



Marcadores moleculares de la calidad espermática

Peter Sutovsky, PhD*, Kyle Lovercamp, PhD**

La evaluación microscópica es una piedra angular del análisis del semen, tanto en animales de granja como en andrología humana, proporcionando información útil sobre la muestra de semen. Sin embargo, las pruebas convencionales se basan en la evaluación subjetiva de los rasgos de los espermatozoides y tienen un limitado valor pronóstico de los resultados de la asistencia a la fertilización. Además, algunos casos de infertilidad masculina pueden ser diagnosticados erróneamente como idiopáticos, porque ciertos tipos de anomalías espermáticas suceden a nivel molecular, a veces con ausencia de manifestaciones morfológicas detectables por microscopía.

Introducción: nuevos enfoques para el análisis de semen

Para abordar este problema, las anomalías estructurales y moleculares de los espermatozoides humanos defectuosos pueden ser reveladas por una serie de biomarcadores. Estos incluyen marcadores fluorescentes de estatus acrosómico, fluorocromos en detección de los espermatozoides alterados de la cromatina o de la integridad del ADN, colorantes de vida, que revelan la actividad espermática mitocondrial, las sondas de detección de apoptosis y detección de anticuerpos de proteínas (arriba-abajo) que están regulados en los espermatozoides defectuosos.

Muchos de estos biomarcadores son las mejores pruebas obtenidas por citometría de flujo que, en contraste con el análisis de microscopía, permite una medición rápida, automática y objetiva de la abundancia relativa de estos biomarcadores en miles de células por muestra.

La evaluación espermática microscópica permite a los andrólogos determinar la localización subcelular de biomarcadores específicos. Sin embargo, la intensidad relativa de la clasificación por microscopía sólo puede ser estimada en un pequeño número de células (100-200 por cada muestra).

En suma, la citometría de flujo y microscopía de epifluorescencia, en combinación con biomarca-

dores de calidad/fertilidad del esperma son técnicas muy útiles en andrología. Sin embargo, pocos marcadores biológicos existentes de la calidad del esperma se correlacionan bien con el área de la fertilidad de los animales de granja machos.

Enfoque de marcadores negativos

La estrategia que hemos construido se basa en la identificación de biomarcadores de la calidad de la fertilidad masculina del esperma en los análisis de proteómica, bioquímicos y inmunocitoquímicos de espermatozoides defectuosos. Buscamos proteínas o ligandos (sustancias que actúan sobre receptores del organismo) que son únicamente asociados con los espermatozoides defectuosos ricos en defectos morfológicos, o sutiles, pero defectos ocultos críticos, tales como saltos de la cadena de ADN no detectables en el análisis microscópico convencional. Estos marcadores están asociados con la mala calidad del semen y la reducción de la fertilidad, lo que justificó la designación de marcadores “negativos” de fertilidad.

Hasta la fecha hemos identificado los siguientes marcadores potenciales de la fertilidad masculina:

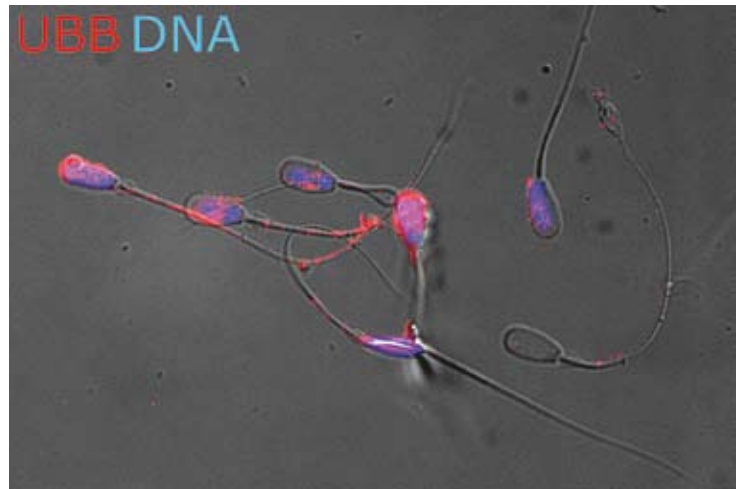
- **Ubiquitina.** Está asociada con la superficie de los espermatozoides defectuosos de seres humanos (Sutovsky et al., 2001b), toros (Sutovsky et al., 2002), verracos (Lov-

ercamp et al., 2007), sementales (Sutovsky et al., 2003) y ratas (Tengowski et al., 2007).

