

Identificación de diferencias proteómicas en muestras oligozoospermicas

Teresa Botta^a, Sabrina Blescia^a, Juan Martínez-Heredia^a, Rafael Lafuente^b, Mario Brassesco^b, José Luis Ballejà^c y Rafael Oliva^a

^aGrupo 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.

^bCentro de Infertilidad y Reproducción Humana (CIRH). Clínica Corachán. Barcelona. España.

^cInstitut Clínic de Ginecologia, Obstetricia i Neonatologia. 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 oligozoospermicos 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 oligozoospermicas, con las presentes en los espermatozoides de 5 donantes de semen a través de su identificación en electroforesis bidimensionales.

Resultados: En los pacientes oligozoospermicos 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 creatinina B (CKB), proteína HINT1 (HINT1), el precursor de la succinil CoA 3 cetoácido transferasa (OXCT1), transgelina-2 (TAGLN2), 2 puntos correspondientes a la actina citosquelética (ActB), la glutatión S-transferasa Mu 3 (GSTM3), anexina 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 (TPI1).

Discusión: Se han identificado varias proteínas presentes en una abundancia distinta en muestras de pacientes oligozoospermicos 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 transferase 1 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), triphosphosphate 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 ahora¹⁻³. 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 independientes⁴⁻¹⁴. 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 oligozoospermicos 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 oligozoospermicos y 5 muestras de donantes de semen. Las muestras de los pacientes correspondían a pacientes oligozoospermicos 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 normozoospermicas 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 licuefacción del semen, los parámetros seminales (volumen, concentración espermática, motilidad) se evaluaron de acuerdo con las recomendaciones publicadas¹⁵⁻¹⁸ 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^{17,18}.

Preparación de las muestras para análisis proteómicos

Se realizaron 3 pools independientes de 5 muestras oligospermicas 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%^{7,19}.

Los espermatozoides de los sedimentos, limpios de células potencialmente contaminantes (comprobado a través de microscopia 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^{4,7}. 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 isoelectroenfoque (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.

Isoelectroenfoque 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

Download English Version:

<https://daneshyari.com/en/article/916098>

Download Persian Version:

<https://daneshyari.com/article/916098>

[Daneshyari.com](https://daneshyari.com)