

Caracterització proteòmica i molecular
d'espermatozoides humans en pacients infèrtils i
controls

*Proteomic and molecular characterization of human
spermatozoa in infertile patients and controls*

Per/*By* Sara de Mateo López

Abril 2010



UNIVERSITAT DE BARCELONA



Universitat de Barcelona
Facultat de Medicina
Departament de Ciències Fisiològiques I

Programa de Doctorat: Biopatologia en
Medicina (Bienni 2005-2007)

TESI DOCTORAL / *THESIS*

Caracterització proteòmica i molecular d'espermatozoides
humans en pacients infèrtils i controls

*Proteomic and molecular characterization of human
spermatozoa in infertile patients and controls*

Memòria presentada per
Memory presented by

Sara de Mateo López

per optar al grau de
to obtain the degree of

Doctora en Biologia
Doctor in Biology

Treball desenvolupat sota la direcció del Dr. Rafael Oliva Virgili al laboratori de Genètica
Humana, Unitat de Genètica, Departament de Ciències Fisiològiques I, Facultat de Medicina,
Universitat de Barcelona

*Work developed under the supervision of Dr. Rafael Oliva Virgili in the Human Genetics
Laboratory, Genetics Unit, Department of Physiologic Sciences I, Faculty of Medicine,
University of Barcelona*

Director
Supervisor

Autora
Author

Dr. Rafael Oliva

Sara de Mateo López



UNIVERSITAT DE BARCELONA



Rafael Oliva Virgili, Professor of Human Genetics in the University of Barcelona,

DECLARES:

That Sara de Mateo López has performed the work entitled “Proteomic and molecular characterization of human spermatozoa in infertile patients and controls” under my direction in order to obtain the degree of Doctor in Biology and that it fulfils the requirements to obtain the “European Doctor” mention, and that the work is ready to be presented from the present day.

Signed: Rafael Oliva Virgili

Barcelona, 14th April 2010

A Chus,
mi gran apoyo durante estos últimos más de ocho años
y la persona con la que quiero compartir mi vida

*“Εν οίδα οτι ουδεν οίδα / en oida oti ouden oida”
“Yo sólo sé que no sé nada”*

Sócrates

*“If I have seen further
it is only by standing on the shoulders of giants”*

Isaac Newton

L'apartat d'agraïments d'una tesi sol ser la part menys important a nivell científic, però la més rellevant pel desenvolupament d'aquesta. Molta gent ha participat, tant directament com indirectament, en la realització d'aquesta tesi i m'agradaria esmentar un per un a tots ells en aquest apartat tan emotiu per a mi, però llavors no acabaria mai!!!

En primer lloc agrair al Dr. Rafael Oliva per permetre'm entrar al seu grup d'investigació i per ser un gran recolzament en els moments difícils. Per transmetre'm la il·lusió de tirar endavant un projecte, encara que no surti a la primera. Per encoratjar-me i permetre'm fer les estades que he realitzat durant la tesi i així créixer a nivell científic i personal. Per donar-me la oportunitat d'assistir a congressos i poder veure la gran quantitat de gent que es troba en la mateixa situació que jo, i també la gran quantitat de persones a qui admirar. Per estar sempre quan el necessitava i per la seva dedicació per que el treball que presento ara sigui com és. Gràcies!!

A la gent del Departament de Ciències Fisiològiques I, al grup de Neurofisiologia, al grup de Bioquímica i en especial als veïns, Dr. Cristobal Mezquita, Dra. Jovita Mezquita, Dra. Belén Mezquita i a la Montse, que sempre que els hi he demanat alguna cosa m'han ajudat. Al Dr. Josep Oriola i al Dr. Jose Manuel Vidal, per formar part dels seminaris del grup i congressos i compartir els seus coneixements de gran qualitat científica i tan valuosos per a mi.

A tota la gent de la Unitat de Reproducció Assistida del Grup Hospital Clínic de Barcelona i en especial al Dr. Ballescà i la Marta Guimerà, per la seva dedicació a administrar-nos totes les dades necessàries de les mostres que hem analitzat i per ajudar-nos a la interpretació de les dades. A Raquel i Cristina del Laboratori d'Andrologia per proporcionar-nos les mostres i tota la informació i ajuda necessària. Tota la ajuda que ens han aportat és de gran importància en aquest treball i considero que és imprescindible agrair la seva dedicació.

A tota la gent de la Unitat de Proteòmica Casanovas (Facultat de Medicina, Plataforma IDIBAPS-UB-PCB) i en especial al Dr. Josep Maria Estanyol, la Dra. Maria José Fidalgo, la Dra. Eva Olmedo i al Fran, així com a tota la gent que ha estat als meus inicis. Tots ells m'han ajudat a endinsar-me en el increïble món de la proteòmica, a interpretar els resultats d'espectrometria de masses i m'han proporcionat dades molt valuoses i essencials pel treball que he realitzat durant la meva tesi doctoral.

A les secretaries, per la seva gran ajuda administrativa, a Núria i Pilar que van estar als meus inicis, i a Sònia i Vanessa, que han estat en la última etapa de la meva tesi. Sempre és molt

agradable rebre una salutació i un somriure cada matí quan t'enfrontes a un possible dia dur de treball.

Al Joan per ensenyar-me tot el que sap de proteòmica i en especial de gels bidimensionals. Per passar dies davant de l'ordinador "discutint" sobre la localització de cada *spot* a centenars de mapes bidimensional i després tancar els ulls i veure un mapa "estel·lar" dels *spots*, definit el patró perfectament. Per transmetre calma durant tots els congressos que hem compartit i per ballar el que sigui a la "disco" dels congressos! Als meus companys actuals de laboratori Meri, Judit i Rubén, perquè heu sigut més que companys de laboratori, i encara que no haguem sortit moltes vegades junts després de les hores estrictament de treball, us considero uns grans amics. Pels nostres "balls" al laboratori al final del dia, pels nostres experiments amb el gel sec, per les nostres fotos posades després de l'amic invisible, per la nostra hora de dinar, pels posteriors "pitis" al sol i les nostres converses, perquè heu compartit amb mi la vostra vida fora del laboratori i sobretot, pel vostre recolzament i ànims durant aquests últims moments i sempre. Us desitjo el millor a la vida!! Ens espera una gran celebració (no només de la tesi, sinó més important de la boda de la Meri!!!).

A Cristina, David i Núria, per ser companys de laboratori als meus inicis (i no tant inicis) de la meva aventura en el món de la recerca i per ensenyar-me tot el que calia. A Teresa i Sabrina perquè m'agradaria haver pogut gaudir molt més de la vostra companyia, el poco tiempo que estuvimos trabajando juntas en el laboratorio fue suficiente para darme cuenta de lo grandes personas que sois. A Maria Cristina, gracias a ti he aprendido algo de italiano, aún tenemos pendiente salir de fiesta todos otra vez!! A tots els col·laboradors que han passat pel laboratori, Marta Aldea, Lucas, Mireia Reche i en especial a Gemma Mestre, que encara segueix fent-nos una visita de tant en tant i sempre ens brinda la seva alegria.

Dank je wel to all the people in the fifth floor of the NCMLS in the Radboud University Nijmegen Medical Centre and especially to Marieke de Vries to let me share her bench during my stay. Sorry, but I almost forget all the expressions in dutch I learnt with all of you, I try to remind them from time to time but dutch is so difficult! Also to all the people of the Department of Obstetrics and Gynaecology of the UMC Radboud University to always help me and be so kind with me during my stay in The Netherlands. To Dr. Peter de Boer and Dr. Liliana Ramos to supervise my work when I was there and to greatly contribute to the article that we have finally published! Un agradecimiento muy especial para Liliana por dirigirme el trabajo realizado en su laboratorio y por todo el apoyo que obtuve por su parte durante mi estancia en

Holanda. Le deseo lo mejor a ella y a su familia, y sobretodo que sigamos manteniendo el contacto en este mundo de la investigación al que tanto tiempo hay que dedicarle.

To the Department of Biochemistry and Molecular & Cellular Biology in Georgetown University Medical Center in Washington DC and especially to Dr. Martin Dym, Dr. Maria Kokkinaki and Dr. Zuping He for their kindness when I was a guest in their laboratory and for their dedication in teaching me what I had time to learn.

A toda la gente que he conocido “fuera del laboratorio” durante las dos estancias que he realizado en Nijmegen y Washington DC, que me han hecho disfrutar de la estancia a un nivel más lúdico. A la Cristina Fernández pels nostres passeigs en bici als voltants de Nijmegen y a toda la gente que conocí en DC y me acogieron como una más, no voy a nombrarlos a todos porque son muchísimos, sólo gracias por esos dos meses tan intensos!

A les meves floretes (suposo que aquesta tesi no serà la única que faci servir aquest nominatiu!!), Cristina, Elsa, Tània, Trini i Vane, perquè sou úniques, cadascuna a la seva manera i això us fa molt especials per a mi!! Pels viatges a les illes al setembre, pels viatges a València (qué bonita es Valencia!!), per les calçotades que hem fet i ens queden per fer, per les nostres cadenes de e-mails interminables acabant sempre amb “alguna sap algo de la Cris?”. Pel vostre recolzament incondicional i perquè sé que sempre us tindrè a totes al meu costat, us estimo!!

Para mis amigos que en ciertas épocas se convirtieron en “compis de pis” compartiendo con ellos los buenos y malos momentos (lo siento por los malos...) y a Mikel, Cris y demás personas a las que considero amigos. A Xavi, Silvia y Elsa por un año compartiendo piso juntos, un año bastante completito, y por el descubrimiento de los “Moros y Cristianos” alicantinos, no tenía ni idea de todo lo que esto implica!! A Dani y Meri por las grandes conversaciones que hemos tenido y tendremos, por los muy buenos momentos de risas y por esas paellas de fin de semana!! A todos ellos sólo decir que un viaje inolvidable nos espera a la vuelta de la esquina!

Muy especialmente a mi madre, por no impedirme nunca hacer lo que quería o sentía, por dejarme irme de casa con dieciocho años para estudiar una carrera, por apoyarme en todas mis decisiones y sobre todo por hacerme como soy, muchas gracias mama!! A José María, por ser una gran persona y cuidar tanto a mi madre. A mi familia política, a Lola, Jesús, Silvia y Luis, por aceptarme tan rápido en la familia tal y como soy y por apoyarme en todo, y a mis sobrinos Hugo y Berta, porque una sonrisa de ellos ilumina todo lo que está a su alrededor y te hacen

ver que la vida no es tan difícil como parece. Por los buenos momentos que hemos compartido y nos quedan por compartir, muchas gracias.

Por último y más importante, mi dedicación de esta tesis a Jesús, mi pareja, la que siempre me ha estado apoyando al máximo en todos los momentos difíciles y en todas las decisiones importantes que he tomado durante todo el tiempo que llevamos juntos. Por aguantar mi mal humor en ciertas ocasiones, mis llantos y mis tan frecuentes momentos de inseguridad. No tengo palabras para agradecerle su apoyo incondicional, sólo gracias por compartir tu vida conmigo.

Presentació de la Tesi

L'objectiu d'aquesta tesi és essencialment, com diu el títol d'aquesta, contribuir a la caracterització molecular de l'espermatozoide, tant de pacients com de controls, a través de la utilització de tècniques proteòmiques.

La memòria de tesi presentada aquí es divideix en set apartats. El primer apartat, la introducció, conté informació del procés d'espermatogènesi i del contingut proteic de l'espermatozoide madur, de la infertilitat/subfertilitat humana masculina i de les tècniques proteòmiques. A continuació es llisten els objectius de la tesi, els resultats en forma d'articles, la discussió d'aquests resultats i les conclusions obtingudes. Es llisten també les publicacions referenciades a la introducció i a la discussió d'aquesta memòria a l'apartat "Bibliografia". Finalment, els annexos inclouen els protocols més freqüentment utilitzats durant la realització d'aquesta tesi juntament amb informació dels reactius emprats en aquests. També hi ha una breu indicació dels congressos en els que he participat, de les beques i estades l'estranger de les que he gaudit durant la tesi, i un llistat d'abreviatures i anglicismes.

Els idiomes escollits per desenvolupar aquesta memòria de tesi han sigut el català i l'anglès. La base d'aquesta tesi, que correspon als articles publicats i l'article en via de publicació que hi ha a la secció de "Resultats", es troba escrita en anglès amb un resum en català al final de cadascun d'ells que és coherent amb el format bilingüe en que s'ha desenvolupat la memòria. La resta dels apartats (introducció, objectius, discussió, conclusions i annexos) s'han escrit íntegrament en català, amb la incorporació de resums en anglès excepte per a la secció de discussió, ja que aquesta ja es troba detallada a cadascun dels articles. Els resums en anglès es situen al principi de cadascun dels tres apartats principals corresponents a la introducció (1.1, 1.2 i 1.3) i un resum general dels objectius i de les conclusions per facilitar l'enteniment del contingut de cadascun d'aquests a les persones de no parla catalana. Al llarg de la memòria, a les parts escrites exclusivament en català, els anglicismes no s'han traduït al català si no que s'han indicat en cursiva. No procedeix incloure un resum en català/anglès als apartats de bibliografia i annexos.

Presentation of the thesis

The objective of the thesis is essentially, as stated in its title, to contribute to the molecular characterization of the spermatozoa in patients and controls through the application of proteomic techniques.

The memory of the thesis presented here is divided into seven parts. The first part, the introduction, contains the information of the spermatogenesis as a process and the protein content of the mature spermatozoa, the human male infertility/subfertility and the principles of the proteomic techniques. Next, the thesis objectives are listed, followed by the results as articles, the discussion of these results and the conclusions. Also, the publications referred in the introduction and discussion of this memory are listed in the "References" section. Finally, the annexes describe the most frequent protocols used during the development of the thesis together with the information of reagents used in these protocols. There is also a brief indication of the congresses, fellowships and abroad short stays in which I have participated. Finally, there is a listing of the abbreviations and anglicisms used in the present thesis memory.

The languages chosen to develop this memory have been English and Catalan. The basis of this thesis is the published articles and the article in preparation that have been included in the "Results" section. All these articles are written in English, with a summary in Catalan at the end. This summary in Catalan has been included to be consistent with the bilingual format of this memory. The other sections (introduction, objectives, discussion, conclusions and annexes) have been completely written in Catalan, with the incorporation of summaries in English except for the discussion section since this is already detailed in each of the articles. The summaries in English have been included at the beginning of each of the three main sections corresponding to the introduction (1.1, 1.2 and 1.3) and a general summary of the objectives, the discussion and the conclusions to facilitate the understanding of the contents of each part to the non-Catalan speakers. In the parts written exclusively in Catalan, the anglicisms have been not translated but are indicated in italics. It was not intended to include a summary in Catalan/English of the references and annexes.

Índex
Index

| | |
|---|-------|
| 1. Introducció / Introduction | 1-53 |
| 1.1. Human spermatozoa | 3 |
| 1.1. L'espermatozoide humà | 5-23 |
| 1.1.1. Espermatogènesi | 5-10 |
| 1.1.2. Composició proteica de l'espermatozoide humà | 10-23 |
| 1.1.2.1. Protamines | 11-14 |
| 1.1.2.2. Histones i variants d'histones | 14-19 |
| 1.1.2.3. Altres proteïnes espermàtiques | 19-23 |
| 1.2. Human male infertility | 25 |
| 1.2. Infertilitat humana masculina | 27-38 |
| 1.2.1. Definició i breu descripció dels mètodes més utilitzats | 27-28 |
| 1.2.2. Anàlisi espermàtic i paràmetres seminals | 28-34 |
| 1.2.2.1. Dany al DNA espermàtic | 32-34 |
| 1.2.3. Mètodes de selecció espermàtica i de fecundació <i>in vitro</i> | 35-38 |
| 1.3. Proteomics | 39 |
| 1.3. Proteòmica | 41-53 |
| 1.3.1. Definició i història | 41-44 |
| 1.3.2. Extracció, separació i tinció proteica | 44-48 |
| 1.3.3. Espectrometria de masses | 48-53 |
| 1.3.3.1. Identificació proteica per MALDI-TOF | 50-51 |
| 1.3.3.2. Identificació proteica per LC-MS/MS | 52-53 |
| 2. Objectius / Objectives | 57-62 |
| 2. Objectives | 59 |

| | |
|---|---------|
| 3. Resultats / Results | 65-202 |
| 3.1. Contingut de protamines i resultats de reproducció assistida / Protamine content and assisted reproductive outcome | 67-78 |
| 3.1.1. Article 1/ Article 1. | |
| de Mateo S, Gázquez C, Guimerà M, Balasch J, Meistrich ML, Ballescà JL, Oliva R (2009) Protamine 2 precursors (Pre-P2), protamine 1 to protamine 2 ratio (P1/P2), and assisted reproduction outcome. <i>Fertility and Sterility</i> 91:715-722..... | 69-76 |
| Resum en català | 77-78 |
| 3.2. Proteòmica de l'espermatozoide humà / Human sperm proteomics | 79-148 |
| 3.2.1. Article 2/ Article 2. | |
| de Mateo S, Martínez-Heredia J, Estanyol JM, Domínguez-Fandos D, Vidal-Taboada JM, Ballescà JL, Oliva R (2007) Marked correlations in protein expression identified by proteomic analysis of human spermatozoa. <i>Proteomics</i> 7:4264-4277..... | 81-94 |
| Resum en català | 95-96 |
| 3.2.3. Article 3/ Article 3. | |
| Martínez-Heredia J, de Mateo S, Vidal-Taboada JM, Estanyol JM, Ballescà JL, Oliva R (2008) Identification of proteomic differences in asthenozoospermic sperm samples. <i>Human Reproduction</i> 23:783-791..... | 99-107 |
| Resum en català | 109-110 |
| 3.2.2. Article 4 / Article 4. | |
| de Mateo S, Castillo J, Estanyol JM, Ballescà JL, Oliva R (2010) Nuclear protein characterization of human spermatozoa through CTAB treatment. <i>In preparation</i> | 113-146 |
| Resum en català | 147-148 |

| | |
|---|----------------|
| 3.3. Caracterització proteica d'espermatozoides humans seleccionats a través de gradients de densitat / <i>Proteomic characterization of human spermatozoa selected through density gradients</i>..... | 149-184 |
| 3.3.1. Article 5/ <i>Article 5</i>. | |
| de Mateo S, Ramos L, van der Vlag, de Boer P, Oliva R (2010) Improvement in chromatin maturity of human spermatozoa selected through density gradient centrifugation. <i>In press</i> | 151-181 |
| Resum en català | 183-184 |
| 3.4. Article de revisió / <i>Review</i>..... | 185-202 |
| 3.4.4. Article 6/ <i>Article 6</i>. | |
| Oliva R, de Mateo S, Estanyol JM (2009) Sperm cell proteomics. <i>Proteomics</i> 9:1004-1017. Review..... | 187-200 |
| Resum en català | 201-202 |
| 4. Discussió / <i>Discussion</i>..... | 205-230 |
| 4. <i>Discussion</i>..... | 207 |
| 4.1. Contingut de protamines i resultats de reproducció assistida..... | 209-211 |
| 4.2. Proteòmica de l'espermatozoide humà..... | 212-226 |
| 4.2.1. Caracterització proteòmica de l'espermatozoide humà..... | 212-218 |
| 4.2.2. Anomalies proteòmiques espermàtiques a pacients infèrtils..... | 219-226 |
| 4.3. Caracterització proteica d'espermatozoides seleccionats a través de gradients de densitat..... | 227-230 |
| 5. Conclusions / <i>Conclusions</i>..... | 233-238 |
| 5. <i>Conclusions</i>..... | 235 |
| 6. Bibliografia / <i>References</i>..... | 241-256 |

| | |
|---|---------|
| 7. Annexos / Annexes | 259-289 |
| 7.1. Protocols | 261-279 |
| 7.1.1. Protocol d'anàlisi proteòmic d'espermatozoides humans amb Gels Bidimensionals | 261-266 |
| 7.1.2. Protocol d'anàlisi de proteïnes nuclears espermàtiques | 267-272 |
| 7.1.3. Protocol d'obtenció de caps espermàtics amb CTAB | 273-274 |
| 7.1.4. Protocol d'immunofluorescència d'espermatozoides decondensats | 275-277 |
| 7.1.5. Protocols de tinció de gels d'acrilamida | 278-279 |
| 7.2. Preparació de solucions stock i informació comercial i d'emmagatzematge | 281-282 |
| 7.3. Participació a congressos, beques i estades a l'estranger | 283-285 |
| 7.4. Abreviatures, anglicismes i tecnicismes | 287-289 |
| | |
| Informe d'índex d'impacte..... | 291 |
| Informe de coautoria..... | 293 |
| <i>Acceptance letter for Article 5</i> | 295-296 |

1

1

Introducció

Introduction

Human spermatozoa

Spermatogenesis is the process that takes place in the seminiferous tubules of the testis in many species, where spermatogonia replicate and differentiate into primary spermatocytes which undergo genetic recombination to give rise to haploid round spermatids. Later, round spermatids experience marked changes in their cellular shape, epigenetic information and chromatin structure. This differentiation stage is called spermiogenesis and involves drastic changes in chromatin remodelling, through the histone to protamine transition, to generate a highly compacted sperm nucleus. This exchange of histones by protamines is not complete in the human mature sperm cell as 5 to 15% of the DNA is still organized by the testis-specific histones.

Protamines are the most abundant sperm nuclear proteins in humans. Their extremely basic charge and the formation of thiol and zinc bridges allow them to further stabilize the sperm chromatin. In human sperm, there are two protamines: the protamine 1 (P1) and the family of protamines 2 (P2). P2 is synthesised as a precursor that is further processed. The P1/P2 ratio has been used to determine the protamine balance of the sperm cell and has been related to infertility based on its association to sperm parameters and the assisted reproduction outcomes. Regarding the histones that remain in the sperm nucleus, the TSH2B (testis-specific H2B) is suggested to be involved in the pronucleus formation and the variants of histone H3 (H3.1/H3.2 and H3.3) are found to participate in the histone-protamine transition and in early embryo development. Histone posttranslational modifications (PTMs) such as acetylations are also relevant for the biology of the sperm cell suggesting that several PTMs of histones are important for the normal development of the spermatozoa and even after gamete fusion.

Human spermatozoa contain a great variety of proteins involved in different functions and that belong to different compartments of the cell. The proteomic study of the sperm cell has been based on different systems of polyacrylamide gel electrophoresis and immunodetection but the development of mass spectrometry (MS) techniques has enriched drastically the sperm protein description. Two main approaches have been applied to characterize the human sperm proteome: protein separation through bidimensional gels coupled to MALDI-TOF, and protein digestion and peptide identification through LC-MS/MS. Both MS technologies are complementary. Human sperm protein identification has described not only proteins required for the normal sperm function such as sperm motility, acrosome reaction or oocyte recognition but also nuclear proteins that are suggested to be leftovers of the spermatogenesis or to have potential role in the embryo development.

1.1. L'espermatzoide humà

1.1.1. Espermatogènesi

La gametogènesi és el mecanisme encarregat de la producció dels gàmetes (cèl·lules haploides) fonamentalment a través del procés anomenat meiosi. Els mascles i les femelles de les espècies animals que es reproduïxen sexualment tenen diferents formes de gametogènesi anomenades espermatogènesi i oogènesi respectivament. L'espermatogènesi, que és la producció dels gàmetes masculins o espermatozoides, té lloc als túbuls seminífers situats a dins de les gònades masculines o testicles (Figura 1). En els humans, aquest procés comença a la pubertat i es perllonga fins al final de la vida de l'individu. Consta de 3 fases anomenades mitosi, meiosi i espermiogènesi.

A la membrana basal dels túbuls seminífers es situen les primeres cèl·lules del procés de producció d'espermatozoides anomenades espermatogonis cèl·lules mare (Clermont 1972). Aquestes cèl·lules diploides experimenten la primera fase espermatogènica de mitosis, que consisteix en la proliferació d'aquestes amb divisions mitòtiques donant lloc a altres tipus d'espermatogonis. Hi ha una gran controvèrsia pel que fa als tipus d'espermatogonis que hi ha en els humans i pel que fa a les seves funcions, però es coneix que els espermatogonis tipus B són concretament els que entren a la següent fase del procés d'espermatogènesi donant lloc als espermatòcits primaris mitjançant també un procés de mitosi (Dym et al 2009).

A la segona fase té lloc el procés de meiosi, és a dir, la reducció del contingut genètic de la cèl·lula a la meitat al llarg de dos divisions meiòtiques donant lloc a una cèl·lula anomenada haploide (amb només un conjunt genètic). A la primera divisió meiòtica es parteix de cèl·lules diploides anomenades espermatòcits primaris. En aquests, es duplica el seu DNA ($2n$, $4c$), s'aparellen els cromosomes homòlegs (un del pare i un altre de la mare), i es produeix la recombinació genètica donant lloc als espermatogonis secundaris que són n , $2c$ (Figura 2, Zamudio et al 2008). Aquests últims, a través de la segona divisió meiòtica on es produeix la

separació de les cromàtides germanes de cada cromosoma recombinat, donaran lloc a les espermàtides rodones.

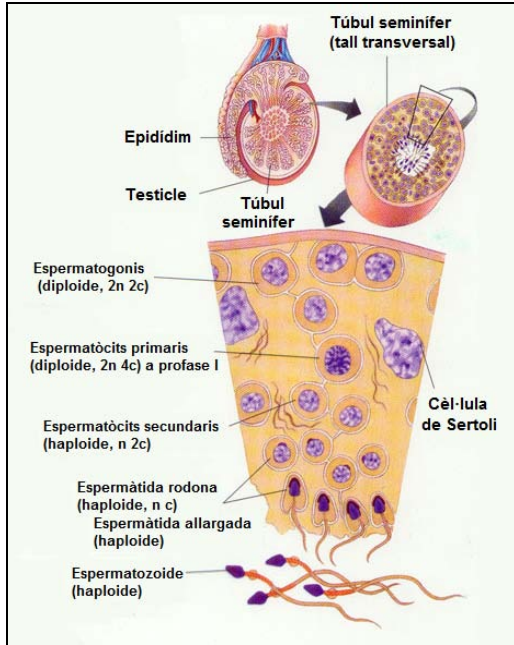


Figura 1. L'espermatogènesi es produeix als túbuls seminífers situats a dins de les gònades masculines. Es pot observar l'epiteli seminífer amb els diferents tipus de cèl·lules germinals (Modificat de la imatge a <https://courses.stu.qmul.ac.uk/smd/kb/microanatomy/humandev/index.htm>).

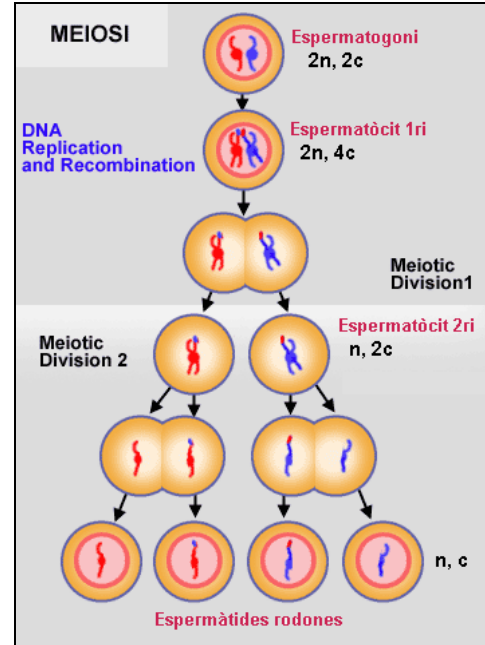


Figura 2. Procés de meiosi on es visualitzen les 2 divisions meiótiques que tenen lloc al llarg de l'espermatogènesi i que permeten la reducció del material genètic de les cèl·lules germinals (Modificat de <http://rationalwiki.com/wiki/Meiosis>).

Per últim, trobem la fase de diferenciació espermàtica o espermiogènesi, on les espermàtides rodones progressen a un estat cel·lular més avançat de maduració anomenat espermàtida allargada. Tot i que en aquesta fase no es produeix cap divisió cel·lular, l'espermàtida rodona experimenta grans canvis, entre ells, passa de ser una cèl·lula amb simetria radial (nucli central) a ser una cèl·lula amb el nucli desplaçat i un flagel que permet el moviment de la cèl·lula. Té lloc també la fusió de les vesícules de Golgi per formar la vesícula acrosòmica que conté enzims i es situa per sobre del nucli envoltant-lo 2/3 parts. Al costat oposat del nucli, els mitocondris es desplacen i es reuneixen, juntament amb els centriols, per acabar formant la peça intermèdia. Un dels centriols, el centriol distal, s'elonga cap al lumen del tub seminífer i forma el flagel. S'ha proposat un mecanisme per la formació del cap i la cua d'espermàtides de rosegadors on intervien estructures formades per elements del citoesquelet (Kierszenbaum and Tres 2004). En aquest mecanisme es troben implicats dos estructures de l'espermàtida rodona anomenades *acroplaxome* i *manchette*. L'*acroplaxome* es troba a l'espai entre

l'acrosoma i el nucli i està compost per F-actina i *Sak57* (homòleg de la queratina 5), entre d'altres proteïnes, i el *manchette* es troba rodejant el nucli espermàtic i es compon per un anell perinuclear format principalment per microtúbuls, *Sak57* i queratina 9 (Kierszenbaum et al 2003). D'aquest anell surt un mantell de microtúbuls que es suggereix que serveix per l'emmagatzemament de proteïnes que després es trobaran a la cua (Kierszenbaum and Tres 2002). Aquestes dos estructures apliquen unes forces a l'espermàtida rodona que promouen la formació de la cua i l'acrosoma a la vegada que participen en la formació del cap.

Al final d'aquests esdeveniments es produeix el canvi bioquímic més important de la espermiogènesi. Aquest consisteix en el desacoblament de les proteïnes que empaqueten el DNA, anomenades histones (estructura nucleohistona), i l'acoblament d'altres proteïnes només presents als espermatozoides, anomenades protamines (estructura nucleoprotamina) (Suau & Subirana 1977, Mezquita & Teng 1977 & 1978, Mezquita 1985, Oliva & Dixon 1991, Oliva 2006). L'estructura nucleoprotamina comporta una major compactació de la cromatina de l'espermatozoide. S'han postulat diferents teories sobre el sentit biològic d'aquest intercanvi proteic, entre elles aconseguir un cap més hidrodinàmic, protegir el material genètic d'agents externs que podrien danyar-lo i eliminar factors que podrien interferir després de la fecundació (Oliva 2006).

El recanvi histona-protamina no és complet i un 5-15% del DNA del nucli de l'espermatozoide humà madur roman empaquetat per histones (Gatewood et al 1987 & 1990, de Yebra & Oliva 1993, Zalensky et al 2002, Hammoud et al 2009a) constituint una estructura nucleosòmica que és més oberta que l'estructura nucleoprotamina. S'ha detectat que nucleosomes espermàtics perduren al zigot suggerint la possibilitat de transmetre informació epigenètica a l'embrió (van der Heijden et al 2006 & 2008). Més recentment s'ha trobat que els nucleosomes que romanen a l'espermatozoide humà estan significativament enriquits en gens importants pel desenvolupament embrionari (Arpanahi et al 2009, Hammoud et al 2009a).

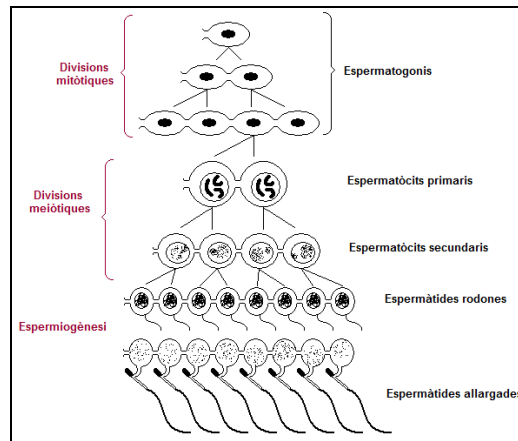


Figura 3. Ponts citoplasmàtics intercel·lulars observats durant tot el procés espermatogènic que permeten l'intercanvi de material entre totes les cèl·lules que es troben connectades gràcies a aquests (Il·lustració basada en Dym & Fawcett 1971).

Les divisions citoplasmàtiques que es produeixen durant el procés d'espermatogènesi no són completes i les cèl·lules filles queden unides entre elles per punts citoplasmàtics d'aproximadament un μm de diàmetre (Figura 3, Phillips 1970, Dym & Fawcett 1971). Les cèl·lules comparteixen citoplasma a través d'aquests punts, i per tant poden funcionar com si fossin cèl·lules diploides i d'aquesta manera produir espermatides cap al lumen del túbul d'una forma sincrònica (Erickson 1973). Aquest fet permet la supervivència d'aquelles cèl·lules que portin el cromosoma Y amb els productes gènics essencials provinents del cromosoma X (Hendriksen et al 1995). Un exemple podria ser el transcrit de la protamina 2 i el de la AKAP4 (*A-Kinase Anchor Protein 4*) que sembla que es transportin pels punts citoplasmàtics gràcies a la unió de la proteïna TB-RBP (*Testis Brain RNA-Binding Protein*), sent important ambdues proteïnes per l'espermatozoide (Morales et al 2002). Una vegada els espermatozoides testiculars s'alliberen al lumen del túbul seminífer, el procés de maduració d'aquestes continua mitjançant el seu pas per l'epidídim, fins arribar a ser espermatozoides madurs i mòbils a l'ejaculat. Durant aquest passatge, el complex nucleoprotamina s'estabilitza gràcies a l'oxidació dels tiols pertanyents als residus de cisteïnes de les protamines que ocasionen la formació de punts disulfur intra i intermoleculars (Saowaros & Panyim 1979, Rufas et al 1991, Vilfan et al 2004, Oliva 2006).

A humans, tot el procés d'espermatogènesi, des de l'espermatogoni fins a l'espermatozoide madur, dura aproximadament 64 dies (Heller & Clermont 1964). A la visualització d'un tall transversal d'uns $5 \mu\text{m}$ del túbul seminífer d'un rosegador només es pot veure un dels estadis del cicle d'espermatogènesi o *cell associations*. Contràriament, a l'humà, es pot veure més

d'un estadi simultàniament (Figura 4, Dym & Fawcett 1971), conclouent així que l'espermatogènesi humana té lloc de forma asincrònica al llarg del túbul seminífer.

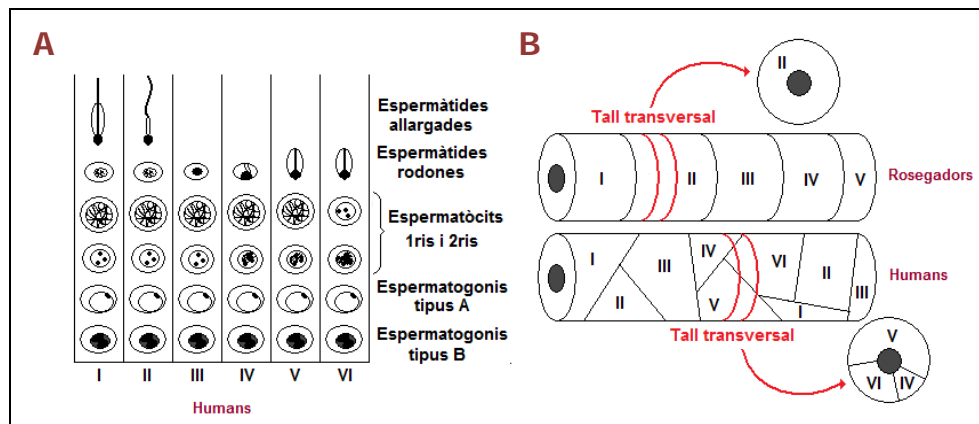


Figura 4. A) Representació esquemàtica dels 6 estadis diferents de l'espermatogènesi en humans (I-VI) establerts segons la fase en que es troba cada cèl·lula germinal que compon l'epiteli seminífer (il·lustració basada en Clermont 1963) B) En un tall transversal del tub seminífer de rosegadors s'observa un dels estadis de l'espermatogènesi (a dalt), en canvi, a humà, en un tall transversal es poden veure més d'un dels estadis de l'espermatogènesi a la vegada (a sota) (Representació d'un túbul seminífer de rosegador (a dalt) i d'humà (a sota)).

Els espermatozoides humans madurs que es troben a l'ejaculat són cèl·lules piriformes, deu mil vegades més petites que l'òvul, i amb capacitat de nedar a través d'un medi aquós. L'estructura de l'espermatozoide es troba simplificada a la Figura 5 i es compon per dos parts principals: cap i flagel. El cap de l'espermatozoide, d'uns 5 μm , conté el nucli de la cèl·lula que es troba envoltat per l'acrosoma en les seves dos terceres parts anteriors. L'acrosoma és una vesícula que conté enzims que facilitaran tant la penetració de l'espermatozoide a través de les capes cel·lulars que envolten l'òocit com la seva fusió amb aquest. El flagel està compost per altres parts anomenades peça intermèdia, cua i peça terminal. Entre la peça intermèdia i el nucli es troba el centríol proximal que forma part de la peça intermèdia i el centríol distal que origina el flagel. La peça intermèdia té una allargada d'uns 4-5 μm i conté també mitocòndries que proporcionen energia en forma d'ATP a la cèl·lula pel moviment flagel·lar. La cua és un flagel d'uns 35 μm que està format per les extensions de microtúbuls del centríol distal i que permet el moviment de la cèl·lula. L'espermatozoide és una cèl·lula especialitzada amb una estructura hidrodinàmica que ofereix una mínima resistència al moviment durant el seu viatge pel tracte femení per trobar-se finalment amb l'òocit.

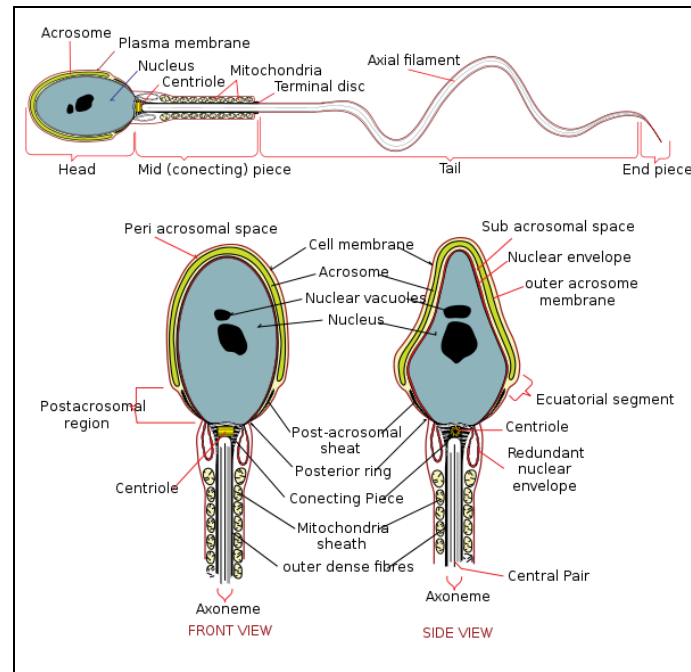


Figura 5. Estructura general de l'espermatozoide humà madur (a dalt). Més en detall, estructura del cap i la peça intermèdia (a sota). Cal destacar l'acrosoma que es troba a sobre el nucli, els microtúbuls que surten del centriol distal i s'allarguen formant la cua, i les mitocondries que produiran energia pel moviment de la cèl·lula (imatge extreta de la web <http://en.wikipedia.org/wiki/Spermatozoon>).

1.1.2. Composició proteica de l'espermatozoide humà

L'espermatozoide, gràcies a la seva facilitat d'obtenció, va ser una de les primeres cèl·lules on primer es va estudiar el seu contingut proteic. Així mateix, les protamines van ser unes de les principals proteïnes identificades al nucli del espermatozoide (Kossel 1928, Dixon & Smith 1968, Black & Dixon 1967, Suau & Subirana 1977, Mezquita 1985, Oliva and Dixon 1991, Oliva et al 2008). A més de les protamines del cap de l'espermatozoide de mamífers, s'han identificat també proteïnes de les diferents parts de la cèl·lula (cua, acrosoma i mitocondris), així com del citoesquelet i de la membrana (Oliva et al 2008). El fet de que el nucli de l'espermatozoide humà estigui compactat per $\geq 85\%$ de protamines i un 5-15% d'histones i altres proteïnes (Gatewood et al 1987 & 1990, de Yebra & Oliva 1993, Zalensky et al 2002, Hammoud et al 2009a) ha donat lloc a l'estudi de factors epigenètics, com són les modificacions i les variants d'histones que succeeixen o intervien al llarg de l'espermatogènesi (Oliva & Mezquita 1982, Rousseaux et al 2005). Cal destacar que els nous avenços en proteòmica són de rellevància ja que tenen un gran impacte en l'enteniment de la biologia de l'espermatozoide (Aitken & Baker 2008).

1.1.2.1. Protamines

Les protamines constitueixen més del 85% de les proteïnes nuclears de l'espermatozoide humà. Aquestes són riques en arginina i per tant es troben carregades molt positivament permetent la seva unió al DNA (Suau & Subirana 1977, Mezquita 1985, Oliva & Dixon 1991, Hud et al 1994). A mamífers hi ha 2 tipus de protamines, la protamina 1 i la família de protamines 2. La protamina 1 es troba a moltes espècies de vertebrats i la família de protamines 2 a alguns mamífers, incloent l'humà i el ratolí (Oliva & Dixon 1991). Existeix l'evidència de que les protamines han evolucionat a partir de la histona H1 (rica en lisina) incrementant el nombre d'aminoàcids amb càrrega positiva (arginines) (Lewis et al 2004, Erín-López et al 2006, Eirín-López & Ausió 2009). A més, s'ha suggerit també la unió de la H1 al solc menor del DNA de la mateixa manera que ho fan les protamines (Balhorn 1982, Roque et al 2004). Addicionalment, les protamines de mamífer han incorporat cisteïnes permetent la formació de ponts disulfur i de ponts de zinc (Bedford & Calvin 1974, Björndahl & Kvist 2010).

La protamina 1 és rica en arginina, cisteïna i tirosina i la seva seqüència, d'uns 50 aminoàcids, es troba ben conservada entre diferents espècies. Conté una regió central rica en arginines, una regió N-terminal molt conservada, residus específics que poden ser fosforil·lats i una regió C-terminal que té una major variabilitat entre espècies (McKay et al 1985, Ammer et al 1986). La família de protamines 2 està constituïda per la P2, P3 i P4, són riques en arginina, cisteïna i histidina, i es diferencien en 4 aminoàcids a la regió N-terminal (McKay et al 1986, Oliva 2006). Tenen una llargària de entre 54 i 58 aminoàcids. Una altra característica és la presència de petites regions conservades histidina-arginina-arginina i de motius Cys2-His2 (*zinc-finger*) (Bianchi et al 1992). Al contrari que la protamina 1, que es sintetitza la forma madura directament del gen PRM1, la família de protamines 2 es sintetitza en forma precursora de 106 aminoàcids a partir del gen PRM2 (Oliva 2006). Aquest precursor es processarà proteolíticament (Yelick et al 1987) per donar lloc als tres components majoritaris de la família esmentades anteriorment (McKay et al 1986, Oliva 2006).

L'estructura nucleoprotamina formada per la unió de les protamines amb el DNA, consisteix en subunitats toroïdals que contenen aproximadament 50Kb de DNA per subunitat (Figura 6 i 7A, Balhorn et al 1999, Balhorn 2007). Aquesta unió protamina-DNA difereix de la que es forma a través de la unió de les histones amb el DNA en l'estructura nucleosòmica. Les protamines s'uneixen al solc menor del DNA pel segment central de poliarginines neutralitzant així la

càrrega negativa del DNA. A un nivell estructural major, el complex protamina-DNA encaixa en el solc major d'una molècula paral·lela de DNA empaquetant-se linealment cara a cara (Balhorn 1982). Aquestes subunitats protamina-DNA s'enrotllen en cercles concèntrics compactant-se en una estructura amb forma de *doughnut* (Figura 6, Balhorn 1982, Ward 1993). A la vegada, es produeixen interaccions intra i interprotamines (Balhorn 1982), i amb més importància, es formen ponts disulfur entre les cisteïnes d'aquestes permetent més compactació de la cromatina espermàtica durant el passatge de l'espermatozoide per l'epidídim (Balhorn et al 1991, Saowaros & Panyim 1979), sent així 6 vegades més compacte el nucli espermàtic que el nucli de les cèl·lules somàtiques (Ward & Coffey 1991). També s'ha descrit la unió de la protamina als *Scaffold-Associated Regions* (SARs) suggerint que aquesta unió podria proporcionar un ordre espacial i temporal per la substitució de les histones per les protamines a l'espermatogènesi (Roque et al 2004). Aquesta elevada compactació característica del nucli espermàtic i deguda a l'estructura nucleoprotamina podria, entre d'altres funcions, protegir el DNA espermàtic d'agressions físiques i químiques que provenen del medi on es troben.