- **El 15-lipoxigenasa (15LOX)**. Se enriquece con diversos componentes de UPP en las gotas citoplasmáticas de espermatozoides de verraco (Fischer et al., 2005) y puede ser utilizado como un indicador negativo de la calidad del semen (Lovercapm et al., 2007).
- En espermatozoides humanos, hemos encontrado que la línea germinal masculina **SPTRX3 tiorredoxina** esta asociada con un citoplasma superfluo de espermatozoides defectuosos (Jiménez et al., 2004), mientras que este no parece ser el caso en especies de animales de granja (estudios en curso).
- En la otra cara de nuestro enfoque de marcadores negativos, encontramos que el **factor activador-receptor de plaquetas (PAFr)**, presente en la superficie normal de los espermatozoides, está expresado en la superficie del espermatozoide defectuoso de toro, aunque su presencia en la superficie de leucocitos contaminan las muestras de semen y esto podría aumentar la presencia de esta molécula en las muestras de pobre calidad (Sutovsky, et al, 2007).
- **Arylsulfatase A (ASA)**, otra proteína presente en la superficie de los espermatozoides asociada con la fertilidad normal, es ubiquitinada y entonces disminuye su presencia en la superficie de los espermatozoides defectuosos de toros.
- Varias **lectinas** están siendo probadas por su capacidad para reconocer glicosilación en la superficie alterada de los espermatozoides defectuosos.

La ubiquitina como biomarcador de la calidad y fertilidad del semen

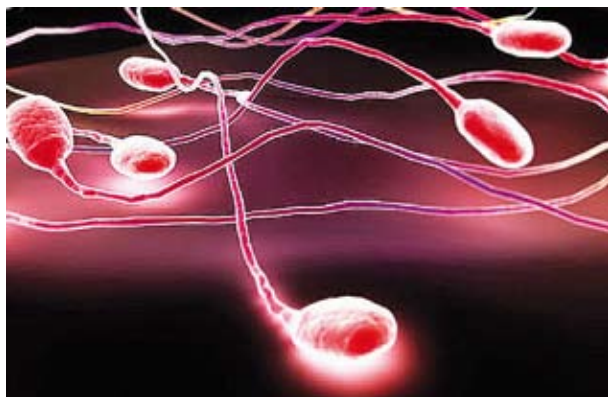
Nuestro laboratorio está particularmente interesado en la ubiquitina, explorando su funcionamiento en la espermatogénesis, la maduración de espermatozoides del epidídimo, así como en la fertilización y el desarrollo del embrión de preimplantación. La ubiquitina (UBI) es una pequeña proteína chaperona que se une covalentemente a residuos Lys de proteínas destinadas a la degradación proteolítica por proteosoma 26S, una subunidad proteolítica multi-holoenzima. Las proteínas son específicas para ubiquitinización por replegamiento, glicosilación alterada, oxidación, reducción del disulfuro o para el desarrollo/programación celular (revisado por Glickman y Ciechanover, 2002).



Ubiquitina en esperma de verraco FK1.

Aunque algunas veces se perciben como una vía de limpieza, la UPP sirve para una precisa variedad de eventos de señalización regulados durante el ciclo celular, control de la transcripción, volumen de trabajo de los receptores de la membrana, y está involucrado en una gran variedad de patologías celulares, que incluyen la enfermedad de Alzheimer, la cirrosis hepática y la infección por VIH (revisado por Glyckman y Ciechanover, 2002). En última instancia, el cordón de sustrato de proteínas con una multi-cadena de ubiquitina de cuatro o más moléculas predestina a dichas proteínas a la degradación proteolítica por proteosoma 26S.

