

ANÀLISI PROTEÒMICA D'ESPERMATOZOIDES DE PACIENTS ASTENOZOOSPÈRMICS I NORMOZOOSPÈRMICS

Juan Martínez,¹ Núria Torregrosa,¹ David Domínguez,¹ Josep M. Estanyol,⁴ Lourdes Mengual,³ Jose Luis Balleascà,² Rafael Oliva^{1*}

¹ Human Genetics Laboratory, Grup de Genètica Humana, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona, IDIBAPS. Casanova, 143. 08036 Barcelona. Adreça electrònica: roliva@ub.edu. Tel. 934 021 877.

² Assisted Reproduction Unit, ICGON, Hospital Clínic, IDIBAPS. Adreça electrònica: balleasca@clinic.ub.es.

³ Laboratori de Biologia Molecular, Fundació Puigvert. Barcelona. Adreça electrònica: lmengual@fundacio-puigvert.es.

⁴ Unitat de Proteòmica, Facultat de Medicina, SCT-PCB-IDIBAPS. Adreça electrònica: jmestanyol@ub.edu.

Resum

En aquest estudi s'han utilitzat les tècniques proteòmiques per a identificar i determinar les variacions de proteïnes presents entre dos grups de pacients infèrtils, tretze normozoospermics i onze astenozoospermics. S'han realitzat gels en dues dimensions per a cada pacient, i ha resultat que les electroforesis bidimensionals detectaven prop d'un miler de proteïnes. No obstant això, només s'ha analitzat la possible variació en catorze proteïnes detectades en les electroforesis bidimensionals seleccionades per la seva constància en els vint-i-quatre individus analitzats. No s'ha trobat cap diferència substancial en la quantitat de proteïna entre el grup normozoospermic i el grup astenozoospermic. No obstant això, s'han identificat diverses proteïnes noves fins ara no descrites com a presents en l'espermatozoide humà. Aquest treball obre la possibilitat d'estudiar una quantitat més elevada de proteïnes, per tal de buscar diferències entre els diversos grups de pacients i d'aprofundir en la funció de les noves proteïnes identificades.

Paraules clau Proteòmica, espermatozoide, proteïnes, infertilitat.

Abstract

Proteomic analysis of spermatozoa from astenozoospermic or normozoospermic patients. In this work we have used the powerful present proteomics approach to identify proteins with quantitative variations between two groups of infertile patients, thirteen normozoospermics and eleven astenozoospermics. Two-dimensional gel electrophoresis of proteins have been performed on the sample corresponding to each patient. Subsequently, several proteins have been identified by mass spectrometry. The results indicate that about a thousand proteins can be detected. However, we have focussed our initial analysis in only fourteen of the proteins selected because of its constancy in all of the twenty-four samples analysed. No substantial differences among the protein levels was found between the normozoospermic and the astenozoospermic groups. Nevertheless, several novel proteins have been identified in the spermatozoa. This work opens the possibility to study a higher number of proteins and to study the function of novel proteins identified.

Key words Proteomics, spermatozoa, protein, infertility.

INTRODUCCIÓ

La infertilitat és un problema que afecta aproximadament el 10-15 % de les parelles en edat reproductiva, i aproximadament la meitat dels casos són deguts a factors masculins (Oliva i Ballejà, 1999). L'OMS ha establert una sèrie de paràmetres seminals per a diferenciar entre mostres normals i patològiques (OMS, 1999). No obstant això, aquests paràmetres són fonamentalment de tipus morfològic i no expliquen els casos d'infertilitat idiopàtica. Per exemple, la causa de la infertilitat en la majoria de pacients normozoospermics continua sent desconeguda. És molt probable que una proporció important sigui deguda a mutacions recessives (Lilford *et al.*, 2001) que poden provocar alteracions en les proteïnes, alteracions que avui dia són susceptibles de ser trobades. Per exemple, en treballs previs hem demostrat la presència d'una baixada o absència de protamina P2 en espermatozoides de pacients infèrtils (de Yebra *et al.*, 1993, 1998). Però la P2 només és una dels milers de proteïnes presents en l'espermatozoide humà (Oliva i Dixon, 1991). És previsible que variacions en multitud de proteïnes addicionals puguin explicar bona part de les infertilitats masculines actualment d'etiologia desconeguda.

El present estudi aborda aquesta situació explotant la capacitat de les eines actuals de la proteòmica. Les tècniques de proteòmica permeten obtenir un gran volum d'informació a partir de quantitats molt minses de mostres biològiques. Nosaltres ens hem centrat inicialment en dos grups de pacients, els astenozoospermics (mobilitat reduïda) i els normozoospermics (tots els valors normals), per intentar trobar resultats diferencials entre els dos. Metodològicament, s'han utilitzat les tècniques d'electroforesi bidimensional (l'isoelectroenfocament i la 2D-SDS-PAGE) seguides de l'anàlisi informàtica amb el programa PDQuest (Bio-Rad) i la posterior identificació de les proteïnes mitjançant el MALDI-TOF.

