

## ORIGINALES

# Identificación de diferencias proteómicas en muestras oligozoospérmicas

Teresa Botta<sup>a</sup>, Sabrina Blescia<sup>a</sup>, Juan Martínez-Heredia<sup>a</sup>, Rafael Lafuente<sup>b</sup>, Mario Brassesco<sup>b</sup>, José Luis Ballesca<sup>c</sup> y Rafael Oliva<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Grupo de Genética Humana. Unidad de Genética. Facultad de Medicina. Universidad de Barcelona. IDIBAPS. Servicio de Bioquímica y Genética Molecular. Hospital Clínico y Provincial. Barcelona. España.

<sup>b</sup>Centro de Infertilidad y Reproducción Humana (CIRH). Clínica Corachán. Barcelona. España.

<sup>c</sup>Institut Clínic de Ginecología, Obstetricia i Neonatología. Hospital Clínico y Provincial. Barcelona. España.

## RESUMEN

**Objetivos:** La oligozoospermia es uno de los hallazgos más comunes presentes en los varones con subfertilidad, pero su etiología sigue siendo desconocida en la mayoría de los casos. En este trabajo se ha propuesto utilizar la metodología de estudio proteómico para identificar proteínas diferenciales presentes en muestras de semen de pacientes oligozoospérmicos y, por tanto, potencialmente implicados en la infertilidad.

**Métodos:** Se comparó la abundancia relativa de 75 proteínas de espermatozoides en 3 grupos de 5 muestras oligozoospérmicas, con las presentes en los espermatozoides de 5 donantes de semen a través de su identificación en electroforesis bidimensionales.

**Resultados:** En los pacientes oligozoospérmicos se han identificado 14 proteínas, con una abundancia relativa diferencial de al menos 2 veces en comparación con los controles. Proteínas detectadas como aumentadas son la creatincinasa B (CKB), proteína HINT1 (HINT1), el precursor de la succinil CoA 3 cetoácido transferasa (OXCT1), transgelina-2 (TAGLN2), 2 puntos correspondientes a la actina citoesquelética (ActB), la glutation S-transferasa Mu 3 (GSTM3), annexina A5 (ANXA5), y la cinasa dependiente de ciclina 5 (CDK5). Proteínas detectadas como disminuidas son el precursor mitocondrial de la cadena beta de la ATP sintasa (ATP5B), proteína ODF2 (ODF2), subunidad beta de la tubulina (TUBB2), proteína CAPZ beta (CAPZB), triosafosfato isomerasa 1 (PTI1).

**Discusión:** Se han identificado varias proteínas presentes en una abundancia distinta en muestras de pacientes oligozoospérmicos en comparación con las muestras de controles. Estas proteínas se podrían considerar como candidatas para el desarrollo de marcadores diagnósticos y abren la oportunidad de profundizar en los mecanismos patogénicos implicados en la oligozoospermia.

**Palabras clave:** Proteómica. Espermatozoide. Oligozoospermia. Proteína.

Trabajo subvencionado con un proyecto del Ministerio de Ciencia y Tecnología BMC2006-03479, fondos FEDER.

**Correspondencia:** Dr. R. Oliva.  
Grupo de Genética Humana.  
Unidad de Genética.  
Facultad de Medicina.  
Hospital Clínico y Provincial.  
Casanova, 143. 08036 Barcelona, España.  
Correo electrónico: roliva@ub.edu

## ABSTRACT

### Identification of proteomic differences in oligozoospermic sperm sample

**Objectives:** Oligozoospermia is one of the most common findings present in subfertile males, but its aetiology remains unknown in most cases. In this work we have used current proteomic tools to identify the different proteins present in oligozoospermic semen samples and therefore potentially involved in infertility.

**Methods:** We compared the expression of 75 sperm protein spots in 3 pools of 5 oligozoospermic samples to that of 5 semen donor controls using two-dimensional proteomic analysis.