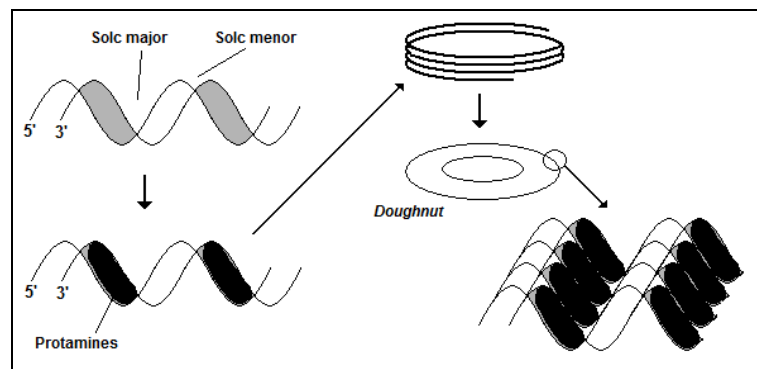


Figura 6. Compactació del DNA a una cèl·lula espermàtica segons el model del *doughnut*. Al nucli espermàtic les càrregues positives de les protamines s'uneixen al solc menor del DNA i neutralitzen les negatives d'aquest (dreta, a sota). Els complexos DNA-protamina s'empaqueten gràcies a forces de *Van der Waals* (esquerra, a sota) formant una estructura en forma de *doughnut* (Representació estreta de Ward 1993).

Tot i les diferències estructurals dels dos tipus de protamines, que podrien explicar diferents funcions d'aquestes, el contingut de protamina 1 i de família de protamines 2 és similar en l'espermatozoide humà de pacients fèrtils (Balhorn et al 1988, Corzett et al 2002). Per l'estudi del contingut de protamines, s'han desenvolupat diferents tècniques, com la immunodetecció d'aquestes (Ramos et al 2008), l'electroforesi amb gels àcids d'urea (Carrell & Liu 2001, Mengual et al 2003, Aoki et al 2005a & 2005b, Torregrosa et al 2006, Aoki et al 2006a & c) o

ambdues (Aoki et al 2006d, Zhang et al 2006, Hammoud et al 2009b). La determinació del contingut de protamines amb immunofluorescència (IF) es basa en les intensitats de les fluorescències de la detecció de cada protamina (Ramos et al 2008, Aoki et al 2006d, Hammoud et al 2009b). En canvi, amb els gels monodimensionals àcids, generalment es determina la relació de la quantitat de protamina 1 amb la de la protamina 2 (P1/P2, de Yebra & Oliva 1993, Torregrosa et al 2006, Aoki et al 2006b, Hammoud et al 2009b). Sembla que tant la determinació de la relació P1/P2 com l'anàlisi amb immunofluorescència són vàlids per la determinació de la proporció de protamines dels espermatozoides d'una mostra, ja que els resultats amb ambdues tècniques són similars o segueixen la mateixa tendència (Aoki et al 2006d, Hammoud et al 2009b). Tot i així, la relació de protamines a través de gels àcids s'ha utilitzat més habitualment que la seva immunodetecció, ja que sembla que la IF no és un mètode adequat per la seva quantificació (Ramos et al 2008) degut, possiblement, a que la presència d'elevades quantitats d'epítops corresponents a les protamines del nucli espermàtic fan que la quantificació de les protamines a través de la IF no sigui tan fiable com la determinació de la relació P1/P2 a través de gels àcids.

Utilitzant la tècnica d'electroforesis en gels àcids, variacions en la relació de protamines (P1/P2) s'han relacionat amb infertilitat masculina (Balhorn et al 1988, Belokopytova et al 1993, de Yebra et al 1993, Torregrosa et al 2006). L'alteració més comunament trobada a pacients infèrtils correspon a un relació de protamines elevada degut potencialment a una baixa quantitat de P2 o inclús a la seva absència i augment de la seva forma precursora (de Yebra et al 1998). Més recentment, s'ha trobat una relació P1/P2 baixa a pacients infèrtils com a conseqüència de possibles alteracions en l'expressió d'ambdós tipus de protamines (Aoki et al 2005a). S'han fet servir altres mètodes indirectes per la detecció d'anomalies en el contingut de protamines com és la tinció amb CMA3. La molècula de CMA3 competeix amb les protamines, i la seva unió al DNA espermàtic emet fluorescència posant en evidència una deficiència en el contingut de protamines o en la condensació del nucli de l'espermatozoide (Manicardi et al 1995). S'ha identificat una correlació inversa entre la unió de la molècula de CMA3 amb el DNA i el nivell de protaminació de l'espermatozoide (Bizzaro et al 1998), detectant d'aquesta manera hipo-protaminació a través de CMA3 a mostres infèrtils (Lolis et al 1996, Franken et al 1999, Nasr-Esfahani et al 2004, 2005).

La relació de protamines no només s'ha correlacionat amb paràmetres seminals si no també amb els resultats de reproducció assistida (veure apartat 1.2.3. per més informació sobre mètodes de reproducció assistida). S'ha detectat una taxa de fecundació menor en aquelles mostres amb una relació de protamines anormal (Aoki et al 2005a), i més concretament amb la utilització de la tècnica de fertilització *in vitro* (IVF) però no amb la de ICSI (Aoki et al 2006a). En aquest mateix treball, relacions baixes de protamines es detecten més freqüentment en aquelles parelles que no aconsegueixen un embaràs. De la mateixa manera que amb la relació de protamines, s'ha determinat una correlació entre la positivitat espermàtica amb CMA3 i la taxa de fertilització, però contràriament no amb la taxa d'embaràs (Razavi et al 2003, Nasr-Esfahani et al 2005 & 2008, Tavalaei et al 2009). Això fa pensar que el contingut de protamines podria estar involucrat en processos post-fertilització a través de la seva potencial relació amb la formació i manteniment de les modificacions epigenètiques de l'espermatozoide durant l'espermatogènesi. També s'ha suggerit que les alteracions en el contingut de protamines podrien ser un marcador de la fallada global del procés d'espermatogènesi.

1.1.2.2. Histones i variants d'histones

La espermàtida rodona, que té el DNA empaquetat amb histones (estructura nucleohistona), entra a la fase de diferenciació o espermiogènesi on es produirà la transició histona-protamina, entre d'altres canvis. Com a conseqüència de que aquest recanvi histona-protamina no es fa de forma totalment completa en humans, el nucli de l'espermatozoide humà està constituït en major part per protamines i un romanent d'histones (Figura 7A). Part d'aquestes histones consisteixen en variants d'histones específiques de testicle i histones amb modificacions tals com metilacions i acetilacions (Rousseaux et al 2005).

Les histones són proteïnes bàsiques riques en lisina i arginina, de baix pes molecular i molt conservades evolutivament en eucariotes. A les cèl·lules somàtiques, les histones s'uneixen al DNA i formen les unitats estructurals anomenades nucleosomes. El conjunt de nucleosomes constitueix el que s'anomena cromatina. Hi ha cinc tipus d'histones, les histones nucleosomals (H2A, H2B, H3 i H4) i la histona d'unió H1. El nucleosoma consisteix en un octàmer format per dos histones nucleosomals de cada tipus, envoltat per 146 parells de bases de DNA que donen lloc a 1,75 voltes (Figura 7B). La histona H1 uneix el DNA que entra i surt del octàmer a través del seu domini C-terminal (CTD), del qual s'ha descrit també la seva unió amb *Scaffold-*

Associated Regions (SARs) (Roque et al 2004). Les histones nucleosomals poden experimentar modificacions a residus específics com són acetilacions, metilacions, fosforilacions o ubiquitinacions (Berger 2002) que permeten l'accés al DNA o no d'altres factors que participen en la replicació o transcripció. També la incorporació de variants d'histones poden permetre la remodelació de la cromatina durant la espermiogènesi (Malik & Henikoff 2003).

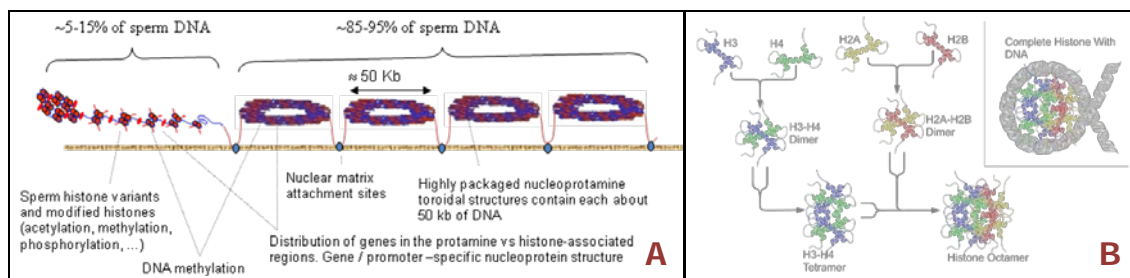


Figura 7. Model d'organització del DNA espermàtic i estructura nucleosòmica clàssica de les cèl·lules somàtiques **A**) Organització de la cromatina en el nucli espermàtic amb regions nucleohistona i regions nucleoprotamina (Oliva & de Mateo 2010) **B**) Representació esquemàtica de l'acoblament de les histones al DNA per la formació dels nucleosomes a les cèl·lules somàtiques (Extret de la wikipedia: <http://en.wikipedia.org/wiki/Histone>).

Durant el procés de remodelació de la cromatina, i al pas intermedi entre la sortida de les histones i l'entrada de les protamines, hi ha la incorporació de les proteïnes de transició (TNPs, Figura 8, Meistrich et al 2003, Rousseaux et al 2005, Oliva 2006). Les proteïnes de transició es troben presents a molts mamífers incloent ratolins i humans. N'hi ha 2 tipus més importants que corresponen a TNP1 i TNP2. Les TNPs són més bàsiques que les histones però menys que les protamines i sembla que tenen un paper important en la condensació del nucli de l'espermatida, ja que ratolins amb delecions dels gens de les proteïnes de transició són infèrtils amb una general baixada en el percentatge de formes normals espermatiques, la mobilitat, la condensació de la cromatina i el processament del precursor de la família de protamines 2 (Shirley et al 2004, Zhao et al 2004).

Més en detall, al llarg de la remodelació de la cromatina i abans del desacoblament de les histones, es produeix la incorporació de variants d'histones al DNA espermàtic i seguidament la hiperacetilació de les histones (Rousseaux et al 2005, Oliva 2006). Una vegada les histones hiperacetilades es desacoblen del DNA, les proteïnes de transició s'incorporen i més endavant les protamines reemplacen aquestes últimes. És important saber que les protamines es troben fosforil·lades abans de la seva incorporació a la cromatina i són defosforil·lades una vegada formen una estructura estable amb el DNA (Oliva & Dixon 1991). Gràcies a la formació de

punts disulfur entre les protamines que te lloc *in vitro*, durant el pas de l'espermatozoide per l'epidídim i *in vitro*, s'aconsegueix una estabilització addicional de l'estructura nucleoprotamina i una major compactació de la cromatina (Saowaros & Panyim 1979, Rufas et al 1991, Balhorn et al 1992). Més recentment s'ha proposat un model alternatiu on l'espermatozoide a l'ejaculat ràpidament experimenta una estabilització de la cromatina reversible depenent de zinc. D'aquesta manera el zinc estabilitza l'estructura i preveu la formació d'un excés de punts disulfur mitjançant la formació de punts de zinc amb els tiols de les cisteïnes de les protamines (Björndahl & Kvist 2010). Tot i que s'ha estudiat molt la transició nucleohistona-nucleoprotamina encara queda molt per esbrinar.

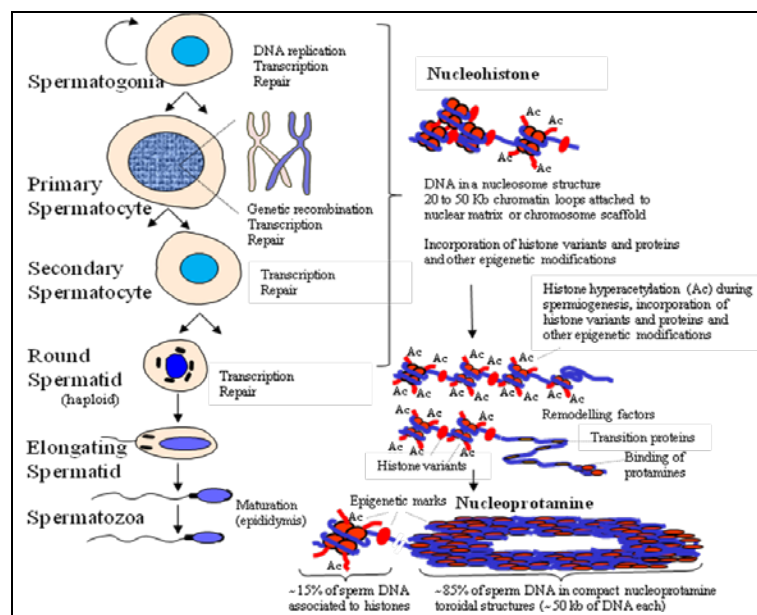


Figura 8. Canvis en l'estructura de la cromatina durant la espermatogènesi. A la fase de diferenciació s'acoblen variants d'histones, les histones s'hiperacetil·len, s'incorporen les proteïnes de transició i finalment les protamines. L'espermatozoide madur conté una major part del seu genoma empaquetat amb protamines en una estructura toroidal (Modificat de Oliva 2006).

L'espermatozoide madur conté una sèrie de variants de les histones H2A, H2B i H3 (Henikoff et al 2004). Tot i que la detecció d'un elevat contingut d'histones o nucleosomes s'ha trobat relacionat amb infertilitat (Blanchard et al 1990, Zhang et al 2006), s'ha suggerit la presència de variants específiques de testicle i de certes modificacions postraduccionals en aquests participen en el correcte funcionament de l'espermatozoide. Així mateix, la proporció d'espermatozoides positius per la variant de la histona H2B, anomenada TSH2B (*Testis/Sperm-specific Histone H2B*, Zalensky et al 2002), és menys variable a donants que a pacients infèrtils (Singleton et al 2007a). A més, es va observar que pacients oligoastenoteratozoospermics (OAT, infèrtils) tenen a l'ejaculat menys espermatozoides que contenen TSH2B comparat amb

normozoospèrmics (fèrtils) (Ramos et al 2008). Addicionalment, Singleton va suggerir que la histona TSH2B podria estar involucrada en la formació del pronucli masculí post-fertilització ja que es va veure que els espermatozoides que contenen TSH2B decondensaven més ràpidament i amb major grau (Singleton et al 2007b). A més a més, s'ha suggerit que la TSH2B podria subministrar una plataforma per la incorporació de variants d'histones durant la espermiogènesi (Govin et al 2007). Recentment, s'ha vist que la TSH2B humana es posiciona a gens importants per l'espermatogènesi (Hammoud et al 2009a) suggerint que la TSH2B podria promoure la seva transcripció o prevenir l'empaquetament d'aquests gens amb les protamines.

Unes altres variants d'histona importants i estudiades a les cèl·lules espermatogèniques són les variants de la histona H3. Hi ha diferents subtipus de histona H3: CenH3 localitzada als centròmers, i les H3 canòniques. Existeixen 2 conjunts de variants de la histona H3 segons la dependència que té la seva expressió: variants dependents de replicació/independents de transcripció (H3.1/H3.2) i variant independent de replicació/dependent de transcripció o variant de reemplaçament (H3.3). Com indica el seu nom, les variants de replicació (H3.1/H3.2) es troben al nucleosoma quan hi ha síntesi de DNA i la variant de reemplaçament (H3.3) quan no n'hi ha (Ahmad & Henikoff 2002a & b). Les histones H3.1/H3.2 espermatogèniques s'expressen i dipositen al DNA durant la fase S (replicació) del DNA, i la pèrdua d'aquestes i incorporació de la variant H3.3 s'ha determinat com un marcador d'eliminació de nucleosomes durant l'espermatogènesi (van der Heijden et al 2007). S'ha postulat que els nucleosomes que contenen les variants de replicació de la histona H3 podrien ser més resistents a la remodelació durant l'elongació nuclear en espermatozoides de pacients OAT comparat amb pacients normozoospèrmics (Ramos et al 2008, van der Heijden et al 2007). Tot i que després de la fusió dels gàmetes, quan les histones H3.1/H3.2 maternes es dipositen al pronucli, no hi ha síntesi de DNA, s'han trobat també les variants H3.1/H3.2 paternes en zigots abans de la fase S pronuclear, fent pensar que hi ha nucleosomes paternes que podrien servir com a plantilla per a la replicació en el zigot on la informació epigenètica pot ser copiada (van der Heijden et al 2008). En quant a la variant H3.3 i com he dit anteriorment, es diposita al DNA després de la sortida de les histones somàtiques a l'espermatozoide durant la espermiogènesi. Dit d'una altra manera, la transició histona-protamina resultarà conseqüentment en un contingut elevat d'histona H3.3 paterna a l'espermatozoide (van der Heijden et al 2005, van der Heijden et al 2007). Això suggereix que les histones H3.3 podrien proporcionar una via de reprogramació epigenètica de la cromatina sexual requerida per silenciar gens en la línia germinal de mamífers (van der Heijden et al 2007). Després de la fecundació, els nucleosomes

que contenen histones paternes H3.3 probablement contribuiran a la cromatina paterna del zigot (van der Heijden et al 2008) o inclús a transmetre memòria d'estats transcripcionals en absència de transcripció gènica (Ng & Gurdon 2008).

Les modificacions postraduccionals a les histones són també de gran importància ja que contenen una informació epigenètica valuosa que potencialment participen en el funcionament de l'espermatozoide. Les acetilacions en les histones poden ser a les serines N-terminals sense estar sotmeses a cap *turnover* i a les lisines N-terminals sotmeses a una ràpida inducció i *turnover*. L'acetilació de les histones redueix la càrrega positiva neta d'aquestes i permet el seu alliberament del DNA facilitant el recanvi histona-protamina (Oliva & Dixon 1991). Addicionalment, la acetilació de les histones actua com a senyal o codi de reconeixement per altres proteïnes. S'han estudiat amb més deteniment les acetilacions de la histona H4 produïdes per les proteïnes CDY (*Chromodomain Protein, Y-linked*). A humans, dos gens CDY es situen a la regió AZFc del cromosoma Y. Aquesta regió AZFc s'ha trobat delecionada a pacient infèrtils amb una fallada espermatogènica, suggerint que les proteïnes CDY podrien tenir un paper important a l'espermatogènesi (Lahn et al 2002) ja que s'ha observat una associació forta entre la delecio del gen CDY1 i la infertilitat (Giachini et al 2005). La importància de l'estudi de l'acetilació de la histona H4 resideix, en part, en que s'han demostrat acetilacions en H4 durant l'espermiogènesi immediatament abans de la transició histona-protamina (Grimes & Henderson 1984, Meistrich et al 1992). A més a més, s'han detectat les acetilacions H4K8ac i H4K12ac a la heterocromatina pericentromèrica d'espermatozoides de ratolí i durant l'expansió nuclear paterna post-fertilització, proposant la possibilitat d'actuar juntes al zigot en la reconstrucció de la partició eucromatina-heterocromatina espermàtica o dels cromosomes somàtic-semblants paternes després de la fecundació, i possiblement també per la conservació de la metilació CpG del DNA (van der Heijden et al 2006). A més de la transmissió d'informació epigenètica al zigot, recentment s'ha detectat l'acetilació H4K12ac enriquida a gens importants pel desenvolupament embrionari (Arpanahi et al 2009).

Tornant a l'espermatozoide madur, l'evidència de que les estructures nucleosòmiques que es mantenen en l'espermatozoide podrien estar relacionades amb el desenvolupament embrionari ha estat un tema sempre latent (Gardiner-Garden et al 1998, Wykes & Krawetz 2003). Però no ha sigut fins recentment que s'han caracteritzat els gens que es troben

enriquets en histones formant l'estructura nucleosòmica a l'espermatozoide (Hammoud et al 2009a, Arpanahi et al 2009). En aquests treballs es conclou que hi ha un enriquiment de gens importants pel desenvolupament embrionari primerenc a les estructures nucleohistona, corroborant el que s'havia sospitat amb anterioritat de que la presència d'illes genòmiques que mantenen l'estructura somàtica de la cromatina podrien ser marcatges essencials per l'establiment de la informació genètica correcta en la descendència (Rousseaux et al 2005, Oliva 2006).

1.1.2.3. Altres proteïnes espermàtiques

Tot i que les protamines van ser una de les primeres proteïnes identificades al nucli del espermatozoide (Balhorn et al 1977, Oliva & Dixon 1991), l'espermatozoide conté una gran varietat de proteïnes específiques conegudes i per conèixer que podrien ser importants pel funcionament correcte de la cèl·lula, tant abans com després de la fertilització. Així mateix, a més de les protamines descrites al nucli de l'espermatozoide, també s'han detectat amb menor abundància altres proteïnes a diferents regions del nucli espermàtic potencialment rellevants per la cèl·lula estructural o funcionalment (Bellvé et al 1992). D'altra banda, els nous mètodes de pre-fraccionament proteic, la millora en les tècniques d'identificació proteica basades en l'espectrometria de masses (MS) i la capacitat de comparar perfils proteòmics dels diferents estats funcionals de l'espermatozoide ens estan facilitant la definició d'elements proteòmics específics que tenen una importància funcional a la cèl·lula (Aitken & Baker 2008).

Inicialment, l'estudi del proteoma de l'espermatozoide es basava en dos estratègies diferents: gels de poliacrilamida o cromatografia i posterior caracterització de les proteïnes per seqüenciació, i gels bidimensionals i detecció proteica amb *Western Blot* (Oliva et al 2008). Emprant aquests mètodes es va aconseguir caracteritzar diverses proteïnes espermàtiques i la seva funció a la cèl·lula (Mezquita 1985, Oliva and Dixon 1991, Meistrich et al 2003, Kierszenbaum & Tres 2004, Balhorn 2007, Oliva et al 2008). Més recentment, amb les noves tècniques d'espectrometria de masses (veure punt 1.3.) s'ha aconseguit caracteritzar més en profunditat el proteoma de l'espermatozoide humà així com d'altres espècies (Oliva et al 2008). D'aquesta manera, l'estudi del proteoma de la cèl·lula d'interès, consisteix actualment en l'extracció de les proteïnes, reducció de la complexitat amb la separació d'aquestes o dels seus pèptids i l'aplicació de l'espectrometria de masses i cerca a les bases de dades de la informació extreta a través de la MS per tal de identificar cada proteïna o pèptid.

La separació proteica per gels bidimensionals acoblada a l'espectrometria de masses ha estat i s'està fent servir per la caracterització proteica de moltes cèl·lules. Breument, als gels bidimensionals les proteïnes es separen primer pel seu punt isoelèctric i després per la seva massa molecular (veure secció 1.3.). El resultat d'aquesta tècnica de separació de les proteïnes dóna lloc a *spots* que es visualitzen amb plata o altres mètodes de tinció (Figura 9), s'escindeixen i es procedeix a la seva identificació proteica mitjançant espectrometria de masses. Aquest mètode s'ha fet servir comunament per caracteritzar tant el proteoma total de l'espermatozoide (Naaby-Hansen et al 1997, Li et al 2007, Martínez-Heredia et al 2006), com de compartiments o parts de l'espermatozoide. També s'ha tret partit de diverses característiques moleculars de l'espermatozoide o patologies morfològiques (Shetty et al 2001, Baker et al 2005, Lefièvre et al 2007, Kumar et al 2009, Liao et al 2009) per descriure el proteoma de diferents estats fisiològics de la cèl·lula. Per a efectes més comparatius, s'ha dissenyat un mètode que utilitza gels bidimensionals i mostres marcades amb fluorocroms anomenat 2D-DIGE (*Two-Dimensional Difference Gel Electrophoresis*) que permet analitzar *in situ* diferències del contingut proteic entre una mostra problema i una mostra control (Figura 10, Baker et al 2005, Liao et al 2009). Així mateix, amb la tècnica de 2D-DIGE s'han arribat a identificar centenars de proteïnes de rata que es troben específicament a les cèl·lules espermatogèniques mitòtiques (espermatòcits), meiotiques (espermatòcits) i post-meiotiques (espermatides), amb el conseqüent l'establiment de perfils d'expressió a través d'un elevat nombre de proteïnes durant l'espermatogènesi no patològica (Rolland et al 2007).

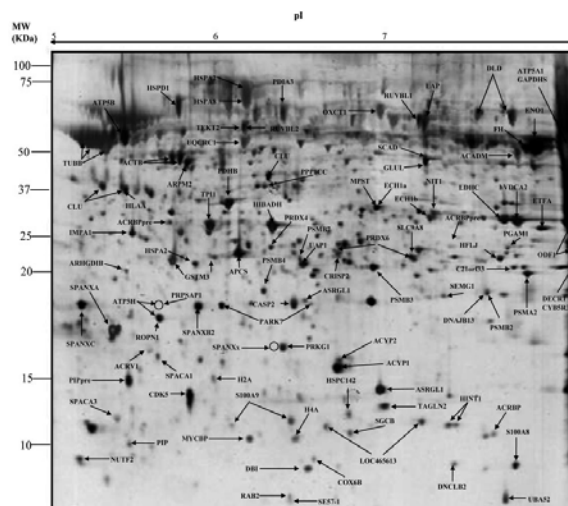


Figura 9. Mapa proteic de l'espermatozoide humà. Cada *spot* es troba caracteritzat per un punt isoelèctric i una massa molecular concreta de la proteïna o proteïnes (2 o 3) que hi conté (Martínez-Heredia et al 2006).

Per a la identificació proteica s'han utilitzat diferents estratègies basades en l'espectrometria de masses (MS). Resumidament, la MS consisteix en la determinació de la massa dels pèptids obtinguts després de la digestió proteica de la mostra a identificar i comparació del *fingerprint* o llista de masses dels pèptids de la mostra problema amb una base de dades (més informació al punt 1.3.3.). Les tècniques més utilitzades en la caracterització del proteoma de l'espermatozoide són el MALDI-TOF i LC-MS/MS. El MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight*) s'aplica comunament a mostres poc complexes com poden ser els *spots* d'un gel bidimensional que contenen de 1 a 3 proteïnes diferents amb el mateix punt isoelèctric i la mateixa massa (Figura 9). El LC-MS/MS (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry/Mass Spectrometry*) combina el poder separador de la cromatografia líquida dels pèptids amb el poder detector del espectròmetre de masses i pot identificar varies desenes de proteïnes partint de mostres més complexes, com poden ser bandes d'un gel monodimensional de poliacrilamida que contenen varies proteïnes.

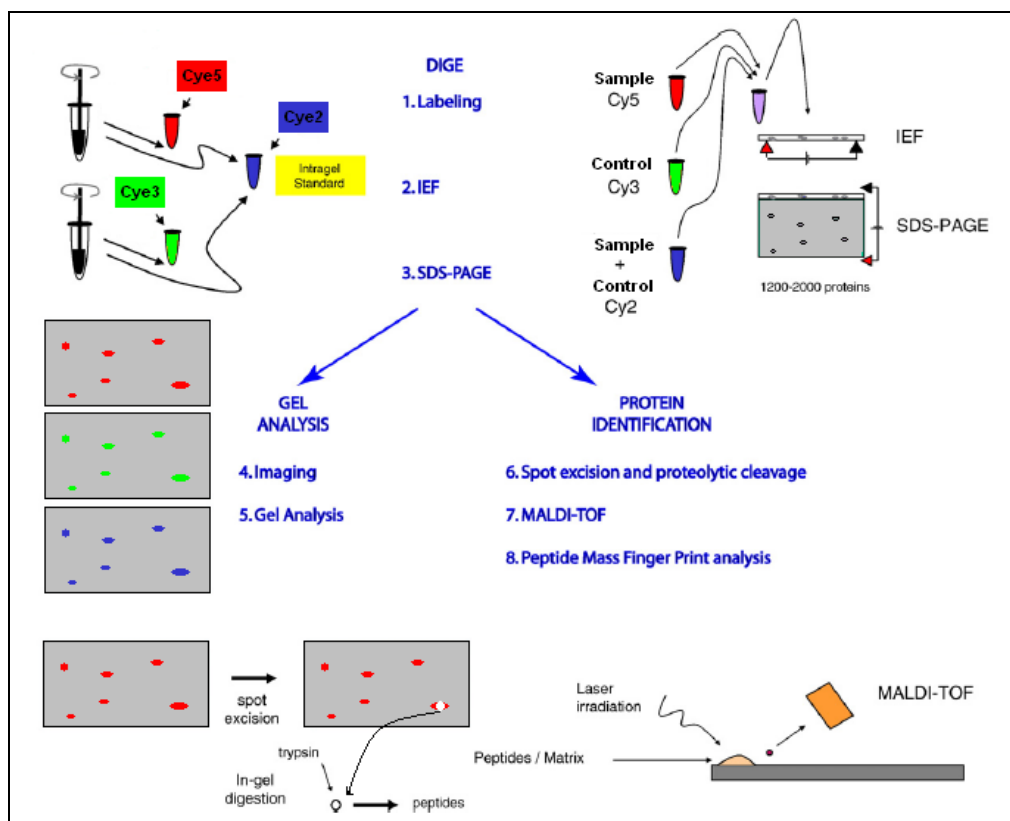


Figura 10. Esquema del protocol de 2D-DIGE. Tant les proteïnes de la mostra problema com els de la mostra control es tenyeixen amb els marcadors específics (Cy3 i Cy5), i una barreja equitativa d'aquestes es tenyeix també amb Cy2 com a control estàndard *intragel*. La barreja de totes les proteïnes marcades es separen segons el seu punt isoelèctric (IEF) i llavors segons la seva massa molecular (SDS-PAGE). S'analitza la imatge obtinguda amb un *software* especial per gels 2D i les proteïnes/*spots* amb diferents abundàncies al gel entre la mostra i el control s'escindeixen i s'analitzen per MS amb MALDI-TOF per tal de identificar-les (Imatge modificada de Jamesdaniel et al 2009).

Per la caracterització del proteoma de l'espermatozoide s'han desenvolupat estratègies que combinen les tècniques de separació proteica i d'espectrometria de masses descrites anteriorment en aquesta memòria, entre d'altres tècniques. Al 2005 va ser publicat el primer treball on s'esmentava que s'havia aconseguit identificar un ampli nombre de proteïnes de l'espermatozoide humà (Johnston et al 2005), tot i així les proteïnes identificades no es van fer públiques a aquest article. Posteriorment, 98 proteïnes van ser identificades pel nostre grup amb gels bidimensionals i la tècnica de MALDI-TOF (Martínez-Heredia et al 2006). Aquest treball va caracteritzar, per tant, el mapa proteic 2D de l'espermatozoide humà amb un centenar d'*spots* identificats (Figura 9) donant la oportunitat a altres laboratoris a analitzar les seves mostres sense tenir que fer ús de l'espectrometria de masses a través de gels 2D. Posteriorment, un altre grup (Baker et al 2007) va identificar i reportar una llista de 1.056 proteïnes de l'espermatozoide humà amb LC-MS/MS. Amb la mateixa tècnica de MS es va descriure el proteoma de l'espermatozoide d'altres espècies de mamífer com és el de ratolí (Baker et al 2008a) i el de rata (Baker et al 2008b).

Entre les proteïnes identificades a l'espermatozoide humà s'han trobat sorpreses, com és la presència de factors de transcripció i d'altres proteïnes nuclears (Martínez-Heredia et al 2006, Baker et al 2007, Lefièvre et al 2007, Oliva et al 2008). La importància d'aquesta troballa resideix en que l'espermatozoide tradicionalment s'havia pensat que era una cèl·lula que només tenia la funció de transmetre el material genètic a l'oòcit (Oliva & Dixon 1991). Actualment se sap que l'espermatozoide proveeix a l'oòcit amb factors de transcripció i proteïnes nuclears que podrien ser simplement el resultat de l'activitat transcripcional que té l'espermatozoide durant l'espermatogènesi. D'altra banda, s'ha suggerit també la possibilitat de que aquestes proteïnes nuclears tinguessin una funció epigenètica en el desenvolupament primerenc del zigot després de la fusió dels gàmetes (Oliva 2006, Oliva et al 2008).

A més de la descripció qualitativa del proteoma de l'espermatozoide, s'han fet estudis quantitius on es comparen els nivells d'abundància de les proteïnes presents a controls fèrtils i a pacient infèrtils, proporcionant així l'oportunitat d'identificar potencials marcadors de patologies espermàtiques concretes. L'estudi proteòmic aporta informació de quines proteïnes conté l'espermatozoide patològic com a resultat d'un procés d'espermatogènesi que ha pogut fallar. D'aquesta manera, es van comparar els nivells de les proteïnes del proteoma obtingut amb gels bidimensionals d'un pacient que va patir una fallada en la fecundació amb

controls donants de semen proporcionant la identificació de 20 proteïnes amb diferents quantitats, o absents/presents, als espermatozoides del pacient (Pixton et al 2004). Un treball similar però comparant pacients astenozoospèrmics amb donants va caracteritzar una desena de proteïnes amb diferents quantitats a les mostres patològiques (Zhao et al 2007). També recentment i utilitzant la tècnica de 2D-DIGE, s'han trobat 35 proteïnes expressades diferencialment entre un pacient globozoospèrmic (cap rodó) i donants (Liao et al 2009). Addicionalment als estudis proteòmics que comparen pacients amb patologies i donants, i ja que sembla que l'espermatozoide no té activitat transcripcional, i per tant no hi ha síntesis de noves proteïnes a les cèl·lules madures (Brewis & Wong 1999), les comparacions entre els proteomes de diferents estats fisiològics o de maduració d'aquest són de gran importància. Així, comparar l'espermatozoide de testicle amb el de l'ejaculat, o l'espermatozoide capacitat amb un de no capacitat, ens podria posar en evidència les modificacions postraduccionals rellevants que experimenten algunes proteïnes de la cèl·lula per aquests processos, i esbrinar els mecanismes que regulen la funció espermatogènica (Aitken & Baker 2008).

Per acabar, el coneixement de la funció de les diverses proteïnes a l'espermatozoide humà juntament amb la integració del seu proteoma amb els processos metabòlics o modificacions de les proteïnes que hi succeeixen, ens podria proporcionar l'enteniment dels processos més importants de la maduració post-testicular de l'espermatozoide (Aitken & Baker 2008). Aquest enteniment ens donaria peu tant a la troballa de tractaments per algunes infertilitat humanes masculines com a tractaments contraceptius.

Human male infertility

Human infertility concerns both partners of a couple and it is defined as the impossibility to reach a pregnancy or to deliver offspring. The main cause of male infertility is the testis functional failure. This failure can be investigated by the sperm and seminal analysis through the measurement of the sperm count, the sperm motility and the percentage of spermatozoa with normal forms, among other characteristics. Thresholds of these parameters have been established by the World Health Organization (WHO) to describe the fertility status of a semen sample that could advise for suitable fertility treatments to achieve a pregnancy.

Sperm DNA damage compromises the genetic information that is delivered to the oocyte. Although sperm nuclear integrity is not incorporated into the routine clinical sperm analysis, several studies have suggested a relation of the sperm DNA damage and infertility. Assisted reproduction outcomes also seem to be affected by the alterations of the sperm nuclear integrity. However, the lack of standardization of most of the techniques used for sperm DNA damage determination makes it difficult to be implemented together with the seminal parameters as a routine in the diagnostic workout of the infertile/subfertile patient.

Assisted reproductive (AR) laboratories intend to solve fertility problems by helping spermatozoa to fertilize. Most of the interventions include selection of sperm cells that are more competent for fertilization through different techniques, depending on the semen quality, such as migration, gradient centrifugation or filtration. Assisted fertilization is based on the two most popular techniques which are the *In vitro fertilization* (IVF), where the fertilization takes place outside the body, and the intracytoplasmic sperm injection (ICSI) where a sperm cell is injected into an oocyte. In both techniques, the high-quality zygotes are transferred to the female uterus to allow pregnancy. Nevertheless, some infertilities are not solved by AR probably due to the existence of yet unknown physiopathogenic mechanisms.

1.2. Infertilitat humana masculina

1.2.1. Definició i etiologia

La infertilitat o esterilitat humana es defineix com la inhabilitat biològica d'una persona per contribuir a la concepció, així com l'estat d'una dona que és incapaç de portar un embaràs a terme (Makar & Toth 2002). Una altra forma de dir-ho, la infertilitat es defineix com la incapacitat de reproduir-se (Vanrell 1992). Hi ha tres tipus de infertilitat, la infertilitat primària on la parella mai ha obtingut un embaràs, la secundària on la dona ha tingut fills anteriorment o ha estat embarassada però ha donat lloc a avortaments i la terciària on l'home o la dona tenen fills amb la parella anterior però no entre ells.

Tot i que he considerat i es considera a la "Real Academia de la Lengua" infertilitat i esterilitat com a sinònims, n'hi ha autors que diferencien els termes. Per una part, infertilitat fa referència a la repetició d'avortaments i esterilitat a la incapacitat de concebre un embaràs (Vanrell 1992), per l'altra banda, el "*American College of Obstetrics and Gynecologist*" defineix la infertilitat com l'absència o disminució de la concepció amb irreversibilitat i la esterilitat amb capacitat reversible. També s'ha establert infertilitat com la incapacitat de tenir un embaràs després d'un any o més de relacions sense protecció (ASRM 2008). Amb l'aplicació i els avenços de les tècniques de reproducció assistida aquesta irreversibilitat es va redefinint contínuament.

Un altre terme relacionat amb la fertilitat és el de subfertilitat, on també es pot definir com la incapacitat d'aconseguir un embaràs a terme després d'un any de relacions sense protecció. D'aquesta manera, la parella es defineix com menys fèrtil que una parella típica. Tot i que hi pot haver confusió amb tots aquests termes i definicions, la infertilitat o qualsevol dels seus possibles sinònims és la impossibilitat d'una parella de concebre un embaràs i portar-lo a terme en un període d'un any de relacions sense protecció. La importància d'aquest fet està en que la infertilitat s'aplica a la parella independentment de si un o ambdós puguin tenir o no la capacitat fecundant reduïda (Ballescà 2002).

Entre el 10 i el 20% de les parelles en edat reproductiva són infèrtils. D'aquests, en un 30-40% dels casos, els problemes de fertilitat provenen de l'home o de la dona, i en un 10-30% dels casos el problema prové de la parella o és desconegut (Medline). Les causes d'infertilitat poden ser de 2 tipus: causes centrals on s'inclouen causes anatòmiques, genètiques, hormonals i immunològiques, i causes que es poden prevenir com són les infeccions i les iatrogèniques. Les causes centrals tenen una prevalença d'un 5% i les causes que es poden prevenir tenen un percentatge variable en diferents parts del món (Sharma et al 2009).

En general, les causes que afecten a la fertilitat humana són la qualitat del semen (comptatge i mobilitat espermàtica), que depèn de la correcta funció dels testicles i del procés espermatogènic, i en el cas de la dona, la qualitat dels oòcits i la correcta funció dels ovaris. A la meitat dels casos la etiologia d'una fallada funcional testicular es troba desconeguda (infertilitat idiopàtica) (Krausz and Giachini 2007). Tot i que a l'espermatogènesi es troben involucrats molts gens, només s'han identificat uns pocs polimorfismes involucrats en la infertilitat ja que aquesta pot ser de natura multifactorial. Les delecions del cromosoma Y en són un exemple ja que s'ha trobat una associació d'aquestes amb successos d'azoospermia/oligozoospermia (Giachini et al 2005). A més, en ambdós sexes, els problemes en l'estructura dels aparells reproductors, així com obstruccions de conductes i anomalies al material gènic (aberracions cromosòmiques i gèniques), poden comprometre la fertilitat en la parella. Tot i així, cal tornar a remarcar que la infertilitat es defineix com un problema de la parella.

1.2.2. Anàlisi espermàtic i paràmetres seminals.

En tot estudi de fertilitat, en primer lloc es dur a terme l'estudi de la qualitat del semen mitjançant el procediment anomenat seminograma. El manual de laboratori per l'examinació i processament del semen humà (WHO 2010) explica detalladament i d'una manera estàndard les pautes necessàries per l'examen de l'ejaculat humà que han de seguir els laboratoris d'andrologia. El semen produït a l'ejaculat es compon per una suspensió d'espermatozoides en un líquid constituït per les secrecions dels òrgans sexuals accessoris. Comunament, una vegada el semen s'ha liquat, es determina el volum, la viscositat, el pH, la concentració

espermàtica, la mobilitat dels espermatozoides, la vitalitat i la morfologia d'aquests, entre d'altres proves. Si es detecta una elevada concentració d'altres cèl·lules com poden ser limfòcits, es necessita un examen bacteriològic addicional de la mostra. També s'ha d'avaluar la presència d'aglutinació (unió entre espermatozoides) o agregació (unió d'espermatozoides amb altres cèl·lules). L'anàlisi bioquímic de la funció de les glàndules accessòries (determinació zinc, fructosa i neutral glucosidasa) també està recomanat. S'han establert uns valors mínims de les característiques seminals per expressar la qualitat del semen analitzat (Taula 1).

| Paràmetre | Límit inferior de referència |
|---|------------------------------|
| Volum seminal (ml) | 1,5 |
| Nombre total d'espermatozoides (10^6 per ejaculat) | 39 |
| Concentració espermàtica (10^6 per ml) | 15 |
| Motilitat progressiva (PR) | 32 |
| Motilitat total (PR+NP, %) | 40 |
| Vitalitat (espermatozoides vius, %) | 58 |
| Morfologia espermàtica (formes normals, %) | 4 |
| pH | $\geq 7,2$ |
| Leucòcits positius per peroxidasa (10^6 per ml) | < 1 |
| MAR test (espermatozoides mòbils units a partícules, %) | < 50 |
| <i>Immunobead</i> test (espermatozoides mòbils units a boles,%) | < 50 |
| Zinc seminal (μmol /ejaculat) | $\geq 2,4$ |
| Fructosa seminal (μmol /ejaculat) | ≥ 13 |
| Glucosidasa neutra seminal (mU/ejaculat) | ≥ 20 |

Taula 1. Valors mínims de referència de les característiques del semen (Modificat de WHO 2010).

La determinació de la qualitat del semen es defineix per una nomenclatura determinada (Taula 2). Els casos més extrems són la aspèrmia o absència d'ejaculació i la azoospèrmia o absència d'espermatozoides al ejaculat. La determinació de la concentració, mobilitat i presència d'altres cèl·lules i/o agregacions es realitza amb un anàlisi microscòpic a través de personal qualificat o de sistemes informàtics com el CASA (*Computer-Aided Sperm Analysis*). Per avaluar la morfologia espermàtica o percentatge d'espermatozoides amb morfologia "normal" cal fer una extensió de la mostra en un portaobjectes, fixar els espermatozoides i tenyir-los per visualitzar les parts d'aquest. Una de les tècniques de tinció més utilitzades és el *Diff-Quik*, que consisteix en tres solucions que s'utilitzen en el següent ordre: el fixador, el Xanten eosinofílic que tenyeix estructures bàsiques com la peça intermèdia o la gota citoplasmàtica i la Tiazina basofílica que tenyeix estructures àcides com el nucli (Figura 11). En l'avaluació de la morfologia espermàtica, el límit inferior de formes normals d'un ejaculat ha anat disminuït al

llarg del temps (Menkveld 2010). A la versió anterior del manual WHO (WHO 1999) no es va indicar cap valor específic encara que es va suggerir un punt de tall al 15% de formes normals. En aquesta nova versió es proposa un 4% de formes normals per definir la morfologia espermàtica d'un ejaculat com a normal. S'ha establert aquest 4% com a límit a través de l'estudi estadístiques de dades publicades (Cooper et al 2010).

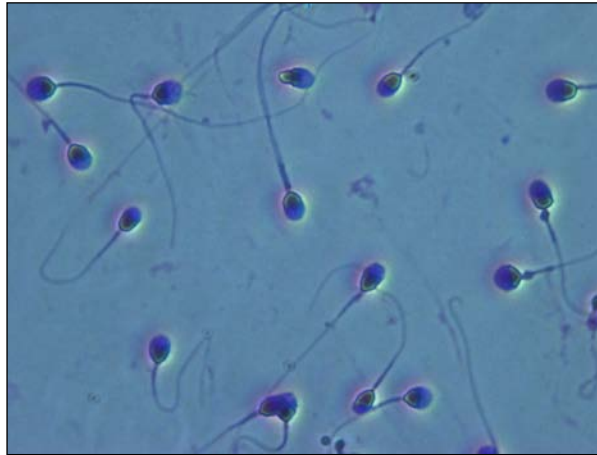


Figura 11. Imatge de microscòpia òptica on es poden observar els espermatozoides tenyits amb *Diff-Quik* a 1000 augments. Es pot observar l'espermatozoide amb el cap (estructura àcida) marcat amb tiazina basofílica (lila) i la peça intermèdia i cua tenyides amb xanten eosinofílic (vermell).

Per la caracterització de la motilitat espermàtica d'un ejaculat, i de forma diferent a edicions anteriors a aquest manual (WHO 1999), es defineixen tres tipus de motilitat de l'espermatozoide humà:

- Motilitat progressiva (PR): l'espermatozoide es mou activament, tant linealment com en un gran cercle, independentment de la velocitat d'aquest.
- Motilitat no progressiva (NP): altres tipus de motilitat de l'espermatozoide però sense progressió.
- Immobilitat (IM): no moviment de l'espermatozoide.