MATERIAL I MÈTODES

Es van obtenir les mostres de semen de vint-i-quatre pacients de la Unitat de Reproducció Assistida de l'Hospital Clínic de Barcelona, amb consentiment previ informat d'aquests. Les mostres van ser processades segons el mètode descrit per Pixton *et al.* (2004) amb variacions. Les mostres se separen inicialment en un gradient de Percoll del 50 % per a separar els espermatozoides dels altres tipus de cèl·lules presents a la mostra (Mengual, 2003). El sediment aconseguit es resuspèn amb el medi de lisi descrit per Pixton *et al.* (2004), perquè quedi a

una concentració de 230×10^6 espermatozoides/ml (concentració òptima determinada empíricament al nostre laboratori). La lisi s'aconsegueix incubant les mostres una hora a temperatura ambient en agitació.

Una vegada lisades les mostres es procedeix a la separació electroforètica. La primera dimensió es realitza amb l'IPGPhor de BioRad Laboratories, Inc. (EUA), en unes tires de pH 5-8 i una llargada de 17 cm. Les condicions de voltatge i temps són les recomanades per BioRad (BioRad, 2004). La segona dimensió es realitza en un sistema Protean II, amb gels fabricats al mateix laboratori (concentració d'acrilamida del 12 %). Les condicions d'electroforesi són 300 V durant 2.45 h. La tinció dels gels es realitza amb tinció argèntica (Blum *et al.*, 1987).

Els gels tenyits s'escanegen a alta resolució amb un sistema GS800. Les imatges es guarden en el format requerit pel programa PDQuest i l'anàlisi posterior es fa amb aquest mateix programa. Els punts interessants són picats manualment i enviats a la Unitat de Proteòmica del campus Casanova de la Plataforma de Proteòmica SCT-PCB-IDIBAPS (Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona). Allà les mostres són processades per a la identificació per masses (sistema MALDI-TOF).

RESULTATS

S'han estudiat un total de vint-i-quatre pacients, dividits en normozoospermics (tretze) i astenozoospermics (onze). Els vint-i-quatre gels resultants han rebut el mateix tractament, amb les mateixes condicions en tot el procediment. A la figura 1 es mostra un exemple d'un dels gels bidimensionals analitzats.

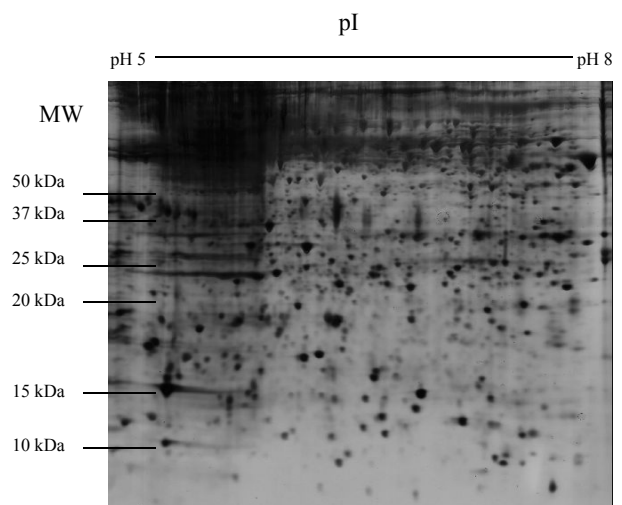


Figura 1 Exemple de gel realitzat al nostre laboratori.

Atesa la complexitat d'una cèl·lula sencera, en aquest treball ens hem centrat només en una fracció de tota la informació que es pot obtenir d'un gel bidimensional. S'han seleccionat un total de seixanta-dos punts del miler aproximat que el programa permet detectar. D'aquests seixanta-dos, s'ha mirat la possible variació entre grups de només catorze dels punts. Aquests catorze punts s'han seleccionat per la seva facilitat a l'hora de ser reconeguts entre els diferents gels. Els valors normalitzats s'obtenen d'aplicar la següent fórmula: Valor normalitzat = valor sense normalitzar × factor d'escala / factor de normalització.

El factor de normalització en aquest cas ha estat la quantitat total en tots els punts. La normalització s'ha fet respecte als seixanta-dos punts, per reduir l'efecte de l'absència d'un punt respecte de la resta. Els resultats es presenten a la figura 2.