**Results:** A total of 14 protein spots have been identified with a > 2 fold different amount in the oligozoospermic samples as compared to controls. Proteins detected as increased are, creatine kinase B (CKB), histidine triad nucleotide-binding protein 1 (HINT1), succinyl CoA 3 ketoacid coenzyme A transferase1 precursor (OXCT1), transgelin-2 (TAGLN2), 2 spots corresponding to cytoskeletal actin (ACTB), glutathione S-transferase Mu 3 (GSTM3), annexin A5 (ANXA5), cyclin dependent kinase 5 (CDK5), and proteins detected as decreased are ATP synthase beta chain, mitochondrial precursor (ATP5B), outer dense fibre protein 2 (ODF2), tubulin beta subunit (TUBB2), capping protein (actin filament) muscle Z-line, beta (CAPZB), triosephosphate isomerase 1 (PTI1).

**Discussion:** We have identified several proteins present in different amounts in oligozoospermic sperm samples as compared to control samples. These proteins could be now be further considered as candidates for the development of diagnostic markers and open up the opportunity to gain further insight into the pathogenic mechanisms involved in oligozoospermia.

**Key words:** Proteomics. Spermatozoa. Oligospermia. Protein.

## INTRODUCCIÓN

La base molecular de oligozoospermia todavía no se comprende completamente en la actualidad, a pesar de que es un hallazgo común presente en los varones con subfertilidad. En parte, esto se debe a la relativa falta de conocimiento de las proteínas que participan en la fisiología normal de los espermatozoides y a las herramientas de análisis disponibles hasta ahora<sup>1-3</sup>. Actualmente, la disponibilidad de técnicas de electroforesis bidimensional junto a la identificación de proteínas utilizando espectrometría de masas ofrece la oportunidad de comparar el mapa proteómico de muestras seminales independientes<sup>4-14</sup>. No obstante, el potencial de las herramientas proteómicas en el estudio de las causas de oligozoospermia aún no se ha explorado plenamente. Por tanto, para contribuir a cubrir este hueco, en el presente estudio se ha realizado una comparación de la abundancia relativa de 75 proteínas identificadas a través de electroforesis bidimensional (2D) extraídas de muestras de espermatozoides de pacientes oligozoospérmicos en comparación con donantes de semen.

## MÉTODOS

### Sujetos y recogida de muestras

El comité de bioética del hospital aprobó este proyecto y se obtuvo el consentimiento informado de los participantes. En este estudio se incluyeron 15 pacientes oligozoospérmicos y 5 muestras de donantes de semen. Las muestras de los pacientes correspondían a pacientes oligozoospérmicos consecutivos, diagnosticados como parte de los análisis rutinarios, en parejas en tratamiento de reproducción asistida durante el período comprendido entre 2006 y 2008. Todos los pacientes y controles eran de Cataluña. Las muestras control correspondían a muestras normozoospérmicas de donantes de semen con fertilidad demostrada requeridas por ley para ser desechadas con fines reproductivos después de haber resultado en 6 embarazos. Las muestras se recogieron por masturbación en envases estériles después de al menos 3 días de abstinencia sexual, pero no más de 7 días. Las muestras se mantuvieron entre 22 y 37 °C y se evaluaron en el laboratorio dentro de 1 h desde su recogida. Después de la licuación del semen, los parámetros seminales (volumen, concentración espermática, motilidad) se evaluaron de acuerdo con las recomendaciones publicadas<sup>15-18</sup> utilizando un analizador automático (CASA, Photolux, S.L. Barcelona, España). Los parámetros básicos de pacientes y de controles se descri-

ben en la tabla 1. En ninguna de las muestras de semen había un número significativo de células redondas o leucocitospermia<sup>17,18</sup>.

### Preparación de las muestras para análisis proteómicos

Se realizaron 3 pôoles independientes de 5 muestras oligospérmicas cada uno (tabla 1). Las muestras de los controles se procesaron independiente (tabla 1). El plasma seminal y otras posibles células contaminantes se eliminaron, tal como se ha descrito anteriormente, a través de centrifugación en un gradiente de Percoll al 50%<sup>7,19</sup>.

Los espermatozoides de los sedimentos, limpios de células potencialmente contaminantes (comprobado a través de microscopía de contraste de fase), se resuspendieron en Ham F10 1x, contados usando la cámara de Makler (Sefi instrumentos médicos, Hainfa, Israel; se contaron aproximadamente 200 células por muestra) y, a continuación, se lavaron 2 veces con Ham F10 1x. La solubilización de las células de los espermatozoides se realizó esencialmente tal como se ha descrito<sup>4,7</sup>. El volumen de *buffer* de lisis se calculó para obtener una concentración correspondiente a aproximadamente 230 millones de espermatozoides/ml en un volumen de 300 µl por cada tira de isoelectrofoque (IEF). Las muestras se incubaron 1 h a temperatura ambiente para permitir su solubilización y, por último, se centrifugaron a 3.000 g 5 min a 4 °C para eliminar los restos potencialmente insolubles.