Per tant, una mostra es defineix com astenozoospermic o amb espermatozoides amb mobilitat reduïda (Taula 2) quan la mobilitat progressiva la presenten menys del 32% dels espermatozoides (WHO 2010). Els valors anteriors de normalitat per la mobilitat espermàtica (WHO 1999) han sigut fins ara aquells que s'han utilitzat a estudis previs a la publicació del nou manual (Zhao et al 2007) i per tant cal esmentar quins eren. Un ejaculat es considerava que tenia motilitat normal quan més del 25% dels espermatozoides es movien ràpida i

rectilíniament (motilitat tipus A) o més del 50% dels espermatozoides tenien una motilitat tipus A i/o es movien d'una manera lenta tant rectilínia com curvilínia (tipus B).

| Nomenclatura | Descripció |
|---------------------------|--|
| Aspèrmia | No producció de semen |
| Azoospèrmia | No espermatozoides al semen (segons el límit del mètode de quantificació utilitzat) |
| Criptoospermia | No observació d'espermatozoides a la preparació fresca però sí al <i>pellet</i> després d'una centrifugació |
| Normozoospermia | Nombre total d'espermatozoides a l'ejaculat (o concentració espermàtica), motilitat PR i formes normals dels espermatozoides de l'ejaculat per sobre el límit inferior |
| Necrospèrmia | Baix percentatge d'espermatozoides vius a l'ejaculat i gran percentatge d'espermatozoides immòbils |
| Oligozoospermia | Nombre total d'espermatozoides a l'ejaculat (o concentració espermàtica) per sota el límit inferior |
| Astenoospermia | Percentatge d'espermatozoides amb motilitat progressiva (PR) sota el límit inferior de referència |
| Teratoospermia | Percentatge de formes normals dels espermatozoides de l'ejaculat per sota el límit inferior |
| Oligoastenoospermia | Nombre total d'espermatozoides a l'ejaculat (o concentració espermàtica) i motilitat PR sota el límit inferior |
| Oligoteratoospermia | Nombre total d'espermatozoides a l'ejaculat (o concentració espermàtica) i formes normals dels espermatozoides de l'ejaculat per sota el límit inferior |
| Astenoteratoospermia | Percentatge d'espermatozoides amb motilitat PR i formes normals dels espermatozoides de l'ejaculat per sota el límit |
| Oligoastenoteratoospermia | Nombre total d'espermatozoides a l'ejaculat (o concentració espermàtica), motilitat PR i formes normals dels espermatozoides de l'ejaculat per sota el límit inferior |
| Hematospèrmia | Presència d'eritròcits al ejaculat |
| Leucitospèrmia | Presència de leucòcits a l'ejaculat per sobre el límit |

Taula 2. Nomenclatura de la qualitat del ejaculat amb relació a la qualitat espermàtica (Modificat de WHO 2010).

Els nous límits establerts al manual de laboratori del WHO (WHO 2010) s'han extret de valors espermàtics d'homes amb paternitat recent provada, i han sigut utilitzats per indicar si un pacient necessita un tractament de fertilitat o no (Cooper et al 2010). D'aquesta manera, no és estrany trobar un ejaculat diagnosticat amb una o varies patologies simultàniament indicant que el procés d'espermatogènesi no ha sigut satisfactori per causes que poden ser desconegudes. L'estudi de mostres espermàtiques amb paràmetres seminals anormals o sota el límit establert pot donar lloc a la caracterització molecular de la patologia o d'un marcador

patològic i per tant, a la cerca de tractament o millora de la possibilitat fertilitzant dels espermatozoides.

1.2.2.1. Dany al DNA espermàtic.

La integritat del DNA, tant del oòcit com de l'espermatozoide, és una característica fonamental a tenir en compte per aconseguir un fecundació amb èxit. L'estudi del DNA de l'oòcit humà no és factible a causa del caràcter invasiu que té l'obtenció d'aquests. En canvi, l'estudi del dany al DNA de l'espermatozoide s'està realitzant a estudis d'infertilitat però no a l'estudi diagnòstic que té lloc d'una manera rutinària al laboratori d'andrologia.

El dany al DNA pot manifestar-se de diferents formes com poden ser talls a la cadena de DNA, llocs on s'ha perdut una base nuclear (abàsics), modificacions de les bases com la formació de 8-hidroxiguanina o unions covalents entre cadenes de DNA o entre DNA i proteïnes (Aitken et al 2009). La fragmentació del DNA produïda a través de talls a la cadena de DNA fa perillar la integritat del material genètic que ha de formar part del zigot i per tant pot comportar al no progrés d'aquest. Els talls al DNA poden ser tant d'una cadena com de les dues. Gràcies a la capacitat de reparació del DNA que té l'oòcit al zigot (Aitken et al 2009), talls d'una cadena de DNA podrien ser reparats després de la fusió de gàmetes ja que l'altra cadena no tallada podria servir de plantilla. En canvi, els talls de doble cadena poden conduir a la pèrdua de fragments cromosòmics durant la formació del pronucli i donar lloc a avortaments o aberracions cromosòmiques desequilibrades a la descendència.

S'han descrit diferents tècniques per la detecció del dany al DNA espermàtic (Garrido et al 2008, Sigman et al 2009). Hi ha dos tipus de tècniques, les que detecten directament el trencament al DNA i les indirectes, que mesuren la susceptibilitat del nucli a ser danyat a través de la determinació de la facilitat d'aquest a ser decondensat (Sigman et al 2009). En quant a les tècniques directes trobem el TUNEL (*Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-mediated 2'-deoxyuridine 5'-triphosphate (dUTP)-Nick End-Labeling*) i l'assaig de COMET o "*Single cell gel electrophoresis*". El TUNEL mesura la presència d'hidroxils 3' lliures procedents del talls de la cadena de DNA (Gorczyca et al 1993) gràcies a la incorporació de bases nuclears marcades fluorescentment a aquests hidroxils lliures (Figura 12). Aquest mètode pot detectar talls al DNA de cadena simple o doble (Zini et al 2001, Domínguez-Fandos et al 2007). El

percentatge de cèl·lules marcades o danyades d'una mostra s'obté a partir de l'observació de preparacions al microscopi de fluorescència o a través de citometria de flux (Zini & Sigman 2009, Domínguez-Fandos et al 2007). A l'assaig de COMET, espermatozoides decondensats s'exposen a una electroforesi en gel d'agarosa. La migració dels fragments de DNA espermàtics provocada pel camp elèctric que es crea durant l'electroforesi dóna lloc a la visualització d'una cua semblant a un cometa que és més o menys llarga depenent del nivell de fragmentació que té la cèl·lula (Ostling & Johanson 1984). L'assaig de COMET sota condicions neutres detecta només talls de cadena doble, i sota condicions alcalines detecta tant talls de cadena doble com de cadena simple. Unes de les tècniques indirectes més comunes són el SCSA (*Sperm Chromatin Structure Assay*) i el SCD (*Sperm Chromatin Dispersion*). L'SCSA consisteix en la unió del *dye* o marcador anomenat taronja d'acridina al DNA. Si el DNA és de doble cadena s'emet una fluorescència verda però si és de cadena simple la fluorescència és vermella (Larson et al 2000). En el cas del SCD, es mesura la dispersió del DNA mitjançant la formació d'un halo sota condicions desnaturalitzants que es correlaciona inversament amb la presència de fragmentació del DNA (Garrido et al 2008).

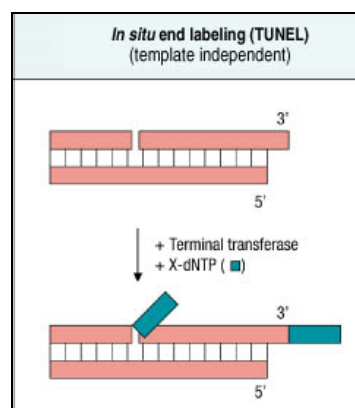


Figura 12. Principi de la tècnica de TUNEL. La incorporació de nucleòtids (dNTPs) marcats amb un *dye* fluorescent (FITC verd, TMR vermell) al hidroxil 3' es fa gràcies a la *Terminal Transferase* detectant d'aquesta manera els talls al DNA (Extret del manual "*Apoptosis, Cell Death, and Cell Proliferation, 3rd Edition*" Roche Applied Science).

A través de l'estudi de la integritat del DNA de l'espermatozoide s'han publicat diversos treballs que mostren que pacients infèrtils tenen més dany al DNA que els pacients fèrtils (Evenson et al 1980, Henkel et al 2004, Tesarik et al 2004, Mehdi et al 2009), ja que la fragmentació del DNA espermàtic es relaciona amb els paràmetres seminals (Lopes et al 1998, Irvine et al 2000, Hammadeh et al 2001a, Sakkas et al 2002, Muratori et al 2003). S'ha

demonstrat també una relació entre el contingut de protamines i el dany al DNA (Manicardi et al 1995, Aoki et al 2006b, Nili et al 2009). A més a més, la presència de precursors de la família de protamines 2 es troba relacionada inversament amb valors de dany al DNA mesurats amb TUNEL (Torregrosa et al 2006).

Altres estudis han relacionat el dany al DNA amb els resultats de reproducció assistida (RA). Una revisió que inclou aquest tema (Oliva & de Mateo 2010) conclou que hi ha una gran dispersió dels resultats degut a varis factors, com són la varietat de tests de dany al DNA emprats, les variacions metodològiques de cada test (Domínguez-Fandos et al 2007), el temps que transcorre des de l'ejaculat fins l'avaluació del dany al DNA (Gosálvez et al 2009) i la recollida i processament de les mostres espermàtiques (Donnelly et al 2000, Young et al 2003), entre d'altres. Tot i aquesta dispersió, s'ha fet un metanàlisi on s'observa que hi ha una relació entre els resultats de dany al DNA i els resultats de la fertilització, seguint una tendència segons la tècnica de reproducció assistida emprada per la fertilització (Zini and Sigman 2009) (veure secció 1.2.3. per a més informació de les tècniques de RA). S'ha observat que una elevada incidència d'espermatozoides danyats al ejaculat afecta al embaràs en el cas de no tenir cap assistència mèdica, amb inseminació artificial (IUI) i més dèbilment amb fertilització *in vitro* (IVF). En canvi, amb la tècnica d'ICSI, el dany al DNA sembla no intervenir en la obtenció d'embarassos arribant a la conclusió de que la tècnica de ICSI fa un potencial *bypass* del possible estat detrimental dels espermatozoides, produint contràriament la disminució dels embarassos en els casos de IUI o IVF.

Els resultats de l'assessorament del dany al DNA d'alguns dels test esmentats anteriorment correlacionen entre ells (Chohan et al 2006) i amb paràmetres seminals. Tot i així, la determinació de la fragmentació del DNA espermàtic encara no s'ha incorporat al manual de laboratori de l'organització mundial de la salut (WHO 2010) com un anàlisi rutinari més en tot estudi diagnòstic. Addicionalment, petites variacions a passos concrets de protocols utilitzats per la detecció de dany espermàtic, com és el TUNEL, poden resultar en diferents mesuraments en la fragmentació del DNA, al contrari que passa quan la tècnica segueix amb unes condicions establertes (Muratori et al 2009). Concloent, l'evidència de que el dany al DNA afecta als resultats de fertilització fa que es necessiti un perfeccionament, i sobretot una estandardització global, en l'assessorament de la integritat del DNA espermàtic per tal d'incorporar aquest paràmetre a l'estudi de l'espermatozoide humà a laboratoris d'andrologia.

1.2.3. Mètodes de selecció espermàtica i de fecundació *in vitro*

La utilització de les tècniques de reproducció assistida s'ha popularitzat durant els últims temps per solucionar problemes d'infertilitat o per facilitar l'obtenció d'un embaràs espontani. Degut a la gran variabilitat dels pacients que atenen les clíniques de fertilització, és necessària la personalització del diagnòstic i del tractament de la parella per optimitzar la eficàcia i seguretat dels resultats (Fauser et al 2008). Mitjançant els nous avenços en les tècniques de reproducció assistida (RA), s'ha aconseguit que parelles que no podien reproduir-se de manera natural, ho aconsegueixin amb la RA. Reproducció assistida o fecundació artificial consisteix en el tractament de la infertilitat gràcies a la manipulació dels gàmetes. Tot i que les tècniques emprades per la reproducció assistida són cares, invasives, tenen un èxit limitat (25% dels cicles donen un naixement) (Nyboe-Andersen et al 2009), comporten riscos i no es troben àmpliament disponibles, la utilització d'aquestes ha augmentat últimament degut a que les parelles tenen fills més tardanament (Barratt et al 2009).

Actualment, no hi ha tractaments disponibles per l'espermatozoide humà patològic, excepte per l'apropament d'aquest al oòcit gràcies a la RA (Barratt et al 2009). Hi ha varis tipus de tècniques en reproducció assistida, però dos de principals que tenen en comú que la fecundació es produeix fora de l'úter de la dona. Aquestes són la fertilització *in vitro* (IVF) i la injecció intracitoplasmàtica (ICSI). La IVF s'utilitza quan hi ha suficient quantitat d'espermatozoides a l'ejaculat com per posar-los en contacte amb l'oòcit en un medi i deixar que un espermatozoide fecundi l'oòcit (Figura 13A). En canvi, l'ICSI s'utilitza quan hi ha pocs espermatozoides disponibles a l'ejaculat (factor masculí) i consisteix en l'elecció d'un espermatozoide mòbil i la introducció d'aquest al citoplasma de l'oòcit mitjançant una agulla molt fina i específica (Figura 13B). Aquesta última tècnica obvia molts passos que succeeixen naturalment durant la fertilització. Aquest fet podria tenir conseqüències a llarg termini com és l'aparició d'anomalies a l'embrió que podrien resultar en avortament o que podrien ser potencialment transferides a la descendència (Barroso et al 2009). Una altra tècnica utilitzada en reproducció assistida és la inseminació intrauterina (IUI), que es tracta d'una tècnica menys agressiva que IVF o ICSI i consisteix en la introducció d'espermatozoides seleccionats en el tracte reproductor de la dona.

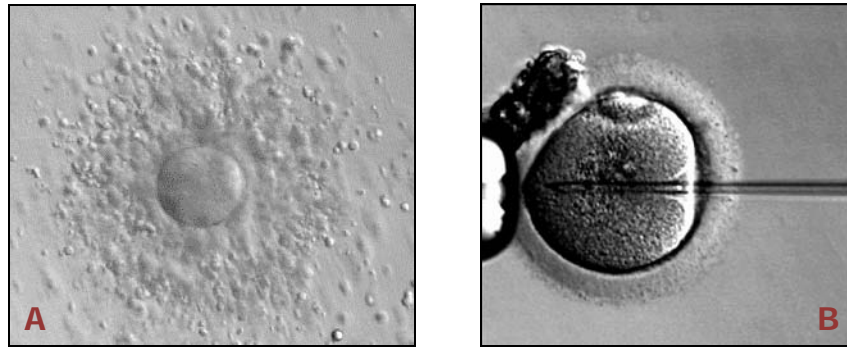


Figura 13. Tècniques de fertilització *in vitro* més comunament utilitzades al laboratori de reproducció assistida. **A)** A la tècnica de *In vitro fertilization* (IVF), els espermatozoides rentats es posen en contacte amb els oòcits despullats de les cèl·lules que l'envolten (imatge extreta de http://en.wikipedia.org/wiki/File:Oocyte_granulosa_cells.jpg corresponent a un oòcit no despullat, amb cèl·lules de la granulosa) **B)** A la *Intracytoplasmic sperm injection* (ICSI), s'escull un espermatozoide mòbil, se li trenca la cua i s'injecta al oòcit madur amb una agulla superfina (Extret de <http://en.wikipedia.org/wiki/File:lcsi.JPG>). S'observa posteriorment el resultat de la fecundació i els zigots de bona qualitat es col·loquen a l'úter de la dona.

A gairebé totes les intervencions que es produeixen a la clínica de fertilització per tal de facilitar la concepció, es controla hormonalment l'activitat reproductora de la dona. Essencialment es controla l'estimulació fol·licular del ovari per saber en quin moment es produirà la ovulació i aconsellar la parella per tenir relacions sexuals, per realitzar la IUI o per extreure els fol·licles (on es troben els oòcits) i realitzar la fecundació *in vitro* (fora del cos de la dona). En el cas de l'home, en tot cicle de reproducció assistida, la selecció dels "millors" espermatozoides de l'ejaculat o l'eliminació del fluid seminal de la mostra també és obligatori.

A través dels resultats de reproducció assistida s'ha observat que espermatozoides defectius podrien afectar més enllà del procés de fertilització, senyalant el fet de que defectes paternals podrien ser determinants pel desenvolupament anormal del zigot (Barroso et al 2009). Des del inici de les tècniques de reproducció assistida en humans, els científics han intentat millorar les tècniques de selecció espermàtica per aconseguir un enriquiment d'espermatozoides mòbils i funcionalment competents per la fertilització (Henkel & Schill 2003). La selecció espermàtica selecciona i separa els espermatozoides mòbils dels immòbils, dels morts, de les cèl·lules contaminants i d'altres microorganismes, iniciant a la vegada la capacitació o activació de la mobilitat espermàtica i així facilitar la inseminació dels oòcits (Centola et al 1998).

Les tècniques de selecció es poden diferenciar en diferents tipus com migració, on es seleccionen els espermatozoides segons el moviment propi de l'espermatozoide; centrifugació en gradient de densitat, on la selecció té lloc gràcies a la combinació de la mobilitat de la

cèl·lula espermatogènica i la seva retenció als marges de les fases, i filtració que aprofita la mobilitat del espermatozoide i la seva adherència a matrius de filtració. L'eficiència d'obtenció d'espermatozoides no patològics d'aquestes tècniques depenen de la qualitat del ejaculat (Henkel & Schill 2003), per tant s'ha d'escollir quin o quina combinació és la més adient per a cada mostra.

Breument, les tècniques de selecció espermàtica més utilitzades al laboratori d'andrologia són el *swim-up* i la centrifugació en gradients de densitat. El procediment *swim-up* és la tècnica més utilitzada i s'aplica en els casos de normozoospermia i infertilitat femenina (Henkel & Schill 2003) ja que es seleccionen els espermatozoides mòbils del ejaculat. Després d'un rentat del semen per centrifugació, es diposita a sobre del *pellet* d'espermatozoides un medi nou adient per aquests, seleccionant d'aquesta manera els espermatozoides mòbils que han nedat cap aquest nou medi. Els avantatges i inconvenients d'aquesta tècnica es troben llistats a la taula 3. Com a controvèrsia, tot i que els espermatozoides seleccionats amb aquesta tècnica poden patir dany al DNA causat per espècies reactives d'oxigen provinents de les cèl·lules que es troben en contacte al *pellet* (Ford 1990), aquests tenen significativament el dany al DNA reduït comparat amb la mostra inicial no tractada (Zini et al 2000, Piomboni et al 2006).

| Avantatges | Inconvenients |
|---|---|
| Fàcil de fer | Limitat a ejaculats amb elevat comptatge i motilitat |
| Molt rentable | |
| Normalment es recupera una fracció molt neta amb espermatozoides mòbils | Baix rendiment |
| | Els espermatozoides poden ser danyats per espècies d'oxigen reactives. |
| | Disminució significant del percentatge d'espermatozoides amb la cromatina condensada amb normalitat |

Taula 3. Avantatges i inconvenients de la tècnica de selecció anomenada *swim-up* (Modificat de Henkel & Schill 2003).

En la centrifugació en gradient de densitats els espermatozoides rentats en suspensió es col·loquen sobre un conjunt de gradients de densitat. Tot aquest conjunt es centrifuga suaument per seleccionar els espermatozoides que aconseguixin arribar al *pellet* (Pousette et al 1986). Hi ha diversos medis de densitat que es poden fer servir per construir els gradients, entre ells el *Percoll* i el *PureSperm*. Tot i que el *Percoll*, gradient format per partícules de silicona cobertes amb PVP, va ser utilitzat inicialment als laboratoris de reproducció assistida,

aquest va ser retirat del mercat per finalitats clíniques al 1996 ja que es van identificar efectes tòxics pels gàmetes (Pharmacia Biotech 1996). Altres medis han sigut dissenyats per substituir el *Percoll*, com és el *PureSperm* que consisteix en partícules de silicona recobertes amb silà (Centola et al 1998). La centrifugació en gradients de densitat no només selecciona els espermatozoides morfològicament normals i mòbils, sinó també aquells que tenen una compactació de la cromatina adient segons la seva determinació amb CMA3 (Hammadeh et al 2001b), entre d'altres avantatges que es descriuen a la taula 4. Recentment, s'ha trobat una disminució de la relació P1/P2 i un augment d'histones als espermatozoides seleccionats al *pellet* després de la centrifugació en gradient (Hammoud et al 2009b) conclouent que, tot i així, aquesta baixa relació de protamines trobada als espermatozoides seleccionats és més similar a la dels donants de semen fèrtils que la que es troba als espermatozoides de la mostra abans de ser seleccionada. Per tant, els gradients de densitat no són només una eina de selecció de poblacions d'espermatozoides segons els seus paràmetres seminals i de condensació nuclear, sinó també a nivell de les proteïnes nuclears que contenen.

| Avantatges | Inconvenients |
|---|--|
| Normalment s'obté una fracció neta amb espermatozoides mòbils | La producció de bones interfases entre els diferents medis requereix molt de temps |
| Espermatozoides de ejaculats amb poca densitat espermàtica es poden separar | Una mica més car |
| Bon rendiment | Risc potencial d'endotoxines |
| Leucòcits són eliminats en gran part | Percoll® no pot ser utilitzat per IVF/ICSI |
| Espècies d'oxigen reactives es redueixen significativament | |

Taula 4. Avantatges i inconvenients de la tècnica de selecció anomenada centrifugació en gradient de densitat (Modificat de Henkel & Schill 2003).

Tot i que les tècniques de reproducció assistida han millorat molt des dels seus inicis, moltes parelles infèrtils encara fallen reiteradament en aconseguir un embaràs a terme a través de la reproducció assistida. El gran desconeixement de la cèl·lula espermàtica podria explicar l'actual impossibilitat de trobar una solució per aquestes parelles. Hi ha evidències que demostren que l'estudi proteòmic de l'espermatozoide podria donar lloc a la informació necessària per explicar les causes d'aquelles infertilitats desconegudes i ajudar a la troballa de possibles tractaments, o simplement a entendre millor la biologia fonamental del gàmeta masculí.

Proteomics

The word proteome was introduced to define the protein complement expressed from a genome. Proteomics is the study of the proteins, their structure and function in the normal and pathologic physiology of cells or tissues. Hence, proteomics aims at the qualitative and quantitative protein description, the description of the protein localization and the determination of the protein-protein interactions. The one of the first approaches described for protein characterization was two-dimensional gel electrophoresis (2D) where the proteins are first separated typically through their isoelectric point and second through their molecular weight. Recent advances on mass spectrometry technology and the description of the complete genome of several species have greatly facilitated the characterization of the sperm proteome.

Mass spectrometry is an analytic technology that allows protein identification. It is based on the trypsinization of a protein sample and measurement of resulting peptide masses through the mass/charge ratio (m/z) determination using a mass spectrometer. Briefly, the MS procedure consists in the separation of the peptides by liquid chromatography (LC), peptide ionization to let them fly along the mass analyser and finally peptide collision in the detector. A representation of the m/z of each peptide and their abundance in the sample is provided forming a fingerprinting that is used to identify the protein/s contained. Two main MS techniques have been applied to the sperm proteome description, MALDI-TOF and LC-MS/MS. The different approaches provide complementary information useful towards a complete proteome description.

1.3. Proteòmica

1.3.1. Definició i breu descripció dels mètodes més utilitzats

La proteòmica és l'estudi a gran escala de les proteïnes, de la seva estructura i de la seva funció (Anderson & Anderson 1998, Blackstock & Weir 1999). Cal recordar que les proteïnes són les parts vitals dels organismes vius ja que són els components principals de les vies metabòliques de les cèl·lules i és per això que l'estudi proteòmic és molt valuós. La proteòmica es defineix com la identificació i el mesurament quantitatiu dels nivells proteics de les cèl·lules per la caracterització dels seus processos biològics (Anderson & Anderson 1998). També es pot definir com l'estudi de les propietats de les proteïnes a gran escala (nivell d'expressió, modificacions postraduccionals, etc.) amb la finalitat d'obtenir una visió global e integrada dels processos i de les xarxes proteiques que esdevenen a la cèl·lula (Blackstock & Weir 1999). Els estudis proteòmics han sigut facilitats gràcies a les llistes de seqüències de DNA que poden donar lloc a proteïnes i als avenços tecnològics d'identificació de proteïnes basats en l'espectrometria de masses (Aebersold & Goodlett 2001). A través d'aquests estudis es vol aconseguir esbrinar les funcions i interaccions de totes les proteïnes d'un organisme. Cal destacar que la proteòmica no només descriu l'equivalent proteic de les bases de dades de DNA, si no que ofereix el concepte de regulació molecular com a ciència sistemàtica (Anderson & Anderson 1998).

La paraula proteoma va ser definida per Wilkins al 1996 durant el desenvolupament de l'electroforesi bidimensional (Anderson & Anderson 1998) com el complement proteic expressat per un genoma (Wasinger et al 1995). Cal emfatitzar que aquesta definició implica que el proteoma tingui una natura estàtica, tot al contrari del que és en la realitat, ja que el proteoma és molt dinàmic i depèn de l'estat fisiològic de la cèl·lula o del teixit (Aebersold & Goodlett 2001). Per tant, l'estudi del proteoma d'una cèl·lula reflecteix l'estat cel·lular o les condicions externes on es troba aquesta.

Els objectius de la proteòmica poden ser molt diversos, però es defineixen dos com a principals: la identificació i descripció quantitativa de les proteïnes que es troben a les cèl·lules als diferents estats fisiològics (proteòmica de l'expressió), i la descripció d'aquestes proteïnes segons la seva localització subcel·lular i la seva interacció proteïna-proteïna (proteòmica del mapa cel·lular) (Blackstock & Weir 1999). La proteòmica de l'expressió es recolza en els mapes bidimensionals (2D) i l'anàlisi d'imatges, mentre que la proteòmica del mapa cel·lular confia en la purificació d'òrgànuls o complexos proteics i l'espectrometria de masses (MS). Mitjançant aquestes dues vies d'aplicació de la proteòmica es poden arribar a identificar marcadors de malalties i inclús, es poden aclarir rutes biològiques fins ara no ben establertes. L'objectiu final de la proteòmica és, per tant, donar llum a la organització i dinamisme del metabolisme, senyalització i regulació de les xarxes proteiques a través de les quals la vida de la cèl·lula transcorre (Anderson et al 2000). A més, es troba també dins dels objectius de la proteòmica l'enteniment dels mecanismes deficients que ocorren a aquestes xarxes a causa d'un procés patològic i, a la vegada, la predicció de com la funció cel·lular canvia quan es manipula la cèl·lula amb drogues, per exemple.

Des de la definició de la proteòmica, la primera estratègia emprada per la separació de mesclures proteiques complexes va ser la electroforesis en gels bidimensionals (2D), donant lloc a la metodologia proteòmica clàssica actual, juntament amb l'espectrometria de masses i la bioinformàtica (Görg et al 2009). O'Farrell va ser el primer que va resoldre més de 1100 spots de proteïnes d'un organisme senzill (*Escherichia coli*) a través d'una electroforesi bidimensional al 1975 (Figura 14, O'Farrell 1975). Tot i aquest èxit i els avanços aconseguits durant els darrers anys, la 2D segueix tenint limitacions, com és l'anàlisi de proteïnes molt àcídiques o molt bàsiques, poc abundants i/o molt hidrofòbiques, entre d'altres (Görg et al 2009). Gràcies a l'aplicació de la 2D, s'han desenvolupat milers de publicacions en l'àmbit de la recerca mèdica, clínica, biològica, genètica o toxicològica. Amb més importància, la combinació dels gels 2D amb les dades de seqüenciació del genoma, l'espectrometria de masses i el progrés de la bioinformàtica, han fet que aquesta tècnica de separació proteica sigui la més comuna en recerca proteòmica. A més, la 2D és l'únic mètode que pot fer un fraccionament reproduïble de barreges proteiques mantenint les seves relacions qualitatives i quantitatives (Martínez-Heredia 2008).

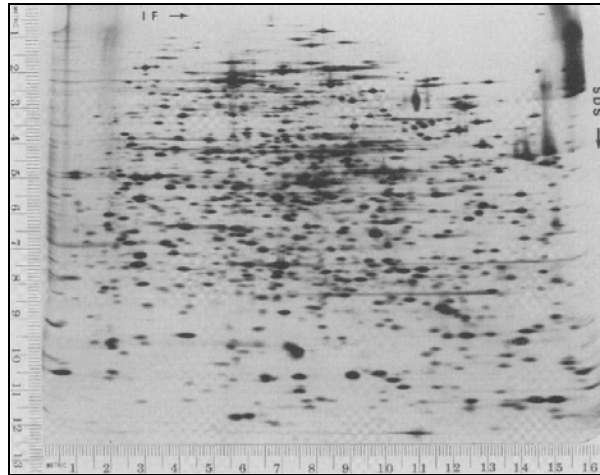


Figura 14. Separació de les proteïnes d'*Escherichia coli* a través d'un gel bidimensional on les proteïnes primer es separen segons el seu punt isoelèctric (horitzontalment) i després segons la seva massa molecular (verticalment) (O'Farrell 1975).

Ja que la tècnica de 2D pot presentar inconvenients respecte a l'automatització i sensibilitat dels resultats, abans de l'anàlisi per la identificació proteica amb l'espectrometria de masses (MS), s'han desenvolupat altres estratègies alternatives de separació proteica diferents de la 2D (Wolf et al 2007, Mauri & Scigelova 2009). En quant a l'estudi de l'espermatozoide, la utilització de gels bidimensionals ha donat lloc a la identificació de centenars de proteïnes (Martínez-Heredia et al 2006), en canvi, amb altres tècniques de separació, es poden arribar a identificar milers de proteïnes (Johnston et al 2005, Baker et al 2007, Baker et al 2008a, 2008b). La tècnica d'espectrometria de masses que es va emprar per la identificació dels *spots* visibles mitjançant un gel bidimensional (Martínez-Heredia et al 2006) va ser l'anomenat MALDI-TOF (veure apartat 1.3.3.1.). En canvi, els catàlegs d'uns milers de proteïnes espermàtiques van ser obtinguts gràcies a un tècnica de MS diferent anomenada LC-MS/MS (veure apartat 1.3.3.2.). Tots aquests treballs que van descriure la identificació de milers de proteïnes a través del LC-MS/MS són de gran rellevància, ja que proporcionen una informació molt extensa i valuosa del contingut proteic de la cèl·lula espermàtica. Contràriament, no tots els centres gaudeixen de sistemes d'espectrometria de masses tals com el LC-MS/MS, limitant així el seu ús en estudis de recerca (Oliva et al 2008). Addicionalment, els mapes proteics bidimensionals ofereixen l'avantatge de poder ser reproduïts per laboratoris que careixen d'equipament de MS i amb més importància, de preservar la informació epigenètica que poden presentar les proteïnes. L'aplicació del LC-MS/MS per la identificació proteica fa que aquesta possible informació epigenètica es perdi a través de l'anàlisi dels pèptids resultants de la digestió directa de les mesclures proteiques. Per tant, s'ha postulat recentment que en un futur, tant l'ús de LC-MS/MS com el de gels bidimensionals, possiblement a través de la tècnica anomenada 2D-DIGE (Figura

10 i 15), serà emprat arreu per recerca bàsica i inclús potencialment en diagnòstic clínic (Oliva et al 2008).

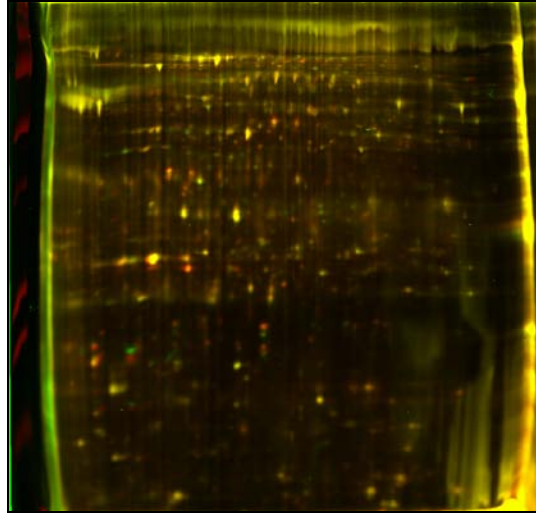


Figura 15. 2D-DIGE comparació entre una mostra amb P1/P2 alt (vermell) i un altre amb P1/P2 normal (verd). Els *spots* grocs manifesten que les 2 mostres contenen la mateixa quantitat d'aquesta proteïna/*spot* (resultats no publicats).

1.3.2. Extracció, separació i tinció proteica

Per tal d'estudiar les proteïnes de cèl·lules o teixits, aquestes s'han d'aïllar de la resta de components de la cèl·lula. En general, s'ha de lisar la cèl·lula purificada o el conjunt de cèl·lules d'interès a través de la disrupció de la membrana citoplasmàtica per permetre l'alliberament del contingut cel·lular al medi. S'han desenvolupat diverses estratègies per l'extracció proteica depenent del tipus de cèl·lula a estudiar, però la més comuna és la permeabilització de la membrana plasmàtica gràcies a detergents tals com l'SDS i el tritó o a agents caotròpics com la guanidina i la urea. Una vegada es tenen tots els components de la cèl·lula en solució, es separen les proteïnes de la resta de components cel·lulars per centrifugacions o altres mètodes més específics.

S'han descrit diferents estratègies per seleccionar i estudiar les proteïnes. En el cas de l'estudi de proteïnes del nucli de l'espermatzoide humà, l'aïllament del cap (que conté el nucli) és un mètode que s'ha utilitzat comunament (Gatewood et al 1987, Gardiner-Garden et al 1998,

Wykes & Krawetz 2003). La clau està en la utilització del detergent CTAB que, a concentracions baixes (0.05%) i sota condicions reductores (DTT, β -mercaptoetanol), aconsegueix solubilitzar les estructures de l'espermatozoide excepte els caps i els complexos ODF de la cua (Vera et al 1984, Egydio de Carvalho et al 2002). En canvi, el CTAB a una concentració del 1%, dissol totes les membranes, elimina l'acrosoma, la peça intermèdia i la cua, aïllant el nucli espermàtic pel seu posterior estudi (Delgado et al 1999, Yoshii et al 2005).

Fa uns anys es va optimitzar un mètode d'extracció de les proteïnes nuclears més abundants del nucli de l'espermatozoide humà, sense l'aïllament del nucli espermàtic amb CTAB (de Yebra & Oliva 1993). Essencialment, aquest mètode es basa en el tractament dels ponts disulfur amb DTT i en l'extracció de les proteïnes amb àcid clorhídric (HCl) 0,5M. El pas inicial en aquest mètode és la lisi de les cèl·lules seguit del trencament dels ponts disulfur presents a les protamines amb hidroclozur de guanidina (GuHCl) i DTT, per tal de reduir així l'elevada compactació en que es troba el nucli espermàtic i permetre l'acció d'altres agents als següents passos del protocol. Posteriorment, la cromatina es deshidrata amb etanol i s'extrauen les proteïnes unides al DNA (bàsiques) amb l'HCl 0,5M. L'HCl aconsegueix que les proteïnes nuclears bàsiques es desenganxin del DNA, per tant, les proteïnes queden en solució i es poden precipitar posteriorment per resuspendre-les en un medi adient per la seva separació en gels àcids, tant monodimensionals (Figura 16A, Torregrosa et al 2006) com bidimensionals (Yoshii et al 2005).

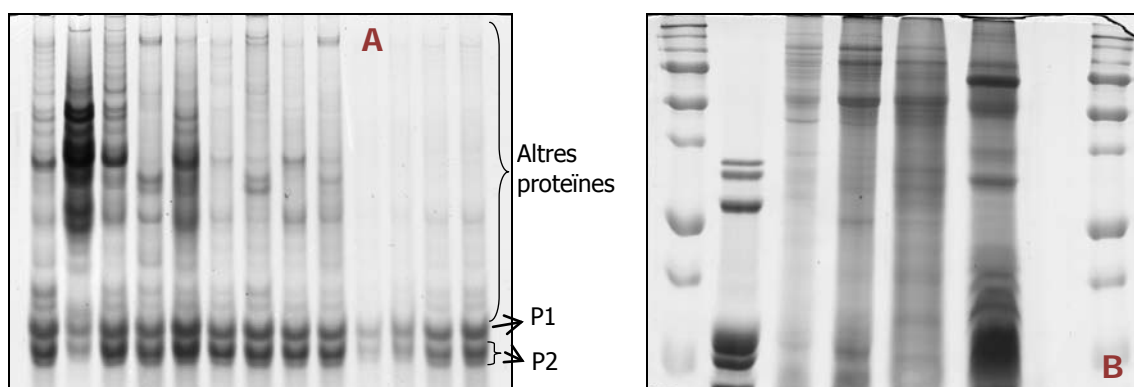


Figura 16. Proteïnes espermàtiques separades amb gels monodimensionals tenyits amb *Coomassie Brilliant Blue*. **A)** Gel monodimensional àcid de poliacrilamida. A cada carril s'observen les proteïnes nuclears d'espermatozoides humans extretes amb HCl. Es poden visualitzar la protamina 1 (P1), la protamina 2 (P2) i altres proteïnes que poden correspondre a histones i que es troben més abundants a mostres infèrtils **B)** SDS-PAGE amb les proteïnes totals de l'espermatozoide separades segons la seva massa molecular (els 4 carrils centrals).

L'estudi del proteoma de l'espermatozoide humà també es pot realitzar a través de gels monodimensionals SDS-PAGE (Figura 16B). En aquest cas, les proteïnes s'extreuen convencionalment amb SDS i un agent reductor com el DTT. L'SDS-PAGE es fa servir clàssicament per organismes vius simples (fins un centenar de proteïnes), però l'estudi d'organismes més complexes va portar a desenvolupar un altre mètode anomenat gels bidimensionals o 2D. En aquest tipus d'electroforesis bidimensional, les proteïnes es separen en una primera dimensió segons els seu punt isoelèctric en unes tires d'acrilamida de pH creixent (isoelectroenfoc, Figura 17) i posteriorment en una segona dimensió segons la seva massa molecular en un gel d'acrilamida (SDS-PAGE), donant lloc a un mapa proteic on cada *spot* correspon majoritàriament a només una proteïna (Figura 9 i 17).

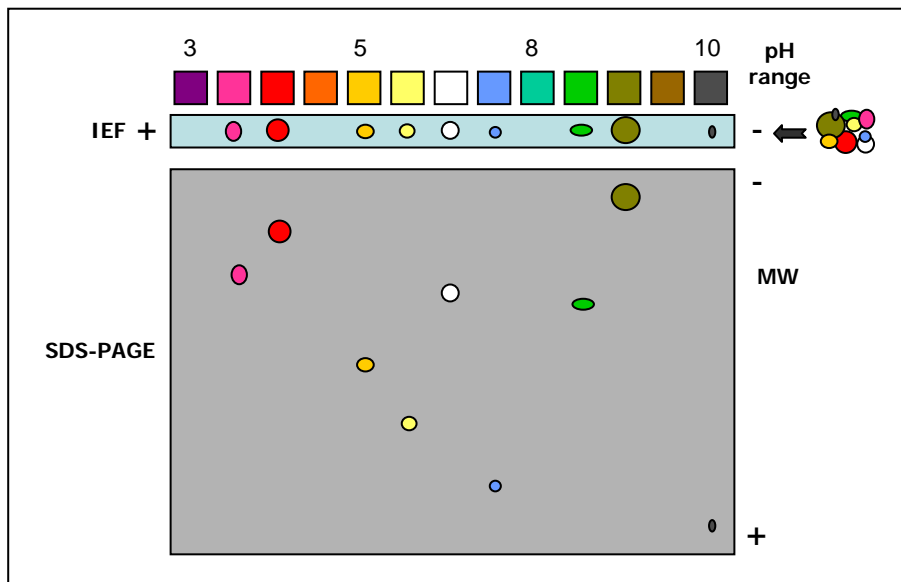


Figura 17. Principi de la tècnica de separació de proteïnes amb gels bidimensionals. Les boles de colors representen proteïnes amb un punt isoelèctric i massa molecular concreta. A la primera dimensió, les proteïnes migren per la tira de pH segons la seva càrrega neta gràcies a una corrent elèctrica i s'aturen quan arriben al pH corresponent al seu punt isoelèctric, ja que és llavors quan es neutralitza la seva càrrega neta. A la segona dimensió, les proteïnes ja separades segons els seu punt isoelèctric, es separen segons la seva massa molecular en un gel d'acrilamida (SDS-PAGE).

Com s'ha dit anteriorment, una bona separació de les proteïnes en sistemes de 2D es va aconseguir amb un medi de lisi cel·lular que contenia Urea com a solubilitzant de les proteïnes (Figura 14, O'Farrell 1975). Aquest va ser millorat més endavant per varis grups. Cal destacar un treball en el que es va afegir una combinació de caotrópics i detergents, com la tiourea i el CHAPS, per solucionar les mancances de solubilitat que presentaven les proteïnes a la primera dimensió en les tires de pH (IPG *strips*) (Rabilloud et al 1997, Pixton et al 2004), arribant així a obtenir uns gels bidimensionals amb una elevada resolució i reproductibilitat.

Una vegada les proteïnes es troben separades segons diferents sistemes d'electroforesis, es poden aplicar diversos mètodes de tinció per la visualització d'aquestes. El primer pas de tota tinció és la fixació de les proteïnes al gel d'acrilamida amb solvents orgànics, com l'etanol i el metanol, els quals permeten la unió de la proteïna i a la matriu del gel i així eviten que aquestes s'alliberin del gel als rentats posteriors. Seguidament, els gels es tenyeixen amb colorants que tenen diverses característiques d'unió a la proteïna per fer-la visible.

Una de les primeres tincions utilitzades per visualitzar les proteïnes dels gels 2D va ser la tinció amb plata (Switzer et al 1979), que va experimentar modificacions al llarg del temps (Blum et al 1987). El principi d'aquesta tinció es basa en la reacció del nitrat de plata amb la proteïna en condicions àcídiques, formant-se la unió dels ions de plata amb la proteïna. Quan s'afegeix formaldehid en condicions alcalines, els ions de plata es redueixen a plata metàl·lica i formen una deposició marró a la vegada que fa precipitar la proteïna a la que es troba unida (Steinberg 2009). Un altre mètode de tinció utilitzat comunament és el *Coomassie Brilliant Blue* (CBB), que consisteix en un *dye* que s'uneix amb interaccions electrostàtiques a aminoàcids protonats (positius) de les proteïnes tals com lisina, arginina i histidina, i amb associacions hidrofòbiques a aminoàcids aromàtics. Aquestes unions, al contrari del que succeeix en la tinció amb plata, no són covalents i per tant són reversibles i no interfereixen amb l'MS. Hi ha 2 tipus de CBB, el R-250 i la seva forma derivada G-250, la sensibilitat de les quals és similar (50 ngr) però menor que la de la tinció amb plata, que és de 5 ngr (Figura 18).

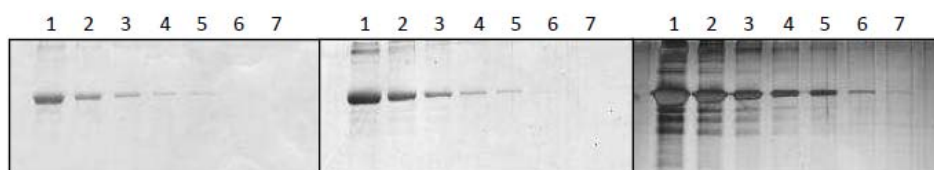


Figura 18. Comparació de les diferents tincions mitjançant BSA carregada a diferents quantitats corresponents a 1: 1 µgr; 2: 0,5 µgr, 3: 0,25 µgr; 4: 0,1 µgr; 5: 0,05 µgr; 6: 0,01 µgr i 7: 0,005 µgr. A l'esquerra, tinció amb *Coomassie Brilliant Blue* (CBB) R-250, a la imatge del mig CBB G-250 i a la dreta tinció amb plata. La tinció amb major sensibilitat és la tinció amb plata on el límit de detecció és de 0,005 µgr de BSA.

Altres mètodes de tinció són els que emeten fluorescència, com és el *Pink Flamingo* (Bio-Rad) i el 2D-DIGE. La tinció de *Flamingo* conté un marcador que normalment no fluoresceix però quan s'uneix a les proteïnes desnaturades emet fluorescència (*FlamingoTM Fluorescent Gel Stain. Instruction Manual*. Número de catàleg 161-0491). La tècnica de 2D-DIGE, que va ser primer descrita al 1997 (Unlü et al 1997), és una bona eina comparativa on les proteïnes

corresponents a 2 mostres diferents es marquen amb marcatges fluorescents diferents per després separar-les a través de gels 2D. Les mescles proteiques marcades d'aquestes mostres es separen simultàniament a un mateix gel bidimensional juntament amb la incorporació d'un estàndard intern corresponent a una mescla equitativa de les 2 mostres a comparar, per així eliminar variacions entre gels (Figura 10 i 15). Els marcadors utilitzats a la electroforesi bidimensional diferencial (2D-DIGE) s'anomenen *CyDye DIGE* i s'uneixen a residus de lisina de les proteïnes sense alterar pràcticament el seu punt isoelèctric (Figura 19). Es troben disponibles marcadors de 3 tipus/colors (*Cy2*, *Cy3* i *Cy5*), dos d'aquests s'utilitzen per les mostres a testar i l'altre, generalment el *Cy2*, per marcar l'estàndard intern que correspon a una barreja equitativa de les mostres. Per propòsits quantitius, s'estableix un marcatge mínim, és a dir, cada proteïna es troba marcada per un únic *dye* que permet la visualització de l'*spot*. La sensibilitat de les tincions fluorescents és similar a la de la tinció amb plata i proporcionen una avantatge sobre la tinció de plata ja que aquestes són compatibles amb la identificació proteica a través de l'espectrometria de masses.