DISCUSSIÓ

L'anàlisi de la mitjana i la desviació estàndard dels valors normalitzats de les proteïnes marcades com a *a* fins a *n* (vegeu la figura 2) revela que no hi ha diferències substancials entre els dos grups respecte a aquestes proteïnes. L'elevada desviació estàndard que trobem també ens indica que hi ha molta variació

entre mostres diferents i que, possiblement, aquesta heterogeneïtat suggereix que no hi ha un únic factor majoritari d'infertilitat, sinó possiblement molts factors diferents.

Una possible explicació a la detecció de l'elevada uniformitat entre grups és que l'elecció dels punts no ha estat arbitrària, sinó que, per tal de facilitar l'anàlisi, s'han estudiat punts fàcilment reconeixibles i presents en totes les bidimensionals. La presència confirmada de tots els punts en tots els gels estudiats podria explicar la poca variació entre grups que trobem. També podria ser un indicador que aquests punts corresponen a proteïnes amb una funció important en l'espermatozoide, i per això es troben valors tan conservats. Queda ara oberta la porta a analitzar un major nombre de punts i de grups de pacients, i a aprofundir en les funcions de les noves proteïnes identificades.

AGRAÏMENTS

Subvencionat amb projecte de recerca de la Generalitat de Catalunya (2001SGR00382), Ministeri de Ciència i Tecnologia (Plan Nacional de I+D BMC2003-03937) i Fondo de Investigaciones Sanitarias (V-2003-RED CO7A-0) a R. O.; N. T. i D. D. estan subvencionats amb una beca de l'IDIBAPS.

BIBLIOGRAFIA

- BIO RAD (2004). *2D electrophoresis for proteomics. A methods and product manual*. www.bio-rad.com.
- BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. (1987). «Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels». *Electrophoresis*, 8:93-99.
- DE YEBRA, L.; BALLESCA, J. L.; VANRELL, J. A.; BASSAS, L.; OLIVA, R. (1993). «Complete selective absence of protamine P2 in humans». *J. Biol. Chem.*, 268:10 553-10 557.
- DE YEBRA, L.; BALLESCA, J. L.; VANRELL, J. A.; 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.
- LILFORD, R.; JONES, A. M.; BISHOP, T. D.; *et al.* (1994). «Case-control study of whether subfertility in men is familial». *Br. Med. J.*, 309:570-573.
- MENGUAL, L. (2003). *Infertilitat masculina: causes, factors de risc genètic i caracterització molecular dels espermatozoides*. Tesis Doctoral.
- OLIVA, R.; BALLESCÀ, J. L. (1999). *Valoración genética de la pareja estéril o infértil*. Madrid: Asociación Española de Andrología.
- OLIVA, R.; DIXON, G. H. (1991). «Protamine genes and the histone to protamine replacement reaction». *Progress in*

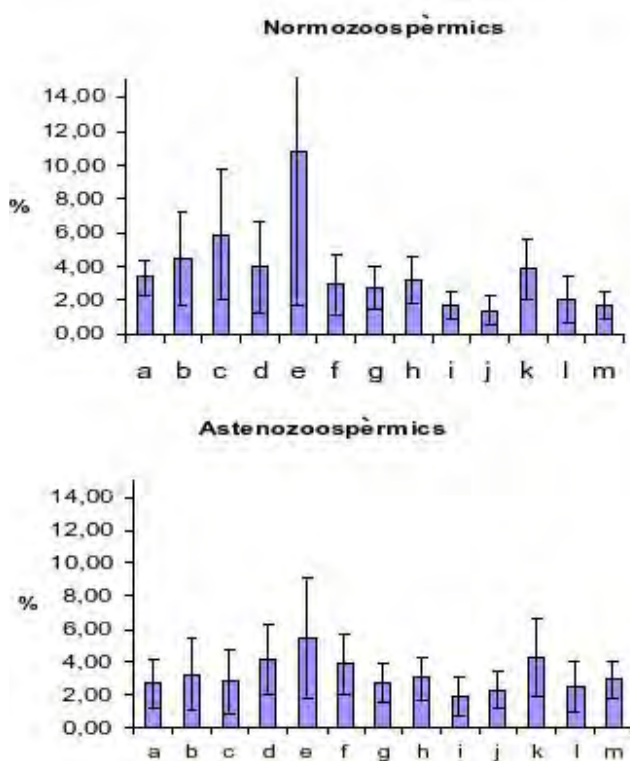


Figura 2 Mitjanes de les diferents proteïnes.

- Nucleic Acids Research and Molecular Biology*, 40:25-94.
- ORGANITZACIÓ MUNDIAL DE LA SALUT (1999). *WHO laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction*. Cambridge: Cambridge University Press, 4a ed.
- PIXTON, K. L.; DEEKS, E. D.; FLESCHE, F. M.; MOSELEY, F. L.; BJORNDAL, L.; ASHTON, P. R.; BARRATT, C. L.; BREWIS, I. A. (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(6):1438-1447.