El proteosoma 26S es un complejo de proteasa multi-subunidad de ~2 MDa compuesto por el complejo regulador 19S (17 subunidades; papel: el reconocimiento del sustrato ubiquitinado, desubiquitinación y preparación) y 20S central (14 subunidades; papel: la degradación del sustrato). Algunas interacciones sustrato-proteasoma y las interacciones entre las subunidades 19S están mediadas por el ATP de la subunidad 19S que requieren ATP. Otras medidas de reconocimiento de sustrato y preparación en el complejo 19S (mantenimiento de las subunidades 19S-ATPasa), así como de la proteólisis real en el núcleo del 20S no es dependiente de ATP. Como resultado de nuestro trabajo y de otros, hay un consenso sobre la relación de la proteólisis del esperma afectado por ubiquitina y las proteínas de ovocitos por el proteosoma 26S para el éxito de la fecundación de los mamíferos, pero sin estar limitado a la exocitosis acrosómica (EA) y la penetración pelúcida de la zona espermática (ZP). Del mismo modo, hemos demostrado que la UPP es necesaria para la eliminación de las mitocondrias paternas tras la fecundación, una observación que explica el dogma básico de la bi-



ología comportamental y evolutiva: el de la herencia estrictamente materna del ADN mitocondrial de humanos y de otros mamíferos (revisado por Baska y de Sutovsky, 2005).

El fundamento de nuestra investigación sobre UPP durante la gametogénesis y la fertilización se consolidó por nuestra observación de que los espermatozoides de los mamíferos, con un defecto visible u oculto, adquieren ubiquitina durante la maduración de los espermatozoides en el epidídimo (Sutovsky et al., 2001a). Eventualmente, desciframos la UPP que opera en los fluidos del epidídimo de los mamíferos gracias a un mecanismo de secreción apócrina, por el cual todos los componentes enzimáticos necesarios de UPP se introducen en el fluido del epidídimo y son libres de mezclarse con los espermatozoides maduros (Baska et al., 2008). Este concepto está siendo ahora reconocido como una función extracelular, no tradicional, de UPP, que se extiende más allá del sistema reproductivo.

¿Qué hace que los espermatozoides defectuosos sean reconocibles a UPP? En general, es el daño proteico por el plegamiento/desplegamiento, la oxidación, reducción de disulfuro, desglicosilación (Glickman y Ciechanover, 2002). En cuanto a la glicosilación alterada, observamos que los espermatozoides defectuosos de toro con etiqueta de ubiquitina adquieren la capacidad de obligar a la lectina de LCA, que tiene gran afinidad por el azúcar con glicoproteínas. Esto sugiere que las glicoproteínas de la superficie espermática podrían disminuir en los espermatozoides con epidídimos defectuosos por alfa-manosidasa, una de las abundantes glicosidasas del fluido del epidídimo. Alternativamente, las glicosilasas del líquido del epidídimo podrían reconocer la superficie de los espermatozoides alterados y adjuntar glicanos inmunoprotectores a la superficie espermática,

como se observó en espermatozoides humanos ubiquitinados.

Estudios de ubiquitinación espermática en animales de granja

Utilizamos la citometría de flujo como principal herramienta para la medida de información objetiva, automática y estadística de los niveles relativos de los marcadores en las pruebas con animales de granja y en las muestras de semen humano. En nuestros estudios de campo con animales de granja hicimos las siguientes observaciones:

- La ubiquitina se correlaciona positivamente con la fragmentación del ADN de espermatozoides de toro ($n = 9$ toros; Sutovsky et al., 2002).
- Cambios estacionales en los niveles de ubiquitina de sementales ($n = 4$; Sutovsky et al., 2003), reflejando la estacionalidad de la producción y de la calidad del semen de sementales.
- La ubiquitinase correlaciona negativamente con los parámetros del semen convencional (recuento de espermatozoides, movilidad, morfología normal...), pero positivamente con los niveles relativos a la superficie de las plaquetas del espermatozoides asociado con el factor activador-receptor (PAFr) de proteínas en novillos sometidos a evaluación inicial ($n = 244$; Sutovsky, et al., 2007).
- El contenido en el semen de 15-LOX medido por citometría de flujo se correlaciona negativamente con el tamaño de la camada, mientras que la ubiquitina mostró correlaciones negativas tanto con el tamaño de la camada como con las tasas de parto ($n = 19$ verracos; Lovercamp et al., 2007). Tanto 15-LOX como la ubiquitina se correlacionan positivamente con el porcentaje de CD-transportador de los espermatozoides en el semen porcino (Lovercamp et al., 2007).