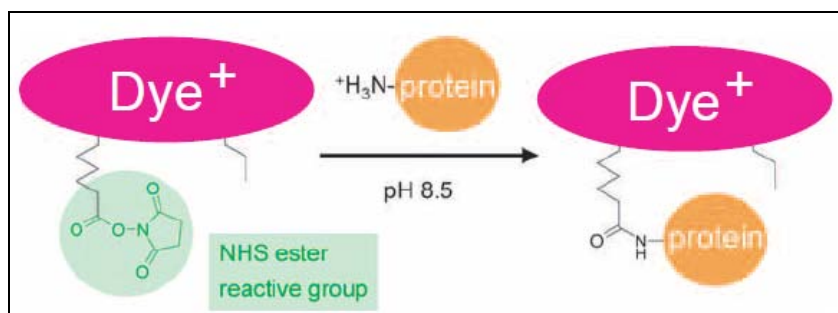


Figura 19. Reacció d'etiquetatge de les proteïnes a través del ester NHS del marcador que s'uneix covalentment al residu amino-epsilon de les lisines de les proteïnes mitjançant la unió amida (Ettan DIGE System. *User Manual* 2005, Referència 18-1173-17 AB).

1.3.3. Espectrometria de masses

Com s'ha dit anteriorment a aquest apartat i al llarg d'aquesta memòria, gràcies als avenços en la seqüenciació del genoma i a les tècniques d'espectrometria de masses (MS), s'ha facilitat la identificació i quantificació dels proteomes d'organismes vius, així com l'anàlisi de les modificacions i interaccions de les proteïnes, oferint la possibilitat de millorar les descripcions existents dels fenotips models (Gstaiger & Aebersold 2009). L'espectrometria de masses és

una tècnica analítica que s'utilitza per determinar la composició elemental d'una mostra o molècula. La MS aplicat a la identificació proteica, consisteix en la tripsinització de les proteïnes d'una mostra o mescla proteica i el mesurament de la massa dels pèptids obtinguts expressat com massa/càrrega d'aquestes (m/z). En la representació gràfica, anomenada empremta peptídica, es visualitzen els *ratios* m/z segons la seva abundància a la mostra analitzada (Figura 20, Pappin et al 1993, Henzel et al 1993). Ja que poques molècules tenen càrrega per si mateixes i en general són poc volàtils, els pèptids a ser analitzats per MS han de ser ionitzats per fer-los volàtils i poder determinar la seva massa. La utilització de la mostra proteica a identificar sense proteòlisi no és possible ja que les proteïnes són molècules molt difícils d'ionitzar sense ser destruïdes durant el procés d'ionització i per això han de ser tripsinitzades i utilitzar els seus pèptids per la seva caracterització (Martínez-Heredia 2008).

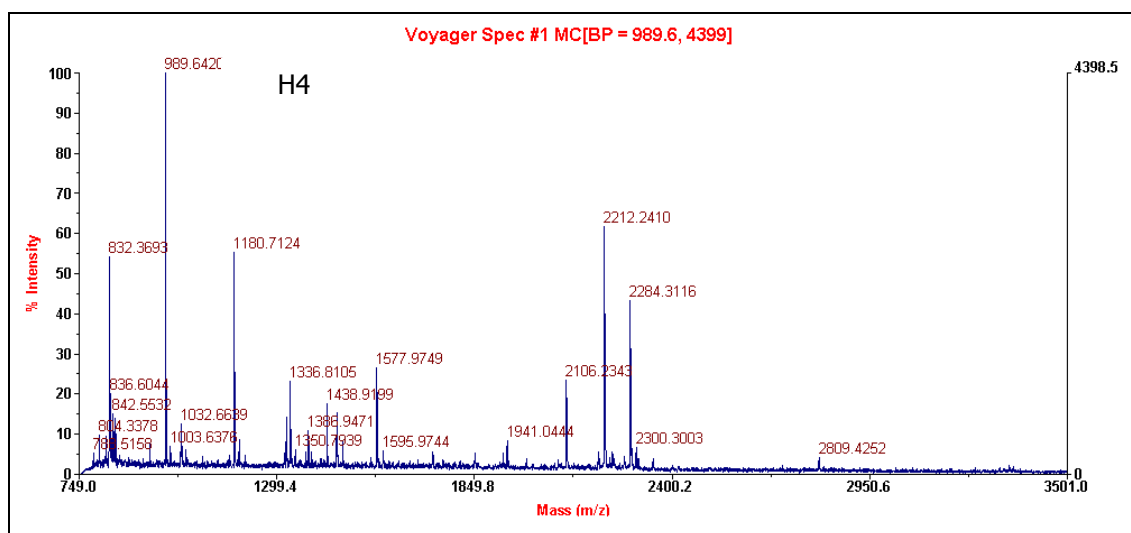


Figura 20. Espectre obtingut amb l'anàlisi amb MALDI-TOF d'una mostra corresponent a un *spot* que es va escindir des d'un gel 2D. Aquest espectre, o empremta peptídica, ha conduït a la identificació de la Histona 4 (H4). Cada pic correspon a un pèptid amb una massa concreta expressada segons el *ratio* m/z (eix de les x). A l'eix de les y es mesura la intensitat que representa l'abundància de cada pèptid a la mostra estudiada.

Per tant, un procediment general de MS consisteix resumidament en tripsinització d'una mostra i separació dels seus pèptids a través d'una cromatografia líquida (LC), seguit de la vaporització d'aquests amb l'ionitzador, convertint així la fase sòlida que conté pèptids ionitzats a gasosa. A continuació, l'analitzador de masses, degut a l'aplicació de camps electromagnètics, separa aquests ions segons les seves masses/càrregues. Per últim, el detector de masses mesura l'abundància de cada ió present a la mostra segons els cops que col·lisiona el pèptid amb el detector (Figura 21, Griffiths & Wang 2009, Gstaiger and Aebersold

2009). La representació d'aquestes col·lisions es fa amb un gràfic m/z vs abundància, donant lloc a un espectre de masses o empremta peptídica (Figura 20), que es compararà amb la base de dades de proteïnes tripsinitzades *in silico* per la seva identificació positiva.

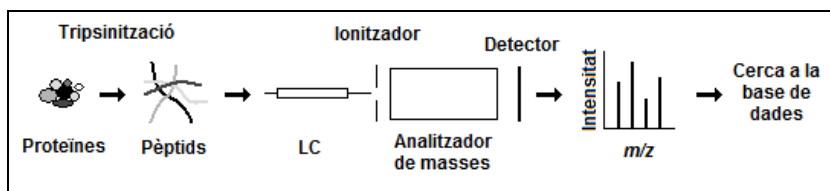


Figura 21. Breu representació esquemàtica del principi de MS per la identificació proteica. Les proteïnes són digerides per la tripsina i els seus pèptids separats per LC. Els pèptids s'ionitzen i es disparen cap a un detector que determina les relacions m/z de cada pèptid a través de l'analitzador de masses. Les empremtes peptídiques obtingudes de cada mostra es comparen amb una bases de dades per veure a quina proteïna correspon la mostra analitzada.

Tot i la gran varietat d'ionitzadors, detectors de masses i analitzadors, i les seves possibles combinacions per la identificació proteica, hi ha dos combinacions que són les més utilitzades per la caracterització del proteoma espermàtic, i són els gels 2D acoblats a la identificació proteica mitjançant MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight*) i la utilització de mostres proteiques complexes i la seva identificació a través de la generació de pèptids i el seu anàlisi amb LC-MS/MS (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry/Mass Spectrometry*) (Oliva et al 2008).

1.3.3.1. Identificació proteica per MALDI-TOF

La tècnica de MALDI-TOF (Tanaka et al 1988) va ser introduïda per la identificació de proteïnes/*spots* obtinguts mitjançant gels bidimensionals (Henzel et al 1993). Aquesta consisteix en un ionitzador de tipus MALDI (Hillenkamp et al 1991) i un analitzador de tipus TOF o *Time Of Flight*. Aquesta tècnica d'ionització és suau i s'usa en MS per permetre la identificació de biomolècules com són els pèptids obtinguts després de la tripsinització de les proteïnes a identificar. Aquests pèptids s'incorporen a una matriu per protegir-los i facilitar la seva ionització i vaporització gràcies al feix del làser que emet el MALDI (Figura 22A, Albrethsen 2007). Els pèptids ionitzats s'acceleren a causa d'un camp elèctric que els fa passar per l'analitzador de masses que els separa o resol segons la seva relació m/z . L'analitzador que s'acobla a l'ionitzador MALDI és normalment el TOF, ja que les característiques d'anàlisi del TOF són adients pels ions generats pel MALDI. La velocitat dels ions que passen pel tub fins

arribar al detector en condicions de buit, és proporcional a la relació m/z . El detector determinarà el temps de vol (TOF) o el temps que ha trigat l'ió a arribar-hi i per tant la m/z o mida dels pèptids, ja que z és normalment 1 (Figura 22B). El camp elèctric al que es troben sotmesos els pèptids ionitzats proporciona a aquests la mateixa energia cinètica, i per tant els pèptids volaran a diferents velocitats depenent de la seva m/z , és a dir, els més petits arribaran abans al detector que els de mida major (Martínez-Heredia 2008). Al final s'obté un espectre de masses de cada mostra analitzada amb la representació de les m/z dels pèptids analitzats i la seva abundància a la mostra, donant lloc a una empremta peptídica (Figura 20).

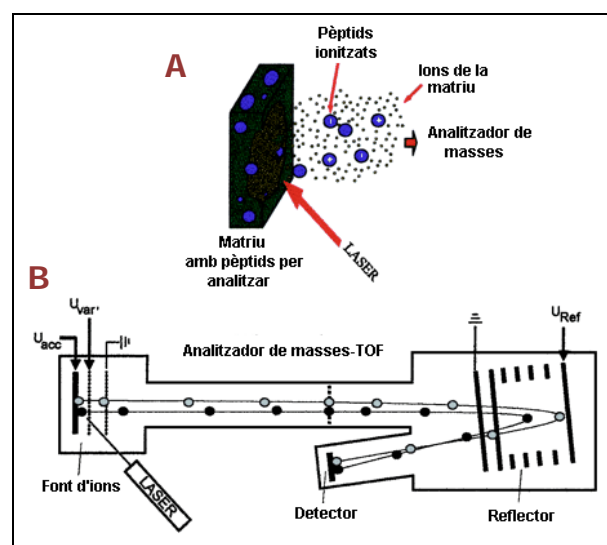


Figura 22. A) La tècnica de MALDI-TOF es basa en la coprecipitació de pèptids amb una matriu que serà irradiada amb polsos de làser per tal d'ionitzar aquests pèptids i crear una fase gasosa que els contindrà B) L'acoblament de l'analitzador TOF permet l'anàlisi de les masses dels pèptids que han sortit disparats (Modificat d'una de les imatges que es troba a la web <http://www.biochem.arizona.edu/classes/bioc471/pages/Lecture23/Lecture23.html>).

Aquestes representacions o empremtes peptídiques es comparen amb les empremtes peptídiques obtingudes *in silico* segons la digestió teòrica de cada proteïna amb un enzim determinat de totes les proteïnes conegudes (Oliva et al 2008). Per tal d'identificar positivament una mostra analitzada com a una proteïna en concret, el número de fragments o pèptids que s'han d'emparellar o trobar al llistat de pèptids d'una proteïna coneguda, s'ha considerat de com a mínim 3 pèptids. Quants més pèptids corresponguin a la mateixa proteïna, més probabilitat d'encert. Com que molts dels algorismes de l'empremta peptídica obtinguda per MALDI-TOF que s'utilitzen per identificar una proteïna assumeixen que provenen d'una sola proteïna (Shevchenko et al 1996), les mostres a identificar a través de la tècnica de MALDI-TOF provenen normalment de gels bidimensionals, on cada mostra/*spot* correspon només a una o dos proteïnes (Martínez-Heredia et al 2006).

1.3.3.2. Identificació proteica per LC-MS/MS

El LC-MS/MS combina el poder de separació del HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) amb el poder de detecció del espectròmetre de masses en tàndem (Oliva et al 2008). L'HPLC separa els pèptids segons càrrega, mida, hidrofobicitat i presència d'etiquetes o aminoàcids específics. Varis tipus d'ionitzadors i analitzadors són utilitzats en combinació amb la cromatografia líquida. En quant a l'espectròmetre de masses en tàndem (MS/MS), com indica el seu nom, està compost per més d'un analitzador permetent així l'anàlisi estructural i de seqüència dels pèptids (Figura 23). El MS/MS normalment consisteix en 2 analitzadors separats per cambres de col·lisió on s'incorpora un gas que col·lisiona amb els pèptids donant lloc a la seva fragmentació total. Al inici del procés, es parteix de pèptids separats per l'HPLC que són disparats per l'ionitzador cap als espectròmetres situats en sèrie. El primer espectrofotòmetre de masses o analitzador actua com un *Time Of Flight* i genera la informació de la massa de cada pèptid, mentre que el segon desintegra cada pèptid i proporciona una mesura de la massa al llarg del temps per determinar l'aminoàcid eliminat cada vegada (Figura 24, Jamesdaniel et al 2009). D'aquesta manera, experiments de LC-MS/MS normalment generen la seqüència peptídica de cada pèptid.

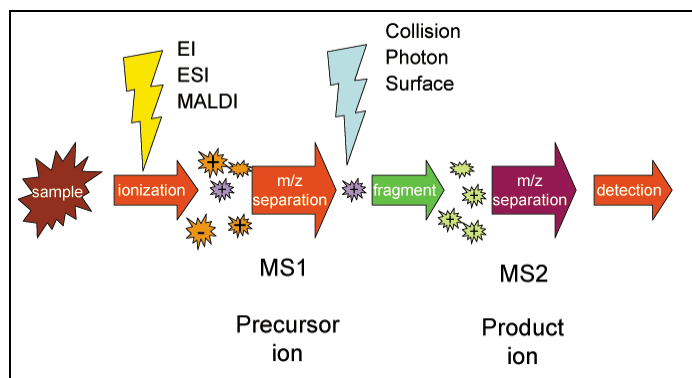


Figura 23. Esquema de l'espectrofotòmetre en tàndem (MS/MS). Els pèptids de la mostra separats per HPLC són ionitzats i disparats cap al primer analitzador (MS1) que detecta la massa/càrrega (m/z) d'aquests. Els pèptids ionitzats passen per la cambra de col·lisió i són fragmentats, aminoàcid per aminoàcid, a la vegada que es detecta la massa de cada fragment pel segon analitzador (MS2). Aquest mètode pot donar lloc a la seqüència dels pèptids analitzats (Extret de http://en.wikipedia.org/wiki/Tandem_mass_spectrometry).

De la mateixa manera que amb la tècnica de MALDI-TOF, la identificació positiva de cada proteïna s'obté gràcies a la comparació de les bases de dades de les masses dels pèptids de cada proteïna d'una manera probabilística, però en aquest cas, la resolució és major i pot donar lloc a la identificació de desenes de proteïnes en una mateixa mostra, ja que ens pot

proporcionar la seqüència de la proteïna (Figura 24). Per aquest motiu, aquest mètode és més adient per complexos proteics separats a través d'electroforesis monodimensionals d'acrilamida (Baker et al 2007), o inclús per la tripsinització de les mescles proteiques i separació dels seus pèptids amb isoelectroenfoc (Baker et al 2008a, 2008b), ja que l'anàlisi de cada mostra és capaç de donar lloc a la identificació de desenes de proteïnes.

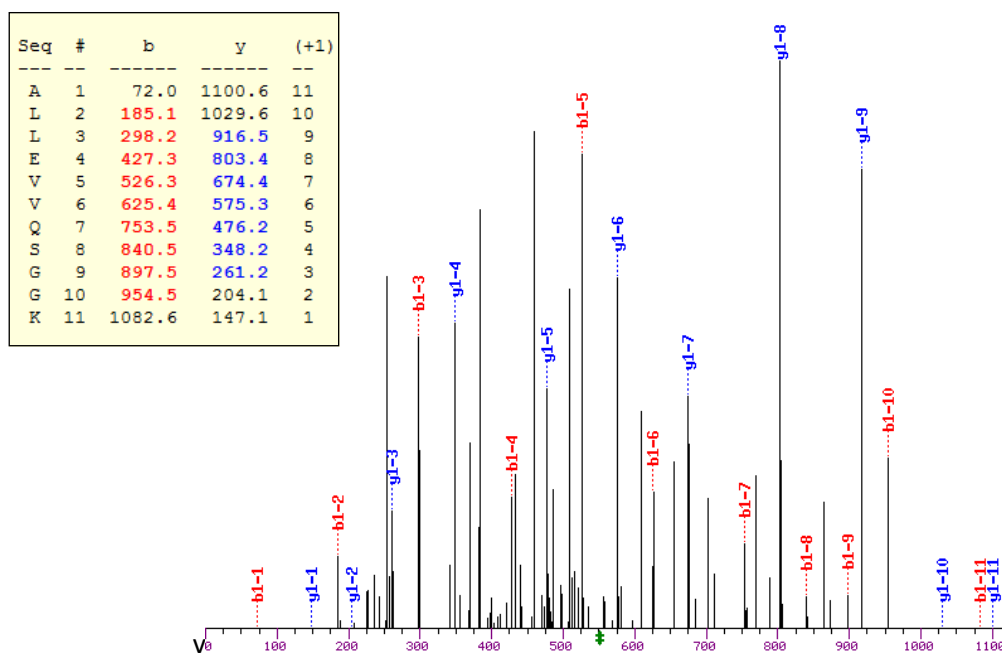


Figura 24. empremta peptídica típica d'un pèptid corresponent a la digestió d'una proteïna identificada des d'una mostra procedent d'un gel 2D per LC-MS/MS. A l'eix de les x es mostra la relació m/z i a l'eix de les y l'abundància de cada fragment generat des del mateix pèptid. En aquest cas, la proteïna identificada correspon a la *Proteasome Subunit Alpha Type-7-like* (PSMA8). A diferència del MALDI-TOF, la seqüència del fragment o pèptid observat aquí es pot determinar i correspon a ALLEVVQSGGK, tal i com es veu al requadre de l'esquerra, gràcies a les masses obtingudes de degradació d'aquest pèptid aminoàcid per aminoàcid.

Tot i les diferències en resolució de les tècniques de MS que es descriuen aquí, la descripció del proteoma total de l'espermatozoide humà a través de gels bidimensionals i MALDI-TOF (Martínez-Heredia et al 2006, de Mateo et al 2007), i per gels monodimensionals i identificació proteica per LC-MS/MS (Baker et al 2007), aporten una informació complementària del proteoma espermàtic humà (Oliva et al 2009). Es suggereix que, degut a l'avantatge que presenten els gels 2D en la preservació de la informació epigenètica de les proteïnes, i al elevat poder resolutori del LC-MS/MS, una combinació d'aquestes podria ser adient per futurs estudis proteòmics (de Mateo et al 2010, *In preparation*).

2

2

Objectius
Objectives

Objectives

The objectives of the thesis are based on the application of proteomics and are related to the molecular characterization of the normal protein composition of the human spermatozoa and its comparison to that of infertile patients:

- 1) To search for potential correlations between the protamine content (P1/P2 ratio) and the presence of protamine 2 precursors (pre-P2/P2 ratio) and the assisted reproductive outcomes.
- 2) To contribute to the characterization of the human sperm proteome through two-dimensional gel electrophoresis of proteins and their identification through mass spectrometry. Additionally, to review the different sperm proteomic studies performed in different model species.
- 3) To search for changes in protein abundance in patients grouped according to seminal parameters related to infertility such as the protamine content, the presence of pre-P2, asthenozoospermia and DNA damage. To identify the proteins correlating with some of the parameters studied in infertile patients. To corroborate some of the proteomic results through immunofluorescence.
- 4) To set up a protocol to isolate human sperm nuclei through CTAB to further characterize the nuclear human sperm proteome by mass spectrometry.
- 5) To characterize the thiol content of human sperm cells through fluorescent mBBr-flow cytometry in infertile patients and controls. To set up a gradient centrifugation PureSperm protocol suitable for the isolation of sperm populations differing in thiol content. To characterize the protamine content of the PureSperm fractions to obtain complementary results of the cytometry data. To characterize isolated sperm fractions through the immunofluorescent detection of the nuclear proteins important for the biology of spermatozoa and potentially for the embryo development.

La infertilitat masculina és un problema que ha anat en augment aquests últims anys. Molts casos d'infertilitat tenen una etiologia desconeguda, és a dir, les causes d'aquesta no es coneixen. En part, això es degut a que les proteïnes i els mecanismes implicats en la espermatogènesi i la funció de l'espermatozoide no es coneixen en detall. Estudis previs al nostre laboratori, entre ells la determinació del contingut de protamines i la caracterització del proteoma de l'espermatozoide humà mitjançant gels bidimensionals i espectrometria de masses, s'han desenvolupat per contribuir a cobrir aquest buit relatiu de coneixements i per estudiar aquests casos d'infertilitat idiopàtica i obrir pas a noves investigacions per tal de trobar marcadors d'aquestes patologies. No obstant, romanen molt aspectes importants per investigar. Entre ells, identificar quina relació existeix entre el contingut de protamines i els resultats de reproducció assistida, caracteritzar proteïnes addicionals del l'espermatozoide humà, i en especial proteïnes nuclears, i identificar possibles alteracions del proteoma i contingut de tiols en diferents grups de pacients infèrtils. Per tant, durant el període de realització d'aquesta tesi s'han caracteritzat a nivell molecular, fonamentalment amb tècniques d'estudi proteic, la composició normal del espermatozoide humà en comparació a pacients infèrtils.

Els objectius d'aquesta tesi es divideixen en cinc punts discrets i a la vegada relacionats entre si per tal de continuar els estudis iniciats amb anterioritat pel grup i donar a conèixer una informació rellevant pel món de l'andrologia i la biologia reproductiva:

- 1) Buscar la correlació entre el contingut de protamines, basat en la relació de protamines (P1/P1) i la presència de precursor de protamina 2 mesurat a través del quocient pre-P2/P2, amb els resultats de reproducció assistida.
- 2) Contribuir a la identificació de les proteïnes que componen l'espermatozoide humà a través d'estudis proteòmics mitjançant gels bidimensionals i identificació proteica per espectrometria de masses. Addicionalment, fer un estudi comparatiu dels proteomes descrits en diferents espècies model en forma d'article de revisió.
- 3) Contribuir a estudiar el proteoma corresponent al mapa proteic bidimensional prèviament caracteritzat pel nostre grup en diversos tipus de pacients infèrtils i controls donant de semen. Buscar les possibles correlacions que hi poden haver entre l'abundància de les proteïnes de mostres individuals. Buscar també canvis en la abundància de les proteïnes de pacients agrupats segons paràmetres relacionats amb la

infertilitat tals com el contingut de protamines, la presència de precursor de protamina 2, la presència d'astenozoospermia i el dany al DNA. Identificar d'aquesta manera proteïnes que podrien estar implicades en algunes infertilitats masculines i relacionades amb els paràmetres estudiats. Comprovar els resultats corresponents a algunes de les proteïnes detectades en una abundància diferent en els pacients fent servir una estratègia alternativa com és la immunofluorescència.

- 4) Implementar un protocol d'aïllament de nuclis d'espermatozoides humans fent servir el detergent CTAB per la seva posterior caracterització proteòmica per espectrometria de masses.
- 5) Caracteritzar el contingut de tiols totals amb la tinció fluorescent mBBr i Citometria de Flux en espermatozoides de pacients infèrtils i de controls. Implementar un protocol de fraccionament d'espermatozoides a través de gradients de PureSperm idoni per tal d'aïllar les subpoblacions d'espermatozoides que difereixen en el contingut de tiols totals. Caracteritzar el contingut de protamines d'aquestes poblacions per assolir una informació complementària a la dels resultats obtinguts amb el Citòmetre de Flux. Caracteritzar els espermatozoides corresponents a les fraccions resultants amb la immunodetecció de la presència de proteïnes nuclears importants per l'espermatozoide, i potencialment involucrades en el desenvolupament embrionari.

3

3

Resultats

Results

3.1. Contingut de protamines i resultats de reproducció assistida
/ *Protamine content and assisted reproductive outcome.*

Article 1

**Protamine 2 precursors (Pre-P2), protamine 1 to protamine 2 ratio
(P1/P2), and assisted reproduction outcome**

de Mateo S, Gázquez C, Guimerà M, Balasch J, Meistrich ML, Ballescà JL, Oliva R (2009)

Fertility and Sterility 91:715-722

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18314125>

Corresponding pages of this memory..... 69-76

Article 1

Protamine 2 precursors (Pre-P2), protamine 1 to protamine 2 ratio (P1/P2), and assisted reproduction outcome

de Mateo S, Gázquez C, Guimerà M, Balasch J, Meistrich ML, Ballescà JL, Oliva R (2009)

Fertility and Sterility 91:715-722

Resum en català

Introducció

Les protamines són les proteïnes majoritàries del nucli espermàtic humà. Els humans expressen dos tipus de protamines, la protamina 1 (P1) i la família de protamines 2 (P2) que es sintetitza de forma precursora (pre-P2) i que posteriorment es processa per originar les formes madures de la protamina 2. Molts estudis han demostrat que espermatozoides de pacients infèrtils tenen una relació P1/P2 aberrant. També s'ha detectat en pacients infèrtils un augment de pre-P2. La relació del contingut de pre-P2 amb la taxa de fertilització i la capacitat d'obtenir un embaràs amb fertilització *in vitro* (ICSI i IVF) no s'ha explorat fins ara. Amb aquest estudi es vol analitzar la correlació del contingut de protamines i de pre-P2 amb els resultats de reproducció assistida (RA).

Metodologia

Es van extreure les proteïnes espermàtiques de cent dos mostres espermàtiques que es van utilitzar per fertilització assistida tant a través de fertilització *in vitro* (IVF) o injecció intracitoplasmàtica (ICSI). També es van incloure dotze controls donants de semen a l'estudi. Les proteïnes nuclears extretes amb HCl de catorze milions d'espermatozoides es van analitzar amb gels àcids de poliacrilamida i es va determinar la relació P1/P2. La determinació de la presència de pre-P2 es va realitzar a través d'una rèplica d'un gel àcid i la immunodetecció per *Western Blot* amb l'anticòs de pre-P2, expressant els resultats com la relació pre-P2/P2. Els resultats de RA es van descriure a través de la taxa de fertilització i la obtenció d'embaràs o no. Es van buscar les possibles relacions entre la relació P1/P2 i la de pre-P2/P2 amb els resultats de RA.

Resultats

Les relacions P1/P2 i pre-P2/P2 correlacionen entre elles i dèbilment amb els paràmetres seminals. Les parelles que no embarassen tenen significativament una relació P1/P2 i pre-P2/P2 menors que aquelles que sí. El grup de pacients amb P1/P2 baixa (estratificat segons dades de donants) mostren una taxa de fertilització més baixa comparat amb els grups P1/P2 mig i P1/P2 alt. L'estratificació dels pacients segons pre-P2/P2 baix o alt no afecta a la taxa de fertilització.

Conclusions

Una baixa relació P1/P2 es relaciona amb una fallada en la obtenció d'embaràs tal i com es va descriure anteriorment. Per primera vegada s'estableix que la relació pre-P2/P2 també es troba disminuïda a aquells pacients que no embarassen. Una possible explicació d'aquest fet podria ser la relació que hi ha entre P1/P2 i pre-P2/P2, sent la relació baixa de pre-P2/P2 un marcador d'una relació també baixa de P1/P2 i afectant així a la capacitat fertilitzant de l'espermatozoide. En quant a la taxa de fertilització, aquesta és menor a les mostres que presenten una P1/P2 baixa quan s'utilitza IVF i no quan es fa servir ICSI. Això fa pensar que el ICSI supera els possibles efectes detrimentals que pot patir l'espermatozoide amb un contingut aberrant de protamines. Una explicació de les associacions trobades entre el contingut de protamines i la presència de pre-P2 amb els resultats de RA és que aquests relacions poden ser el resultat de diverses etiologies independents resultant en un grup heterogeni d'alteracions de les protamines com s'han detectat en aquest estudi.

3.2. Proteòmica de l'espermatozoide humà / *Human sperm proteomics.*

Article 2

Marked correlations in protein expression identified by proteomic analysis of human spermatozoa

de Mateo S, Martínez-Heredia J, Estanyol JM, Domínguez-Fandos D, Vidal-Taboada JM, Ballescà JL, Oliva R (2007)

Proteomics 7:4264-4277

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18040982>

Corresponding pages of this memory..... 81-94

Article 2

Marked correlations in protein expression identified by proteomic analysis of human spermatozoa

de Mateo S, Martínez-Heredia J, Estanyol JM, Domínguez-Fandos D, Vidal-Taboada JM, Ballescà JL, Oliva R (2007)

Proteomics 7:4264-4277

Resum en català

Introducció

L'estudi del proteoma de l'espermatozoide té interès tant per l'enteniment d'aspectes fonamentals de la reproducció com per la identificació de moltes causes d'infertilitat masculina fins ara desconegudes. L'estudi de les proteïnes més abundants a través de mètodes convencionals ha permès identificar quines anomalies proteiques es relacionen amb alteracions espermàtiques. El desenvolupament de les tècniques d'espectrometria de masses (MS) ha obert la possibilitat d'estudiar un gran nombre addicional de proteïnes. Un mapa proteic de l'espermatozoide humà per gels bidimensionals ha sigut establert anteriorment amb la identificació proteica a través de la tècnica de MS anomenada MALDI-TOF. En aquest estudi s'han buscat les correlacions potencials entre proteïnes de pacients individuals i amb el contingut de protamines i el dany al DNA.

Metodologia

Es van incloure en aquest estudi quaranta-set pacients i deu controls donants de semen. Es va determinar el contingut de protamines a través de la determinació de la relació de protamina 1 (P1) i protamina 2 (P2) (P1/P2) i la presència de precursor de protamina 2 (pre-P2) amb la relació pre-P2/P2 i també el dany al DNA amb la tècnica de TUNEL. A les mateixes mostres es va extreure la totalitat de les proteïnes espermàtiques per separar-les en el sistema de gel de poliacrilamida bidimensional (2D). Les proteïnes es van separar a la primera dimensió segons el seu punt isoelèctric i a la segona dimensió segons la seva massa molecular amb un gel SDS-PAGE. Es van escindir *spots* del mapa proteic abans no caracteritzats per tal de procedir a la

seva identificació proteica. Addicionalment, l'expressió de 101 proteïnes/*spots* segons les densitats òptiques d'aquests es va relacionar entre elles mateixes i amb el contingut de protamines i dany al DNA.

Resultats

Es van identificar 33 proteïnes noves del proteoma 2D de l'espermatozoide humà. Cal remarcar que onze d'aquestes tenen una funció relacionada amb la transcripció. Es van trobar 67 correlacions entre l'expressió de les 101 proteïnes/*spots* en pacients individuals amb un coeficient de correlació molt elevat i una elevada significança. També es van trobar vuit proteïnes amb diferents nivells d'expressió entre les mostres amb baix i elevat dany al DNA, set entre P1/P2 baixa, mitja i elevada, i cinc entre baix i alt pre-P2/P2.

Conclusions

S'ha contribuït a la identificació d'*spots* del mapa 2D de l'espermatozoide humà i entre aquestes proteïnes s'han trobat proteïnes amb una possible funció epigenètica al nucli espermàtic. S'han identificat també un gran nombre de correlacions entre proteïnes mai descrites fins ara. Aquestes correlacions entre proteïnes poden donar lloc a la descripció de relacions funcionals entre proteïnes no estudiades anteriorment que podrien ser de rellevància en l'enteniment d'algunes infertilitats on la causa és desconeguda. Algunes de les proteïnes on la seva expressió s'ha correlacionat amb el dany al DNA podrien tenir una relació lògica com és la CLU i la HSPA2. De les proteïnes trobades com alterades segons el contingut de protamines, la PHB és una interessant troballa ja que s'ha descrit múltiples funcions per aquesta a la cèl·lula espermàtica. S'ha confirmat a la vegada alguns dels resultats obtinguts per tècniques d'immunofluorescència amb la l'anticòs anti-PHB. S'obre la oportunitat d'estudiar la funció de les proteïnes identificades i la seva relació funcional amb altres proteïnes i amb els paràmetres estudiats en aquest estudi.

Article 3

Identification of proteomic differences in asthenozoospermic sperm samples

Martínez-Heredia J, de Mateo S, Vidal-Taboada JM, Estanyol JM, Ballescà JL, Oliva R
(2008)

Human Reproduction 23:783-791

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18281682>

Corresponding pages of this memory..... 99-107

Article 3

Identification of proteomic differences in asthenozoospermic sperm samples

Martínez-Heredia J, de Mateo S, Vidal-Taboada JM, Estanyol JM, Ballescà JL, Oliva R (2008)

Human Reproduction 23:783-791

Resum en català

Introducció

L'astenozoospermia és una patologia espermàtica comú on les seves causes no s'han identificat en detall. L'estudi de l'astenozoospermia a través de gels bidimensionals ha donat lloc a la oportunitat d'esbrinar aspectes fonamentals d'aquesta patologia. En aquest estudi s'han descrit proteïnes que tenen una potencial implicació en l'astenozoospermia a través de l'anàlisi de l'expressió de les proteïnes identificades al mapa proteic de l'espermatozoide humà.

Metodologia

Vint pacient astenozoospermics i deu controls donants de semen han sigut inclosos en aquest estudi. Els plasma seminal va ser eliminat amb un gradient del 50% de Percoll per evitar la contaminació d'altres cèl·lules. Les proteïnes es van extreure amb un medi de lisis que conté urea i aquestes es van separar en una primera dimensió en tires de pH de 5 a 8. La segona dimensió, on les proteïnes es van separar segons el seu pes molecular, es va fer amb un gel al 12% de poliacrilamida. Es va determinar la intensitat de 101 proteïnes/*spots* a pacients astenozoospermics i controls i es van identificar les possibles correlacions en l'expressió de les proteïnes dels espermatozoide amb la patologia estudiada.

Resultats

L'estudi comparatiu de les quantitats de les proteïnes del mapa bidimensional de l'espermatozoide humà entre pacients astenozoospermics i donants ha resultat en la identificació de disset proteïnes, set amb quantitats menors i vuit i un *spot* compost per dos proteïnes amb majors en pacients. La immunolocalització d'una de les proteïnes identificades

(clusterina i seminogelina) confirma els resultats proteòmics. A més, s'ha pogut crear un *cluster* amb l'expressió de les proteïnes caracteritzades que separa els pacients dels controls en dos grups discrets.

Conclusions

Totes les proteïnes identificades en aquest estudi amb excepció de la clusterina i la seminogelina s'han caracteritzat per primera vegada com a relacionades amb l'astenozoospèrmia. Catorze d'aquestes proteïnes pertanyen a tres grups funcionals principals que són la producció d'energia, l'estructura i moviment i la senyalització cel·lular i regulació. També s'han detectat varies proteïnes alterades en forma de precursor en astenozoospèrmics. S'han trobat explicacions lògiques d'aquestes proteïnes caracteritzades amb la mobilitat reduïda dels pacients estudiats. S'ha trobat també una signatura d'expressió proteica que podria predir l'astenozoospèrmia amb l'elaboració d'un *cluster* que podria ser interessant cap a la identificació de possibles etiologies o mecanismes involucrats en l'astenozoospèrmia.

Article 4

Proteomic identification of human sperm nuclei isolated through CTAB treatment

de Mateo S, Castillo J, Estanyol JM, Ballescà JL, Oliva R (2010)

In preparation

Corresponding pages of this memory..... 113-146

Article 4

Proteomic identification of human sperm nuclei isolated through CTAB treatment

de Mateo S, Castillo J, Estanyol JM, Ballescà JL, Oliva R (2010)

In preparation

Resum en català

Introducció

La composició proteica de l'espermatozoide humà és rellevant per l'enteniment d'aspectes fonamentals en la reproducció i per la identificació de causes d'infertilitat desconegudes. S'han descrit proteïnes amb funcions al nucli de l'espermatozoide a estudis proteòmics anteriors basats en la identificació proteica a través de l'espectrometria de masses (MS). Aquestes proteïnes nuclears podrien tenir un paper important en el desenvolupament de l'espermatozoide o en mecanismes posteriors a la fusió gamètica. Tot això ha portat a focalitzar aquest estudi en la descripció del proteoma nuclear de l'espermatozoide humà amb diferents sistemes d'electroforesis amb gels de poliacrilamida i les tècniques de MS.

Metodologia

S'han aïllat els nuclis espermàtics de quatre mostres normozoospermiques mitjançant tractament amb un detergent anomenat CTAB que dissol totes les estructures de la cèl·lula excepte el nucli. La puresa dels nuclis es va comprovar amb microscòpia òptica i microscòpia electrònica de transmissió. Es van extreure les proteïnes nuclears per ser després separades en gels bidimensionals (2D), gels àcids de poliacrilamida i gels SDS-PAGE i es van escindir els *spots*/bandes visibles per la seva identificació proteica a través de MS.

Resultats

Els nuclis aïllats no tenien adherit ni estructures de la cua ni d'acrosoma segons la visualització d'aquests amb microscòpia òptica i amb microscòpia electrònica de transmissió. Es van resoldre prop de 150 *spots* amb gels 2D dels quals es van escindir 76 que han donat lloc a la

identificació amb MS de 41 proteïnes diferents. Als gels monodimensionals àcid i d' SDS s'han visualitzat diverses bandes de les quals s'han retallat un total de 90 fragments per caracteritzar les proteïnes que hi contenen. La identificació de les proteïnes separades pels sistemes d'electroforesi monodimensionals es troba incompleta però s'espera la caracterització de centenars de proteïnes diferents addicionals del nucli de l'espermatzoide humà.

Conclusions

Els resultats d'identificació proteica per gels bidimensionals han donat lloc a la caracterització de 41 proteïnes diferents del proteoma nuclear de l'espermatzoide humà. D'aquestes, moltes ja es van identificar a estudis proteòmics similars però en quatre aquesta és la primera vegada que s'han caracteritzat a l'espermatzoide i són la HISTH2AA, SUZ12, Testin i HSPA13. S'ha buscat la possible localització nuclear de totes les proteïnes que no es tenia constància anteriorment i a algunes no s'ha pogut justificar donant lloc possiblement a una nova funció de la proteïna descrita a l'espermatzoide. La disponibilitat de centenars de proteïnes addicionals des dels gels monodimensionals donarà lloc a una caracterització més completa del proteoma nuclear de l'espermatzoide humà.

3.3. Caracterització proteica d'espermatozoides humans seleccionats a través de gradients de densitat / *Proteomic characterization of human spermatozoa selected through density gradients.*

Article 5

Improvement in chromatin maturity of human spermatozoa selected through density gradient centrifugation

de Mateo S, Ramos L, van der Vlag, de Boer P, Oliva R (2010)

In press

Corresponding pages of this memory..... 151-181

Article 5

Improvement in chromatin maturity of human spermatozoa selected through density gradient centrifugation

de Mateo S, Ramos L, van der Vlag, de Boer P, Oliva R (2010)

In press

Resum en català

Introducció

Un dels més fonamentals i característics canvis durant l'espermatogènesi és el recanvi d'histones per protamines que empaquetaran el nucli espermàtic. En humans, aquest recanvi no és complet i romanen a la cromatina histones i variants d'histones possiblement importants tant pel desenvolupament espermàtic com per la post-fertilització. S'han trobat a pacients infèrtils alteracions en l'oxidació de les protamines i la formació de ponts disulfur entre les cisteïnes d'aquestes durant el pas de l'espermatozoide per l'epidídim. En aquest estudi s'ha estandarditzat un protocol de centrifugació en gradients de PureSperm que és capaç d'aïllar parcialment poblacions espermàtiques que difereixen en la maduració de la cromatina segons el contingut de protamines i de variants d'histones.

Metodologia

Un conjunt de setanta-nou pacients oligoastenoteratozoospèrmics (OAT) i un conjunt de 37 pacients normozoospèrmics es van incloure en aquest estudi. Les cèl·lules espermàtiques d'ambdós tipus de mostres es van seleccionar amb un protocol de centrifugació en gradient consistent en un gradient del 45% i posteriorment del 30 i 90% amb les dos fraccions resultats de la primera centrifugació. Es van determinar els tiols lliures i tiols totals de les fraccions obtingudes al final del protocol de centrifugació en gradient i la mostra inicial (*neat*) amb la molècula fluorescent mBBR que uneix tiols reduïts i citometria de flux. També es va determinar el contingut de protamines amb gels de poliacrilamida àcids i es van caracteritzar proteïnes de la cromatina com són els nucleosomes, precursor de protamina 2 (pre-P2), les variants d'histones H3.1/H3.2 i TH2B i les modificacions H4k8ac i H4K8, 12, 16ac per

immunofluorescència (IF). També es va determinar el dany al DNA d'aquestes cèl·lules amb TUNEL.

Resultats

El protocol de centrifugació en gradient en OAT va seleccionar al *pellet* del 90% espermatozoides amb un major contingut de protamines determinat tant per mBBr-citometria de flux com amb gels àcids segons la relació protamina/DNA. També es troba una major maduració de la cromatina als espermatozoides seleccionats d'ambdós mostres segons la caracterització de proteïnes nuclears mitjançant IF, especialment per la TH2B i la H4k8ac. Es va detectar també una tendència en la millora del dany al DNA als espermatozoides seleccionats.

Conclusions

En aquest treball s'ha aconseguit separar parcialment les poblacions visibles a les mostres estudiades segons el seu contingut de protamines determinat per mBBr i amb gels àcids amb el protocol de centrifugació en gradient presentat. També, els espermatozoides seleccionats, contenen més variant d'histona TH2B a la que s'ha descrit una influència en la formació del pronucli i enriquit a gens importants per l'espermatogènesi. A més, la modificació d'histona H4k8ac també s'ha trobat en major quantitat als espermatozoides seleccionats. Aquesta se li ha atribuït un paper en la determinació de la heterocromatina després de la fecundació i un enriquiment a gens importants pel desenvolupament embrionari. Aquest treball ha donat lloc a una major caracterització de l'espermatozoide humà amb diferents tècniques que proveeix un increment en el coneixement biològic del l'espermatozoide normal.

3.4. Article de revisió / *Review*.

Article 6

Sperm cell proteomics

Oliva R, de Mateo S, Estanyol JM (2009)

Proteomics 9:1004-1017. Review.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19212950>

Corresponding pages of this memory..... 187-200

Article 6

Sperm cell proteomics

Oliva R, de Mateo S, Estanyol JM (2009)

Proteomics 9:1004-1017. Review.

Resum en català

L'espermatozoide és la cèl·lula responsable de portar la informació genètica al oòcit. A més, recentment s'ha vist que també pot portar una *cargo* epigenètic important pel desenvolupament embrionari. Molts estudis proteòmics s'han desenvolupat per caracteritzar l'espermatozoide d'humà i d'altres espècies. Aquesta revisió es focalitza en els resultats més rellevants disponibles de l'estudi de l'espermatozoide humà a nivell proteòmic.

El proteoma de l'espermatozoide madur humà ha sigut descrit gràcies a les tècniques d'espectrometria de masses (MS). S'han utilitzat essencialment dos estratègies diferents: gels bidimensionals (2D) i MALDI-TOF com tècnica d'MS o digestió peptídica d'una mescla proteica i LC-MS/MS. Amb la primera estratègia s'han caracteritzat 131 proteïnes del mapa bidimensional permetent la utilització d'aquest mapa per altres laboratoris sense tenir que utilitzar l'MS. Amb la segona estratègia s'ha identificat un catàleg de 1056 proteïnes. La comparació d'aquestes dues vies d'estudi del proteoma de l'espermatozoide humà dona lloc a la conclusió de que ambdós aporten una informació complementària. En els gels 2D s'han identificat 42 proteïnes que no s'havien identificat amb LC-MS/MS, i a més, l'electroforesi de proteïnes mesura el seu possible contingut epigenètic.

La utilització dels recursos proteòmics, i en especial de l'espectrometria de masses, ha permès la identificació de proteïnes possiblement involucrades en algunes causes d'infertilitat desconegudes com és l'astenozoospermia entre d'altres. Aquests resultats donant peu a pensar en el gran potencial que conté l'estudi i la identificació proteica per MS i en la possibilitat d'aplicació d'aquestes a la clínica en un futur.

L'estudi proteòmic no només s'ha aplicat a l'espermatozoide humà si no també a altres mamífers i organismes inferiors com *Caenorhabditis elegans* donant lloc a la identificació de proteïnes potencialment essencials evolutivament per la biologia de l'espermatozoide.

Com he dit anteriorment, abans l'espermatozoide es creia que només tenia la funció d'entregar el material gènic a l'oòcit, però s'ha descrit relativament recentment que també proveeix a l'oòcit d'informació epigenètica que podria ser crucial pel desenvolupament embrionari. Aquesta informació epigenètica es troba constituïda per RNAs i proteïnes que es torben unides a regions específiques del genoma masculí ja que el 5-15% del DNA d'algunes espècies es troba compactat per histones i altres proteïnes. A més, s'han descrit factors de transcripció i proteïnes nuclears a estudis proteòmics que podrien ser tant romanents derivats de l'espermatogènesi com intervenir en el desenvolupament embrionari primerenc.

Concloent, tot i el gran catàleg de proteïnes identificades a l'espermatozoide humà en condicions normals i patològiques, encara hi ha un gran desconeixement de la biologia de l'espermatozoide. La implementació de l'estudi proteòmic a la clínica es troba molt limitat en aquests temps però sense cap dubte, la proteòmica ofereix un gran potencial per la caracterització de biomarcadors de la funció espermàtica.