### Isoelectrofoque y electroforesis

Las proteínas solubilizadas se colocaron en la bandeja de rehidratación con tiras de 17 cm (pH, 5-8) lineales (Bio-Rad) y rehidratadas durante al menos 12 h. El IEF se realizó a 20 °C con el siguiente programa: 15 min con rampa rápida (0-250 V), 2 h con una rampa lenta (250-10.000 V), 45.000-60.000 V con una rampa rápida (10.000 V) y 10 h con una rampa lenta (50 V).

Una vez terminado el IEF, las tiras se equilibraron en 6 M urea, 0,375 M tris-HCl, pH 8,8, 20% glicerol, 2% SDS y 2% DTT 10 min, seguido por el mismo tampón sin DTT y suplementado con un 2,5% de iodoacetamida durante 10 min. La electroforesis se realizó con una protean II (Bio-Rad) a 300 V durante aproximadamente 3 h hasta que el frente de azul de bromofenol comenzaba a migrar fuera del extremo inferior de los geles.

### Tinción de la bidimensional y análisis de las proteínas

Después de la electroforesis, los geles se tiñeron con Pink Flamingo (Bio-Rad), siguiendo las instrucciones

TABLA 1. Parámetros seminales básicos en los pacientes oligozoospérmicos y en los controles incluidos en el presente estudio

Muestra	Concentración espermática ( $\times 10^6/\text{ml}$ )	Volumen (ml)	Recuento espermático total	Espermatozoides móviles
<b>Oligozoospérmicos</b>				
<i>Pool 1</i>				
3.322	6,1	2,0	12,2	20,9
2.996	7,6	2,8	21,3	18,4
2.980	7,7	2,4	18,5	18,2
3.353	7,7	3,6	27,7	20,5
3.214	7,3	3,4	24,8	36,6
<i>Pool 2</i>				
2.781	10,2	2,3	23,5	28,7
2.640	11,2	6,5	72,8	16,7
2.877	11,3	3,7	41,8	28,6
3.403	12,3	4,1	50,4	27,2
3.147	12,8	2,2	28,2	29,7
<i>Pool 3</i>				
2.800	13,8	3,5	48,3	23,1
2.786	15,2	3,8	57,7	14,5
3.216	14,5	7,2	104,4	35,5
3.141	17,9	4,0	71,6	41,8
2.707	18,7	3,0	56,1	31,7
<b>Controles</b>				
1.333	71,9	3,0	215,7	72,7
1.344	205,1	2,3	471,7	87,7
1.125	206,5	2,5	516,2	95,2
1.107	91,6	5,0	458,0	66,3
1.113	203,2	7,2	1.463,0	93,1

del proveedor. Para análisis de la imagen, los geles se escanearon con un scanner fluorescente Typhoon (SG-800, Bio-Rad) y las imágenes se procesaron con el software PDQuest 7.1.1 (Bio-Rad). Las proteínas incluidas en el análisis ya se habían identificado previamente como parte de proyectos proteómicos previos<sup>7,9</sup> (fig. 1). Los valores se normalizaron con la opción de “cantidad total válida en los puntos” siguiendo instrucciones comerciales (Bio-Rad). Los puntos proteicos de las bidimensionales correspondientes a 2 o más proteínas diferentes se han descartado de este estudio. Asimismo, sólo se consideraron los puntos proteicos que podrían identificarse en todos los 3 *pools* de pacientes oligozoospérmicos. La proteínas que cumplían estas condiciones ( $n = 75$ ) se analizaron para identificar cambios de al menos 2 veces un incremento o disminución en su cantidad en las muestras de pacientes oligozoospérmicos en comparación con los controles (Mann Whitney,  $p < 0,05$ ; paquete estadístico SPSS).

