterina es troba relacionada amb la prevenció de dany per estrès oxidatiu (Reyes-Moreno et al., 2002), la precipitació de proteïna (Ibrahim et al., 2000), l'aglutinació de espermatozoides anòmals (O'Bryan et al., 1990, 1994), i el control de la lisis d'espermatozoides induïda pel complement (Jenne and Tchopp, 1989). L'habilitat de la clusterina de preveure dany oxidatiu pot representar un benefici per a l'espermatozoide tan al tracte reproductor femení com en un sistema de fecundació in vitro. A toros es va trobar que els espermatozoides positius per a clusterina (CPS, *clusterin positive spermatozoa*) eren tots anòmals, i que la seva presència correlacionava de manera inversa amb la mobilitat (Ibrahim et al., 2000). A porc, rata i ratolí s'ha demostrat que un increment de la temperatura testicular condueix a una major incidència de CPS (Clark and Griswold, 1997; Ibrahim, 2000). A més, només s'ha trobat clusterina en espermatozoides humans anòmals (O'Bryan et al., 1990, 1994). En aquest treball, s'ha detectat un increment de la quantitat de la forma precursora de la clusterina a mostres astenozoospèrmiques comparat amb donants de semen utilitzant tant un enfoc proteòmic (Taula 4.5 i Fig 4.11) com amb tècniques d'immunocitoquímica (Fig 4.12).

5.3.2.- Normozoospèrmics en comparació amb donants de semen de fertilitat provada.

Una vegada analitzats els pacients astenozoospèrmics, es va procedir a realitzar el mateix tipus d'anàlisi amb els pacients normozoospèrmics. En aquest cas es van comparar sis pacients normozoospèrmics amb una infertilitat d'etiologia desconeguda i cinc donants de fertilitat provada. En aquest estudi es buscava informació relacionada amb la fertilitat, descobrir qualsevol dada que pogués explicar perquè homes amb característiques seminals normals (i amb parelles sense cap problema reproductiu evident) són incapaçs de reproduir-se.

Novament, es va comparar l'abundància relativa de les diferents proteïnes en els diferents grups realitzant un test U de Mann-Whitney. L'anàlisi estadístic dels pacients normozoospèrmics en comparació als donants de fertilitat provada ens retorna dos proteïnes amb una expressió diferencial entre els dos grups. Aquestes proteïnes són la

proteïna regulada per glucosa de 58 kDa (PDIA3) i la proteïna de la seqüència expressada a testicles 12 (TEX12) (Taula 4.6, Fig 4.13).

Aquestes proteïnes es troben totes augmentades en pacients normozoospèrmics comparats amb els donants fèrtils.

La família PDI (*protein disulfide isomerase*) es troba involucrada en la formació de ponts disulfurs. El membre fundador de la família es suficient, *in vitro*, per reconfigurar substrats proteics o per isomeritzar substrats amb els ponts disulfur col·locats de manera incorrecta (Alanen et al., 2006).

La PDIA3 és una disulfid oxidoreductasa tiol-proteïna, i ha estat estudiada en molts estudis clínics, tant com chaperona com receptor de membrana d'una hormona esteroidea (1,25(OH)2D3) (Khanal and Nemere, 2007). Més important per al cas estudiat, però, es el fet que la PDIA3 és una proteïna resident del reticle endoplàsmic (RE), responsable de la resistència al estrès del reticle (fet que condueix, si falla, a l'apoptosis de la cèl·lula per acumulació de proteïnes malament plegades) (Corazzari et al., 2007). Així, un increment en espermatozoides normozoospèrmics pot indicar l'existència de factors d'estrès, que podrien afectar a la fertilitat (de manera indirecta) i a la vitalitat espermàtica via apoptosis.

La proteïna de la seqüència expressada a testicles 12 (TEX12) s'ha descrit com un possible factor pertanyent al complex sinaptonèmic (Hamer et al., 2006). S'ha descrit que una fallida del complex sinaptonèmic pot conduir a infertilitat masculina (Miyamoto et al., 2003). TEX12 es troba fortament relacionada amb SYCE2, i és una part del complex central del sinaptonema. Donat el fet que tenim augmentada TEX12, es pot hipotetitzar que el possible problema seria, potser, una fallida de SYCE2. També es pot tenir en compte que, segons la literatura, TEX12 només s'expressa durant la meiosis; potser el que s'està observant és un problema adquirit des de la meiosis, que podria afectar d'alguna manera a la capacitat fecundant dels espermatozoides.