4

4

Discussió
Discussion

Discussion

For the discussion in English see the discussion section of each article in the following pages of this memory:

- Article 1

de Mateo S, Gázquez C, Guimerà M, Balasch J, Meistrich ML, Ballescà JL, Oliva R (2009) Protamine 2 precursors (Pre-P2), protamine 1 to protamine 2 ratio (P1/P2), and assisted reproduction outcome. *Fertility and Sterility*..... 72-75

- Article 2

de Mateo S, Martínez-Heredia J, Estanyol JM, Domínguez-Fandos D, Vidal-Taboada JM, Ballescà JL, Oliva R (2007) Marked correlations in protein expression identified by proteomic analysis of human spermatozoa. *Proteomics*..... 89-92

- Article 3

Martínez-Heredia J, de Mateo S, Vidal-Taboada JM, Estanyol JM, Ballescà JL, Oliva R (2008) Identification of proteomic differences in asthenozoospermic sperm samples. *Human Reproduction*..... 103-106

- Article 4

de Mateo S, Castillo J, Estanyol JM, Ballescà JL, Oliva R (2010) Nuclear protein characterization of human spermatozoa through CTAB treatment. *In preparation*..... 122-127

- Article 5

de Mateo S, Ramos L, van der Vlag, de Boer P, Oliva R (2010) Improvement in chromatin maturity of human spermatozoa selected through density gradient centrifugation. *In press*..... 163-165

- Article 6

Oliva R, de Mateo S, Estanyol JM (2009) Sperm cell proteomics. *Proteomics. Review*..... 187-196

4.1. Contingut de protamines i resultats de reproducció assistida

Aquesta part de la discussió es basa en l'article 1 presentat a aquesta memòria de tesi: de Mateo S, Gázquez C, Guimerà M, Balasch J, Meistrich ML, Ballescà JL, Oliva R (2009) Protamine 2 precursors (Pre-P2), protamine 1 to protamine 2 ratio (P1/P2), and assisted reproduction outcome. *Fertility and Sterility* 91:715-722.

La determinació del contingut de protamines segons la relació de protamines (P1/P2) i la relació del precursor de protamina 2 amb la protamina 2 (pre-P2/P2) a la mateixa mostra seleccionada per gradients de PureSperm i que va ser utilitzada per reproducció assistida (IVF i ICSI), va mostrar una correlació amb la taxa d'embaràs (de Mateo et al 2009). Així mateix, en determinats casos, la taxa de fertilització es pot veure també afectada pel contingut de protamines.

La relació de protamines del grup de pacients que no embarassen és més baixa que la del grup de pacients que aconsegueixen l'embaràs. La taxa de fertilització emprant la tècnica de IVF també es troba disminuïda a pacients amb P1/P2 baixa, fet que no succeix quan s'utilitza la tècnica de ICSI. Aquests resultats es troben en concordança amb els obtinguts en estudis anteriors (Aoki et al 2006a). Una de les funcions que s'ha atribuït a les protamines ha sigut el correcte empaquetament del nucli de l'espermatozoide permetent que aquest arribi a l'òocit (Oliva & Dixon 1991), de manera que una relació P1/P2 aberrant podria donar lloc a alteracions en les formes hidrodinàmiques de l'espermatozoide resultant en una baixa motilitat (Aoki et al 2005). Amb tot això, una possible explicació sobre els resultats obtinguts pot ser que la baixa relació de protamines dificulta la fertilització només en el cas de IVF ja que els espermatozoides han de nedar per arribar al oòcit, i no com passa amb ICSI, on l'espermatozoide s'injecta directament al oòcit. Una explicació alternativa sobre els efectes perjudicials de la relació P1/P2 baixa pot ser que els espermatozoides siguin menys viables i presentin un major dany al DNA (Aoki et al 2006d) i per tant, possiblement menys capaços de fecundar amb èxit. Tot i així, sembla que la injecció intracitoplasmàtica (ICSI) és capaç de fer un

bypass de la disminució en l'habilitat funcional espermàtica associada amb la deficiència en el contingut de protamines (Aoki et al 2006d).

Diversos estudis han detectat pacients infèrtils amb relacions de protamines (P1/P2) elevades (Balhorn et al 1988, de Yebra et al 1993, de Yebra et al 1998, Mengual et al 2003) com a possible conseqüència de la disminució de protamina 2 madura, a causa del processament incomplet del seu precursor pre-P2 (de Yebra et al 1998). Aquest fet es troba recolzat per la detecció d'una correlació positiva entre P1/P2 i pre-P2/P2. Tot i així, a l'estudi presentat aquí, dos mostres que tenen nivells elevats de precursor presenten una relació de protamines considerada com normal i per tant, concretament en aquestes mostres, el contingut de protamines i la presència de precursor de P2 no es troben relacionats. Recentment, es va descriure també la detecció d'una relació de protamines baixa a pacients infèrtils (Aoki et al 2005). Tot això ens fa pensar que les associacions entre P1/P2, pre-P2/P2 i la taxa d'embaràs que hem detectat en aquest estudi poden ser el resultat de diferents etiologies independents, resultant en un grup heterogeni d'alteracions al contingut de les protamines (Carrell et al 2007).

La presència de precursor de protamina 2 ja s'ha demostrat prèviament en pacients infèrtils (de Yebra et al 1998, Torregrosa et al 2006), però aquest treball és el primer que relaciona els nivells de Pre-P2 amb els resultats de reproducció assistida. Els resultats mostren també una relació de pre-P2/P2 baixa al grup de pacients que no embarassa, en canvi, aquesta relació no afecta a la taxa de fertilització. Una possible explicació pot ser que, degut a que la relació de protamines i la de pre-P2/P2 correlacionen positivament en aquest treball i en un treball anterior (Torregrosa et al 2006), i com que la relació P1/P2 baixa sembla que fa disminuir la capacitat d'obtenir un embaràs, la relació baixa de pre-P2/P2 podria ser un marcador de P1/P2 baixa. A més, és possible que el DNA espermàtic no correctament empaquetat per les protamines sigui més susceptible a ser danyat i doni lloc a uns resultats de reproducció assistida pobres (Aoki et al 2005b, Domínguez-Fandos et al 2007). Un altre hipòtesi podria ser que les protamines funcionin com a marcador epigenetic d'algunes regions del genoma masculí amb un potencial efecte al desenvolupament del embrió (Oliva & Dixon 1991, Oliva 2006, Martínez-Heredia et al 2006, de Mateo et al 2007).

La interpretació global dels resultats d'aquest estudi és que la presència d'una relació P1/P2 baixa als espermatozoides de pacients infèrtils es troba relacionada amb una funció defectuosa en el procés de fertilització quan aquests espermatozoides s'utilitzen per fecundació *in vitro* (IVF), encara que aquest possible efecte negatiu de la P1/P2 baixa és superat mitjançant la utilització del ICSI. Per altra banda, tot i que la fertilització no es troba disminuïda en presència d'una relació P1/P2 baixa en el cas que s'utilitzi ICSI, el desenvolupament embrionari no progressa, tal i com s'observa amb la taxa d'embaràs. Un gran ventall d'estudis s'obren per aclarir el potencial mecanisme involucrat en les correlacions trobades en aquest treball.

4.2. Proteòmica de l'espermatozoide humà

Aquesta segona part de la discussió es basa en els articles 2, 3, 4 i 6 presentats a aquesta memòria de tesi. L'apartat anomenat "Caracterització proteòmica de l'espermatozoide humà" es basa específicament en l'article de revisió i en els articles que han donat lloc a la descripció proteòmica de l'espermatozoide humà:

- Oliva R, de Mateo S, Estanyol JM (2009) Sperm cell proteomics. *Proteomics* 9:1004-1017. Review.
- de Mateo S, Martínez-Heredia J, Estanyol JM, Domínguez-Fandos D, Vidal-Taboada JM, Ballescà JL, Oliva R (2007) Marked correlations in protein expression identified by proteomic analysis of human spermatozoa. *Proteomics* 7:4264-4277.
- de Mateo S, Castillo J, Estanyol JM, Ballescà JL, Oliva R (2010) Nuclear protein characterization of human spermatozoa through CTAB treatment. *In preparation*.

L'apartat d'aquesta discussió anomenat "Anomalies proteòmiques espermàtiques a pacients infèrtils" es basa en els següents articles:

- de Mateo S, Martínez-Heredia J, Estanyol JM, Domínguez-Fandos D, Vidal-Taboada JM, Ballescà JL, Oliva R (2007) Marked correlations in protein expression identified by proteomic analysis of human spermatozoa. *Proteomics* 7:4264-4277
- Martínez-Heredia J, de Mateo S, Vidal-Taboada JM, Estanyol JM, Ballescà JL, Oliva R (2008) Identification of proteomic differences in asthenozoospermic sperm samples. *Human Reproduction* 23:783-791".

4.2.1. Caracterització proteòmica de l'espermatozoide humà

L'espermatozoide és la cèl·lula responsable d'entregar el genoma patern a l'òocit. La cèl·lula espermàtica durant la espermatogènesi experimenta importants canvis genètics, cel·lulars,

funcionals i a nivell de la compactació de la cromatina (Oliva & Dixon 1991, Mezquita 1985, Kierszenbaum & Tres 2004, Rousseaux et al 2005, Balhorn 2007). Al final de l'espermatogènesi es produeix el recanvi de les histones per les protamines (Oliva & Dixon 1991, Balhorn 2007, Oliva 2006) donant lloc a una major compactació del DNA de l'espermatozoide. Tot i així, aquest recanvi en humans no és complet i aproximadament un 15% del DNA roman empaquetat per les histones. A la vegada, una cop l'espermatozoide es fusiona amb l'òocit, el pronucli espermàtic experimenta un altre recanvi de les protamines per les histones.

La importància del procés d'espermatogènesi i l'accessibilitat de l'espermatozoide han donat lloc al desenvolupament d'estudis sobre la composició i els mecanismes involucrats en aquesta cèl·lula (Oliva & Dixon 1991, Balhorn 2007, Oliva 2006, Meistrich et al 2003). Les noves tècniques d'identificació proteica, a través de l'espectrometria de masses (MS), han donat lloc a una descripció extensa de les proteïnes que componen l'espermatozoide humà (Lefièvre et al 2007, Martínez-Heredia et al 2006, Baker et al 2007, de Mateo et al 2007, Aitken et al 2008).

L'estudi de la composició de l'espermatozoide humà va començar al 1873 per Miescher, que va descriure un component bàsic de l'espermatozoide de Salmó anomenat "protamin", ara conegut com a protamina (Dahm 2005). Per tant, les protamines van ser una de les primeres proteïnes identificades a l'espermatozoide de moltes espècies (Felix 1960, Balhorn 2007). A més de les protamines, la cèl·lula espermàtica conté altres proteïnes que es troben a les diferents parts d'aquesta, com és la cua, l'acrosoma, els mitocondris i la matriu nuclear. La caracterització proteica de l'espermatozoide ha progressat enormement gràcies a les noves tècniques d'espectrometria de masses utilitzades per la identificació proteica (Pixton et al 2004, Martínez-Heredia et al 2006, Lefièvre et al 2007, de Mateo et al 2007, Baker et al 2007, Wu & Chu 2008). Per la descripció del proteoma de l'espermatozoide s'han utilitzat essencialment 2 procediments: separació de les proteïnes per gels bidimensionals i identificació proteica amb MALDI-TOF, i separació de les proteïnes o pèptids segons la seva massa molecular i identificació proteica amb LC-MS/MS.

En quant a la identificació proteica a través de gels bidimensionals (2D) i MALDI-TOF, s'ha descrit un catàleg de més d'un centenar de proteïnes (Pixton et al 2004, Martínez-Heredia et al 2006, Li et al 2007, de Mateo et al 2007). En el cas de les proteïnes més abundants del nucli

espermàtic, les protamines, es prediu que aquestes no apareguin al mapa proteic a través de gels bidimensionals convencionals degut a la seva natura bàsica, que les portaria a un dels extrems de la tira de pH a través de la primera dimensió implicant que aquestes siguin resoltes per la segona dimensió. A més, les protamines són insolubles amb SDS i per tant s'espera que no entrin dins del SDS-PAGE que compon la segona dimensió. Per tant, hi ha altres alternatives per estudiar les protamines o proteïnes bàsiques espermàtiques, mitjançant gels àcids tan bidimensionals (Yoshii et al 2005) com monodimensionals (Torregrosa et al 2006).

Una altra estratègia per la descripció del proteoma espermàtic és la utilització de LC-MS/MS per la identificació de mesclures proteiques, com les bandes d'un gel monodimensional, més complexes que les obtingudes amb els gels 2D, on cada *spot* correspon normalment a una única proteïna. Amb aquesta estratègia es van aconseguir identificar prop de 2000 proteïnes (Johnston et al 2005), però no es van descriure llavors quines proteïnes eren. Més endavant, un catàleg de 1056 proteïnes de l'espermatozoide humà es va publicar a través de la separació de les proteïnes solubles i insolubles en Tritó X-100 en un gel d' SDS-PAGE seguit de la seva identificació a través de LC-MS/MS (Baker et al 2007).

S'ha qüestionat quina tècnica d'espectrometria de masses aplicar quan es vol descriure el proteoma de l'espermatozoide, gels 2D i MALDI-TOF o LC-MS/MS. Una comparació dels resultats obtinguts de la descripció del proteoma de l'espermatozoide humà per MALDI-TOF (Martínez-Heredia et al 2006, de Mateo et al 2007) i per LC-MS/MS (Baker et al 2007) demostra que la localització cel·lular de les proteïnes identificades per ambdós mètodes és molt similar ja que les categories a les que pertanyen les proteïnes difereixen en un factor de 1-2 (Oliva et al 2009). A més, es van identificar amb MALDI-TOF 42 proteïnes que no es trobaven a la llista de més de mil proteïnes obtinguda amb LC-MS/MS. Aquest fenomen pot ser degut a la diferència que hi ha en el procés d'obtenció de les proteïnes i no en la tècnica de MS utilitzada. Un altre aspecte a considerar entre les dos tècniques de MS és que a través de la utilització de gels 2D i MALDI-TOF es permet la preservació de les marques epigenètiques de les proteïnes (modificacions postraduccionals (PTMs) com acetilacions, metilacions, etc), ja que aquestes es separen segons la seva càrrega (degut possiblement a una marca epigenètica) als gels bidimensionals i cada *spot* es caracteritza per una sola forma de la proteïna amb les seves possibles PTMs. Tot al contrari, LC-MS/MS pot partir d'un extracte més complex de proteïnes, on pot haver-hi la mateixa proteïna amb diferents marques epigenètiques, que es

tripsinitza generant pèptids i eliminant la possibilitat d'identificar quantes PTMs contenen potencialment les proteïnes a identificar. Per altra banda, la gran quantitat de proteïnes identificades i la robustesa dels resultats amb l'LC-MS/MS és major. Així mateix, es conclou que les dos tècniques són complementàries i es preveu que en futurs experiments d'identificació proteica s'aplicarà una combinació d'ambdues tècniques, tal i com s'ha fet recentment al treball presentat en aquesta tesi doctoral que es troba en fase de preparació (de Mateo et al 2010, *In Preparation*).

Caracterització proteòmica de l'espermatozoide humà

El nostre grup va descriure 98 proteïnes d'un total de 1000 *spots* resolts al mapa proteic de l'espermatozoide humà generat a través de gels 2D i la utilització de MALDI-TOF (Martínez-Heredia et al 2006). Més endavant es van identificar 33 noves proteïnes addicionals d'aquest mapa proteic (de Mateo et al 2007), donant lloc a un conjunt de 131 proteïnes identificades en total. D'aquesta manera es permet l'estudi del proteoma de l'espermatozoide humà per altres grups a través de mapes proteics (2D) sense la utilització de l'espectrometria de masses i amb un llenguatge fàcil d'entendre.

Les proteïnes identificades per aquests mapes 2D corresponen esperadament a diferents categories funcionals: producció d'energia; citoesquelet, flagel i moviment cel·lular; cicle cel·lular, apoptosi i estrés oxidatiu; interacció espermatozoide-oòcit, i síntesi, repliegament i recanvi proteic. Sorprenentment, s'han caracteritzat proteïnes potencialment involucrades al procés de transcripció com el *zinc-finger* ZN234 (Abrink et al 1995). Addicionalment, s'han detectat altres proteïnes amb funcions nuclears com és el factor MCM7, el qual s'ha descrit que té un paper en el cicle cel·lular i la regulació de la proliferació cel·lular (Com et al 2006). Fa uns anys es creia que l'espermatozoide humà només incloïa la funció d'entregar el DNA patern a l'oòcit (Oliva & Dixon 1991), però ara se sap que l'espermatozoide també té el potencial de transferir factors de transcripció al gàmeta femení (Gil et al 2006). Existeixen dos hipòtesis per justificar la presència d'aquests factors de transcripció i proteïnes nuclears a l'espermatozoide. Per una banda, pot ser que corresponguin a factors que han quedat després de l'espermatogènesi, podent així obtenir l'evidència de si han ocorregut errors durant aquest procés. A l'altre hipòtesi es suggereix que siguin factors que marquen regions del genoma masculí i que tenen una funció epigenètica en l'embrió. Ja que aquestes proteïnes nuclears representen una petita fracció de les proteïnes associades a la cromatina espermàtica,

recentment s'ha dirigit l'estudi proteòmic per la caracterització del proteoma nuclear de l'espermatozoide humà a través de l'obtenció de nuclis espermàtics a través del tractament amb el detergent CTAB (de Mateo et al 2010, *In Preparation*) per tal de facilitar la identificació dels components minoritaris del proteoma nuclear de l'espermatozoide humà.

Caracterització proteòmica del nucli de l'espermatozoide humà

A aquest treball presentat (de Mateo et al 2010, *In preparation*), hem implementat un procediment d'aïllament de nuclis espermàtics humans eficient amb el qual s'han pogut aïllar nuclis amb una alta puresa amb els que extreure les seves proteïnes nuclears de l'espermatozoide humà donant lloc a la identificació preliminar de 41 proteïnes. La major part de les famílies de proteïnes identificades corresponen a les histones, SPANX, citoqueratines, subunitats del proteasoma i Tektines. D'altres proteïnes no han sigut prèviament descrites com presents al nucli de l'espermatozoide humà o no s'ha descrit la seva funció en relació a la funció de la cromatina, com són la DLST, S100A8, S100A9 i les Tektines. Fins ara, no s'ha trobat informació o indicació de trobar-se a l'espermatozoide en quatre de les proteïnes descrites: HIST2H2AC, SUZ12, Testin i HSPA13.

Aproximadament un 5-15% de la cromatina espermàtica humana es troba empaquetada per nucleosomes que inclouen les quatre histones canòniques més les variants d'histones, com són les H2A.X, H2A.Z, H3.3 i cenH3 (Gatewood et al 1990, van der Heijden et al 2008). Aquí hem identificat les histones canòniques (HIST1H2AA, HIST1H2AG i HIST2H2AC) i la histona H4. Diverses variants de les histones H2A i H2B han sigut també descrites, com són les H2A.Bbd, la H2AV, H3.3 i TSH2B. El paper d'algunes d'aquestes s'ha suggerit d'importància per l'espermatogènesi, com són la H2A.Bbd (Ishibashi et al 2009), la H2AV o H2A.Z-2 (Matsuda et al 2010) i la H3.3 (van der Heijden et al 2007), i per processos post-fertilització com la TSH2B (Singleton et al 2007b, Govin et al 2007), que s'ha vist també associada a gens importants per l'espermatogènesi (Hammoud et al 2009a).

Les altres famílies de proteïnes trobades amb elevada abundància al nucli de l'espermatozoide humà són les SPANX, que s'han trobat principalment al cap de l'espermatozoide (Salemi et al 2004) i s'ha suggerit que tenen un paper en l'espermioogènesi (Westbrook et al 2006); les citoqueratines, que participen en la formació del cap i la cua de l'espermatozoide

(Kierszenbaum & Tres 2004) i que es van identificar a la matriu nuclear de hámster (Ocampo et al 2005), i les subunitats del proteasoma (PSM), les quals s'han descrit prèviament al citoplasma i nucli de l'espermatozoide (Zimmerman and Sutovsky 2009). Pel que fa a les S100A8, S100A9 i Tektines, no hem trobat explicació de la seva localització nuclear.

A la literatura, s'han trobat possibles explicacions de la localització nuclear d'una proteïna que no s'havia descrit prèviament al nucli/cap espermàtic, anomenada SSB1, i que s'ha trobat colocalitzada al nucli amb una proteïna important pel cicle lític del virus Epstein-Barr (EBV) (Wiedmer et al 2008). Per altra banda, s'han trobat mostres seminals infectades per EBV amb un comptatge espermàtic normal (Kapranos et al 2003) que podria explicar la identificació de SSB1 en el nucli de pacients normozoospermics. En quant a la família HSP70 (HSPA2 i HSPA13 identificades aquí), ha sigut localitzada a la regió acrosoma/cap/nucli d'espermatozoides ejaculats (Kamaruddin et al 2004). A més, l'HSPA2 s'ha caracteritzat amb un paper important en la infertilitat masculina ja que és un component del complex sinaptonemal de la meiosi i participa en l'espermogènesi tardana com a remodelador de membrana plasmàtica (Huszar et al 2006). L'HSPA2 també es va identificar com una de les proteïnes amb un nivell d'expressió que correlaciona amb valors de dany al DNA (de Mateo et al 2007), suggerint que les cèl·lules espermàtiques que no tenen HSPA2 pateixen apoptosi massiva (Govin et al 2006). En canvi, aquesta ha sigut la primera vegada que s'ha descrit la HSPA13 o STCH a l'espermatozoide i per tant, no hi ha informació disponible del seu paper a la cèl·lula espermàtica.

Altres proteïnes s'han trobat associades a l'acrosoma d'espermàtides, com són la PRDX4 (Sasagawa et al 2001) i la PDIA3 (Zhang et al 2007), possiblement participant en la formació de l'acrosoma d'espermatozoides humans. S'ha suggerint un paper en la fertilització i en la maduració de l'espermatozoide per la PDIA3. En quant a la VDAC2, s'ha descrit també a caps d'espermatozoide boví (Triphan et al 2008), i la APCS a la superfície d'espermatozoides humans viables (Naaby-Hansen et al 2010) amb capacitat d'unió a la cromatina (Pepys et al 1994), podent explicar la seva localització al nucli espermàtic per una estratègia proteòmica com la que es presenta aquí. En canvi, la localització nuclear espermàtica d'altres proteïnes trobades en aquest estudi, com són la DLST i la BAF, pot ser no predictable a través de la informació disponible a la literatura. Tot i que BAF és un component de la làmina nuclear de la membrana interna d'altres cèl·lules (Meyerzon et al 2009), no hi ha cap estudi de la funció d'aquesta proteïna a les cèl·lules espermàtiques. La seminogelina (SEMG1), caracteritzada com

una proteïna de secreció, s'ha detectat al cap i peça mitja d'espermatozoides humans, possiblement canviant el potencial i permeabilitat de la membrana i inhibint la motilitat espermàtica indirectament (Yoshida et al 2009), tal i com es va detectar anteriorment (Zhao et al 2007, Martínez-Heredia et al 2008). Cal remarcar que la detecció de proteïnes secretades o de membrana a aquest estudi podria ser deguda a la importació d'aquestes des del fluid epididimal, seminal o prostàtic (Martínez-Heredia et al 2006, Baker et al 2007, de Mateo et al 2007). Una explicació alternativa podria ser que, la potencial reorganització de les proteïnes durant l'aïllament doni lloc a la seva identificació al proteoma del nucli espermàtic.

A través d'aquest estudi, quatre proteïnes han sigut identificades per primera vegada a l'espermatozoide humà. Per la SUZ12 i la testina, s'ha descrit la seva funció a altres cèl·lules, que podria estar o no relacionada amb la funció espermàtica. La SUZ12 és un component del complex EED-EZH2 que té activitat metiltransferasa d'histones (HMT) (Cao and Zhang 2004), mentre que la testina forma part de les unions *adherens* entre les cèl·lules de Sertoli i els caps de les espermàtides allargades, just abans de l'espermiació (Zong et al 1994). No es va detectar ni expressió ni secreció de la testina per part de les cèl·lules espermàtiques de rata (Grima et al 1995), però sí per les cèl·lules de Sertoli. La identificació al nucli de l'espermatozoide humà d'aquestes proteïnes obre la possibilitat d'explorar la seva potencial participació en el metabolisme espermàtic no patogènic.

En resum, considerant les proteïnes identificades amb gels bidimensionals, hem caracteritzat diverses proteïnes que ja s'havien estudiat a l'espermatozoide així com d'altres que no s'havien trobat al nucli espermàtic fins ara. A més, algunes proteïnes ja caracteritzades per estudis proteòmics previs, s'han trobat ara a nuclis espermàtics sense cap explicació disponible a la literatura per la seva localització nuclear. La identificació de proteïnes nuclears addicionals mitjançant gels monodimensionals i LC-MS/MS que s'està portant a terme i que es preveu que donarà lloc a centenars de proteïnes diferents, proporcionarà una informació valuosa respecte al contingut proteic del nucli espermàtic humà.

4.2.2. Anomalies proteòmiques espermàtiques a pacients infèrtils

La identificació d'anomalies proteiques a l'espermatozoide humà a pacients infèrtils s'ha desenvolupat clàssicament mitjançant gels monodimensionals àcids a través de la determinació del seu contingut de protamines i d'histones (Balhorn et al 1988, de Yebra et al 1993, Torregrosa et al 2006, Oliva 2006, Zhang et al 2006, Zini et al 2007). Adicionalment, s'ha determinat el contingut d'altres proteïnes amb gels SDS-PAGE (Naz & Leslie 1999, Chatzimeletiou et al 2008). Inicialment, l'aplicació de l'espectrometria de masses per la caracterització proteica espermàtica va donar lloc a la identificació de quines proteïnes es trobaven amb diferents nivells d'abundància, a través de gels 2D, en un pacient que fallava en el procés de fertilització, comparat amb controls (Pixton et al 2004). Subseqüentment, un altre treball similar va identificar les proteïnes amb diferent quantitats en pacients astenozoospèrmics (mobilitat espermàtica reduïda) comparat amb donants normozoospèrmics (Zhao et al 2007). Als treballs presentats en aquesta tesi es va estudiar també les diferències proteiques de pacients astenozoospèrmics, amb un major número de mostra, i de pacients amb alteracions en el contingut de protamines i amb elevat dany al DNA determinat mitjançant la tècnica de TUNEL (Martínez-Heredia et al 2008, de Mateo et al 2007, respectivament).

Estudi proteòmic a pacients astenozoospèrmics

De les 101 proteïnes/spots estudiats amb gels 2D, disset proteïnes van ser identificades amb diferent abundància a un grup de 20 pacients astenozoospèrmics, comparat amb controls donants de semen. Totes aquestes proteïnes, menys la seminogelina i la clusterina, s'han descrit per primera vegada com desregulades a pacients astenozoospèrmics. La seminogelina ja es va trobar prèviament augmentada a espermatozoides de pacients astenozoospèrmics (Zhao et al 2007) i la clusterina amb major quantitat a espermatozoides anòmals i amb baixa motilitat (O'Bryan et al 1990, Ibrahim et al 2000).

La funció de 14 de les 17 proteïnes identificades correspon a tres grups funcionals: producció d'energia; moviment i estructura, i regulació i senyalització cel·lular. A més, és important mencionar que 6 de 17 proteïnes corresponen a formes precursoras de proteïnes madures. L'acumulació de precursors a pacients astenozoospèrmics podria indicar una fallada

generalitzada del processament postraducciona d'aquests, de la mateixa manera com s'ha detectat la presència elevada de precursor de protamina 2 a pacients infèrtils (de Yebra et al 1998, Torregrosa et al 2006).

Les proteïnes corresponents al grup funcional de producció d'energia són COX6B, DLDpre, FHpre i ECH1pre. D'aquestes, la COX6B (Citocrom c oxidasa) és l'enzim final de la cadena respiratòria i és necessari per la producció d'ATP, i per tant, una disminució d'aquesta proteïna, tal i com s'ha detectat aquí, podria comportar a una reducció de la producció d'ATP i conseqüentment a una disminució en la mobilitat espermàtica. La DLD és un de les tres proteïnes catalítiques del complex piruvat deshidrogenasa que converteix el piruvat en Acetil-CoA. Una disminució de la forma madura del DLD, i per tant, com a conseqüència un augment de la seva forma precursora, podria donar lloc a una distorsió metabòlica extensa (Robinson 1995). En concret, la disfunció del cicle de Krebs podria comportar una disminució de la motilitat dels espermatozoides en pacients astenozoospermics, ja que se sap que la freqüència del batec del flagel es troba directament relacionada amb la producció d'energia o ATP (Cardullo & Baltz 1991). Una altra proteïna a la que es suggereix que l'augment del seu precursor causa la disminució de la forma madura és la FH, proteïna que participa al cicle del àcid cítric o de Krebs (Coughlin et al 1998). Per tant, en aquest treball s'han identificat diverses proteïnes relacionades amb les majors fonts de producció d'ATP de l'espermatozoide que potencialment promouen una fallada del moviment de la cua a astenozoospermics. Aquests resultats es troben en concordança amb els obtinguts a un estudi previ (Zhao et al 2007), suggerint la presència d'una desregulació general en les vies metabòliques que produeixen l'energia necessària pel moviment espermàtic.

Un altre grup funcional de proteïnes alterat a astenozoospermics és el grup d'estructura i moviment, on es troben ACTB, H2A, PIP, PIPpre i SEMG. L'actina (ACTB) participa a moltes funcions cel·lulars com és la motilitat cel·lular entre d'altres (Machesky & Install 1999). Per tant, una disminució de ACTB podria explicar una disminució del moviment espermàtic, ja que sense un bon suport del citoesquelet, el flagel no podria moure's correctament. Menys informació hi ha de la proteïna PIP, de la que es diu que es troba involucrada en la unió de l'actina (Schaller et al 1991, Caputo et al 1999, Yoshida et al 2003). PIP també s'ha trobat a la zona postacrosòmica, unida a la superfície de l'espermatozoide després de la capacitació presentant una potencial implicació en la fertilització (Bergamo et al 1997). També s'ha descrit

que la PIP degrada un dels majors constituents del coàgul seminal, la fibronectina (Lilja et al 1989, Autiero et al 1991, Caputo et al 2000). Aquest fet suggereix que la PIP podria contribuir a la degradació de la fibronectina durant la liqüefacció, i per tant, la disminució de PIP i del seu precursor a pacients astenozoospèrmics podria donar lloc a una liqüefacció incompleta i a una conseqüent major viscositat del fluid seminal que comportaria una major resistència al moviment espermàtic, ja que el moviment de la cua es relaciona amb la viscositat del medi (Cardullo and Baltz 1991). Una altra proteïna que s'ha trobat augmentada en astenozoospèrmics és el precursor de la seminogelina de 21 kDa. S'ha descrit la funció del fragment de la seminogelina de 14kDa com a inhibidor de la motilitat (Yoshida et al 2003), per tant podria ser que aquest fragment identificat en aquest treball presenti el mateix efecte.

En el grup de proteïnes implicades en la regulació i senyalització cel·lular, IMPA1 es troba a elevats nivells en astenozoospèrmics. El IMPA1 participa en la síntesi de mio-inositol (Cryns et al 2008) i se li ha atribuït a aquest una potencial funció reguladora de la osmolaritat del fluid seminal vesicular. Així mateix, s'ha demostrat que una hipo- o hiper-osmolaritat del medi redueix la mobilitat progressiva i les velocitats dels espermatozoides (Liu et al 2006), i per tant, és possible que una elevada quantitat de IMPA1 intervingui en la reducció de la motilitat. És remarcable que vuit de les proteïnes que s'han trobat incrementades als pacients astenozoospèrmics s'han identificat també S-nitrosilades (Lewis et al 1996, Lefièvre et al 2007), suggerint un mecanisme alternatiu per la modulació de la motilitat espermàtica deguda al òxid nítric.

Sobre les proteïnes que no es troben a dins de cap dels 3 grups funcionals mencionats, la HSPA2 s'ha identificat com una de les primeres chaperones de les proteïnes de transició (TNP1 i TNP2, Govin et al 2006), i com a disminuïda a espermatozoides de pacients infèrtils (Cedenho et al 2006). A més, l'HSPA2 és també un component del complex sinaptonemal i s'ha trobat implicada en els últims esdeveniments de la espermiogènesi, com és la extrusió citoplasmàtica i la remodelació de la membrana (Huszar et al 2006). Per tant, la detecció de l'HSPA2 augmentada a astenozoospèrmics podria estar relacionada amb la disfunció de la motilitat a algun d'aquests nivells. A la vegada, TEX12, que intervé també al complex sinaptonemal, ha sigut caracteritzada també com augmentada en aquests pacients (Hamer et al 2006).

Una altra proteïna interessant és el precursor de la clusterina, el qual, tot i que s'ha suggerit que participa a molts processos dins i fora la cèl·lula, la seva funció no es troba de tot clara. En quant a les seves funcions a nivell de la fertilitat, s'ha dit que la clusterina es troba relacionada amb la prevenció del dany al DNA provocat per les reaccions oxidatives (Reyes-Moreno et al 2002), entre d'altres. La prevenció del dany oxidatiu per part de la clusterina podria beneficiar l'espermatzoide en el tracte reproductiu de la femella, així com en els procediments de reproducció assistida. A toros, es va descriure que espermatzoides positius per clusterina eren anormals i que la presència de clusterina es relacionava inversament amb la motilitat (Ibrahim et al 2000). A altres animals s'ha trobat augmentada la clusterina a espermatzoides provinents de testicles amb elevada temperatura (Clark & Grisworld 1997, Ibrahim et al 2000) i a humans a espermatzoides anormals (O'Bryan et al 1990 & 1994). En aquest estudi, el precursor de la clusterina s'ha detectat augmentat a astenozoospermics, tant a nivell proteòmic com mitjançant la immunodetecció. Un punt interessant és el fet de que la detecció de proteïnes augmentades o disminuïdes al espermatzoide podria ser degut a causa d'una alteració de l'expressió del gen o a un increment/disminució de la importació d'aquestes a la cèl·lula. Almenys, la identificació de diferents nivells de seminogelina i clusterina a les cèl·lules espermàtiques, podria ser deguda a l'augment de la importació d'aquestes. Calen més experiments per aclarir si el contacte amb el fluid seminal podria causar aquestes diferències proteòmiques als espermatzoides dels pacients.

Per comprovar si el patró d'expressió proteòmic dels espermatzoides de pacients astenozoospermics és diferent al de controls, es va fer un *cluster* o agrupació. Aquest va resultar en la separació clara dels pacients astenozoospermics i els donants segons els nivells de cada proteïna analitzada a aquest estudi. Tot i que no s'ha trobat cap proteïna específica que pugui ser utilitzada com a marcador d'astenozoospermia, la combinació de la informació proteòmica dels diferents *spots* analitzats ha sigut suficient per agrupar els pacients astenozoospermics separats dels controls. A més, dins del grup d'astenozoospermics es poden diferenciar subgrups, interpretant així que aquests resultats podrien apuntar a claus importants per la identificació de diferents etiologies associades amb l'astenozoospermia.

Concloent, aquest estudi demostra la validesa de l'anàlisi proteòmic per la identificació de proteïnes amb diferents nivells d'abundància a cèl·lules espermàtiques de pacients astenozoospermics comparat amb controls, mitjançant la descripció de 17 proteïnes alterades.

D'aquesta manera, s'obre una porta per la identificació dels mecanismes i dels marcadors involucrats en l'astenozoospermia.

Estudi proteòmic a pacients infèrtils

En aquest treball s'ha trobat que existeix una correlació entre l'expressió de les diverses proteïnes que es troben a un mateix gel bidimensional (2D) de mostres independents. A més, s'han trobat proteïnes on la seva expressió correlaciona amb el contingut de protamines, la presència de precursor de protamina 2 i el dany al DNA determinat per la tècnica de TUNEL. Segons el nostre coneixement, aquest estudi proteòmic és el primer en relacionar l'expressió de les proteïnes de pacients independents mitjançant gels bidimensionals amb el contingut de protamines i el dany al DNA per gels 2D.

Tot i que la infertilitat humana masculina és un problema mèdic important, la etiologia de molts dels casos és encara desconeguda (Oliva 2006). D'aquesta manera, l'estudi proteòmic de pacients infèrtils podria proporcionar l'explicació molecular d'algunes infertilitats segons si les proteïnes es troben sobreexpressades o subexpressades als pacients infèrtils. La identificació de 131 proteïnes corresponents a *spots* del mapa proteòmic de l'espermatozoide humà (Martínez-Heredia et al 2006, de Mateo et al 2007) ha donat lloc a la oportunitat d'estudiar els nivells d'expressió de 101 proteïnes/*spots* en pacients agrupats segons el seu contingut de protamines i segons el seu dany al DNA, a més determinar les possibles correlacions entre proteïnes de pacients independents.

L'evidència de que estudis proteòmics podrien administrar la identificació de possibles proteïnes involucrades en la infertilitat masculina (Pixton et al 2004, Zhao et al 2007) ha portat a estudiar el nivell proteic de 57 pacients utilitzant el mapa 2D amb l'anàlisi de les 101 proteïnes/*spots* més abundants. Sorprenentment, s'ha detectat que la expressió d'algunes proteïnes correlaciona amb la expressió d'altres en el mateix mapa, obtingut de pacients individuals, amb una correlació molt significativa ($p < 0,001$) i uns coeficients de correlació molt elevats ($r > 0,5$), tant negatius com positius.

Sobre aquestes correlacions entre proteïnes s'han trobat algunes possibles explicacions, com és la correlació en l'expressió d'algunes subunitats del proteasoma amb d'altres subunitats

d'aquest, donant la oportunitat d'entendre millor la funció del proteasoma durant l'espermatogènesi i la fertilització (Haraguchi et al 2007). Una altra correlació directa trobada és la que hi ha entre la PIP i el seu precursor, on quan una de les dues es troba augmentada, l'altre també. Aquest fet es troba amb concordança amb els resultats trobats en l'estudi del proteoma de pacients astenozoospermics, presentat en aquesta memòria de tesi, on tant la PIP com el seu precursor es trobaven els dos disminuïts a aquests pacients comparat amb controls (Martínez-Heredia et al 2008).

Altres correlacions trobades entre proteïnes no són tan directes i la cerca a la literatura pot proporcionar relacions potencials. Així doncs, la correlació entre l'*Outer dense fiber protein 2* (ODF2) i la CDK5 podria ser explicada perquè l'ODF serveix com un blanc funcional de la CDK5 (Rosales et al 2004). Altres relacions són més directes, com és que la CDK5 s'ha detectat durant la espermatogènesi a la primera i segona divisió mitòtica (Godet et al 2004), explicant parcialment la correlació entre aquesta proteïna i la histona H2A. Aquesta observació podria tenir implicacions en la comprensió de l'origen de les alteracions en el reemplaçament de les histones per les protamines durant l'espermogènesi (Balhorn et al 1988, de Yebra et al 1993, Oliva 2006, Carrell et al 2007).

Hi ha casos on la expressió d'una proteïna correlaciona amb un *spot* que està compost per 2 proteïnes i per tant no es pot saber amb quina de les dos es produeix la correlació, o si la correlació implica a les dos proteïnes del *spot*. Tot i així la PIP correlaciona amb l'*spot* compost per la clusterina i la *Ser/Tre protein phosphatase 1* (*spot* anomenat CLU/PPP1CC), posant en evidència la possible relació del PIP amb la clusterina, ja que s'han identificat com antígens en l'aglutinació espermàtica a homes infèrtils (Carlsson et al 2004). Una altra correlació similar és la de la proteïna HSPA2 (*Heat shock protein 2*) i l'*spot* anomenat PSMB7/UAP1, compost per una subunitat del proteasoma i l'*Sperm-associated antigen 2*, on s'ha vist anteriorment que la inhibició del proteasoma resulta en una inducció de les proteïnes *Heat shock* (Ding & Keller 2001).

Aquestes correlacions entre proteïnes a pacients individuals podrien tenir implicacions importants en la caracterització d'associacions funcionals de proteïnes abans no descrites a l'espermatozoide. A més d'aquesta troballa, l'expressió de certes proteïnes també s'ha vist

diferent a pacients agrupats segons el contingut de protamines i el nivell de dany al DNA que presenten els seus espermatozoides. Aquests paràmetres estudiats s'han trobat relacionats amb infertilitat anteriorment (Balhorn et al 1988, de Yebra et al 1993, Sakkas et al 2003, Oliva 2006, Torregrosa et al 2006), però no s'han relacionat fins ara amb els possibles canvis en la composició proteica espermàtica.

Vuit proteïnes s'han identificat amb diferents nivells en pacients amb elevat dany al DNA. Segons dades publicades, a varies d'aquestes proteïnes se'ls hi ha suggerit una relació amb la integritat al DNA. Un dels cassos esmentats és la clusterina, que s'ha relacionat amb l'apoptosi (Bailey et al 2002). El terme "apoptosi abortiva" va ser presentat com un terme que podria explicar elevats nivells de dany al DNA en pacients infèrtils (Sakkas et al 2003). L'HSPA2 també s'ha trobat anteriorment relacionada amb resultats de TUNEL, on s'ha vist que les cèl·lules espermàtiques que no contenen HSPA2 es paren a la profase I dirigint la cèl·lula espermàtica a una apoptosi massiva (Govin et al 2006).

Cinc proteïnes van ser identificades amb diferents nivells d'expressió en grups de pacients dividits segons si la relació de protamines (P1/P2) és baixa, mitja o alta (segons mitja \pm SD de donants controls de semen), i set proteïnes més segons si la relació pre-P2/P2 és baixa o alta (segons els quartils dels extrems de les dades de pacients). D'aquestes, n'hi ha que s'ha descrit la seva funció prèviament a l'espermatozoide, però d'altres, aquesta és la primera vegada que es detecten a la cèl·lula espermàtica i no es coneix la seva implicació a la biologia de l'espermatozoide (veure de Mateo et al 2007). Una proteïna interessant és la prohibitina (PHB), que s'ha trobat correlacionada positivament amb TUNEL i negativament amb la relació P1/P2, tant amb dades proteòmiques com immunocitofluorescents. La PHB sembla tenir varies funcions (Mishra et al 2006). Tal i com indica el seu nom, una d'elles és l'aturada o "prohibició" de la proliferació cel·lular (Choongkittaworn et al 1993) i una altra pot ser el comportar-se com una chaperona nuclear on pot modular l'activitat transcripcional (Mishra et al 2006). La ubiquitinització de la PHB s'ha demostrat a espermàtides testiculars i a espermatozoides (Thompson et al 2003, Mishra et al 2006), proposant un paper en la facilitació del marcatge d'espermatozoides anòmals per la seva degradació (Thompson et al 2003). Els espermatozoides de pacients infèrtils s'han caracteritzat també amb anomalies en el contingut de protamines i amb dany al DNA (Aoki et al 2005b), per tant, la correlació trobada en aquest

treball entre PHB i aquests paràmetres podria ser explicada per les funcions atribuïdes a la PHB.

Finalment, amb els dos treballs presentats en aquest apartat de “Anomalies proteòmiques espermàtiques a pacients infèrtils”, hem contribuït en la identificació de correlacions de l’expressió entre proteïnes a espermatozoides de pacients individuals. S’ha relacionat també l’expressió d’algunes proteïnes amb paràmetres que ja havien sigut identificats com involucrats en la infertilitat, com és el contingut de protamines, el dany al DNA i amb la patologia seminal anomenada astenozoospermia. Queda llavors oberta una finestra per subseqüents estudis dirigits a aclarir les funcions d’aquestes proteïnes identificades i les potencials vies metabòliques de l’espermatozoide humà implicades en les infertilitats masculines degudes als paràmetres estudiats.

4.3. Caracterització proteica d'espermatozoides seleccionats a través de gradients de densitat

L'última part de la discussió es basa en l'article 5 d'aquesta memòria de tesi: de Mateo S, Ramos L, van der Vlag, de Boer P, Oliva R (2010) Improvement in chromatin maturity of human spermatozoa selected through density gradient centrifugation. *International Journal of Andrology*. In press (veure la carta d'acceptació de l'article a la pàgina 295-296 d'aquesta memòria).

En aquest treball s'ha fet servir per primera vegada un protocol de centrifugació en gradient de densitat amb PureSperm constituït per 2 passos que permet la selecció d'una fracció d'espermatozoides que presenten una bona maduració de la cromatina, tal com indiquen les dades de tiols totals (protaminació) i la determinació del contingut de protamines relatiu al DNA. A més, s'ha confirmat aquest efecte de selecció amb la detecció d'un menor contingut d'histones a la fracció seleccionada a través de la seva detecció amb immunofluorescència (IF).

Com a observació general d'aquest estudi, el mesurament de la totalitat de tiols provinents de les protamines a les mostres abans de la centrifugació en gradient (anomenades *neat*) i la fracció seleccionada després del gradient, mostren un major pic de fluorescència (major contingut de tiols totals o protaminació) a la població seleccionada al histograma i anomenada M2, dels normozoospermics comparats amb els oligoastenoteratozoospermics (OAT). A la vegada, els OAT presenten menor fluorescència a les poblacions M1 i M2 que els normozoospermics. En quant a les senyals d'immunofluorescència corresponents a les histones H3.1/H3.2, els nucleosomes i el marcador de nucleosomes KM2 preferent per les cèl·lules somàtiques apoptòtiques s'han vist augmentades a totes les fraccions estudiades dels OAT, excepte pels nucleosomes a la fracció seleccionada (*pellet* del 90%). Aquests resultats es troben en concordança amb la determinació d'una relació protamina/DNA menor en el *neat* i en la fracció no seleccionada dels OAT, comparat amb normozoospermics i donants. La relació P1/P2 i les relacions protamina vs DNA, sobretot en OAT, es normalitzen considerablement a la fracció seleccionada després de la centrifugació en gradient d'una manera més clara que amb

la mesura de la totalitat dels tiols amb la molècula d'mBBr i Citometria de Flux. Aquest fet podria ser degut a que en els OAT la reducció dels tiols amb DDT per mesurar els tiols totals no ha sigut òptima a causa dels fenòmens d'hiperoxidació de les protamines identificats anteriorment (Ramos et al 2008). Finalment, les dades presentades aquí estan en concordança amb els treballs d'altres grups on els OAT mostren una remodelació incompleta de la cromatina després de l'espermioogènesi (Engh et al 1992, de Yebra et al 1993 & 1998, Mengual et al 2003, Zhang et al 2006, Nili et al 2009).