## RESULTADOS

En el análisis se incluyeron 75 proteínas identificadas previamente utilizando la espectrometría de masas

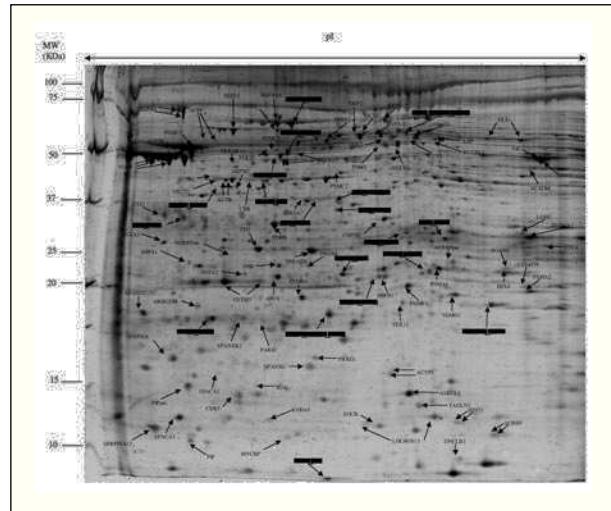


Figura 1. Electroforesis bidimensional de proteínas de espermatozoides identificadas a través de espectrometría de masas y consideradas para su análisis en el presente trabajo. La bidimensional corresponde a uno de los controles incluido en el presente trabajo.

(fig. 1)<sup>7,9,14</sup>. La comparación de las muestras de los pacientes oligozoospérmicos con las de los donantes resultó en la detección de 14 puntos de proteínas, con al menos un aumento o disminución del doble en

comparación de los controles (tabla 2; fig. 2). El promedio en la cantidad relativa osciló entre 2,1 y 13,6 (tabla 2).

Nueve de las proteínas se detectaron incrementadas en las muestras oligozoospérmicas en comparación con las muestras control (tabla 2). Estas proteínas son la creatincinasa B (CKB), la proteína HINT1, el precursor de la succinil CoA 3 cetoácido transferasa (OXCT1), la transgelina-2 (TAGLN2), 2 puntos correspondientes a la actina citoesquelética (ActB), la glutation S-transferasa Mu 3 (GSTM3), la annexina A5 (ANXA5) y la cinasa dependiente de ciclina 5 (CDK5). Las proteínas detectadas como disminuidas son el precursor mitocondrial de la cadena beta de la ATP sintasa, (ATP5B), la proteína ODF2 (ODF2), la subunidad beta de la tubulina (TUBB2), la proteína CAPZ beta (CAPZB) y el triosafosfato isomerasa 1 (TPII). Cabe señalar que muchas de las proteínas no se han analizado, ya que han incluido en el análisis sólo 75 puntos proteicos identificados de los más de 1.000 detectable en los geles bidimensionales (fig. 1). Por lo tanto, cabría esperar que muchas más proteínas diferenciales presentes en pacientes oligozoospérmicos se puedan identificar en futuros estudios.

## DISCUSIÓN

En el presente trabajo se ha determinado la abundancia relativa de las principales proteínas extraídas de muestras de espermatozoides de pacientes oligozoospérmicos y de controles normozoospérmicos, y se ha encontrado que 14 puntos proteicos se detectan