A l'hora d'interpretar aquestes dades, però, s'ha de tenir en compte que només s'han pogut estudiar 6 pacients; aquest fet, sumat al tipus d'anàlisi estadístic fet (al voltant de 100 comparacions a la vegada) i a la significança obtinguda, ens ha de fer ser cautes davant la importància de les dades, ja que, segons l'estadística, 1 de cada 100 resultats pot ser producte de l'atzar, i només s'han assolit dos proteïnes diferencials. Així, abans de poder concloure res de manera ferma, s'ha d'ampliar l'estudi, intentant aconseguir

uns resultats més significatius. O bé confirmar aquests resultats amb estudis específics per immunohistoquímica. No obstant, el temps per a realitzar una tesi doctoral és limitat, i aquests nous experiments es duran a terme al laboratori de Genètica Humana, però no per aquest investigador.

5.4.- Estudi de la capacitat predictiva del patró d'expressió de les proteïnes quantitativament diferents mitjançant l'agrupació en "clusters".

Una vegada es tenien els estudis comparatius fets entre els diferents tipus de pacients, i tota una sèrie de proteïnes amb quantitats significativament diferents, el següent pas va ser comprovar si aquestes proteïnes, per si soles, podien servir per a agrupar les mostres entre elles, buscant un efecte predictor en el patró d'expressió. Si es podia trobar un patró d'expressió que definís "infertilitat", potser les proves pronòstiques serien més ràpides. A més, si a l'hora d'agrupar les mostres, dins d'un mateix fenotip (astenozoospermia o infertilitat) es troben subgrups (com ha passat en l'estudi amb DNACHIPS i càncer) ens podria estar indicant que hi ha més d'un problema amb el mateix nom.

Per tal de validar aquesta hipòtesi, es van utilitzar els valors d'expressió obtinguts del PDQuest, i es va procedir a la realització d'un "cluster" no supervisat de les dades. El resultat del "cluster" per a la comparació pacient astenozoospermic-controls es pot veure a la Fig 4.11, i ens mostra als donants de semen (controls) agrupats tots en la mateixa branca de l'arbre, separats dels pacients astenozoospermics. Aquesta agrupació tan clara ens indica que, tot i que cap de les proteïnes per si sola pot explicar l'astenozoospermia, agrupades creen una signatura proteica suficientment clara com per a diferenciar entre donants de semen i pacients astenozoospermics. En un futur, potser es podran utilitzar aquestes dades amb valor diagnòstic, per tal de donar un diagnòstic de la infertilitat més clar, amb noves solucions.

A més, dintre de la branca dels pacients astenozoospermics, es distingeixen 4 subgrups, amb característiques d'expressió diferent. Probablement, aquests subgrups ens indiquin diferents causes per a l'astenozoospermia, però abans de poder concloure res s'hauran de realitzar més experiments, per tal d'incrementar el tamany mostral i intentar obtenir patrons més clars.

5.5.- Posada en marxa del sistema d'anàlisi DIGE en espermatozoides humans.

A més d'analitzar les mostres d'espermatozoides amb tinció argèntica, s'han desenvolupat altres mètodes de tinció. Un dels mètodes més novedós és l'anàlisi DIGE, que ens permet analitzar grups diversos de manera ràpida i fiable. En aquest treball, s'ha posat a punt la tecnologia DIGE realitzant comparacions entre pacients astenozoospèrmics i normozoospèrmics. Una vegada el protocol DIGE va ser estandarditzat, s'ha realitzat una comparació entre un pacient astenozoospèrmic i un donant de semen, per tal de comprovar les dades obtingudes amb l'anàlisi amb tinció argèntica.

Per tal de confirmar el patró, quatre punts s'han retallat en el gel DIGE, esperant obtenir les mateixes proteïnes prèviament descrites. Un cop aquestes proteïnes han sigut confirmades, s'ha procedit a estudiar el patró proteic del gel tenyit amb DIGE amb els resultats obtinguts prèviament amb la comparació estadística entre mostres de pacients astenozoospèrmics i donants de sement. Moltes de les proteïnes amb diferències quantitatives s'han confirmat també amb un anàlisi DIGE, a més de pràcticament una cinquantena de proteïnes addicionals. No s'han trobat totes les proteïnes trobades amb la tinció argèntica, segurament perquè en aquest anàlisi només s'ha treballat amb dos mostres, una de cada, mentre que a l'estudi previ s'ha treballat amb una trentena de mostres.

Així, en aquest cas s'han vist les diferències individuals, i no necessàriament les diferències entre grups. No obstant, és important senyalar que la majoria de les proteïnes estudiades s'han pogut identificar també amb aquesta aproximació, fet que recolza els estudis fets amb plata. Estudis posteriors hauran d'acabar de confirmar les proteïnes identificades amb plata, a més d'acabar de descriure el proteoma del pacient infèrtil mitjançant l'estudi de les proteïnes amb expressió diferencial trobades en l'estudi pilot.

És important senyalar el fet que, per a realitzar l'estudi DIGE, només s'ha hagut d'invertir una setmana de temps, mentre que per a realitzar l'estudi amb tinció de plata, el temps invertit ha sigut de mesos.