Els valors de TUNEL són més elevats que els publicats anteriorment (Henkel et al 2004, Domínguez-Fandos et al 2007) ja que s'ha de tenir en compte que totes les mostres han sigut congelades i descongelades de la mateixa manera, podent afectar així al dany al DNA però no a les proteïnes nuclears i protamines. Tant els normozoospermics com els OAT presenten una menor incidència de dany al DNA als espermatozoides seleccionats comparat amb els no seleccionats, com ja es va detectar prèviament (Morrell et al 2004, Tomlinson et al 2001, Sakkas et al 2000). A la comparació de les dades de TUNEL amb el marcatge immunofluorescent del marcador d'apoptosi KM2 (Dieker et al 2007), es veu la tendència de trobar una major presència de KM2 als espermatozoides no seleccionats en ambdós tipus de mostres, sent només significativa als OAT. Aquesta tendència és consistent amb l'associació d'una fracció gran de tiols lliures amb valors de TUNEL també elevats a espermatozoides de pacients OAT (Ramos et al 2008), ja que l'excés d'un baix contingut de tiols lliures podria ser originat per l'estrès oxidatiu conseqüent de la producció de ROS o per processos apoptòtics.

Les dades obtingudes amb la detecció del precursor de protamina 2 (pre-P2) (Torregrosa et al 2006, de Mateo et al 2009) indiquen un major marcatge als espermatozoides seleccionats dels OAT. Aquest fet és contrari a la creença de que la presència elevada de pre-P2 indica una maduració incompleta de la cromatina espermàtica. Tot i així, el primer treball presentat a aquesta tesi va trobar que els espermatozoides que produïen un embaràs contenien més pre-P2 detectat per *Western Blot* que els que no (de Mateo et al 2009). Encara no s'ha descrit cap explicació sobre aquest fet.

Una qüestió pertinent amb la recerca feta en aquest treball és veure si l'efecte del gradient de centrifugació ha sigut capaç de millorar la qualitat de la cromatina dels espermatozoides dels

pacients OAT. Tant els valors de tiols totals com els de protamina/DNA són majors a la fracció seleccionada dels OAT, significat un major contingut de protamines a aquesta fracció. En canvi, això no passa amb els normozoospermics, on el major contingut de protamines es troba al *neat* i no al *pellet* del 90%. Tot i així, les dades sobre el contingut de protamines de Citometria de Flux i de gels àcids correlacionen bé. Una esperada baixada del contingut de nucleosomes (marcador PL2-3) i d'histones a la fracció seleccionada no és del tot visible als nostres resultats. Això podria ser degut a que la decondensació amb DTT-heparina abans de realitzar la IF és, en general, més efectiva i homogènia a pacients normozoospermics que a OAT, i per tant, en el moment de la decondensació ha pogut haver una selecció involuntària de les cèl·lules amb millor qualitat als OAT i per això no veiem una menor presència de nucleosomes a les seves cèl·lules seleccionades a través de IF.

No obstant, els efectes de la selecció mitjançant de la centrifugació en gradient d'altres proteïnes nuclears estudiades són més interessants per la H4K8ac i la TH2B, ja que els espermatozoides seleccionats es troben significativament més enriquits per aquests marcadors. La histona específica de testicle hSTH2B detectat per l'anticòs TH2B (van Rooijen et al 1998) s'ha descrit amb un paper en la decondensació del nucli masculí després de la fusió dels gàmetes, suggerint una influència de la histona hSTH2B en la formació del pronucli (Singleton et al 2007b). També s'ha suggerit que podria proporcionar una plataforma per la incorporació de variants d'histones (Govin et al 2007) que podria ser important per la determinació de la cromatina post-fertilització. Recentment, dades de *microarrays ChIP on ChIP* han trobat aquesta histona unida a promotors de gens importants per la biologia de l'espermatozoide, la capacitació i la fertilització, i no en gens involucrats en el desenvolupament embrionari (Hammoud et al 2009a).

L'acetilació de la histona H4 a la lisina 8 (H4K8ac) és un marcador present a la heterocromatina pericentromèrica d'espermatozoides de ratolí (van der Heijden et al 2006), que també pot ser detectat durant la expansió nuclear després de la fusió del gàmetes. Aquesta acetilació és similar a la H4K12ac i s'ha proposat l'actuació conjunta d'aquestes en la delineació del desenvolupament de la heterocromatina masculina al zigot quan aquests senyals es perden (van der Heijden et al 2006). Un altre grup (Arpanahi et al 2009) no només va identificar la H4K12ac com un marcador de la fracció soluble de la cromatina espermàtica després del tractament amb endonucleasa (nucleosomes), si no també la va trobar enriquida a gens

importants pel desenvolupament embrionari, al contrari que la TH2B. Cal dir que ambdós tipus de mostres estudiades contenen majors valors de H4K8ac als espermatozoides seleccionats (amb la cromatina més densa). Es va demostrar prèviament que la única major estructura de la cromatina que es manté als espermatozoides de mamífer durant la espermiogènesi és la organització del DNA en dominis en *loop* units a la matriu nuclear (Ward & Coffey 1991, Klaus et al 2001). Per tant, podem suposar que la densitat dels espermatozoides està relacionada amb la organització en *loop* unida a la matriu nuclear (Martens et al 2002, Shaman et al 2007). Una indicació d'aquesta relació s'observa en espermatozoides d'humans i porcs mitjançant la tècnica del SCD (*Sperm Chromatin Dispersion*) juntament amb la tinció de la matriu nuclear, on es va trobar una correlació entre la grandària dels *loops* i les característiques de la matriu tenyida. D'aquesta manera, la matriu estava més compacta en porcs (de la Torre et al 2007) i no tenyida en humans (Santiso et al 2007) quan els *loops* de DNA eren més grans. Així mateix, l'estat d'acetilació de la histona H4 podria ser un predictor de la densitat de la matriu nuclear ja que l'obertura de la cromatina, detectat per l'anticòs que marca el dsDNA, no és l'únic marcador de la densitat/condensació de la cromatina (Ramos et al 2008).

En resum, el gradient de centrifugació de PureSperm presentat dona suport a la percepció de que els gradients de densitat purifiquen, al menys parcialment, espermatozoides ben condensats o "fèrtils" de les poblacions heterogènies característiques de pacients OAT (Hammadeh et al 2001b, Sakkas et al 2000, Söderlund & Lundin 2000). No obstant, amb aquest treball no es pretén descriure un mètode alternatiu de selecció d'espermatozoides per reproducció assistida ja que l'augment de centrifugacions augmenten l'estrès oxidatiu (Zini et al 1999). En canvi, amb aquesta estratègia comparativa s'ha donant lloc a una percepció fonamental que podria proporcionar informació d'aspectes com la variació de la estructura de la cromatina espermàtica, connectant la protaminació amb el contingut d'histones i algunes modificacions d'aquestes. Tot això podria contribuir a la millor comprensió del desenvolupament normal de l'espermatozoide (Aitken & De Iuliis 2010).

5

5

Conclusions

Conclusions

Conclusions

The objectives developed in this thesis have led to the results that have been published in the presented articles with the main following conclusions:

- 1) The P1/P2 and pre-P2/P2 ratios are associated with the assisted reproductive outcomes. Specifically, low P1/P2 and pre-P2/P2 ratios are related to low pregnancy rates in patients undergoing assisted reproduction. The fertilization rate is low in patients with a low P1/P2 ratio in IVF but it is not affected in ICSI.
- 2) It has been contributed to the characterization of the human sperm proteome through the identification of 33 new proteins in the 2D map. With these proteins the human sperm two-dimensional gels now contains 131 identified proteins.
- 3) Seventeen proteins have been detected with different protein abundance in the sperm cells from asthenozoospermic patients as compared to normozoospermics. These proteins correspond to different protein precursor, to proteins involved in energy production, movement, structure, regulation and cellular signalling, and could be potentially used as markers for asthenozoospermia.
- 4) The protein levels of fifty-eight 2D map *spots* are correlated with the levels of other proteins at high significance. This may provide clues to new potential functional associations not described previously.
- 5) Eight proteins have been identified in an altered protein abundance correlating with DNA damage. Similarly, seven proteins have been correlated with protamine content and five with the pre-P2/P2 ratio. These findings could provide new clues towards the identification of possible sperm molecular mechanisms and their alterations in infertile patients.
- 6) A protocol has been set up to isolate human sperm nuclei through CTAB treatment with the goal of further identifying the nuclear proteins using PureSperm cell fractions. The *spots/bands* obtained after protein extraction and separation have been analysed through mass spectrometry. Forty-one different proteins have been characterized until now. Further data from the one-dimensional gels will probably provide the identification of hundreds of additional different proteins that will complete the characterization of nuclear human sperm proteome.
- 7) A gradient centrifugation protocol has been set up to isolate sperm populations of normozoospermic and OAT patients differing in their total thiol content (protamination) as measured through mBBR staining and flow cytometry. The protamine/DNA ratios of the fractions obtained show a good correlation with the cytometry approach. The immunofluorescence data derived from the detection of the nuclear proteins that could be involved in the right embryo development suggest a better chromatin maturity in the selected sperm fraction. Nevertheless, there are still differences in the abundances of nuclear proteins studied in the selected spermatozoa in OAT patients as compared to normozoospermic patients.

Els objectius desenvolupats a aquesta tesi han donat lloc a uns resultats publicats o en fase de publicació que donen peu a establir les següents conclusions:

- 1) La relació de protamines (P1/P2) i la presència de precursors de la protamina 2 (pre-P2/P2) es relaciona amb els resultats de Reproducció Assistida. Concretament, una baixa relació de P1/P2 i de pre-P2/P2 es relacionen amb una baixa taxa d'embarassos en pacients en tractament per reproducció assistida. La taxa de fecundació es troba disminuïda en els pacients amb una relació P1/P2 anormalment baixa en el cas de IVF i però no quan es va servir ICSI.
- 2) S'ha contribuït a la caracterització del mapa proteic bidimensional de l'espermatozoide humà identificant 33 proteïnes noves anteriorment no descrites. Amb aquestes noves proteïnes s'ha aconseguit ampliar fins a 131 les proteïnes identificades en el mapa proteic bidimensional caracteritzat pel nostre laboratori.
- 3) S'han identificat 17 proteïnes presents en unes quantitats significativament diferents en pacients astenozoospèrmics en relació a controls. D'aquestes, sis proteïnes corresponen a formes precursoras i tretze proteïnes entren dins de tres grups funcionals que són producció d'energia; moviment i estructura, i regulació i senyalització cel·lular essent possible relacionar funcionalment d'algunes d'aquestes amb la baixa motilitat espermàtica de les mostres estudiades. Aquests proteïnes identificades podrien tenir una utilitat com a marcadors moleculars d'astenozoospèrmia.
- 4) S'ha trobat que els nivells proteics corresponents a cinquanta-vuit *spots* proteics identificats en el mapa proteic de l'espermatozoide humà es correlacionen amb altres *spots* en diferents pacients individuals. Aquests resultats suggereixen la presència de possibles relacions entre proteïnes a l'espermatozoide humà prèviament no descrites.
- 5) S'han identificat vuit proteïnes presents en quantitats alterades que es relacionen amb el dany al DNA, set que es relacionen amb el contingut de protamines i cinc que es relacionen amb la presència de precursors de la protamina 2. Aquestes troballes aporten pistes per a la identificació de possibles mecanismes moleculars de l'espermatozoide i de les seves alteracions en alguns pacients infèrtils.
- 6) S'ha aconseguit implementar un protocol d'aïllament de nuclis de l'espermatozoide humà a través de CTAB per la seva posterior identificació proteica. L'aïllament ha

resultat en nuclis d'una elevada puresa tal i com es demostra amb Microscòpia Òptica i Microscòpia Electrònica de Transmissió. L'extracció i separació proteica en gels bidimensionals, SDS-PAGE i gels monodimensionals àcids ha donat lloc a un conjunt d'*spots*/bandes visibles que s'han escindit i identificat amb espectrometria de masses. Els *spots* identificats a través de gels bidimensionals corresponen a 41 proteïnes diferents de les quals 4 s'han identificat per primera vegada a l'espermatozoide humà. Les famílies de proteïnes més abundants són les histones, SPANX, citoqueratines, subunitats del proteasoma i tektines. És previsible que la identificació de centenars de proteïnes addicionals fent servir l'estratègia de gels monodimensionals i LC-MS/MS proveeixi una descripció del proteoma nuclear de l'espermatozoide humà molt més completa.

- 7) S'ha implementat un protocol de centrifugació en gradients de PureSperm aconseguint aïllar poblacions de espermatozoides de pacients normozoospermics i OAT segons el contingut de tiols totals (protaminació) a través de la tinció amb mBBr i Citometria de Flux. El contingut de protamines/DNA determinat per electroforesis en gels àcids de les fraccions obtingudes després del gradient es correlaciona amb la totalitat de tiols de les cèl·lules espermàtiques analitzades per Citometria, confirmant la utilitat d'ambdues tècniques per detectar el nivells de protaminació de les mostres. Les dades d'immunofluorescència de proteïnes nuclears de la fracció d'espermatozoides seleccionada mostren una millor maduresa de la cromatina que podria tenir implicacions en el correcte desenvolupament embrionari. Tot i així, existeixen diferències en la detecció d'algunes d'aquestes proteïnes entre pacients normozoospermics i OATs proporcionant evidència d'una maduresa nuclear incompleta en els OAT.

6

6

Bibliografia

References

- Abrink M, Aveskogh M, Hellman L (1995) Isolation of cDNA clones for 42 different Krüppel-related zinc finger proteins expressed in the human monoblast cell line U-937. *DNA Cell Biol* 14:125-136.
- Aebersold R and Goodlett DR (2001) Mass spectrometry in proteomics. *Chem Rev* 101:269-295. Review.
- Ahmad K and Henikoff S (2002a) Histone H3 variants specify modes of chromatin assembly. *Proc Natl Acad Sci* 99:16477-16484.
- Ahmad K and Henikoff S (2002b) The histone variant H3.3 marks active chromatin by replication-independent nucleosome assembly. *Mol Cell* 9:1191-1200.
- Aitken RJ and Baker MA (2008) The role of proteomics in understanding sperm cell biology. *Int J Androl* 31:295-302. Review.
- Aitken RJ, De Luliis GN, McLachlan RI (2009) Biological and clinical significance of DNA damage in the male germ line. *Int J Androl* 32:46-56.
- Aitken RJ and De Luliis GN (2010) On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 16:3-13. Review.
- Albrethsen J (2007) Reproducibility in protein profiling by MALDI-TOF mass spectrometry. *Clin Chem* 53:852-858.
- Ammer H, Henschen A, Lee CH (1986) Isolation and amino-acid sequence analysis of human sperm protamines P1 and P2. Occurrence of two forms of protamine P2. *Biol Chem Hoppe Seyler* 367:515-522.
- Anderson NL and Anderson NG (1998) Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis* 19:1853-1861.
- Anderson NL, Matheson AD, Steiner S (2000) Proteomics: applications in basic and applied biology. *Curr Opin Biotechnol* 11:408-412.
- Aoki VW, Liu L, Carrell DT (2005a) Identification and evaluation of a novel sperm protamine abnormality in a population of infertile males. *Hum Reprod* 20:1298-1306.
- Aoki VW, Moskovtsev SI, Willis J, Liu L, Mullen JB, Carrell DT (2005b) DNA integrity is compromised in protamine-deficient human sperm. *J Androl* 26:741-748.
- Aoki VW, Liu L, Jones KP, Hatasaka HH, Gibson M, Peterson CM, Carrell DT (2006a) Sperm protamine 1/protamine 2 ratios are related to in vitro fertilization pregnancy rates and predictive of fertilization ability. *Fertil Steril* 86:1408-1415.
- Aoki VW, Christensen GL, Atkins JF, Carrell DT (2006b) Identification of novel polymorphisms in the nuclear protein genes and their relationship with human sperm protamine deficiency and severe male infertility. *Fertil Steril* 86:1416-1422.
- Aoki VW, Emery BR, Carrell DT (2006c) Global sperm deoxyribonucleic acid methylation is unaffected in protamine-deficient infertile males. *Fertil Steril* 86:1541-1543.
- Aoki VW, Emery BR, Liu L, Carrell DT (2006d) Protamine levels vary between individual sperm cells of infertile human males and correlate with viability and DNA integrity. *J Androl* 27:890-898.
- Arpanahi A, Brinkworth M, Iles D, Krawetz SA, Paradowska A, Platts AE, Saida M, Steger K, Tedder P, Miller D (2009) Endonuclease-sensitive regions of human spermatozoal chromatin are highly enriched in promoter and CTCF binding sequences. *Genome Research* 19:1338-1349.
- ASRM, Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine (2008) Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril* 89:1603.
- Autiero M, Abrescia P, Guardiola J (1991) Interaction of seminal plasma proteins with cell surface antigens: presence of a CD4-binding glycoprotein in human seminal plasma. *Exp Cell Res* 197:268-271.
- Bailey RW, Aronow B, Harmony JA, Griswold MD (2002) Heat shock-initiated apoptosis is accelerated and removal of damaged cells is delayed in the testis of clusterin/ApoJ knock-out mice. *Biol Reprod* 66:1042-1053.

- Baker MA, Witherdin R, Hetherington L, Cunningham-Smith K, Aitken RJ (2005) Identification of post-translational modifications that occur during sperm maturation using difference in two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics* 5:1003-1012.
- Baker MA, Reeves G, Hetherington L, Müller J, Baur I, Aitken RJ (2007) Identification of gene products present in Triton X-100 soluble and insoluble fractions of human spermatozoa lysates using LC-MS/MS analysis. *Proteomics Clin Appl* 1:524-532.
- Baker MA, Hetherington L, Reeves GM, Aitken RJ (2008a) The mouse sperm proteome characterized via IPG strip prefractionation and LC-MS/MS identification. *Proteomics* 8:1720-1730.
- Baker MA, Hetherington L, Reeves G, Müller J, Aitken RJ (2008b) The rat sperm proteome characterized via IPG strip prefractionation and LC-MS/MS identification. *Proteomics* 8:2312-2321.
- Balhorn R, Gledhill BL, Wyrobek AJ (1977) Mouse sperm chromatin proteins: quantitative isolation and partial characterization. *Biochemistry* 16:4074-4080.
- Balhorn R (1982) A model for the structure of chromatin in human sperm. *J Cell Biol* 93:298-305.
- Balhorn R, Reed S, Tanphaichitr N (1988) Aberrant protamine 1/protamine 2 ratios in sperm of infertile human males. *Experientia* 44:52-55.
- Balhorn R, Corzett M, Mazrimas J, Watkins B (1991) Identification of bull protamine disulfides. *Biochemistry* 30:175-181.
- Balhorn R, Corzett M, Mazrimas JA (1992) Formation of intraprotamine disulfides in vitro. *Arch Biochem Biophys* 296:384-393.
- Balhorn R, Cosman M, Thorton K, Krishnan VV, Corzett M, Bench G, Kramer C, Lee J, Hud NV, Allen M, Prieto M, Meyer-ILse W, Brown JT, Kirz J, Zhang X, Bradbury EM, Maki G, Braun RE, Breed W (1999) Protamine-mediated condensation of DNA in mammalian sperm. The male gamete: from basic science to clinical applications. *Cache River Press*. Vienna 55-70.
- Balhorn R (2007) The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome Biol* 8:227. Review.
- Ballescà JL (2002) Estudio del varón estéril. *Reproducción humana*. Editorial Mc Graw.Hill. Interamericana. Pag. 279-285.
- Barratt CL, Kay V, Oxenham SK (2009) The human spermatozoon - a stripped down but refined machine. *J Biol* 8:63. Review.
- Barroso G, Valdespin C, Vega E, Kershenovich R, Avila R, Avendaño C, Oehninger S (2009) Developmental sperm contributions: fertilization and beyond. *Fertil Steril* 92:835-848. Review.
- Bedford JM and Calvin HI (1974) The occurrence and possible functional significance of -S-S- crosslinks in sperm heads, with particular reference to eutherian mammals. *J Exp Zool* 188:137-155.
- Belokopytova IA, Kostyleva EI, Tomilin AN and Vorob'ev VI (1993) Human male infertility may be due to a decrease of the protamine P2 content in sperm chromatin. *Mol Reprod Dev* 34:53-57.
- Bergamo A, Bataille R, Pellat-Deceunynck C (1997) CD40 and CD95 induce programmed cell death in the human myeloma cell line XG2. *Br J Haematol* 97:652-655.
- Berger SL (2002) Histone modifications in transcriptional regulation. *Curr Opin Genet Dev* 12:142-148.
- Bianchi F, Rousseaux-Prevost R, Sautiere P, Rousseaux J (1992) P2 protamines from human sperm are zinc -finger proteins with one CYS2/HIS2 motif. *Biochem Biophys Res Commun* 182:540-547.
- Bizzaro D, Manicardi GC, Bianchi PG, Bianchi U, Mariethoz E, Sakkas D (1998) In-situ competition between protamine and fluorochromes for sperm DNA. *Mol Hum Reprod* 4:127-132.
- Björndahl L and Kvist U (2010) Human sperm chromatin stabilization: a proposed model including zinc bridges. *Mol Hum Reprod* 16:23-29. Review.
- Black JA and Dixon GH (1967) Evolution of protamine: a further example of partial gene duplication. *Nature* 216:152-154.

- Blackstock WP and Weir MP (1999) Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends Biotechnol* 17:121-127.
- Blanchard Y, Lescoat D, Le Lannou D (1990) Anomalous distribution of nuclear basic proteins in round-headed human spermatozoa. *Andrologia* 22:549-555.
- Blum H, Beier H, Gross HJ (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8:93-99.
- Brewis IA and Wong CH (1999) Gamete recognition: sperm proteins that interact with the egg zona pellucida. *Rev Reprod* 4:135-142.
- Cao R and Zhang Y (2004) SUZ12 is required for both the histone methyltransferase activity and the silencing function of the EED-EZH2 complex. *Mol Cell* 15:57-67.
- Caputo E, Carratore V, Ciullo M, Tiberio C, Mani JC, Piatier-Tonneau D, Guardiola J (1999) Biosynthesis and immunobiochemical characterization of gp17/GCDFP-15. A glycoprotein from seminal vesicles and from breast tumors, in HeLa cells and in *Pichia pastoris* yeast. *Eur J Biochem* 265:664-670.
- Caputo E, Manco G, Mandrich L, Guardiola J (2000) A novel aspartyl proteinase from apocrine epithelia and breast tumors. *J Biol Chem* 275:7935-7941.
- Cardullo RA and Baltz JM (1991) Metabolic regulation in mammalian sperm: mitochondrial volume determines sperm length and flagellar beat frequency. *Cell Motil Cytoskeleton* 19:180-188.
- Carlsson L, Ronquist G, Nilsson BO, Larsson A (2004) Dominant prostatic immunogens for sperm-agglutinating autoantibodies of infertile men. *J Androl* 25:699-705.
- Carrell DT and Liu L (2001) Altered protamine 2 expression is uncommon in donors of known fertility, but common among men with poor fertilizing capacity, and may reflect other abnormalities of spermiogenesis. *J Androl* 22:604-610.
- Carrell DT, Emery BR, Hammoud S (2007) Altered protamine expression and diminished spermatogenesis: what is the link? *Hum Reprod Update* 13:313-327. Review.
- Cedenho AP, Lima SB, Cenedeze MA, Spaine DM, Ortiz V, Oehninger S (2006) Oligozoospermia and heat-shock protein expression in ejaculated spermatozoa. *Hum Reprod* 21:1791-1794.
- Centola GM, Herko R, Andolina E, Weisensel S (1998) Comparison of sperm separation methods: effect on recovery, motility, motion parameters, and hyperactivation. *Fertil Steril* 70:1173-1175.
- Chatzimeletiou K, Morrison EE, Prapas N, Prapas Y, Handyside AH (2008) The centrosome and early embryogenesis: clinical insights. *Reprod Biomed Online* 16:485-491. Review.
- Chohan KR, Griffin JT, Lafromboise M, De Jonge CJ, Carrell DT (2006) Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. *J Androl* 27:53-59.
- Choongkittaworn NM, Kim KH, Danner DB, Griswold MD (1993) Expression of prohibitin in rat seminiferous epithelium. *Biol Reprod* 49:300-310.
- Clark AM and Griswold MD (1997) Expression of clusterin/sulfated glycoprotein-2 under conditions of heat stress in rat Sertoli cells and a mouse Sertoli cell line. *J Androl* 18:257-263.
- Clermont Y (1963) The cycle of the seminiferous epithelium in man. *Am J Anat* 112:35-51.
- Clermont Y (1972) Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol Rev* 52:198-236.
- Com E, Rolland AD, Guerrois M, Aubry F, Jégou B, Vallet-Erdtmann V, Pineau C (2006) Identification, molecular cloning, and cellular distribution of the rat homolog of minichromosome maintenance protein 7 (MCM7) in the rat testis. *Mol Reprod Dev* 73:866-77.
- Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S, Auger J, Baker HW, Behre HM, Haugen TB, Kruger T, Wang C, Mbizvo MT, Vogelsong KM (2010) World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Hum Reprod Update* 16:231-245.
- Corzett M, Mazrimas J, Balhorn R (2002) Protamine 1: protamine 2 stoichiometry in the sperm of eutherian mammals. *Mol Reprod Dev* 61:519-527.

- Coughlin EM, Christensen E, Kunz PL, Krishnamoorthy KS, Walker V, Dennis NR, Chalmers RA, Elpeleg ON, Whelan D, Pollitt RJ, Ramesh V, Mandell R, Shih VE (1998) Molecular analysis and prenatal diagnosis of human fumarase deficiency. *Mol Genet Metab* 63:254-262.
- Cryns K, Shamir A, Van Acker N, Levi I, Daneels G, Goris I, Bouwknecht JA, Andries L, Kass S, Agam G, Belmaker H, Bersudsky Y, Steckler T, Moechars D (2008) IMPA1 is essential for embryonic development and lithium-like pilocarpine sensitivity. *Neuropsychopharmacology* 33:674-684.
- Dahm R (2005) Friedrich Miescher and the discovery of DNA. *Dev Biol* 278:274-288. Review.
- de la Torre J, López-Fernández C, Pita M, Fernández JL, Johnston SD, Gosálvez J (2007) Simultaneous observation of DNA fragmentation and protein loss in the boar spermatozoon following application of the sperm chromatin dispersion (SCD) test. *J Androl* 28:533-540.
- de Mateo S, Martínez-Heredia J, Estanyol JM, Domínguez-Fandos D, Vidal-Taboada JM, Ballescà JL, Oliva R (2007) Marked correlations in protein expression identified by proteomic analysis of human spermatozoa. *Proteomics* 7:4264-4277.
- de Mateo S, Gázquez C, Guimerà M, Balasch J, Meistrich ML, Ballescà JL, Oliva R (2009) Protamine 2 precursors (Pre-P2), protamine 1 to protamine 2 ratio (P1/P2), and assisted reproduction outcome. *Fertil Steril* 91:715-722.
- de Mateo S, Ramos L, van der Vlag, de Boer P, Oliva R (2010) Improvement in chromatin maturity of human spermatozoa selected through density gradient centrifugation. *In press*.
- de Mateo S, Castillo J, Estanyol JM, Ballescà JL, Oliva R (2010) Proteomic identification of human sperm nuclei isolated through CTAB treatment. *In preparation*.
- de Yebra L and Oliva R (1993) Rapid analysis of mammalian sperm nuclear proteins. *Anal Biochem* 209:201-203.
- de Yebra L, Ballescà JL, Vanrell JA, Bassas L and Oliva R (1993) Complete selective absence of protamine P2 in humans. *J Biol Chem* 268:10553-10557.
- de Yebra L, Ballescà JL, Vanrell JA, Corzett M, Balhorn R, Oliva R (1998) Detection of P2 precursors in the sperm cells of infertile patients who have reduced protamine P2 levels. *Fertil Steril* 69:755-759.
- Delgado NM, Sánchez-Vázquez ML, Reyes R, Merchant-Larios H (1999) Nucleons, I: A model for studying the mechanism of sperm nucleus swelling in vitro. *Arch Androl* 43:85-95.
- Dieker JW, Fransen JH, van Bavel CC, Briand JP, Jacobs CW, Muller S, Berden JH, van der Vlag J (2007) Apoptosis-induced acetylation of histones is pathogenic in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 56:1921-1933.
- Ding Q and Keller JN (2001) Proteasome inhibition in oxidative stress neurotoxicity: implications for heat shock proteins. *J Neurochem* 77:1010-1017.
- Dixon GH and Smith M (1968) Nucleic acids and protamine in salmon testes. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 8:9-34.
- Domínguez-Fandos D, Camejo MI, Ballescà JL, Oliva R (2007) Human sperm DNA fragmentation: correlation of TUNEL results as assessed by flow cytometry and optical microscopy. *Cytometry A* 71:1011-1018.
- Donnelly ET, O'Connell M, McClure N, Lewis SE (2000) Differences in nuclear DNA fragmentation and mitochondrial integrity of semen and prepared human spermatozoa. *Hum Reprod* 15:1552-1561.
- Dym M and Fawcett DW (1971) Further observations on the numbers of spermatogonia, spermatocytes, and spermatids connected by intercellular bridges in the mammalian testis. *Biol Reprod* 4:195-215.
- Dym M, Kokkinaki M, He Z (2009) Spermatogonial stem cells: mouse and human comparisons. *Birth Defects Res C Embryo Today* 87:27-34. Review.
- Egydio de Carvalho C, Tanaka H, Iguchi N, Ventelä S, Nojima H, Nishimune Y (2002) Molecular cloning and characterization of a complementary DNA encoding sperm tail protein SHIPPO 1. *Biol Reprod* 66:785-795.

- Eirín-López JM, Frehlick LJ, Ausió J (2006) Protamines, in the footsteps of linker histone evolution. *J Biol Chem*. 2006 Jan 6;281(1):1-4. Epub 2005 Oct 20. Review.
- Eirín-López JM and Ausió J (2009) Origin and evolution of chromosomal sperm proteins. *Bioessays* 31:1062-1070. Review.
- Engh E, Clausen OP, Scholberg A, Tollefsrud A, Purvis K (1992) Relationship between sperm quality and chromatin condensation measured by sperm DNA fluorescence using flow cytometry. *Int J Androl* 15:407-415.
- Erickson RP (1973) Haploid gene expression versus meiotic drive: the relevance of intercellular bridges during spermatogenesis. *Nat New Biol* 243:210-212.
- Evenson DP, Darzynkiewicz Z, Melamed MR (1980) Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science* 240:1131-1133.
- Fausser BC, Diedrich K, Devroey P; Evian Annual Reproduction Workshop Group 2007 (2008) Predictors of ovarian response: progress towards individualized treatment in ovulation induction and ovarian stimulation. *Hum Reprod Update* 14:1-14.
- Felix K (1960) Protamines. *Adv Protein Chem* 15:1-56.
- Ford WCL (1990) The role of oxygen free radicals in the pathology of human spermatozoa: Implications of IVF. *Clinical IVF Forum; Current Views in Assisted Reproduction*. Manchester University Press, UK; 1990:123-139.
- Franken DR, Franken CJ, de la Guerre H, de Villiers A (1999) Normal sperm morphology and chromatin packaging: comparison between aniline blue and chromomycin A3 staining. *Andrologia* 31:361-366.
- Gardiner-Garden M, Ballesteros M, Gordon M, Tam PP (1998) Histone and protamine-DNA association: conservation of different patterns within the beta-globin domain in human sperm. *Mol Cell Biol* 18:3350-3356.
- Garrido N, Remohí J, Martínez-Conejero JA, García-Herrero S, Pellicer A, Meseguer M (2008) Contribution of sperm molecular features to embryo quality and assisted reproduction success. *Reprod Biomed Online* 17:855-865. Review.
- Gatewood JM, Cook GR, Balhorn R, Bradbury EM, Schmid CW (1987) Sequence-specific packaging of DNA in human sperm chromatin. *Science* 236:962-964.
- Gatewood JM, Cook GR, Balhorn R, Schmid CW, Bradbury EM (1990) Isolation of four core histones from human sperm chromatin representing a minor subset of somatic histones. *J Biol Chem* 265:20662-20666.
- Giachini C, Guarducci E, Longepied G, Degl'Innocenti S, Becherini L, Forti G, Mitchell MJ, Krausz C (2005) The gr/gr deletion(s): a new genetic test in male infertility? *J Med Genet* 42:497-502.
- Gil S, Yosef D, Golan N, Don J (2006) The enigma of ATCE1, an acrosome-associated transcription factor. *Dev Biol* 298:201-211.
- Godet M, Damestoy A, Mouradian S, Rudkin BB, Durand P (2004) Key role for cyclin-dependent kinases in the first and second meiotic divisions of rat spermatocytes. *Biol Reprod* 70:1147-1152.
- Gorczyca W, Traganos F, Jesionowska H, Darzynkiewicz Z (1993) Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA in situ to denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells. *Exp Cell Res* 207:202-205.
- Görg A, Drews O, Lück C, Weiland F, Weiss W (2009) 2-DE with IPGs. *Electrophoresis* 1:122-32. Review.
- Gosálvez J, Cortés-Gutiérrez E, López-Fernández C, Fernández JL, Caballero P, Nuñez R (2009) Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation dynamics in fertile donors. *Fertil Steril* 92:170-173.
- Govin J, Caron C, Escoffier E, Ferro M, Kuhn L, Rousseaux S, Eddy EM, Garin J, Khochbin S (2006) Post-meiotic shifts in HSPA2/HSP70.2 chaperone activity during mouse spermatogenesis. *J Biol Chem* 281:37888-92.

- Govin J, Escoffier E, Rousseaux S, Kuhn L, Ferro M, Thévenon J, Catena R, Davidson I, Garin J, Khochbin S, Caron C (2007) Pericentric heterochromatin reprogramming by 11 new histone variants during mouse spermiogenesis. *J Cell Biol* 176:283-294.
- Griffiths WJ and Wang Y (2009) Mass spectrometry: from proteomics to metabolomics and lipidomics. *Chem Soc Rev* 38:1882-18896. Review.
- Grima J, Zhu LJ, Zong SD, Catterall JF, Bardin CW, Cheng CY (1995) Rat testin is a newly identified component of the junctional complexes in various tissues whose mRNA is predominantly expressed in the testis and ovary. *Biol Reprod* 52:340-355.
- Grimes SR Jr and Henderson N (1984) Hyperacetylation of histone H4 in rat testis spermatids. *Exp Cell Res* 152:91-97.
- Gstaiger M and Aebersold R (2009) Applying mass spectrometry-based proteomics to genetics, genomics and network biology. *Nat Rev Genet* 10:617-627. Review.
- Hamer G, Gell K, Kouznetsova A, Novak I, Benavente R, Höög C (2006) Characterization of a novel meiosis-specific protein within the central element of the synaptonemal complex. *J Cell Sci* 119:4025-4032.
- Hammadeh ME, Zeginiadov T, Rosenbaum P, Georg T, Schmidt W, Strehler E (2001a) Predictive value of sperm chromatin condensation (aniline blue staining) in the assessment of male fertility. *Arch Androl* 46:99-104.
- Hammadeh ME, Zavos PM, Rosenbaum P, Schmidt W (2001b) Comparison between the quality and function of sperm after semen processing with two different methods. *Asian J Androl* 3:125-130.
- Hammoud SS, Nix DA, Zhang H, Purwar J, Carrell DT, Cairns BR (2009a) Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development. *Nature* 460:473-478.
- Hammoud S, Liu L, Carrell DT (2009b) Protamine ratio and the level of histone retention in sperm selected from a density gradient preparation. *Andrologia* 41:88-94.
- Haraguchi CM, Mabuchi T, Hirata S, Shoda T, Tokumoto T, Hoshi K, Yokota S (2007) Possible function of caudal nuclear pocket: degradation of nucleoproteins by ubiquitin-proteasome system in rat spermatids and human sperm. *J Histochem Cytochem* 55:585-595.
- Heller CG and Clermont Y (1964) Kinetics of the germinal epithelium in man. *Recent Prog Horm Res* 20:545-575.
- Hendriksen PJ, Hoogerbrugge JW, Themmen AP, Koken MH, Hoeijmakers JH, Oostra BA, van der Lende T, Grootegoed JA (1995) Postmeiotic transcription of X and Y chromosomal genes during spermatogenesis in the mouse. *Dev Biol* 170:730-733.
- Henikoff S, Furuyama T, Ahmad K (2004) Histone variants, nucleosome assembly and epigenetic inheritance. *Trends Genet* 20:320-326.
- Henkel RR and Schill WB (2003) Sperm preparation for ART. *Reprod Biol Endocrinol* 1:108. Review.
- Henkel R, Hajmohamed M, Stalf T, Hougendijk C, Mehnert C, Menkveld R, Gips H, Schill WB, Kurger TF (2004) Influence of deoxyribonucleic acid damage on fertilization and pregnancy. *Fertil Steril* 81:965-972.
- Henzel WJ, Billeci TM, Stults JT, Wong SC, Grimley C, Watanabe C (1993) Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:5011-5015.
- Hillenkamp F, Karas M, Beavis RC, Chait BT (1991) Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers. *Anal Chem* 63:1193A-1203A.
- Hud NV, Milanovich FP, Balhorn R (1994) Evidence of novel secondary structure in DNA-bound protamine is revealed by Raman spectroscopy. *Biochemistry* 33:7528-7535.
- Huszar G, Ozkavukcu S, Jakab A, Celik-Ozenci C, Sati GL, Cayli S (2006) Hyaluronic acid binding ability of human sperm reflects cellular maturity and fertilizing potential: selection of sperm for intracytoplasmic sperm injection. *Curr Opin Obstet Gynecol* 18:260-267. Review.

- Ibrahim NM, Gilbert GR, Loseth KJ, Crabo BG (2000) Correlation between clusterin-positive spermatozoa determined by flow cytometry in bull semen and fertility. *J Androl* 21:887-894.
- Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL, Fulton N, Milne PA and Aitken RJ (2000) DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *J Androl* 21:33-44.
- Ishibashi T, Li A, Eirín-López JM, Zhao M, Missiaen K, Abbott DW, Meistrich M, Hendzel MJ, Ausió J (2010) H2A.Bbd: an X-chromosome-encoded histone involved in mammalian spermiogenesis. *Nucleic Acids Res* 38:1780-1789.
- Jamesdaniel S, Salvi R, Coling D (2009) Auditory proteomics: methods, accomplishments and challenges. *Brain Res* 1277:24-36.
- Johnston DS, Wooters J, Kopf GS, Qiu Y, Roberts KP (2005) Analysis of the human sperm proteome. *Ann N Y Acad Sci* 1061:190-202.
- Kamaruddin M, Kroetsch T, Basrur PK, Hansen PJ, King WA (2004) Immunolocalization of heat shock protein 70 in bovine spermatozoa. *Andrologia* 36:327-234.
- Kapranos N, Petrakou E, Anastasiadou C, Kotronias D (2003) Detection of herpes simplex virus, cytomegalovirus, and Epstein-Barr virus in the semen of men attending an infertility clinic. *Fertil Steril* 79 Suppl 3:1566-1570.
- Kierszenbaum AL and Tres LL (2002) Bypassing natural sperm selection during fertilization: the azh mutant offspring experience and the alternative of spermiogenesis in vitro. *Mol Cell Endocrinol* 187:133-138. Review.
- Kierszenbaum AL and Rivkin E, Tres LL (2003) Acroplaxome, an F-actin-keratin-containing plate, anchors the acrosome to the nucleus during shaping of the spermatid head. *Mol Biol Cell* 14:4628-4640.
- Kierszenbaum AL and Tres LL (2004) The acrosome-acroplaxome-manchette complex and the shaping of the spermatid head. *Arch Histol Cytol* 67:2712-2784. Review.
- Klaus AV, McCarrey JR, Farkas A, Ward WS (2001) Changes in DNA loop domain structure during spermatogenesis and embryogenesis in the Syrian golden hamster. *Biol Reprod* 64:1297-1306.
- Kossel A (1928) The protamines and histones. London: Longmans Green.
- Krausz C and Giachini C (2007) Genetic risk factors in male infertility. *Arch Androl* 53:125-133. Review.
- Kretser and Kerr (1994) The Physiology of Reproduction. Ed E Knobil & J D Neill. Lippincott, Williams & Wilkins.
- Kumar V, Hassan MI, Tomar AK, Kashav T, Nautiyal J, Singh S, Singh TP, Yadav S (2009) Proteomic analysis of heparin-binding proteins from human seminal plasma: a step towards identification of molecular markers of male fertility. *J Biosci* 34:899-908.
- Lahn BT, Tang ZL, Zhou J, Barndt RJ, Parvinen M, Allis CD, Page DC (2002) Previously uncharacterized histone acetyltransferases implicated in mammalian spermatogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:8707-8712.
- Larson KL, DeJonge CJ, Barnes AM, Jost LK, Evenson DP (2000) Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques. *Hum Reprod* 15:1717-1722.
- Lefièvre L, Chen Y, Conner SJ, Scott JL, Publicover SJ, Ford WC, Barratt CL (2007) Human spermatozoa contain multiple targets for protein S-nitrosylation: an alternative mechanism of the modulation of sperm function by nitric oxide? *Proteomics* 7:3066-3084.
- Lewis JD, Saperas N, Song Y, Zamora MJ, Chiva M, Ausió J (2004) Histone H1 and the origin of protamines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:4148-4152.
- Lewis SE, Donnelly ET, Sterling ES, Kennedy MS, Thompson W, Chakravarthy U (1996) Nitric oxide synthase and nitrite production in human spermatozoa: evidence that endogenous nitric oxide is beneficial to sperm motility. *Mol Hum Reprod* 2:873-878.

- Li LW, Fan LQ, Zhu WB, Nien HC, Sun BL, Luo KL, Liao TT, Tang L, Lu GX (2007) Establishment of a high-resolution 2D reference map of human spermatozoal proteins from 12 fertile sperm-bank donors. *Asian J Androl* 9:321-329.
- Liao TT, Xiang Z, Zhu WB, Fan LQ (2009) Proteome analysis of round-headed and normal spermatozoa by 2-D fluorescence difference gel electrophoresis and mass spectrometry. *Asian J Androl* 11:683-693.
- Lilja H, Abrahamsson PA, Lundwall A (1989) Semenogelin, the predominant protein in human semen. Primary structure and identification of closely related proteins in the male accessory sex glands and on the spermatozoa. *J Biol Chem* 264:1894-1900.
- Lolis D, Georgiou I, Syrrou M, Zikopoulos K, Konstantelli M, Messinis I (1996) Chromomycin A3-staining as an indicator of protamine deficiency and fertilization. *Int J Androl* 19:23-27.
- Lopes S, Sun JG, Jurisicova A, Meriano J, Casper RF (1998) Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 69:528-532.
- Machesky LM and Insall RH (1999) Signaling to actin dynamics. *J Cell Biol* 146:267-272.
- Makar RS and Toth TL (2002) The evaluation of infertility. *Am J Clin Pathol* 117:S95-103.
- Malik HS and Henikoff S (2003) Phylogenomics of the nucleosome. *Nat Struct Biol* 10:882-891.
- Manicardi GC, Bianchi PG, Pantano S, Azzoni P, Bizzaro D, Bianchi U, Sakkas (1995) Presence of endogenous nicks in DNA of ejaculated human spermatozoa and its relationship to chromomycin A3 accessibility. *Biol Repro* 52:864-867.
- Martens JH, Verlaan M, Kalkhoven E, Dorsman JC, Zantema A (2002) Scaffold/matrix attachment region elements interact with a p300-scaffold attachment factor A complex and are bound by acetylated nucleosomes. *Mol Cell Biol* 22:2598-2606.
- Martínez-Heredia J, Estanyol JM, Ballescà JL, Oliva R (2006) Proteomic identification of human sperm proteins. *Proteomics* 6:4356-4369.
- Martínez-Heredia Joan. *Caracterització proteòmica de l'espermatozoide humà. Proteïnes diferencials trobades en pacients astenozoospermics*. [en línia]. Barcelona: Universitat de Barcelona. Departament de Ciències Fisiològiques I, 2008. <http://www.tdx.cat/TDX-0205109-123048> [Consulta: 9 Març 2010].
- Martínez-Heredia J, de Mateo S, Vidal-Taboada JM, Ballescà JL, Oliva R (2008) Identification of proteomic differences in asthenozoospermic sperm samples. *Hum Reprod* 23:783-791.
- Matsuda R, Hori T, Kitamura H, Takeuchi K, Fukagawa T, Harata M (2010) Identification and characterization of the two isoforms of the vertebrate H2A.Z histone variant. *Nucleic Acids Res* [Epub ahead of print]
- Mauri P and Scigelova M (2009) Multidimensional protein identification technology for clinical proteomic analysis. *Clin Chem Lab Med* 47:636-646. Review.
- McKay DJ, Renaux BS, Dixon GH (1985) The amino acid sequence of human sperm protamine P1. *Biosci Rep* 5:383-391.
- McKay DJ, Renaux BS, Dixon GH (1986) Human sperm protamines. Amino-acid sequences of two forms of protamine P2. *Eur J Biochem* 156:5-8.
- MedLine Plus. <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/001191.htm>
- Mehdi M, Khantouche L, Ajina M, Saad A (2009) Detection of DNA fragmentation in human spermatozoa: correlation with semen parameters. *Andrologia* 41:383-386.
- Meistrich ML, Trostle-Weige P K, Lin R, Bhatnagar YM and Allis CD (1992) Highly acetylated H4 is associated with histone displacement in rat spermatids. *Mol Reprod Dev* 31:170-181.
- Meistrich ML, Mohapatra B, Shirley CR, Zhao M (2003) Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis. *Chromosoma* 111:483-488.
- Mengual L, Ballescà JL, Ascaso C, Oliva R (2003) Marked differences in protamine content and P1/P2 ratios in sperm cells from percoll fractions between patients and controls. *J Androl* 24:438-447.