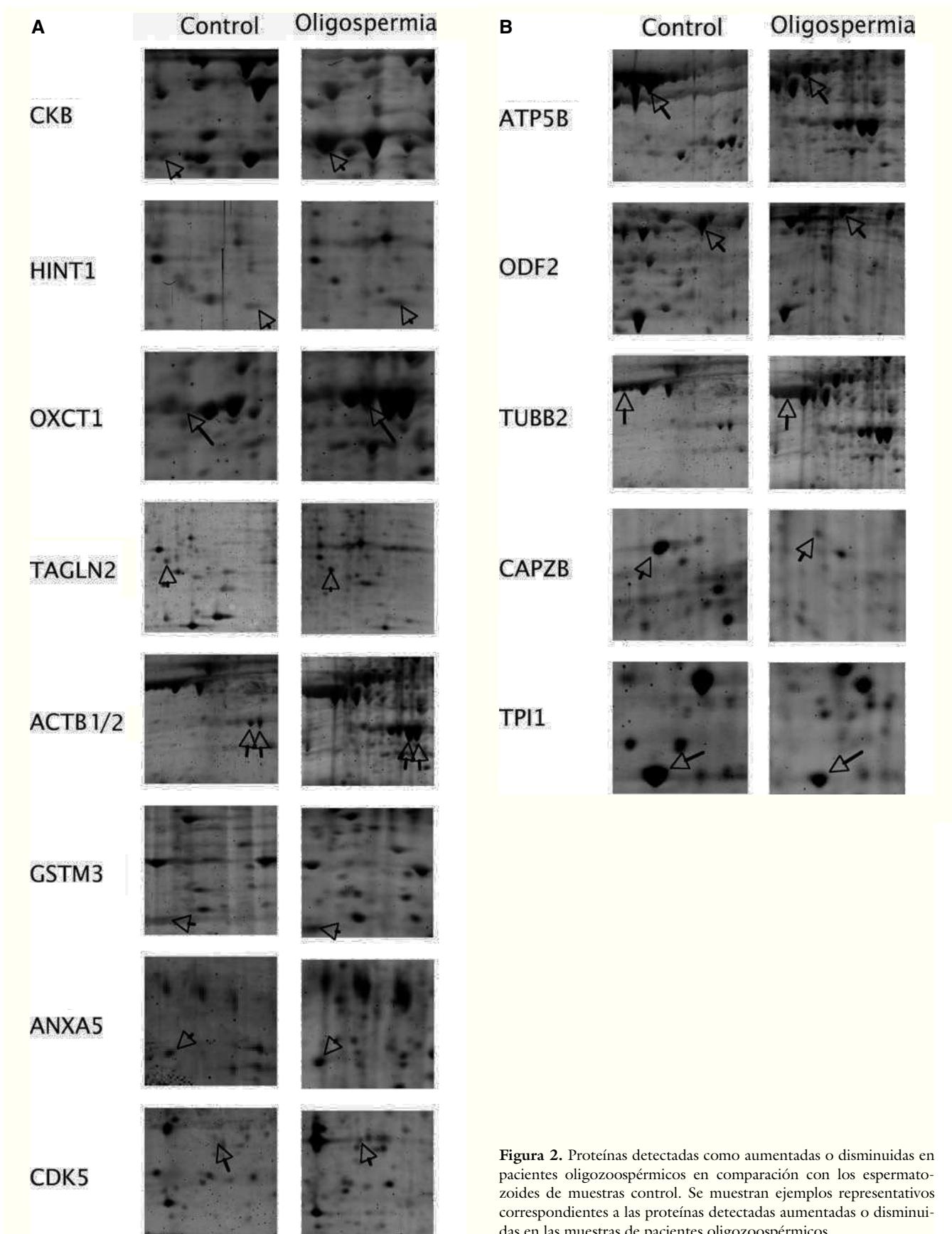
como diferenciales, ya sea aumentados o disminuidos, con una diferencia de al menos 2 veces en el grupo de pacientes oligozoospérmicos en comparación con los controles (tabla 2; figs. 1 y 2). Todas estas proteínas se describen por primera vez como alteradas en muestras de espermatozoides de pacientes oligozoospérmicos. Es interesante observar que las proteínas detectadas pertenecen a 3 categorías diferentes: 5 relacionadas con la energía, 3 con la señalización y regulación, y 6 proteínas estructurales.

Entre las 5 proteínas relacionadas con la producción de energía, se han detectado 3 incrementadas y 2 disminuidas en muestras de pacientes oligospérmicos en comparación con los controles. Proteínas aumentadas son CKB, OXCT1 y GSTM3. Proteínas disminuidas son ATP5B y PTI1.

Entre las 6 proteínas estructurales se han detectado 3 aumentadas y 3 disminuidas en los pacientes oligospérmicos. Proteínas aumentadas son TAGLN2, ActB y ANXA5. Proteínas detectadas como disminuidas en los pacientes son ODF2, TUBB2 y CAPZB. El grupo “señalización celular y regulación” está constituido por CDK5, HINT1 y ANXA5. Podría haber diferentes explicaciones para el aumento o la disminución detectada en diversas proteínas en pacientes oligospérmicos. Una posibilidad podría ser que algunas de las proteínas detectadas estén implicadas en los mecanismos fisiopatogénicos de la oligospermia. Otra posibilidad podría ser que las proteínas alteradas fuesen una consecuencia de una alteración general de la expresión proteica en pacientes oligospérmicos, pero no sean la causa directa de la etiología de la oligospermia. En cualquier caso, las proteínas detectadas abren las puer-