Importancia de la gota citoplasmática en espermatozoides de verraco

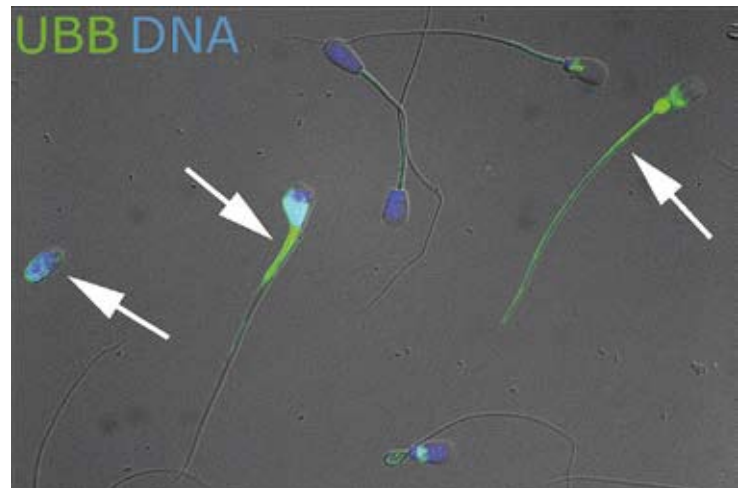
La ubiquitina y otros componentes de UPP se acumulan en la gota citoplasmática del espermatozoides de verraco (CD) y puede ser utilizado para la medición automática del contenido de espermatozoides en el semen de un animal (Fischer et al., 2005). La transmisión de espermatozoides CD es una de las anomalías más extendidas y peor entendidas en la eyaculación de los verracos. El CD es una membrana cerrada en la vesícula del citoplasma celular que permanece

unida a la pieza intermedia de la cola de espermatozoide después de la finalización de la espermatogénesis en el testículo. Los estudios especializados utilizando microscopía han determinado la forma y el tamaño del CD de mamíferos, en general esférica y de 2-3µm de diámetro.

Durante la evaluación microscópica, los CD se pueden observar conectados o separados de los espermatozoides. Cuando están junto al espermatozoide, los CD están asociados con la pieza intermedia de la cola en uno de dos lugares posibles: en el extremo proximal de la pieza intermedia; es decir, cerca de la cabeza del espermatozoide (CD proximal) o situado en el extremo distal de la pieza intermedia (CD distal); es decir, en la unión de la pieza intermedia y la de principio de la cola de los espermatozoides. El CD distal también puede estar asociado con la cola de los espermatozoides, anomalía conocida como reflejo de la pieza intermedia distal. Por último, el CD también se puede observar desprendido de la cola de los espermatozoides y de libre flotación en el eyaculado (CD suelto). Este tipo se puede observar de forma individual o en agrupaciones presentes en el semen de verraco.

La formación de CD se produce durante la espermatogénesis, cuando en el proceso de formación los haploides del espermatozoide maduran primero como una célula espermática alargada y, finalmente, en un espermatozoide completamente diferenciado. La formación de CD se inicia cuando el citoplasma celular residual es sacado de la espermátida alargada y es retenido y destruido por las células de Sertoli, las células del desarrollo del epitelio seminífero. Cuando el tallo espermático, que conecta el citoplasma celular residual al CD es cortado, una pequeña cantidad de citoplasma permanece unida a la pieza intermedia de la cola del espermatozoide. Esta pequeña cantidad de citoplasma es el CD. Todas las células de espermatozoide de nueva formación en los testículos poseen un CD proximal, después de la espermatogénesis.

Después de la espermatogénesis, los espermatozoides pasan de los testículos al epidídimo, que es una glándula tubular situada en la parte exterior de los testículos. El epidídimo consta de tres áreas contiguas: la cabeza (caput), el cuerpo (corpus) y la cola (cola). Los espermatozoides viajan a través del epidídimo por un período que ronda entre los 7 y los 14 días, dependiendo de la especie. Es durante ese tránsito epididimal cuando los espermatozoides maduran y se vuelven fértiles. Cuando se liberan en el testículo, todos los espermatozoides poseen ya una unidad de CD proximal.