- Menkveld R (2010) Clinical significance of the low normal sperm morphology value as proposed in the fifth edition of the WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. *Asian J Androl* 12:47-58.
- Meyerzon M, Gao Z, Liu J, Wu JC, Malone CJ, Starr DA (2009) Centrosome attachment to the *C. elegans* male pronucleus is dependent on the surface area of the nuclear envelope. *Dev Biol* 327:433-446.
- Mezquita C and Teng CS (1977) Studies on sex-organ development. Changes in nuclear and chromatin composition and genomic activity during spermatogenesis in the maturing rooster testis. *Biochem J* 164:99-111.
- Mezquita C and Teng CS (1978) Studies on sex-organ development. Changes in chromatin structure during spermatogenesis in maturing rooster testis as demonstrated by the initiation pattern of ribonucleic acid synthesis in vitro. *Biochem J* 170:203-210.
- Mezquita C (1985) Chromatin composition, structure and function in spermatogenesis. *Revis Biol Celular* 5:V-XIV:1-124. Review.
- Mishra S, Murphy LC, Murphy LJ (2006) The Prohibitins: emerging roles in diverse functions. *J Cell Mol Med* 10:353-363. Review.
- Morales CR, Lefrancois S, Chennathukuzhi V, El-Alfy M, Wu X, Yang J, Gerton GL, Hecht NB (2002) A TB-RBP and Ter ATPase complex accompanies specific mRNAs from nuclei through the nuclear pores and into intercellular bridges in mouse male germ cells. *Dev Biol* 246:480-494.
- Morrell JM, Moffatt O, Sakkas D, Manicardi GC, Bizzaro D, Tomlinson M, Nilsson H, Holmes PV (2004) Reduced senescence and retained nuclear DNA integrity in human spermatozoa prepared by density gradient centrifugation. *J Assist Reprod Genet* 21:217-222.
- Muratori M, Maggi M, Spinelli S, Filimberti E, Forti G and Baldi E (2003) Spontaneous DNA fragmentation in swim-up selected human spermatozoa during long term incubation. *J Androl* 24:253-262.
- Muratori M, Tamburrino L, Tocci V, Costantino A, Marchiani S, Giachini C, Laface I, Krausz C, Meriggiola MC, Forti G, Baldi E (2009) Small Variations in Crucial Steps of Tunel Assay Coupled to Flow Cytometry Greatly Affect Measures of Sperm DNA Fragmentation. *J Androl* [Epub ahead of print]
- Naaby-Hansen S, Flickinger CJ, Herr JC (1997) Two-dimensional gel electrophoretic analysis of vectorially labeled surface proteins of human spermatozoa. *Biol Reprod* 56:771-787.
- Naaby-Hansen S, Diekman A, Shetty J, Flickinger CJ, Westbrook A, Herr JC (2010) Identification of calcium-binding proteins associated with the human sperm plasma membrane. *Reprod Biol Endocrinol* 8:6.
- Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Mozdarani H, Mardani M, Azvagi H (2004) Relationship between protamine deficiency with fertilization rate and incidence of sperm premature chromosomal condensation post-ICSI. *Andrologia* 36:95-100.
- Nasr-Esfahani MH, Salehi M, Razavi S, Anjomshoa M, Rozbahani S, Moulavi F, Mardani M (2005) Effect of sperm DNA damage and sperm protamine deficiency on fertilization and embryo development post-ICSI. *Reprod Biomed Online* 11:198-205.
- Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Tavalae M (2008) Failed fertilization after ICSI and spermiogenic defects. *Fertil Steril* 89:892-898.
- Naz RK and Leslie MH (1999) Sperm surface protein profiles of fertile and infertile men: search for a diagnostic molecular marker. *Arch Androl* 43:173-181.
- Ng RK and Gurdon JB (2008) Epigenetic memory of an active gene state depends on histone H3.3 incorporation into chromatin in the absence of transcription. *Nat Cell Biol* 10:102-109.
- Nili HA, Mozdarani H, Aleyasin A (2009) Correlation of sperm DNA damage with protamine deficiency in Iranian subfertile men. *Reprod Biomed Online* 18:479-485.
- Nyboe-Andersen A, Goossens V, Bhattacharya S, Ferraretti AP, Kupka MS, de Mouzon J, Nygren KG (2009) European IVF-monitoring (EIM) Consortium, for the European Society of Human Reproduction

and Embryology: Assisted reproductive technology and intrauterine inseminations in Europe, 2005: results generated from European registers by ESHRE: ESHRE. *Hum Reprod* 24:1267-1287.

O'Bryan MK, Baker HW, Saunders JR, Kirszbaum L, Walker ID, Hudson P, Liu DY, Glew MD, d'Apice AJ, Murphy BF (1990) Human seminal clusterin (SP-40,40). Isolation and characterization. *J Clin Invest* 85:1477-1486.

O'Bryan MK, Murphy BF, Liu DY, Clarke GN, Baker HW (1994) The use of anticlusterin monoclonal antibodies for the combined assessment of human sperm morphology and acrosome integrity. *Hum Reprod* 9:1490-1496.

Ocampo J, Mondragón R, Roa-Espitia AL, Chiquete-Félix N, Salgado ZO, Mújica A (2005) Actin, myosin, cytokeratins and spectrin are components of the guinea pig sperm nuclear matrix. *Tissue Cell* 37:293-308.

O'Farrell PH (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 250:4007-4021.

Oliva R and Mezquita C (1982) Histone H4 hyperacetylation and rapid turnover of acetyl groups in transcriptionally inactive rooster testis spermatids. *Nucleic Acids Res* 10:8049-8059.

Oliva R and Dixon GH (1991) Vertebrate protamine genes and the histone-to-protamine replacement reaction. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 40:25-94. Review.

Oliva R (2006) Protamines and male infertility. *Hum Reprod Update* 12:417-435. Review.

Oliva R, Martínez-Heredia J, Estanyol JM (2008) Proteomics in the study of the sperm cell composition, differentiation and function. *Syst Biol Reprod Med* 54:23-36. Review.

Oliva R, de Mateo S, Estanyol JM (2009) Sperm cell proteomics. *Proteomics* 9:1004-1017. Review.

Oliva R and de Mateo S (2010). Chapter 4. Medical implications of sperm nuclear quality. In *Epigenetics and Reproduction*. (Rousseaux S and Khochbin S, Eds.) Springer. Submitted.

Ostling O and Johanson KJ (1984) Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 123:291-298.

Pappin DJ, Hojrup P, Bleasby AJ (1993) Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. *Curr Biol* 3:327-332.

Pepys MB, Booth SE, Tennent GA, Butler PJ, Williams DG (1994) Binding of pentraxins to different nuclear structures: C-reactive protein binds to small nuclear ribonucleoprotein particles, serum amyloid P component binds to chromatin and nucleoli. *Clin Exp Immunol* 97:152-157.

Pharmacia Biotech (1996) Important notice: Percoll® NOT to be used in Assisted Reproduction Technologies in Humans. *Pharmacia Biotech Inc*. December 12.

Phillips DM (1970) Insect sperm: their structure and morphogenesis. *J Cell Biol* 44:243-277. Review.

Piomboni P, Bruni E, Capitani S, Gambera L, Moretti E, La Marca A, De Leo V, Baccetti B (2006) Ultrastructural and DNA fragmentation analyses in swim-up selected human sperm. *Arch Androl* 52:51-59.

Pixton KL, Deeks ED, Flesch FM, Moseley FL, Björndahl L, Ashton PR, Barratt CL, Brewis IA (2004) Sperm proteome mapping of a patient who experienced failed fertilization at IVF reveals altered expression of at least 20 proteins compared with fertile donors: case report. *Hum Reprod* 19:1438-1447.

Pousette A, Akerlöf E, Rosenborg L, Fredricsson B (1986) Increase in progressive motility and improved morphology of human spermatozoa following their migration through Percoll gradients. *Int J Androl* 9:1-13.

Rabilloud T, Adessi C, Giraudel A, Lunardi J (1997) Improvement of the solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 18:307-316.

Ramos L, van der Heijden GW, Derijck A, Berden JH, Kremer JA, van der Vlag J, de Boer P (2008) Incomplete nuclear transformation of human spermatozoa in oligo-astheno-teratospermia:

- characterization by indirect immunofluorescence of chromatin and thiol status. *Hum Reprod* 23:259-270.
- Razavi S, Nasr-Esfahani MH, Mardani M, Mafi A, Moghdam A (2003) Effect of human sperm chromatin anomalies on fertilization outcome post-ICSI. *Andrologia* 35:238-243.
- Reyes-Moreno C, Boilard M, Sullivan R, Sirard MA (2002) Characterization and identification of epididymal factors that protect ejaculated bovine sperm during in vitro storage. *Biol Reprod* 66:159-166.
- Robinson BH (1995) Lactic acidemia (disorders of pyruvate carboxylase, pyruvate dehydrogenase). *The metabolic and molecular Bases of Inherited Disease*. Editors Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. New York, McGraw-Hill, 1479-1499.
- Rolland AD, Evrard B, Guitton N, Lavigne R, Calvel P, Couvet M, Jégou B, Pineau C (2007) Two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis analysis of spermatogenesis in the rat. *J Proteome Res* 6:683-697.
- Roque A, Orrego M, Ponte I, Suau P (2004) The preferential binding of histone H1 to DNA scaffold-associated regions is determined by its C-terminal domain. *Nucleic Acids Res* 32:6111-6119.
- Rosales JL, Lee BC, Modarressi M, Sarker KP, Lee KY, Jeong YG, Oko R, Lee KY (2004) Outer dense fibers serve as a functional target for Cdk5.p35 in the developing sperm tail. *J Biol Chem* 279:1224-1232.
- Rousseaux S, Caron C, Govin J, Lestrat C, Faure AK, Khochbin S (2005) Establishment of male-specific epigenetic information. *Gene* 345:139-153.
- Rufas O, Fisch B, Seligman J, Tadir Y, Ovadia J, Shalgi R (1991) Thiol status in human sperm. *Mol Reprod Dev* 29:282-288.
- Sakkas D, Manicardi GC, Tomlinson M, Mandrioli M, Bizzaro D, Bianchi PG, Bianchi U (2000) The use of two density gradient centrifugation techniques and the swim-up method to separate spermatozoa with chromatin and nuclear DNA anomalies. *Hum Reprod* 15:1112-1116.
- Sakkas D, Moffatt O, Manicardi GC, Mariethoz E, Tarozzi N, Bizzaro D (2002) Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biol Reprod* 66:1061-1067.
- Sakkas D, Seli E, Bizzaro D, Tarozzi N, Manicardi GC (2003) Abnormal spermatozoa in the ejaculate: abortive apoptosis and faulty nuclear remodelling during spermatogenesis. *Reprod Biomed Online* 7:428-432. Review.
- Salemi M, Calogero AE, Di Benedetto D, Cosentino A, Barone N, Rappazzo G, Vicari E (2004) Expression of SPANX proteins in human-ejaculated spermatozoa and sperm precursors. *Int J Androl* 27:134-139.
- Santiso R, Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosálvez J, Fernández JL (2007) Evidence of modified nuclear protein matrix in human spermatozoa with fragmented deoxyribonucleic acid. *Fertil Steril* 87:191-194.
- Saowaros W and Panyim S (1979) The formation of disulfide bonds in human protamines during sperm maturation. *Experientia* 35:191-192.
- Sasagawa I, Matsuki S, Suzuki Y, Iuchi Y, Tohya K, Kimura M, Nakada T, Fujii J (2001) Possible involvement of the membrane-bound form of peroxiredoxin 4 in acrosome formation during spermiogenesis of rats. *Eur J Biochem* 268:3053-3061.
- Schaller J, Akiyama K, Kimura H, Hess D, Affolter M, Rickli EE (1991) Primary structure of a new actin-binding protein from human seminal plasma. *Eur J Biochem* 196:743-750.
- Shaman JA, Yamauchi Y, Ward WS (2007) The sperm nuclear matrix is required for paternal DNA replication. *J Cell Biochem* 102:680-688.
- Sharma S, Mittal S, Aggarwal P (2009) Management of infertility in low resource countries. *BJOG* 116:77-83. Review.
- Shetty J, Diekman AB, Jayes FC, Sherman NE, Naaby-Hansen S, Flickinger CJ, Herr JC (2001) Differential extraction and enrichment of human sperm surface proteins in a proteome: identification of immunocontraceptive candidates. *Electrophoresis* 22:3053-3066.

- Shevchenko A, Jensen ON, Podtelejnikov AV, Sagliocco F, Wilm M, Vorm O, Mortensen P, Shevchenko A, Boucherie H, Mann M (1996) Linking genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:14440-14445.
- Shirley C, Hayashi S, Mounsey S, Yanagimachi R, Meistrich M (2004) Abnormalities and reduced reproductive potential of sperm from Tnp1- and Tnp2-null double mutant mice. *Biol Reprod* 71:1220-1229.
- Sigman M, Baazeem A, Zini A (2009) Semen analysis and sperm function assays: what do they mean? *Semin Reprod Med* 27:115-123. Review.
- Singleton S, Zalensky A, Doncel GF, Morshedi M, Zalenskaya IA (2007a) Testis/sperm-specific histone 2B in the sperm of donors and subfertile patients: variability and relation to chromatin packaging. *Hum Reprod* 22:743-750.
- Singleton S, Mudrak O, Morshedi M, Oehninger S, Zalenskaya I, Zalensky A (2007b) Characterisation of a human sperm cell subpopulation marked by the presence of the TSH2B histone. *Reprod Fertil Dev* 19:392-397.
- Söderlund B and Lundin K (2000) The use of silane-coated silica particles for density gradient centrifugation in in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 15:857-860.
- Steinberg TH (2009) Protein gel staining methods: an introduction and overview. *Methods Enzymol* 463:541-563.
- Suau P and Subirana JA (1977) X-ray diffraction studies of nucleoprotamine structure. *J Mol Biol* 117:909-926.
- Switzer RC 3rd, Merrill CR, Shifrin S (1979) A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 98:231-237.
- Tanaka K, Waki H, Ido Y, Akita S, Yoshida Y, Yoshida T, Matsuto T (1988) Protein and polymer analyses up to m/z 100.000 by laser ionization TOF-MS. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2:151-153.
- Tavalaee M, Razavi S, Nasr-Esfahani MH (2009) Influence of sperm chromatin anomalies on assisted reproductive technology outcome. *Fertil Steril* 91:1119-1126.
- Tesarik J, Greco E, Mendoza C (2004) Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation. *Hum Reprod* 19:611-615.
- Thompson WE, Ramalho-Santos J, Sutovsky P (2003) Ubiquitination of prohibitin in mammalian sperm mitochondria: possible roles in the regulation of mitochondrial inheritance and sperm quality control. *Biol Reprod* 69:254-260.
- Tomlinson MJ, Moffatt O, Manicardi GC, Bizzaro D, Afnan M, Sakkas D (2001) Interrelationships between seminal parameters and sperm nuclear DNA damage before and after density gradient centrifugation: implications for assisted conception. *Hum Reprod* 16:2160-2165.
- Torregrosa N, Domínguez-Fandos D, Camejo MI, Shirley CR, Meistrich ML, Ballescà JL, Oliva R (2006) Protamine 2 precursors, protamine 1/protamine 2 ratio, DNA 3 integrity and other sperm parameters in infertile patients. *Hum Reprod* 21:2084-2089.
- Triphan X, Menzel VA, Petrunkina AM, Cassará MC, Wemheuer W, Hinsch KD, Hinsch E (2008) Localisation and function of voltage-dependent anion channels (VDAC) in bovine spermatozoa. *Pflugers Arch* 455:677-686.
- Unlü M, Morgan ME, Minden JS (1997) Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis* 18:2071-2077.
- van der Heijden GW, Dieker JW, Derijck AA, Muller S, Berden JH, Braat DD, van der Vlag J, de Boer P (2005) Asymmetry in histone H3 variants and lysine methylation between paternal and maternal chromatin of the early mouse zygote. *Mech Dev* 122:1008-1022.
- van der Heijden GW, Derijck AA, Ramos L, Giele M, van der Vlag J, de Boer P (2006) Transmission of modified nucleosomes from the mouse male germline to the zygote and subsequent remodeling of paternal chromatin. *Dev Biol* 298:458-469.

- van der Heijden GW, Derijck AA, Pósfai E, Giele M, Pelczar P, Ramos L, Wansink DG, van der Vlag J, Peters AH, de Boer P (2007) Chromosome-wide nucleosome replacement and H3.3 incorporation during mammalian meiotic sex chromosome inactivation. *Nat Genet* 39:251-258.
- van der Heijden GW, Ramos L, Baart EB, van den Berg IM, Derijck AA, van der Vlag J, Martini E, de Boer P (2008) Sperm-derived histones contribute to zygotic chromatin in humans. *BMC Dev Biol* 8:34.
- van Roijen HJ, Ooms MP, Spaargaren MC, Baarends WM, Weber RF, Grootegoed JA, Vreeburg JT (1998) Immunoexpression of testis-specific histone 2B in human spermatozoa and testis tissue. *Hum Reprod* 13:1559-1566.
- Vanrell JA (1992) Esterilidad, subfertilidad e infertilidad: definición, frecuencia y etiología. *Fertilidad y esterilidad humanas*. Ediciones Científicas y Técnicas, S.A. pag 1-43.
- Vera JC, Brito M, Zuvic T, Burzio LO (1984) Polypeptide composition of rat sperm outer dense fibers. A simple procedure to isolate the fibrillar complex. *J Biol Chem* 259:5970-5977.
- Vilfan ID, Conwell CC, Hud NV (2004) Formation of native-like mammalian sperm cell chromatin with folded bull protamine. *J Biol Chem* 279:20088-20095.
- Ward WS and Coffey DS (1991) DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biol Reprod* 44:569-574. Review.
- Ward WS (1993) Deoxyribonucleic acid loop domain tertiary structure in mammalian spermatozoa. *Biol Reprod* 48:1193-1201.
- Wasinger VC, Cordwell SJ, Cerpa-Poljak A, Yan JX, Gooley AA, Wilkins MR, Duncan MW, Harris R, Williams KL, Humphery-Smith I (1995) Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis* 16:1090-1094.
- Westbrook VA, Schoppee PD, Vanage GR, Klotz KL, Diekman AB, Flickinger CJ, Coppola MA, Herr JC (2006) Hominoid-specific SPANXA/D genes demonstrate differential expression in individuals and protein localization to a distinct nuclear envelope domain during spermatid morphogenesis. *Mol Hum Reprod* 12:703-716.
- WHO (1999) World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction. Fourth edition. Cambridge University Press.
- WHO (2010) World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen . Fifth edition. *In Press*.
- Wiedmer A, Wang P, Zhou J, Rennekamp AJ, Tiranti V, Zeviani M, Lieberman PM (2008) Epstein-Barr virus immediate-early protein Zta co-opts mitochondrial single-stranded DNA binding protein to promote viral and inhibit mitochondrial DNA replication. *J Virol* 82:4647-4655.
- Wilkins MR, Sanchez JC, Gooley AA, Appel RD, Humphery-Smith I, Hochstrasser DF, Williams KL (1996) Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol Genet Eng Rev* 13:19-50. Review.
- Wolff S, Antelmann H, Albrecht D, Becher D, Bernhardt J, Bron S, Büttner K, van Dijk JM, Eymann C, Otto A, Tam le T, Hecker M (2007) Towards the entire proteome of the model bacterium *Bacillus subtilis* by gel-based and gel-free approaches. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 849:129-140.
- Wu TF and Chu DS (2008) Sperm chromatin: fertile grounds for proteomic discovery of clinical tools. *Mol Cell Proteomics* 7:1876-1886. Review.
- Wykes SM and Krawetz SA (2003) The structural organization of sperm chromatin. *J Biol Chem* 278:29471-29477.
- Yelick PC, Balhorn R, Johnson PA, Corzett M, Mazrimas JA, Kleene KC, Hecht NB (1987) Mouse protamine 2 is synthesized as a precursor whereas mouse protamine 1 is not. *Mol Cell Biol* 7:2173- 2179.
- Yoshida K, Yamasaki T, Yoshiike M, Takano S, Sato I, Iwamoto T (2003) Quantification of seminal plasma motility inhibitor/semenogelin in human seminal plasma. *J Androl* 24:878-884.

- Yoshida K, Krasznai ZT, Krasznai Z, Yoshiike M, Kawano N, Yoshida M, Morisawa M, Tóth Z, Bazsáné ZK, Márián T, Iwamoto T (2009) Functional implications of membrane modification with semenogelins for inhibition of sperm motility in humans. *Cell Motil Cytoskeleton* 66:99-108.
- Yoshii T, Kuji N, Komatsu S, Iwahashi K, Tanaka Y, Yoshida H, Wada A, Yoshimura Y (2005) Fine resolution of human sperm nucleoproteins by two-dimensional electrophoresis. *Mol Hum Reprod* 11:677-681.
- Young KE, Robbins WA, Xun L, Elashoff D, Rothmann SA, Perreault SD (2003) Evaluation of chromosome breakage and DNA integrity in sperm: an investigation of remote semen collection conditions. *J Androl* 24:853-861.
- Zalensky AO, Siino JS, Gineitis AA, Zalenskaya IA, Tomilin NV, Yau P, Bradbury EM (2002) Human testis/sperm-specific histone H2B (hTSH2B). Molecular cloning and characterization. *J Biol Chem* 277:43474-43480.
- Zamudio NM, Chong S, O'Bryan MK (2008) Epigenetic regulation in male germ cells. *Reproduction* 136:131-146. Review.
- Zhang J, Wu J, Huo R, Mao Y, Lu Y, Guo X, Liu J, Zhou Z, Huang X, Sha J (2007) ERp57 is a potential biomarker for human fertilization capability. *Mol Hum Reprod* 13:633-639.
- Zhang X, San Gabriel M, Zini A (2006) Sperm nuclear histone to protamine ratio in fertile and infertile men: evidence of heterogeneous subpopulations of spermatozoa in the ejaculate. *J Androl* 27:414-420.
- Zhao C, Huo R, Wang FQ, Lin M, Zhou ZM, Sha JH (2007) Identification of several proteins involved in regulation of sperm motility by proteomic analysis. *Fertil Steril* 87:436-48.
- Zhao M, Shirley C, Hayashi S, Marcon L, Mohapatra B, Suganuma R, Behringer R, Boissonneault G, Yanagimachi R, Meistrich M (2004) Transition nuclear proteins are required for normal chromatin condensation and functional sperm development. *Genesis* 38:200-213.
- Zimmerman S and Sutovsky P (2009) The sperm proteasome during sperm capacitation and fertilization. *J Reprod Immunol* 83:19-25.
- Zini A, Mak V, Phang D, Jarvi K (1999) Potential adverse effect of semen processing on human sperm deoxyribonucleic acid integrity. *Fertil Steril* 72:496-499.
- Zini A, Finelli A, Phang D, Jarvi K (2000) Influence of semen processing technique on human sperm DNA integrity. *Urology* 56:1081-1084.
- Zini A, Kamal KM, Phang D (2001) Free thiols in human spermatozoa: correlation with sperm DNA integrity. *Urology* 58:80-84.
- Zini A, Gabriel MS, Zhang X (2007) The histone to protamine ratio in human spermatozoa: comparative study of whole and processed semen. *Fertil Steril* 87:217-219.
- Zini A, Boman JM, Belzile E, Ciampi A (2008) Sperm DNA damage is associated with an increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI: systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod* 23:2663-2668.
- Zini A and Sigman M (2009) Are tests of sperm DNA damage clinically useful? Pros and cons. *J Androl* 30:219-229. Review.
- Zong SD, Zhu LJ, Grima J, Aravindan GR, Bardin CW, Cheng CY (1994) Cyclic and postnatal developmental changes of testin in the rat seminiferous epithelium--an immunohistochemical study. *Biol Reprod* 51:843-851.

7

7

Annexos
Annexes

7.1. Protocols

7.1.1. Protocol d'anàlisi proteòmic d'espermatozoides humans amb Gels Bidimensionals

Preparació de les mostres (Sample preparation)

Rentar mostres del fluid seminal (mostra fresca) o del 7% Glicerol/Ham-F10 1X (mostra congelada) a 3000g 5 minuts 4°C.

Resuspendre el *pellet* amb 0,5-1 ml Ham-F10 1X i determinar la concentració amb la Cambra de Makler. Centrifugar la mostra a 3000g 5 minuts 4°C i resuspendre-la amb 1-2 ml Ham-F10 1X (depenent de la concentració de la mostra i dels gradients que es vulguin fer).

Preparar el gradient de *Percoll* al 50% (preparar al moment d'utilitzar i en gel). Preparar primer una solució *stock* de *Percoll* 100%:

| | <u>1 ml</u> |
|------------------------------|---------------------------------|
| 87% <i>Percoll</i> comercial | 870 µl <i>Percoll</i> comercial |
| 10% HAM F-10 10X | 100 µl HAM F-10 10X |
| 0,225% NaHCO ₃ | 30 µl 7,5% NaHCO ₃ |

A partir del *Percoll* 100% es prepara el *Percoll* 50% per fer el coixí de densitat. Es prepara 1 ml *Percoll* al 50% per a cada ~50 milions d'espermatozoides:

| | <u>1 ml</u> |
|---------------------------|-------------------------------|
| 50% <i>Percoll</i> 100% | 500 µl <i>Percoll</i> 100% |
| 47% HAM F-10 1X | 470 µl HAM F-10 1X |
| 0,225% NaHCO ₃ | 30 µl 7,5% NaHCO ₃ |

Fer el coixí de densitat a un *falcon* de 15 ml: afegir 1 ml de 50% *Percoll*, a sobre afegir l'1 ml de mostra resuspesa en HAM F-10 1X. Fer-lo amb cura de no barrejar les dues fases: *falcon* en diagonal i la mostra ha de caure per les parets del tub.

Deixar reposar el gradient, 10 minuts en gel. Així es barreja una mica i el canvi de fase no és tant brusc.

Centrifugar a 800g 20minuts 4°C. Un cop centrifugat ha de ser visible una interfase i un *pellet*.

Treure el sobrenedant i ficar la interfase en 1 *ependorf*. Deixar el *pellet* al *falcon*. En teoria només haurien d'haver espermatozoides al *pellet* i potser també a la interfase, per tant la resta es descarta.

Resuspendre el *pellet* amb 1 ml de HAM F-10 1X i passar-lo a un *ependorf*.

Fer el comptatge dels espermatozoides de la interfase i del *pellet* a la Cambra de Makler. A l'interfase s'espera que només hi hagi cèl·lules de descamació epitelial, limfòcits... (en un cas ideal no hauria d'haver espermatozoides, ja que en teoria amb el gradient s'hauria d'aconseguir separar els espermatozoides de la resta de cèl·lules).

Posar 3 μ l de la mostra a la Cambra de Makler i fer el comptatge.

Breu explicació de com comptar amb la Cambra de Makler: el requadre consta de 10 files x 10 columnes. El comptatge de 10 quadrets (una fila) dóna la concentració de la mostra ($\times 10^6$ espermatozoides/ml). Per tenir una concentració més fiable es compten 3 files (30 quadrets) i es divideix per 3.

Extracció proteica amb el Medi de Lisi (Protein extraction with Lysis Buffer)

Es prepara el Medi de Lisi i es congela sense afegir ni el DTT ni el PMSF (es troben al congelador per evitar la seva degradació). Posar-los quan es vagi a utilitzar el medi.

| | <u>10 ml</u> |
|----------------------------------|------------------------------|
| 7 M Urea | 4,2 gr Urea |
| 2 M Tiourea | 1,52 gr Tiourea |
| 1% CHAPS (pes/volum) | 0,1 gr CHAPS |
| 1% N-octilglucopiranòxid | 0,1 gr N-octilglucopiranòxid |
| 0,5% IPG Buffer 3-10 (pes/volum) | 50 μ l IPG Buffer |

| | <u>1 ml medi lisi</u> |
|------------------|------------------------------|
| 18 mM de DTT | 18 μ l 1M DTT |
| 2,4 μ M PMSF | 24 μ l 100mM PMSF |

Afegir al *pellet* un volum de Medi de Lisi tal que s'aconsegueixi una concentració de 91,8 milions d'espermatozoides en 0,4 ml, és a dir, $229,5 \times 10^6$ espermatozoides/ml.

O afegir el medi de lisi necessari perquè es desfaci el *pellet* (100-200 μ l de Medi de Lisi).

Per la tinció amb *Flamingo* uns 25×10^6 espermatozoides en 300 μ L són necessaris per veure el patró d'*spots* (però no per la identificació de proteïnes).

Incubar la mostra en agitació 1 hora RT per obtenir les proteïnes en solució gràcies a la lisi.

Centrifugar 3000g 5 minuts 4°C per eliminar restes cel·lulars del *pellet* i guardar el sobrenedant en un nou *eppendorf*. Congelar les mostres en el medi de lisi a -20°C si no es processen al moment o preparar-les per l'isoelectroenfoc.

Quantificar la mostra amb *Bradford* per tal de tenir a cada gel uns 200 µgr de proteïna, quantitat suficient per la seva identificació amb espectrometria de masses (si s'escau, mirar compatibilitats reactius medi lisi amb sistemes de quantificació de proteïna: *BCA Protein Assay*, *Bradford*, *2D Quant Kit*, etc.).

Primera dimensió o Isoelectroenfoc (First dimension or Isoelectric Focusing)

Cada tira de pH de 17 cm (BioRad) ha contactar amb 300 µl de mostra en Medi de Lisi (amb DTT i PMSF) durant l'isoelectroenfoc. Per tant, portar el volum de mostra a utilitzar a un volum de 300 µl amb el Medi de Lisi i DTT i PMSF necessari.

Abans de carregar els 300 µl de mostra a la cubeta de la Protean IEF Cell es posen 6 µl de *DeStreak* (GE Healthcare) per minimitzar agregats de proteïnes durant l'isoelectroenfoc. Distribuir els 300 µl uniformement al carril de la cubeta i posar la tira de tal manera que la cara de l'acrilaminda toqui la mostra.

Fer l'isoelectroenfoc posant en marxa el programa SEMEN2 (*stored method* → SEMEN2 → indicar el número de tires que s'han posat → *run method*). Abans de iniciar el programa SEMEN2 deixar la mostra durant 10 minuts amb la tira perquè la tira absorbeixi la mostra. Un cop transcorregut aquest temps afegir oli mineral per sobre de la tira fins a cobrir-la, per evitar que es cremi la tira degut a l'augment de temperatura per l'electricitat, i iniciar el programa.

El programa "SEMEN2" consta de:

1er: fa una rehidratació passiva de 12h.

2on: Un isoelectroenfoc de 8-10h:

| | |
|---------------------|--------------|
| ↗ Step 1: 250V | 20 minuts |
| ↗ Step 2: 10.000V | 2h 30 minuts |
| ↖ Step 3: 10.000V/h | 40.000V |
| ↖ Step 4: 500V | 10 hores |

↖ Rapid ramp

↗ Slow ramp

Un altre programa més suau i adient per mostres conflictives i brutes com els oligoastenoteratozoospèrmics (OAT) és el programa "Hola" on l'isoelectroenfoc consta de:

| | |
|---------------------|----------|
| ↪ Step 1: 500V | 1 hora |
| ↪ Step 2: 1.000V | 1 hora |
| ↪ Step 3: 4.000V | 1 hora |
| ↪ Step 4: 8.000V | 1 hora |
| ↪ Step 5: 10.000V | 1 hora |
| ↪ Step 6: 10.000V/h | 40.000V |
| ↪ Step 7: 500V | 10 hores |

Un cop acabat l'isoelectrofoc de les tires, apagar la *Protean IEF Cell*. Es poden guardar les tires amb dos tubs de 15 ml + film a -20°C una vegada eliminat les restes d'oli.

Agafar la tira amb pinces i posar-la vertical sobre un paper per eliminar restes d'oli.

Equilibrar les tires amb els tampons d'Equilibració I i II. Primer s'ha de ficar cada tira en 6 ml/tira de Tampó d'Equilibració I durant 10-15 minuts i en agitació.

Treure solució i ficar 6 ml/tira de la Tampó d'Equilibració II durant altres 10-15 minuts en agitació.

Preparació del gel gran d'acrilamida (SDS-PAGE)

Netejar els vidres amb alcohol (o amb aigua si els gels es tenyeixen amb *Flamingo*).

Col·locar els vidres (un gran i un petit) a l'aparell amb els separadors grans de color gris. Un cop col·locats estrènyer els vidres amb les rosques negres. Fer servir el cartró que té la mesura del gel per centrar els separadors i els vidres i així evitar que no perdi la solució del gel.

Posar H₂OmQ per comprovar que els vidres no perden H₂O durant uns minuts. Treure l'H₂O i eixugar els vidres amb paper de filtre.

Preparar la solució per fer el Gel d'Acrilamida en el següent ordre:

| | <u>Gel gran (x1 gel)</u> |
|-------------------------|--|
| H ₂ OmQ | 17,2 ml |
| 0,345 M Tris-HCl pH 8,8 | 11,04 ml 1,5 M Tris-HCl pH 8,8 |
| 0,1% SDS | 480 µl 10% SDS |
| 12% Acrilamida | 9,6 ml 30% Acril/Bisacril (29:1) + 9,6 ml 30% Duracryl |

El TEMED i l'APS s'afegeixen per polimeritzar el gel, llavors no s'ha d'afegir fins que no s'hagi de ficar als vidres.

| | |
|-------------|----------------------------|
| 0,13% TEMED | 62,4 µl TEMED |
| 0,046% APS | 224 µl 10% APS (0,1 gr/ml) |

Afegir la solució dins dels vidres ben assecats i la pinta adient per les tires.

Deixar gelificar 1-3 hores RT i després treure la pinta, netejar amb aigua on estava la pinta i embolicar amb film tota la estructura i ficar-ho a la nevera O/N (dos nits està OK).

Preparació del Tampó d'Equilibració (Equilibration Buffer)

Reactius comuns pel Tampó d'Equilibració I i II:

25 ml (2 tires → 12,5 ml/equilibració)

| | |
|-------------------------|-------------------------------|
| 6M Urea | 9,01 gr Urea |
| 0,375 M Tris-HCl pH 8,8 | 12,5 ml 1,5 M Tris-HCl pH 8,8 |
| 20% glicerol | 5 ml Glicerol |
| 2% SDS | 0,5 gr SDS |
| H ₂ Omq | fins 25 ml |

Es divideix els 25 ml en 2 tubs de 15 ml, un per cada tampó d'equilibració. Entre els tampons I i II tenen de diferent que el I porta un 2% de DTT i el II un 2,5% de Iodoacetamida. Aquests dos reactius es posen al moment que es vol fer servir el Tampó d'Equilibració.

Tampó d'equilibració I (12,5 ml/equilibració)

| | |
|--------|-------------|
| 2% DTT | 0,24 gr DTT |
|--------|-------------|

Tampó d'equilibració II (12,5 ml/equilibració)

| | |
|--------------------|----------------------|
| 2,5% Iodoacetamida | 0,3 gr Iodoacetamida |
|--------------------|----------------------|

Agafem 1% Agarosa amb una miqueta de *Bromofenol Blue* i escalfar-ho al microones 10-20 segons (fins que bulli). Deixar refredar.

Mullar les tires en una proveta amb SDS 1X (Tampó d'Electroforesis també anomenat TGS), i a continuació ficar-les als gels (el pol positiu de la tira cap a l'esquerra i el negatiu cap a la dreta). La part de la poliacrilamida de les tires es col·loca mirant al vidre gran. Acabar de ficar les tires fins que toqui el gel amb l'ajuda d'una pinta.

Tampó TGS 10X (2 L)

| | |
|--------------------|------------------|
| 0,25 M Tris | 60 gr Tris |
| 1,92 M Glicina | 288,4 gr Glicina |
| 1% SDS | 20 gr SDS |
| H ₂ Omq | fins 2 L |

El tampó es troba 10X, s'ha de diluir a 1X. Per la cubeta Protean II es necessiten 4 L Tampó d'Electroforesis per tant s'agafen 400 ml Tampó 10X + fins 4 L H₂O_mQ i obtindrem TGS a 25 mM Tris, 192 M Glicina i 0,1% SDS.

Ficar l'agarosa desgelificada i freda sobre les tires amb una pipeta fins omplir tota la superfície del vidre petit. Deixar polimeritzar l'agarosa (~15 segons).

Ficar els gels a la cubeta Protean II i omplir-la amb TGS 1X (s'ha de cobrir amb tampó els elèctrodes de sota i a la part del mig entre els dos gels). Els vidres petits miren cap a dins.

Córrer a l'electroforesi a 300V fins que el front (*Bromofenol Blue* que porta l'agarosa) arribi a baix (abans que s'escapi), és a dir, unes 3 hores 10 minuts aproximadament. Parar l'electroforesi. Desmuntar l'aparell per treure els gels i fer la tinció de plata o de *Coomassie Brilliant Blue*. El tampó TGS 1X es pot reciclar 2-3 vegades.

7.1.2. Protocol d'anàlisi de proteïnes nuclears espermàtiques

Extracció proteïnes nuclears (Nuclear protein extraction)

Partir d'un volum d'ejaculat de cada mostra corresponent a 14×10^6 espermatozoides. Es pot partir amb menys milions de cèl·lules (fins a 5 milions) utilitzant els volums de les solucions proporcionals.

Centrifugar a 8940g 5 minuts 4°C i eliminar el sobrenedant (fluid seminal). Resuspendre el *pellet* amb 300 µl de HAM-F10 1X per rentar la mostra.

Centrifugar a 8940g 5 minuts 4°C i tornar a resuspendre el *pellet* amb 300 µl Ham-F10 1X. Si fos necessari (perquè la mostra està molt bruta) caldria afegir una tercera vegada Ham F10 1X, però normalment no cal.

Rentar el sediment amb 200 µl d'una Solució de Permeabilització que desestabilitza les membranes i permeabilitza les cèl·lules.

| | <u>1 ml</u> |
|------------------------|------------------------------|
| 20 mM Tris-HCl pH 8 | 20 µl 1 M Tris-HCl pH 8 |
| 1 mM MgCl ₂ | 4 µl 0,5 M MgCl ₂ |
| 0,5% Tritó X-100 | 5 µl Tritó X-100 |
| H ₂ OmQ | 971 µl |

Centrifugar a 8940g 5 minuts 4°C i eliminar el sobrenedant amb pipeta. Resuspendre amb 200 µl PMSF 1mM (10 µl PMSF 100 mM + 990 µl H₂OmQ) per aconseguir fer un xoc a les cèl·lules i trencar-les. Centrifugar a 8940g 5 minuts 4°C.

Resuspendre les cèl·lules (*pellet*) amb 50 µl de la Solució EDTA per solubilitzar les cèl·lules del *pellet*.

| | <u>1 ml</u> |
|----------------------|--------------------------|
| 100 mM Tris-HCl pH 8 | 100 µl 1 M Tris-HCl pH 8 |
| 20 mM EDTA | 40 µl 0,5 M EDTA |
| 1 mM PMSF | 10 µl 100 mM PMSF |
| H ₂ OmQ | 971 µl |

Afegir 1 volum (50 µl) de la Solució GuHCl/DTT per dissociar el nucli amb fortes condicions reductores (DTT) i desnaturalitzants (GuHCl). Barrejar molt bé (maracas-like) perquè queda com un moc degut a la cromatina. Fer un punt de vòrtex.

| | <u>500 µl</u> |
|------------|----------------------|
| 575 mM DTT | 0,04435 gr DTT |
| 6 M GuHCl | fins 500 µl |

Aturar la reacció afegint 5 volums (1 ml) d'etanol absolut fred (-20°C). Barrejar molt bé per inversió i vòrtex fins que s'observi un fil blanc que correspon al DNA deshidratat. Incubar 10 minuts a -20°C o aturar el protocol en aquest punt deixant la mostra al congelador.

Centrifugar 12880g 15 minuts 4°C, eliminar el sobrenedant per decantació i eixugar amb un paper de filtre.

Afegir 500 µl de 0,5 M HCl per extreure les proteïnes ja que l'HCl competeix amb el DNA per la unió de les proteïnes bàsiques. Vòrtex, incubar 5 minuts 37°C, vòrtex, incubar 2 minuts més.

Centrifugar 17530g 10 minuts 4°C. Guardar el sobrenedant que conté proteïnes en un tub pre-refredat on prèviament s'ha afegit 125 µl de 100% TCA (concentració final 20% TCA). També es guarda el sediment que conté el DNA (-20°C), tot i que estarà força trencat, per la quantificació.

[Quantificació del DNA per hidròlisi amb àcid perclòric (PCA): rentar dos vegades amb 0,5 N PCA i centrifugar 17000g 10 minuts 4°C. Incubar el DNA amb 0,5 N PCA durant 20 minuts a un bany de 90°C per hidrolitzar el DNA i obtenir nucleòtids. Centrifugar a 4420g 10 minuts 4°C per recol·lectar els nucleòtids al sobrenedant. Quantificar els nucleòtids amb *Nanodrop* a 260nm i una constant de 38 ngr/µl]

Incubar 10 min a 4°C perquè el TCA precipiti les proteïnes. Centrifugar 17530g 10 minuts 4°C. Eliminar sobrenedant per decantació. Les proteïnes es troben per les parets però no es veuen.

Afegir 500 µl de la Solució de β-mercaptoetanol en acetona preparat al moment per tal de rentar les proteïnes. Centrifugar 17530g 5 minuts 4°C. Repetir aquest pas per fer un segon rentat.

| | |
|---------------------|-------------------------|
| | <u>10 ml</u> |
| 1% β-mercaptoetanol | 0,1 ml β-mercaptoetanol |
| Acetona | fins 10 ml |

S'assequen les proteïnes en l'*speed-vacuum* (bomba que fa el buit) durant 5-10 minuts i finalment es resuspenen en 20 µl de Tampó de Mostra. Preservar la mostra congelada a -20°C.

| | |
|----------------------|-------------------------|
| | <u>1 ml</u> |
| 5,5 M Urea | 0,330 gr Urea |
| 20% β-mercaptoetanol | 200 µl β-mercaptoetanol |
| 5% Àcid acètic | 50 µl Àcid acètic |
| H ₂ OmQ | fins 1 ml |

Electroforesis àcida (Acid gel electrophoresis)

Fem un Gel de Poliacrilamida Àcid petit. Afegim en el següent ordre els components:

| | <u>15 ml (2 gels petits)</u> |
|--------------------------------|---|
| 5,5 M Urea | 2,25 gr Urea |
| 5% Àcid Acètic | 771 µl Àcid Acètic |
| 15,1% Acrilamida/Bisacrilamida | 7,5 ml 30 % Acrilamida/0,2% Bisacrilamida |
| H ₂ O _{mQ} | fins 15 ml |

Desgassificar durant 30-40 minuts.

| | |
|-------------|----------------|
| 0,53% TEMED | 80 µl TEMED |
| 5,3% PSA | 800 µl 10% PSA |

Netejar els vidres i muntar-los (el separador ja està incorporat al vidre gran). Ficar aigua uns minuts per comprovar que no s'escapa el líquid. Ficar la solució de poliacrilamida a poc a poc (sense fer bombolles) entre els dos vidres i col·locar la pinta. Gelificar durant uns 30min - 1 hora. Treure les pintes i rentar els pous amb H₂O destil·lada (sota l'aixeta).

Pre-Electroforesis (Pre-electrophoresis)

Posar els gels a les cubetes i omplir-les amb tampó Àcid acètic 0,9 N (128,43 ml Àcid acètic + fins a 2,5 L H₂O_{mQ}).

Col·locar la polaritat dels elèctrodes de la cubeta correctament (connectar-ho al mateix color de l'elèctrode), però la polaritat dels elèctrodes a la font és invertida (vermell amb negre i negre amb vermell) a 150 V durant 1hora 15minuts - 1hora 30minuts fins que l'amperatge sigui constant (18mA a una cubeta de 2 gels).

Electroforesis (Electrophoresis)

Renovar tot el Tampó Acètic 0,9 N. Rentar els pous amb una xeringa i tampó 0,9 N acètic.

Carregar les mostres dissoltes en Tampó de Mostra (-20°C). La proporció correcta per veure les bandes de protamines al gel correctament és 2,5 µl carregats en un carril per cada 20 µl on hi ha uns 14x10⁶ espermatozoides.

Afegir 3 µl de Tampó de Mostra amb verd de metil (10mg/100µl) i córrer el gel a 150 V durant aproximadament 55 minuts-1 hora fins que el front del verd de metil es troba una mica per sota de la meitat del gel.

Polaritat dels elèctrodes de la font
canviada!!