**TABLA 2.** Proteínas detectadas en una cantidad diferente (al menos 2 veces) en muestras de pacientes oligospérmicos en comparación con muestras de donantes normozoospérmicos de fertilidad probada

Proteína	Donantes (promedio de densidad de los puntos)	Pacientes oligozoospérmicos (promedio de densidad de los puntos)	Diferencias
<i>Proteínas aumentadas en los pacientes</i>			
CKB	1.258	17.131	13,6
HINT1	933	5.880	6,3
OXCT1	3.300	18.800	5,7
TAGLN2	1.616	7.932	4,9
ACTB (spot 1)	7.440	29.724	4,0
GSTM3	3.081	11.415	3,7
ANXA5	4.587	11.873	2,6
CDK5	2.655	6.035	2,3
ACTB (spot 2)	14.350	29.683	2,1
<i>Proteínas disminuidas en los pacientes</i>			
ATP5B	46.393	6.064	7,7
ODF2	18.185	3.708	4,9
TUBB2	44.825	9.338	4,8
CAPZB	8.802	2.492	3,5
PTI1	29.062	13.938	2,1



**Figura 2.** Proteínas detectadas como aumentadas o disminuidas en pacientes oligozoospérmicos en comparación con los espermatozoides de muestras control. Se muestran ejemplos representativos correspondientes a las proteínas detectadas aumentadas o disminuidas en las muestras de pacientes oligozoospérmicos.

tas a profundizar más en el estudio de los mecanismos patogénicos implicados en la oligospermia y tienen el potencial de ser útiles como biomarcadores en pacientes con oligospermia. Por ejemplo, será interesante confirmar en un futuro las diferencias detectadas en la abundancia relativa de ciertas proteínas utilizando técnicas inmunofluorescentes con anticuerpos específicos. En estudios futuros también será preciso aclarar en qué medida el contacto de los espermatozoides con secreciones del epidídimo, de las glándulas seminales o del líquido prostático puede ser responsable de algunas de las diferencias detectadas en los pacientes oligozoospérmicos.

En estudios proteómicos previos en pacientes astenozoospérmicos se han podido identificar diversas proteínas implicadas en la regulación de la motilidad espermática<sup>8,12</sup>. Mediante técnicas de separación electroforética convencional también ha sido posible identificar alteración de contenido de protaminas en muestras de pacientes oligospérmicos<sup>20-25</sup>. No obstante, éste es el primer estudio realizado en pacientes oligozoospérmicos utilizando electroforesis bidimensional y técnicas de análisis proteómico.

## CONCLUSIONES

En conclusión, en este trabajo se describe por primera vez la utilización de técnicas de análisis bidimensional proteómico para identificar proteínas alteradas en espermatozoides de pacientes oligozoospérmicos. De relevancia, se han identificado 14 puntos proteicos con un patrón proteómico alterado en pacientes oligozoospérmicos. Este resultado abre ahora las puertas a la realización de estudios adicionales encaminados a la identificación de los mecanismos fisiopatológicos implicados en la oligozoospermia y al posible desarrollo de las proteínas identificadas como marcadoras en la infertilidad.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Sara de Mateo y a Francisco Fernández por su apoyo técnico.

## Bibliografía

- Oliva R, Dixon GH. Vertebrate protamine genes and the histone-to-protamine replacement reaction. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 1991;40:25-94.
- Kierszenbaum AL, Tres LL. The acrosome-acroplaxome-manchette complex and the shaping of the spermatid head. *Arch Histol Cytol.* 2004;67:271-84.
- Rousseaux S, Caron C, Govin J, Lestrat C, Faure AK, Khochbin S. Establishment of male-specific epigenetic information. *Gene.* 2005;345:139-53.
- Pixton KL, Deeks ED, Flesch FM, Moseley FL, Bjorndahl L, Ashton PR, et al. 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.* 2004;19:1438-47.
- Tan Y, Fan L, Luo K, Zhu W, Lu G. Establishment of the two-dimensional gel electrophoretic protein map of the human sperm head. *Zhonghua Nan Ke Xue.* 2004;10:886-9.
- Johnston DS, Wooster J, Kopf GS, Qiu Y, Roberts KP. Analysis of the human sperm proteome. *Ann N Y Acad Sci.* 2005;1061:190-202.
- Martínez-Heredia J, Estanyol JM, Ballesca JL, Oliva R. Proteomic identification of human sperm proteins. *Proteomics.* 2006;6:4356-69.
- Martínez-Heredia J, de Mateo S, Vidal-Taboada JM, Estanyol JM, Ballesca JL, Oliva R. Proteomic expression differences between asthenozoospermic and normozoospermic sperm samples. *Hum Reprod.* 2007;23:783-91.
- de Mateo S, Martínez-Heredia J, Estanyol JM, Domínguez-Fandos D, Vidal-Taboada JM, Ballesca JL, et al. Marked correlations in protein expression identified by proteomic analysis of human spermatozoa. *Proteomics.* 2007;7:4264-77.
- Capkova J, Elzeinová F, Novák P. Increased expression of secretory actin-binding protein on human spermatozoa is associated with poor semen quality. *Hum Reprod.* 2007;22:1396-404.
- Baker MA, Witherdin R, Hetherington L, Cunningham-Smith K, Aitken RJ. Identification of post-translational modifications that occur during sperm maturation using difference in two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics.* 2005;5:1003-12.
- Zhao C, Huo R, Wang FQ, Lin M, Zhou ZM, Sha JH. Identification of several proteins involved in regulation of sperm motility by proteomic analysis. *Fertil Steril.* 2007;87:436-8.
- Lefevre L, Chen Y, Conner SJ, Scott JL, Publicover SJ, Ford WC, et al. Human spermatozoa contain multiple targets for protein S-nitrosylation: an alternative mechanism of the modulation of sperm function by nitric oxide? *Proteomics.* 2007;7:3066-84.
- Oliva R, Martínez-Heredia J, Estanyol JM. Proteomics in the study of the sperm cell composition, differentiation and function. *Syst Biol Reprod Med.* 2008;54:23-36.
- ESHRE Andrology Special Interest Group. Guidelines on the application of CASA technology in the analysis of spermatozoa. *Hum Reprod.* 1998;13:142-5.
- Krause W, Viethen G. Quality assessment of computer-assisted semen analysis (CASA) in the andrology laboratory. *Andrologia.* 1999;31:125-9.
- World Health Organization. WHO laboratory manual for examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. Cambridge: Cambridge University Press; 1999.
- Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, Swanson RJ, Matta JF, Veeck LL, et al. New method of evaluation sperm morphology with predictive value for human in vitro fertilization. *Urology.* 1987;30:248-51.
- Mengual L, Ballesca JL, Ascaso C, Oliva R. Marked differences in protamine content and P1/P2 ratios in sperm cells from percoll fractions between patients and controls. *J Androl.* 2003;24:438-47.
- Balhorn R, Reed S, Tanphaichitr N. Aberrant protamine 1/protamine 2 ratios in sperm of infertile human males. *Experientia.* 1988;44:52-5.
- de Yebra L, Ballesca JL, Vanrell JA, Bassas L, Oliva R. Complete selective absence of protamine P2 in humans. *J Biol Chem.* 1993;268:10553-7.
- de Yebra L, Ballesca JL, Vanrell JA, Corzett M, Balhorn M, Oliva R. Detection of P2 precursors in the sperm cells of infertile patients who have reduced protamine P2 levels. *Fertil Steril.* 1998;69:755-9.
- Cedenho AP, Lima SB, Cenedeze MA, Spaine DM, Ortiz V, Oehninger S. Oligozoospermia and heat-shock protein expression in ejaculated spermatozoa. *Hum Reprod.* 2006;21:1791-4.
- Torregrosa N, Domínguez-Fandos D, Camejo MI, Shirley CR, Meistrich ML, Ballesca JL, et al. Protamine 2 precursors, protamine 1/protamine 2 ratio, DNA integrity and other sperm parameters in infertile patients. *Hum Reprod.* 2006;21:2084-9.
- de Mateo S, Gázquez C, Guimerà M, Balasch J, Meistrich ML, Ballesca JL, et al. Protamine 2 precursors (pre-P2), protamine 1 to protamine 2 ratio (P1/P2), and assisted reproduction outcome. *Fertil Steril.* En prensa 2008.