Western Blot del precursor de protamina 2 (Precursor Protamine 2 Western Blot)

Manipular-ho tot sempre amb les pinces

Prepara el Tampó de Transferència àcid acètic 0,9 mM (0,1284 ml Àcid acètic + 2,5 L H₂OmQ) i mantenir-lo a la nevera perquè ha d'estar fred per la transferència de les proteïnes al paper *Immobilon*.

Tallar una membrana *Immobilon* de la mida de les plaques de la cubeta, humitejar-la 1 minut en Metanol i rentar-la amb H₂OmQ per hidratar la membrana. Humitejar-la finalment 10-15 minuts amb Tampó de Transferència.

Tallar 2 papers *Watmann* gruixuts i humitejar-los amb Tampó de Transferència.

Submergir 2 *Scotch-brite* especials per la transferència en el Tampó de Transferència.

Descarregar el gel i deixar-lo en el Tampó de Transferència 10 minuts aproximadament.

Col·locar les diferents capes del bloc de transferència (*sandwich*) de la següent manera:

Placa TRANSPARENT (pol +)

1 *Scotch-brite*
1 Paper *Watmann* gruixut
↓
Gel àcid
Membrana
1 Paper *Watmann* gruixut
1 *Scotch-brite*

Polaritat dels elèctrodes de la font correctament!!

Placa NEGRA (pol -)

Al posar l'últim paper *Watmann* passar-hi una punta de pipeta gran com a rodet fent pressió per evitar la formació de bombolles.

Ficar en *sandwich* a la cubeta i afegir el Tampó de Transferència fred. Ficar la cubeta en gel i fer la transferència en fred a 75 V durant 1 hora.

Obrir el *sandwich* i veure si hi ha hagut la transferència (la marca del verd de metil es troba a la membrana). Fer una senyal a l'esquerra a dalt i tallar la membrana.

Immuno-tinció (Immunostaining)

Posar la membrana 5-10 minuts en TBS 1X-0,1% *Tween* 20 (100 ml TBS 10X + 5 ml 20% *Tween* 20 + fins 1 L H₂OmQ) en agitació constant.

Bloquejar la membrana amb la Solució de Bloqueig durant 1 hora en agitació constant en 5% llet desnatada freda amb TBS 1X -0,1% *Tween* 20 en agitació constant.

| | |
|----------------------|-----------------------------------|
| | <u>50 ml (2 membranes)</u> |
| 5% llet desnatada | 2,5 gr llet desnatada |
| TBS 1X-0,1% Tween 20 | fins 50 ml TBS 1X-0,1% Tween 20 |

Rentar 3 vegades la membrana durant 5 minuts en TBS 1X-0,1% Tween 20.

Afegir l'Anticòs Primari segons la dilució correcta per l'anticòs en TBS 1X-0,1% Tween 20. Es pot reutilitzar una vegada ja que dura una setmana a 4°C. En cas del precursor de Protamina 2 la dilució és 1:2500 (4 µl Anticòs Primari + 10 ml TBS 1X-0,1% Tween 20).

Incubar la membrana amb l'Anticòs Primari O/N a 4°C en agitació o bé 1 hora a temperatura ambient en agitació.

Fer tres rentats de 5 minuts amb TBS 1X-0,1% Tween 20.

Hibridar amb l'Anticòs Secundari adient per l'Anticòs Primari en la dilució que es recomana comercialment. L'anticòs del precursor de la protamina 2 s'ha obtingut de conill, per tant necessiten Anti-Mouse 1:2500 (4 µl Anticòs Secundari + 10 ml 5% llet desnatada amb TBS 1X-0,1% Tween 20).

Incubar la membrana amb l'Anticòs Secundari 1h en agitació.

Fer tres rentats de 5min amb TBS 1X-0,1% Tween 20.

Revelat (Detection)

Preparar el Substrat (Luminol + potenciadors) en un *ependorf* de 2 ml que s'hidrolitza a través de l'enzim HRP (*Horseradix Peroxidase*) que té unit l'Anticòs Secundari. D'aquesta manera, el producte resultant, que és quimioluminiscent, es visualitza i dóna una senyal que és proporcional a la quantitat de proteïna que hi ha:

700 µl de Solució A + 700 µl de Solució B

Preparar el Revelador (100 ml Revelador + 500 ml H₂O_{mQ}), el Fixador (200 ml Fixador + 800 ml H₂O_{mQ}) i la resta de les quatre cubetes que es necessiten per revelar la membrana en un film:

Revelador_H₂O destil·lada_Fixador_H₂O + sabó

...Apagar la llum i treballar amb la llum vermella...

Assecar la membrana amb paper *Watmann* (pressió lleugera) i afegir el substrat repartit uniformement per tota la membrana amb una pipeta *Pasteur*.

Deixar actuar 5 minuts. Assecar amb paper *Watmann* i cobrir la membrana amb film transparent. Col·locar la membrana al *cassette* i enganxar-ho amb 2 cintes adhesives. Ficar el

film a sobre, pressionar uns segons i fer senyal al film a una cantonada per saber l'orientació de la membrana al film.

Transcorregut 2-5 minuts obrir el *cassete* i ficar el film a la primera cubeta amb revelador i deixar-lo el temps necessari fins que vegi les bandes al film.

Treure el film del revelador passar-lo per la segona cubeta (H₂O destil·lada) uns segons per parar el revelat.

Ficar-lo al fixador durant uns minuts fins que estigui totalment transparent el film.

Finalment rentar el film amb aigua amb sabó i després netejar-lo amb aigua de l'aixeta i deixar-lo assecar.

7.1.3. Protocol d'obtenció de caps espermàtics amb CTAB

Preparació de les mostres (Sample preparation)

Es parteix d'una mostra de uns 400×10^6 espermatozoides totals i es comença amb els rentats de la mostra.

Rentar amb 1 ml HAM F-10 1X a 3000g 5 minuts 4°C.

Rentar 2 o 3 vegades amb 1 ml PBS a 3000g 5 minuts 4°C, observar al microscopi òptic fins que la mostra es vegi neta sense moltes altres cèl·lules ni punts negres).

Rentat a 3000g 5 minuts 4°C amb 1 ml/ 100×10^6 espermatozoides (~1 ml/*eppendorf*) d'una Solució de Rentat I constituïda per:

| | <u>5 ml (1 mostra)</u> |
|---------------------|-------------------------------|
| 100 mM NaCl | 500 µL 1M NaCl |
| 10 mM Tris-HCl pH 8 | 50 µL 1 M Tris-HCl pH 8 |
| 1 mM EDTA | 10 µL 0,5 M EDTA |
| 0,1 mM PMSF | 5 µL 100 mM PMSF |
| H ₂ Omq | fins 5 ml H ₂ Omq |

Cada mostra passa a trobar-se repartida en 4 *eppendorf* de 1,5 ml amb un 1 ml a cadascun.

Decapitació (Decapitation)

Incubar 15 minuts 4°C (gel) amb 1 ml/ 100×10^6 espermatozoides d'una Solució Reductora constituïda per:

| | <u>5 ml (1 mostra)</u> |
|----------------------|-------------------------------|
| 10 mM DTT | 50 µL 1M DTT |
| 0,05 M Tris-HCl pH 8 | 250 µL 1 M Tris-HCl pH 8 |
| H ₂ Omq | fins 5 ml H ₂ Omq |

Incubar 30 minuts a 4°C (gel) amb 1% CTAB dins de la solució anterior.

El CTAB és un detergent que és difícil de dissoldre amb H₂Omq i per tant no es pot fer una solució *stock* més concentrada d'1% per després incorporar a les mostres perquè no es dissol! Per tant afegir 0,01 gr CTAB a cada *eppendorf* (1 ml)

Rentats després decapitació (Washes after decapitation)

Fer 2 rentats a 3000g 5 minuts 4°C amb 1 ml/100x10⁶ espermatozoides d'una Solució de Rentat II constituïda per:

| | <u>5 ml (1 mostra, 2 rentats)</u> |
|---------------------|--|
| 1% CTAB | 0,05 gr CTAB |
| 10 mM Tris-HCl pH 8 | 50 µL 1 M Tris-HCl pH 8 |
| 0,05% Digitonina | 0,0025 gr Digitonina |
| H ₂ Omq | fins 5 ml H ₂ Omq |

Fer 2 rentats a 3000g 5 minuts 4°C amb 1 ml/100x10⁶ espermatozoide amb una Solució de Rentat III constituïda per:

| | <u>5 ml (1 mostra, 2 rentats)</u> |
|---------------------|--|
| 100 mM NaCl | 1 ml 1M NaCl |
| 10 mM Tris-HCl pH 8 | 100 µL 1 M Tris-HCl pH 8 |
| 0,05% Digitonina | 0,005 gr Digitonina |
| H ₂ Omq | fins 10 ml H ₂ Omq |

El *pellet* de caps s'observa a l'últim rentat al microscopi òptic i es compta amb la Cambra de Makler. S'uneixen tots el caps en un sol *eppendorf* i es resuspen en la solució adient (Medi de lisi (2D), Tampó de mostres (Gel àcid), *Sample Buffer* (SDS-PAGE), etc).

7.1.4. Protocol d'immunofluorescència d'espermatozoides decondensats

Preparació de les mostres (Sample preparation)

Si els portaobjectes no es troben pre-tractats amb Poly-L-Lisina comercialment, tractar-los nosaltres mateixos. La Poly-L-Lisina permet que les cèl·lules s'adhereixin al portaobjectes. Pre-tractar els portaobjectes amb 1M NaOH, submergir 5-10 vegades amb H₂OmQ i assecat-los 10 minuts a 100°C. Posar una gota de Poly-L-Lisina al portaobjectes i escampar-ho per tot el portaobjectes. Deixar assecat i guardar-los en una capsula a RT.

Agafar una alíquota de 1×10^6 d'espermatozoides per cada portaobjectes i rentar-la amb PBS (3000g 5 minuts) les vegades que sigui necessari per netejar la mostra. Resuspendre el *pellet* amb 5 µl PBS aproximadament i posar-la sobre el portaobjectes. Repartir les cèl·lules pel centre del portaobjectes amb una punta de pipeta.

Si la proteïna a detectar als espermatozoides es troba potencialment al nucli, seguir el protocol de Decondensació. Si no és així, continuar amb el protocol d'Immunofluorescència.

Decondensació (Decondensing protocol)

Incubar els portaobjectes amb la mostra escampada a una Cambra humida (caixa amb paper mullat) a RT fins que la mostra comença a no ser transparent (5-10 minuts aproximadament).

Afegir 100 µl de la Solució de Decondensació preparada al moment a sobre la mostra que es troba en un portaobjectes.

| | <u>1 ml</u> |
|---------------------------------|--------------------|
| 2,5 mM DTT | 2,5 µL 1 M DTT |
| 0,2% Tritó X-100 | 2 µL Tritó X-100 |
| 100 UI/ml Heparina (= 1 mgr/ml) | 0,001 gr Heparina |
| PBS | 995,5 µL |

Incubar la mostra a la Cambra humida durant 7-8 minuts i mirar al Microscopi Òptic el grau de decondensació de les cèl·lules (posar un cobreobjectes quadrat). Quan el grau de decondensació sigui adequat (el volum del cap és dos-tres vegades més gran i gris) parar la decondensació i anotar el temps que ha trigat (normalment 10-15 minuts).

Parar la decondensació amb la Solució de Fixació 2% Paraformaldehid (2% PFA, dilució del *Stock* 8% PFA amb PBS, fer mínim 40 ml) durant 10 minuts a RT.

Immunofluorescència (Immunofluorescence)

Fixar les mostres amb 2% PFA (mirar últim pas protocol Decondensació) durant 10 minuts a RT.

Les mostres, una vegada fixades, es poden guardar a una caixa ben tancada amb film a -20°C però preferiblement continuar amb la immunolocalització.

Rentar els portaobjectes amb 20 minuts RT amb 0,05% Tritó-PBS per permeabilitzar les cèl·lules.

Preparar la Solució de Bloqueig I consistent en 1% BSA en 0,05% Tritó-PBS (0,1 gr BSA + 10 ml 0,05% Tritó-PBS). Es pot guardar 1 setmana a la nevera.

Bloquejar els portaobjectes 1 hora 37°C amb 200 µl/portaobjectes de la Solució de Bloqueig I amb 10% NGS a la Cambra Humida (20 µl NGS + 180 µl Solució de Bloqueig I). Posar *Parafilm* de la mida del portaobjectes a sobre la mostra.

Treure el *Parafilm* i eliminar el màxim possible de líquid sense tocar la mostra.

Incubar les mostres 2-3 hores 37°C amb 100 µl/portaobjectes de l'Ànticòs Primari a la dilució adequada en la Solució de Bloqueig I amb 10% NGS a la Cambra Humida. Cobrir la mostra amb *Parafilm*.

| | |
|-----------------------------|-----------------------------|
| | <u>1 ml</u> |
| Dilució de l'Ànticòs adient | X µl |
| 10% NGS | 10 µl NGS |
| | 90 µl Solució de Bloqueig I |

Alternativament es pot incubar la mostra 20 minuts 37°C i després O/N 4°C a la Cambra Humida amb *Parafilm*. Al dia següent incubar 20 minuts 37°C.

Treure el *Parafilm* i eliminar el màxim possible de líquid sense tocar la mostra.

Mullar els portaobjectes amb 0,05% Tritó-PBS.

Rentar els portaobjectes 15 minuts RT amb 0,05% Tritó-PBS en agitació. Mullar els portaobjectes amb PBS i rentar-los 10 minuts amb PBS en agitació.

Preparar la Solució de Bloqueig II consistent en 1% BSA en PBS (sense tritó). Es pot guardar 1 setmana a la nevera.

Treure el màxim possible de líquid sense tocar la mostra i incubar els portaobjectes 30 minuts 37°C amb 200 µl/portaobjectes de la Solució de Bloqueig II amb 10% NGS a la Cambra Humida. (10 µl NGS + 90 µl Solució de Bloqueig II). Cobrir la mostra amb *Parafilm*.

A partir d'ara evitar la llum directa sobre les mostres.

Incubar les mostres 2 hores 37°C amb 100 µl/portaobjectes de l'Anticòs Secundari adient per l'anticòs primari a la dilució adequada en la Solució de Bloqueig II a la Cambra Humida. Cobrir la mostra amb *Parafilm*.

| | |
|-----------------------------|------------------------------|
| Dilució de l'Anticòs adient | <u>1 ml</u> |
| 10% NGS | X µl |
| | 10 µl NGS |
| | 90 µl Solució de Bloqueig II |

Mullar els portaobjectes amb PBS.

Rentar els portaobjectes 10 minuts RT amb PBS en agitació.

Incubar les mostres 10 minuts RT amb 100 µl/portaobjectes de 1/3000 *Hoechst* en PBS (1 µl *Hoechst* (1 mgr/ml en H₂Omq) + 3 ml PBS) a la Cambra Humida. Cobrir la mostra amb *Parafilm*.

Treure el *Parafilm* i mullar els portaobjectes amb PBS. Treure el màxim possible de líquid sense tocar la mostra, posar 15 µl *Prolong* i posar un cobreobjectes net a sobre.

“Curar” els portaobjectes a una caixa en horitzontal O/N RT a la obscuritat. Al dia següent segellar les cantonades del cobreobjectes amb esmalt d'ungles i visualitzar les mostres amb el Microscopi de Fluorescència. Guardar els portaobjectes a una caixa ben tancada amb film a -20°C.

7.1.5. Protocols de tinció de gels d'acrilamida

Tinció de plata (Silver staining)

Fixar els gels 1 hora amb tampó 30% Etanol/10% Àcid acètic en H₂Omq.

Tres rentats de 20 minuts amb 30% Etanol en H₂Omq.

1 minut de Pretractament 0,02% Na₂S₂O₃ (10 ml *Stock* 2% Na₂S₂O₃ + 990 ml H₂Omq).

Tres rentats de 20 segons amb H₂Omq.

Tenyir 20 minuts amb la Solució de Plata que correspon al 0,2% AgNO₃ (2 gr plata/L).

Fer 3 rentats de 20 segons amb H₂Omq.

Velar els gels durant 5 minuts amb la Solució de Velat:

| | <u>1L (2 gels → 500 ml/gel)</u> |
|---|--|
| 6% Na ₂ CO ₃ | 60 gr Na ₂ CO ₃ (costa de dissoldre's) |
| 0,0004% Na ₂ S ₂ O ₃ | 200 µl <i>Stock</i> 2% Na ₂ S ₂ O ₃ |
| 18,5% Formaldèhid | 500 µl 37% Formaldèhid |
| H ₂ Omq | fins 1 L |

Fer 2 rentats de 2 minuts amb H₂Omq.

Parar el velat amb 30% Etanol /10% Àcid acètic durant 10 minuts i llavors O/N.

Tinció amb Coomassie Blue (Coomassie Brilliant Blue Staining)

Tenyir 45' en agitació amb la Solució de Tinció basada en *Coomassie Brilliant Blue* (CBB R-250).

| | <u>550 ml</u> |
|--------------------|----------------------|
| 0,2% CBB R-250 | 1 gr CBB R-250 |
| 45% Metanol | 250 ml Metanol |
| 10% Àcid Acètic | 50 ml Àcid acètic |
| H ₂ Omq | 250 ml |

Filtrar la solució de tinció amb un paper de poyata a sobre un embut abans d'utilitzar. Aquesta solució es pot reutilitzar varies vegades.

Destenyir 5 minuts en agitació amb el Destenyidor I (50% metanol/10% Àcid acètic en H₂Omq).

Destenyir O/N amb el Destenyidor II (10% Metanol/10% Àcid acètic en H₂O_mQ). Fer els canvis de Destenyidor II que calguin per reduir el *background*.

Tinció amb EZBlue (EZBlue staining)

(Segons instruccions comercials. Sigma. Número de producte: G 1041)

Si es vol tenyir un gel d'SDS fer 3 rentats de 5 minuts amb H₂O_mQ. Si es tracta d'un altre tipus de gel fer només un rentat.

Fixar les proteïnes al gel 15 minuts amb la Solució de Fixació (50% Metanol/10% Àcid acètic en H₂O_mQ).

Rentar els gels 10-15 minuts amb H₂O_mQ.

Tenyir de 45 minuts a 1 hora mínim en agitació amb *EZBlue*.

Destenyir 15 minuts amb H₂O_mQ en agitació. Fer els canvis d' H₂O_mQ que calguin per reduir el *background*.

Tinció amb Flamingo (Flamingo staining)

Fixar els gels 2 hores o O/N amb la Solució de Fixació (40% Etanol/10% Àcid acètic en H₂O_mQ).

Tenyir els gels mínim durant 3 hores amb la Solució Flamingo 1X (diluir la Solució *stock* 10X comercial). Es pot reutilitzar 3 vegades o una mica més la Solució *Flamingo* 1X guardada a la nevera. Tapar els gels tenyint-se i després de la tinció per evitar perdre la fluorescència.

Opcionalment es pot reduir el *background* amb una incubació durant 10 minuts amb 0,1% *Tween* 20 en H₂O_mQ. Abans d'escanejar els gels treure aquesta solució i posar H₂O_mQ.

ESCANEJAR ELS GELS

7.2. Preparació de solucions *stock* i informació comercial i d'emmagatzematge.

Preparació Solucions

El volum final de les solucions es troba en conjunció amb el necessari segons la seva utilització als protocols descrit aquí. Quan s'ha d'ajustar el pH, resuspendre en menys del volum final per afegir NaOH o HCl necessari per ajustar el pH. Algunes de les següents solucions *Stock* es poden trobar també comercialment.

| Stock | Reactius | Guardar a |
|--|---|---------------|
| 0,05% Tritó-PBS | 25 µL Tritó X-100 + 50 ml PBS | RT |
| 1% Agarosa | 0,25 gr en 25 ml H ₂ Omq | 4°C |
| 2% Na ₂ S ₂ O ₃ | 0,02 gr Na ₂ S ₂ O ₃ + H ₂ Omq | RT |
| 7,5% NaHCO ₃ | 0,75 gr NaHCO ₃ + 10 ml H ₂ Omq | 4°C |
| 8% PFA | 2 gr PFA + 25 ml H ₂ Omq. En agitació a un bany calent + 2 gotes de 1 M NaOH (solució transparent). Ajustar pH a 7. Aliquotar. | -20°C |
| 10% APS | 0,1 gr APS + 1 ml H ₂ Omq | Fer al moment |
| 10% SDS | 50 gr SDS + 500 ml H ₂ Omq | RT |
| 30% Etanol | 600 ml Etanol + fins 2 L H ₂ Omq | RT |
| 0,5 M EDTA | 7,31 gr EDTA + 50 ml H ₂ Omq. Ajustar pH a 8 | RT |
| 0,5 M HCl | 10,44 ml 37% HCl + fins 250 ml H ₂ Omq | RT |
| 0,5 M MgCl ₂ | 10,16 gr MgCl ₂ + 100 ml H ₂ Omq | RT |
| 0,5 N PCA | 42 ml 70% PCA + fins 1L H ₂ Omq | 4°C |
| 10% Metanol/10% Àcid acètic | 200 ml Metanol + 200 ml Àcid acètic + fins 2L H ₂ Omq | RT |
| 100% TCA | 25 gr TCA + fins 250 ml H ₂ Omq | 4°C |
| 1 M DTT | 1,54 gr DTT + 10 ml H ₂ Omq. Aliquotar 200 µl | -20°C |
| 1 M NaCl | 29,22 gr NaCl + 500 ml H ₂ Omq | RT |
| 1 M NaOH | 20 gr NaOH + 500 ml H ₂ Omq | RT |
| 1 mgr/ml Hoechst | 25 mgr Hoechst + 25 ml H ₂ Omq. Aliquotar 500 µL | -20°C |
| 30% Etanol/10% Àcid acètic | 600 ml Etanol + 200 ml Àcid acètic + fins 2L H ₂ Omq | RT |
| 40% Metanol/10% Àcid acètic | 400 ml Metanol + 100 ml Àcid acètic + fins 1L H ₂ Omq | RT |
| 50% Metanol/10% Àcid acètic | 500 ml Metanol + 100 ml Àcid acètic + fins 1L H ₂ Omq | RT |
| 6M GuHCl | 143,3 gr GuHCl + 250 ml H ₂ Omq | RT |
| 1 M Tris-HCl pH 8 | 60,57 gr Tris + 500 ml H ₂ Omq. Ajustar pH a 8 | RT |
| 1,5 M Tris-HCl pH 8,8 | 90,86 gr Tris + 500 ml H ₂ Omq. Ajustar pH a 8,8 | RT |
| 0,1% Tween 20 | 0,2 ml Tween 20 + 200 ml H ₂ Omq | RT |
| 20% Tween 20 | 40 ml Tween 20 + 160 ml H ₂ Omq | RT |
| 100 mM PMSF | 0,17 gr PMSF + 10 ml isopropanol. Aliquotar 200 µl | -20°C |
| 30% Acrilamida/0,2% Bisacrilamida | 30 gr Acrilamida + 0,2 gr Bisacrilamida + 100 ml H ₂ Omq | 4°C |
| TBS 10X | 24,2 gr Tris + 80 gr NaCl + fins 1L H ₂ Omq. Ajustar pH 7,6 | RT |

Informació comercial i d'emmagatzematge

| Reactiu | Casa comercial | Referència | Guardar a |
|---|-------------------------------|------------|-----------|
| 37% Formaldehid | Merck | 1.04003 | RT |
| 70% PCA | Merck | 1.00519 | RT |
| Acetona | Merck | 1.00014 | RT |
| Àcid acètic | Panreac | 131008 | RT |
| Acrilamida/Bisacrilamida 29:1 | BioRad | 161-0156 | 4°C |
| Agarosa | Pronadisa | 8034 | RT |
| AgNO ₃ (Nitrat de Plata) | Merck | 1.01510 | RT |
| APS | Serva | 13375 | RT |
| Bromophenol Blue | Merck | 1.08122 | RT |
| CHAPS | Sigma-Aldrich | C3023 | RT |
| Coomassie Brilliant Blue R-250 | BioRad | 161-0400 | RT |
| DeStreak™ Reagent | GE Healthcare | 17-6003-18 | 4°C |
| DTT | Sigma-Aldrich | D9779 | RT |
| Duracryl | Proteomics Solutions | 0080-0148 | 4°C |
| EDTA | Merck | 1.08418 | RT |
| Etanol | Panreac | 131086 | RT |
| Etanol (Extracció protamines) | Merck | 1.00983 | RT |
| Glicerol | USB | 16374 | RT |
| Glicina | Merck | 1.04201 | RT |
| GuHCl | USB | 75823 | RT |
| HCl | Merck | 1.00317 | RT |
| Hoechst 33342 | Sigma-Aldrich | B2261 | -20°C |
| Iodoacetamida | Sigma-Aldrich | I1149 | 4°C |
| IPG Buffer | BioRad | 163-2094 | 4°C |
| Isopropanol | Panreac | 221090 | RT |
| Metanol | Panreac | 131091 | RT |
| MgCl ₂ ·6H ₂ O | Merck | 1.05833 | RT |
| Na ₂ CO ₃ | Merck | 1.06392 | RT |
| Na ₂ S ₂ O ₃ | Merck | 1.06512 | RT |
| NaCl | Merck | 1.06404 | RT |
| NaHCO ₃ | Merck | 1.06323 | RT |
| NaOH | Merck | 1.06482 | RT |
| N-Octilglucopiranòsid | Sigma-Aldrich | O8001 | -20°C |
| PBS | BioMerieux | 75 511 | RT |
| PFA | Merck | 1.04005 | RT |
| PMSF | Sigma-Aldrich | P7626 | RT |
| Poly-L-Lisina | Sigma-Aldrich (Fluka) | 81355 | -20°C |
| SDS | Sigma-Aldrich (Calbiochem) | 428023 | RT |
| TCA | Merck | 1.00810 | RT |
| TEMED | PlusOne | 17-1312-01 | 4°C |
| Tiourea | Merck | 1.07979 | RT |
| Tris | USB | 75825 | RT |
| Tritó X-100 | Sigma-Aldrich | X100 | RT |
| Tween 20 | Sigma-Aldrich | P7949 | RT |
| Urea | Sigma-Aldrich (GE-Healthcare) | 17-1319-01 | RT |

7.3. Participació a congressos, beques i estades a l'estranger

Participació a congressos

de Mateo S, Gázquez C, Torregrosa N, Guimerà M, Ballescà J.L, Shirley C, Meistrich M, Oliva R (2006)

Protamines levels, protamine 2 precursors in the sperm cells from infertile patients and assisted reproduction outcome.

14th European Testis Workshop on the Molecular and Cellular Endocrinology of the Testis - Bad Aibling (Alemanya), 22-26 Abril 2006. Assistència.

Martínez-Heredia J, de Mateo S, Gázquez C, Oriola J, Estanyol JM, Guimerà M, Balasch J, Ballescà JL, Oliva R (2006)

Proteomics of human spermatozoa in infertile patients and in controls.

Perspectives in Proteomics - Barcelona, 30 Juny 2006. Comunicació oral (Dr. Martínez-Heredia).

Oliva R, Martínez-Heredia J, de Mateo S, Gázquez C, Oriola J, Estanyol JM, Guimerà M, Balash J and Ballescà JL (2006)

Proteomics of human spermatozoa, protamine content and assisted reproduction outcome.

10th International Symposium Spermatology - Madrid, 18-22 Setembre 2006. Comunicació oral (Dr. Rafael Oliva).

de Mateo S, Martínez-Heredia J, Domínguez-Fandos D, Estanyol JM, Ballescà JL, Oliva R (2006)

Protamine content and proteomics of the human spermatozoa.

Congrés: Advanced Workshop and BAS annual meeting 2006 - Leeds (Regne Unit), 15-18 Novembre 2006. Assistència.

de Mateo S, Martínez-Heredia J, Vidal-Taboada JM, Domínguez-Fandos D, Estanyol JM, Ballescà JL, Oliva R (2006)

Protamine content and proteomics of the human spermatozoa.

3rd Workshop on Biomedical Genomics and proteomics - Barcelona, 15 Desembre 2006. Assistència i Comunicació oral.

de Mateo S, Martínez-Heredia J, Vidal-Taboada JM, Domínguez-Fandos D, Estanyol JM, Ballescà JL, Oliva R (2007)

Correlació de proteïnes de l'espermatozoide humà amb la integritat del DNA, amb el contingut de protamines i amb els nivells de precursor de protamina 2.

X Jornades de Biologia de la Reproducció - Barcelona, 25 Abril 2007. Assistència i Comunicació oral. Referència ISBN: 978-84-7283-911-3.

Oliva R, de Mateo S, Martínez-Heredia J, Vidal-Taboada JM, , Domínguez-Fandos D, Estanyol JM, and Ballescà JL (2007)

Proteomic analysis of human spermatozoa from infertile patients and controls.

32nd Annual Conference American Society of Andrology (Testis Workshop, Andrology Lab Workshop, and Annual Meeting of the American Society of Andrology) - Tampa, Florida (USA), 18-24 Abril 2007. Comunicació oral (Dr. Rafael Oliva).

Oliva R, de Mateo S, Martínez-Heredia J, Gázquez C, Vidal-Taboada JM, Domínguez-Fandos D, Estanyol JM, and Ballescà JL (2007)

Proteomic analysis of human sperm proteins reveals marked protein expression differences in independent samples from infertile patients.

Florence-Utah International Symposium: Genetics of Male Infertility - Florència (Itàlia), 14-16 Setembre 2007. Comunicació oral (Dr. Rafael Oliva).

de Mateo S, Martínez-Heredia J, Botta-Orfila T, Estanyol JM, Domínguez-Fandos D, Vidal-Taboada JM, Ballescà JL and Oliva R (2008)

Proteomic analysis of human spermatozoa: identification of marked correlations in protein expression.

15th European Testis Workshop on the Molecular and Cellular Endocrinology of the Testis - Naantali (Finlàndia), 2-6 Maig 2008. Assistència i Comunicació oral.

de Mateo S, Estanyol JM, Ballescà JL and Oliva R (2009)

Human sperm nuclear isolation and proteome description.

9th International Congress of Andrology - Barcelona, 7-10 Març 2009. Assistència i pòster.

de Mateo S, Estanyol JM, Ballescà JL and Oliva R (2009)

Aislamiento nuclear de espermatozoides humanos y descripción proteómica.

XIV Congreso de la Sociedad Española de Andrología, XI Reunión Ibérica de Andrología y IV Reunión Iberoamericana de Andrología - Barcelona, 10-11 Març 2009. Assistència i pòster.

de Mateo S, Estanyol JM, Ballescà JL and Oliva R (2009)

Aïllament del nucli d'espermatozous humans i anàlisi del seu proteoma.

XI Jornades de Biologia de la Reproducció – Girona, 30 Abril 2009. Assistència i Comunicació oral. Referència ISBN: 978-84-92583-47-8.

de Mateo S, Guimerà M, Balasch J, Ballescà JL and Oliva R (2009)

Determination of protamines and protamine 2 precursors and their relation to the assisted reproduction outcome.

5th International Workshop of Molecular Andrology - Giessen (Alemanya), 8-10 Maig 2009. Assistència i pòster.

Beques i estades al estranger

2006-2009: Beca predoctoral per a la formació de personal investigador de la Generalitat de Catalunya (FI).

2008: Beca per estades d'investigació fora de Catalunya de la Generalitat de Catalunya (2007-BE-2-00195). Atorgada per una estada de 4 mesos durant 2008 en Radboud University Nijmegen Medical Centre (UMC), Departament de obstetrícia i ginecologia, Nijmegen, Països Baixos.

2009: Beca per estades d'investigació fora de Catalunya de la Generalitat de Catalunya (2009-BE-1-00452). Atorgada per una estada de 2 mesos durant 2009 en Georgetown University Medical Center, Departament de bioquímica i biologia molecular i cel·lular, Washington DC, Estats Units d'Amèrica.

7.4. Abreviatures, anglicismes i tecnicismes

| | |
|----------------------|--|
| 2D/2DE | Two-Dimensional gel/Two-Dimensional gel Electrophoresis |
| 2D-DIGE | Two-Dimensional-Difference Gel Electrophoresis |
| 2n, 4c; 2n, 2c | n = contingut cromosòmic, c = contingut de DNA o material genètic |
| AKAP4 | A-Kinase Anchor Protein 4 |
| APCS | Serum Amyloid P-Component |
| ART | Assisted Reproductive Technology |
| ATP | Adenosine Triphosphate |
| AZFc | Azoospermia Factor c (regió del cromosoma Y) |
| BSA | Bovine Serum Albumin |
| CASA | Computer-Aided Sperm Analysis |
| CBB | Coomassie Brilliant Blue |
| CDK5 | Cyclin dependent kinase 5 |
| CDY | Chromodomain Protein, Y-linked |
| ChIP | Chromatin Immunoprecipitation |
| CLU | Clusterin |
| CMA3 | Cromomicina A3 |
| CpG | Regions del DNA on es troba una concentració elevada de citosines i guanines molt properes en la seqüència |
| CTAB | Cetyl Trimethylammonium Bromide |
| Cy2, Cy3, Cy5 | Cyanine dye 2 (Blau), Cyanine dye 3 (Verd), Cyanine dya 5 (Vermell) |
| Cys2-His2 motif | Motiu format per 2 cisteïnes i 2 histidines |
| DLD | Dihydrolipoamide dehydrogenase precursor |
| DLST | Dihydrolipoamide S-succinyltransferase |
| DNA | Deoxyribonucleic Acid |
| dNTPs | deoxynucleotide Triphosphates |
| dsDNA | double-strand DNA |
| DTT | Dithiothreitol |
| Dye | Marcador |
| EDTA | Ethylenediaminetetraacetic Acid |
| FACS | Fluorescence Activated Cell Sorter |
| FH | Fumarate hydratase precursor |
| gr, mgr, µgr | Gram/Miligram/Microgram |
| GuHCl | Guanidinium chloride |
| H1, H2A, H2B, H3, H4 | Histona 1/Histona 2A/Histona 2B/Histona 3/Histona 4 |
| H3.1, H3.2, H3.3 | Variants de la histona H3 |

| | |
|------------------|---|
| H4K8ac, H4K12ac | Acetilació a la lisina 8 i de la lisina 12 de la histona H4 respectivament |
| HCl | HydroChloride |
| HMT | Histone Methyltransferase complexes |
| HPLC | High Performance Liquid Chromatography |
| HSP70 | Heat Shock Protein 70 protein family |
| HSPA13 | Heat Shock 70 kDa Protein 13 |
| HSPA2 | Heat Shock related 70kDa Protein 2 |
| ICSI | Intracytoplasmatic Sperm Injection |
| IEF | Isoelectrofocusing |
| IF | Immunofluorescència |
| IMPA1 | Inositol-1-Monophosphatase |
| <i>In silico</i> | Procediment que s'ha dut a terme per una computadora o via simulació computacional |
| <i>In situ</i> | Al lloc |
| <i>In vitro</i> | Tècnica o procediment que es du a terme en un ambient controlat fora d'un organisme viu |
| IPG strip | Immobilized PH Gradient strip |
| IUI | Intrauterine Insemination |
| IVF | <i>In Vitro</i> Fertilization |
| KM2 | Anticòs que detecta les acetilacions H4K8,12,16 preferent per nuclis apoptòtics |
| L, ml, µl | Litre/Mililitre/Microlitre |
| LC | Liquid Chromatography |
| LC-MS/MS | Liquid Chromatography-Mass Spectrometry/Mass Spectrometry |
| M/mM | Molar (mol/L)/Milimolar (milimol/L) |
| m/z | mass to charge ratio |
| MALDI-TOF | Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight |
| mBBr | Monobromobimane fluorescent dye |
| MS | Mass Spectrometry |
| NGS | Normal Goat Serum |
| O/N | Overnight. Al llarg de tota la nit |
| OAT | Oligoasthenoteratozoospermic patient |
| ODF | Outer Dense Fiber |
| P1, P2, pre-P2 | Protamina 1/Família de protamines 2/precursor de protamina 2 |
| P1/P2, pre-P2/P2 | Relació protamina 1/protamina 2; relació precursor de protamina2/protamina 2 |
| PBS | Phosphate Buffered Saline |
| PCA | Perchloric Acid |
| PDIA3 | Protein Disulfide-Isomerase A3 |
| PFA | ParaFormAldehyde |
| PHB | Prohibitin |

| | |
|-------------|---|
| PIP, PIPpre | Prolactin induced protein, PIP precursor |
| PL2-3 | Anticòs que detecta la unió H2A/H2B amb el DNA |
| PMSF | PhenylMethaneSulfonylFluoride |
| PRDX4 | Peroxiredoxin-4 |
| PRM1, PRM2 | Protamine 1 gene, Protamine 2 gene |
| PSM | Proteasome Subunit |
| PTM | PosTraductional Modification |
| PVP | Polivinilpirrolidona/Povidona |
| RA | Reproducció Assistida |
| ROS | Reactive Oxygen Species |
| RT | Room Temperature |
| SARs | Scaffold-Associated Regions (també anomenat MARs (Matrix-Associated Regions)) |
| SCD | Sperm Chromatin Dispersion test |
| SCSA | Sperm Chromatin Structure Assay |
| SD | Standard Deviation |
| SDS | Sodium Docecil Sulfate |
| SDS-PAGE | SDS-Poliacrylamide Gel Electrophoresis |
| SPANX | Sperm Protein Associated with the Nucleus on the X chromosome protein family |
| SSB1 | Single-Stranded DNA-Binding protein, mitochondrial |
| ssDNA | single-strand DNA |
| TB-RBP | Testis brain RNA-binding protein |
| TBS | Tris-Buffered Saline |
| TCA | Trichloroacetic Acid |
| TEX12 | Testis-expressed sequence 12 protein |
| TF | Transcription Factor |
| TNPs | Transition Proteins |
| TOF | Time Of Flight |
| TSH2B/TH2B | Testis-Specific Histone 2B |
| TUNEL | Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated 2'-deoxyuridine 5'-triphosphate (dUTP)-Nick End-Labeling |
| VDAC2 | Voltage-Dependent Anion-selective Channel protein 2 |
| WHO | World Health Organization |



El Dr. Rafael Oliva Virgili, director de la tesi doctoral elaborada per Sara de Mateo López, amb el títol “Caracterització proteòmica i molecular d’espermatozoides humans en pacients infèrtils i controls”,

CERTIFICA QUE:

L'article 1 inclòs la tesi, amb el títol “*Protamine 2 precursors (Pre-P2), protamine 1 to protamine 2 ratio (P1/P2), and assisted reproduction outcome*” va ser publicat a la revista ***Fertility and Sterility***, volum 91 (2009), pàgines 715-722, i que aquesta revista té un índex d'impacte de **4.167**.

L'article 2 inclòs la tesi, amb el títol “*Marked correlations in protein expression identified by proteomic analysis fo human spermatozoa*” va ser publicat a la revista ***Proteomics***, volum 7 (2007), pàgines 4264-4277, i que aquesta revista té un índex d'impacte de **4.586**.

L'article 3 inclòs la tesi, amb el títol “*Identification of proteomic differences in asthenozoospermic samples*” va ser publicat a la revista ***Human Reproduction***, volum 23 (2008), pàgines 783-791, i que aquesta revista té un índex d'impacte de **3.773**.

L'article 4 inclòs a la tesi, amb el títol “*Proteomic identification of human sperm nuclei through CTAB treatment*” està en preparació ja que es troba procés d'espera de dades d'identificació de proteïnes addicionals. Serà enviat a una revista científica en un futur molt proper.

L'article 5 inclòs la tesi, amb el títol “*Improvement in chromatin maturity of humans permatozoa selected through density gradient centrifugation*” es troba acceptat (veure carta d'acceptació a les pàgines 295-296) per ser publicat a la revista ***International Journal of Andrology***, (2010), i que aquesta revista té un índex d'impacte de **4.021**.

L'article 6 de revisió inclòs la tesi, amb el títol “*Sperm cell proteomics*” va ser publicat a la revista ***Proteomics***, volum 9 (2009), pàgines 1004-1017, i que aquesta revista té un índex d'impacte de **4.586**.

Barcelona, a 14 d'Abril de 2010



UNIVERSITAT DE BARCELONA



El Dr. Rafael Oliva Virgili, director de la tesi doctoral elaborada per Sara de Mateo López, amb el títol “Caracterització proteòmica i molecular d’espermatozoides humans en pacients infèrtils i controls”, en la que està inclòs l’article titulat “*Identification of proteomic differences in asthenozoospermic sperm samples*” publicat a la revista *Human Reproduction*, volum 23 (2008), pàgines 783-791,

Informa que Sara de Mateo López consta, juntament amb el Dr. Joan Martínez Heredia, el Dr. Jose Manuel Vidal Taboada, el Dr. Josep Maria Estanyol, el Dr. Jose Luís Ballejà i el Dr. Rafael Oliva, com a coautor del mencionat article. El doctorand va realitzar part de les tasques de processament de les mostres espermàtiques analitzades i la obtenció dels gels bidimensionals d’aquests. També va realitzar l’anàlisi dels gels bidimensionals juntament amb el Dr. Joan Martínez Heredia. Per completar l’estudi va realitzar la immunolocalització de la *Clusterina* que es mostra a l’article i la quantificació d’aquests en mostres astenozoospermiques i normozoospermiques.

El Dr. Joan Martínez Heredia va incloure en la seva tesi doctoral que va ser presentada al 2008 una breu descripció preliminar dels resultats obtinguts amb aquest treball que posteriorment va donar lloc a l’article que es presenta en aquesta tesi.

Barcelona, 14 d’Abril de 2010

De: <eic.int.j.androl@gmail.com>
Para: <sarademateo@ub.edu>
Enviado: martes, 13 de abril de 2010 9:00
Asunto: International Journal of Andrology - IJA-2010-0015.R1 DECISION
Re: Your manuscript with co-author entitled Improvement in chromatin maturity of human spermatozoa selected through density gradient centrifugation.

Dear Miss de Mateo,

I am pleased to inform you that your revised manuscript has been accepted for publication in the International Journal of Andrology. After editorial corrections your manuscript will be forwarded to the publishers from whom you will receive proofs.

Please, correct a small error indicated below at the proof stage.

Reviewers' comments:

The authors can be congratulated on a very nice and interesting paper. The manuscript can now be accepted for publication. There is only one typing error on page 6, line 21; it should read Beckman.

Please could you complete and return an Online Open Exclusive License Form (oof) OR Exclusive License Form (elf) to publishing editor (Fax: +65 6511 8288). If you wish your paper to be OnlineOpen, you are required to complete the combined payment and copyright licence form available from our website at: http://www.blackwellpublishing.com/pdf/ija_oof.pdf. If you do not wish your paper to be OnlineOpen, you are required to complete the standard Exclusive Licence Form available from our website at: http://www.blackwellpublishing.com/pdf/ija_elf.pdf.

Proofs will be sent via E-mail as an Acrobat PDF (portable document format) file. The E-mail server must be able to accept attachments up to 4MB in size. Acrobat reader will be required in order to read this file. This software can be downloaded (free of charge) from the following web site: <http://www.adobe.com/prodindex/acrobat/main.html>

This will enable the file to be opened, read on screen and printed out in order for any corrections to be added. Further instructions will be sent with the proof. Proofs will be posted if no E-mail address is available: in your absence, please arrange for a colleague to access your E-mail to retrieve the proofs.

Thank you for submitting your manuscript to the International Journal of Andrology.

Yours sincerely,

Ewa Rajpert-De Meyts
Chief Editor

Additional information:

To minimise publication time of your manuscript it is important that all electronic artwork is supplied to the editorial office in the correct format and resolution. I recommend that you consult the Illustration guidelines at <http://www.blackwellpublishing.com/bauthor/digill.asp> if you need advice on any aspect of preparing your artwork.

Production status tracking - You can now track your article via the publisher's Author Services.

Once your paper is with the Production Editor, you will receive an e-mail with a unique code that automatically adds your article to the system when you register. With Author Services you can check the status of your article online and choose to receive automated e-mails at key stages of production. Therefore, please ensure that we have your complete e-mail address. There may be a short delay whilst the article is sent to the Production Editor and logged into the production tracking system. Additional services will be added to the website soon.

OnlineEarly - The International Journal of Andrology operates a system called OnlineEarly, whereby articles are published online ahead of assignment to an issue and publication in print. You can track the progress of your article and learn when it is published online by registering for Author Services. Please note that in order to publish your article as quickly as possible, and if your article is received very close to the copy deadline for an issue, it may be incorporated directly into that issue without first appearing OnlineEarly. The Blackwell Synergy Website for journal is <http://www.blackwell-synergy.com/loi/ija>.

If you register in Author Services you will receive free access to your article.

OnlineOpen

The International Journal of Andrology is pleased to participate in OnlineOpen, a new service for scholarly communications on the online journals platform, Blackwell Synergy. You have elected to include your article as OnlineOpen. If you have not already done so, please download the "Open Access Exclusive License Form"

from the journal website at:

http://www.blackwellpublishing.com/pdf/ija_oof.pdf

Your article will be prepared for publication in the usual manner and will be posted online on Blackwell Synergy with the full range of features associated with the International Journal of Andrology. Your article will be archived for perpetuity and will be registered at relevant Abstracting and Indexing services and at CrossRef. Online Open articles will be 'flagged' on the Blackwell Synergy site as being freely available for all. They will also be included in the print edition of journals with an indicator which shows that the article is available for free online. The publisher is trialling this service with more than 60 journals. For more information, see

<http://www.blackwellpublishing.com/static/onlineopen.asp>.

Reprints and Offprints - You will receive instructions for ordering offprints when you are notified that your proofs are ready for review.

Production queries - Please note that now your paper has been accepted, all queries related to the production of your paper may be directed to the Production Office at Blackwell

ija@oxon.blackwellpublishing.com or +44 (0) 131 226 7232.