Ubiquitina en espermatozoide de toro.

tozoides maduran y se vuelven fértiles. Cuando se liberan en el testículo, todos los espermatozoides poseen ya una unidad de CD proximal.

Como el espermatozoide pasa de la cabeza del epidídimo hasta el corpus, el CD se desplaza por la pieza intermedia de la zona proximal a la posición distal. Todavía no se comprende por qué mecanismos de movimiento del CD se producen en el epidídimo. A raíz de la migración a la posición distal, el CD puede ser liberado en la región de la cola del epidídimo en algunas especies. Sin embargo, en el jabalí la mayoría de los espermatozoides del epidídimo todavía poseen un CD en la posición distal, y algunos espermatozoides poseen un CD en la posición proximal. Durante la eyaculación, o inmediatamente a partir de entonces, el CD puede ser liberado de los espermatozoides y encontrarse flotando libremente en el plasma seminal de la eyaculación.

Numerosas investigaciones han analizado la migración del CD en los cerdos y otras especies de animales de granja durante el tránsito del epidídimo. En el verraco, el porcentaje de espermatozoides con un CD proximal en los rangos del epidídimo ronda entre el 40-90%. Esta cifra se reduce alrededor de un 5-15% en el epidídimo de caballo. Por el contrario, el porcentaje de espermatozoides con rangos de CD distal está entre un 0-20% en la cabeza del epidídimo, llegando a 11-97% en la cola. No se sabe si el CD que se forma en los espermatozoides sirve para un determinado propósito durante la maduración de los espermatozoides o la fertilización, o si el CD es simplemente un desecho remanente tras completarse la espermatogénesis.



De una revisión de la literatura es difícil concluir lo que podría considerarse un porcentaje “normal” de los espermatozoides en el CD del verraco. El rango “normal” para los espermatozoides que poseen CD parece ser entre un 10 a un 15% en la eyaculación de un verraco (Waberski et al., 1994; Lovercamp et al., 2007b), aunque se ha informado de porcentajes aún más altos. Tales discrepancias podrían ser causadas por la variedad de calidad del semen en la muestra de verraco, o bien por diferencias en la evaluación microscópica del semen. Entre los posibles factores que causan la retención de la unidad de CD por los espermatozoides eyaculados son la temperatura del semen subóptima, la temperatura ambiental del macho, fundamentalmente por el calor, exposición química tóxica para la reproducción, falta de madurez sexual, mala alimentación, enfermedades, tales como PRRSV, los cambios de fotoperíodo y la frecuencia irregular de recolección.

En varios estudios recientes, se ha sugerido la relación entre la frecuencia de espermatozoides con CD y la fertilidad del verraco. Waberski et al. (1994) descubrieron que el esperma con CDs extendido en verracos tiene relaciones perjudiciales con las tasas de fecundidad y el tamaño de la camada. Los autores observaron que el CD representa la anomalía morfológica más frecuente en los espermatozoides de los verracos modificados genéticamente.

En un estudio *in vitro* realizado por Petrunkina et al. (2001) se analizó el esperma vinculante

para explantes del epitelio del oviducto de cerdo. Se cree que el espermatozoide se une al epitelio del oviducto para que tenga éxito la fertilización. Hubo una correlación negativa significativa del porcentaje de esperma con CD adjunto y esperma vinculante. Además, hubo una negativa correlación entre la motilidad de la muestra de semen y los porcentajes de espermatozoides con CD adjunto. Lovercamp et al. (2007a, 2007b) examinaron las relaciones entre los espermatozoides, los parámetros de morfología en eyaculados de verraco y los datos resultantes de la fertilidad (porcentaje de partos y el total de número de nacidos).

En este estudio se analizaron 71 eyaculaciones de 13 verracos que se utilizaron después para 1.754 servicios industriales. Los resultados mostraron estadísticamente correlaciones lineales negativas significativas para el CD distal y CD DMR con porcentaje de partos. Además, hubo una significativa correlación negativa lineal entre la tasa de partos y acumulados CD adjunto (CD proximal + CD distal + CD DMR). El análisis de regresión mostró que los espermatozoides con CD adjunto representaron el 30% de la variabilidad observado en el porcentaje de partos. Curiosamente, de ese 30%, el CD distal fue responsable del 20%, mientras que el proximal y el CD DMR fueron responsables del 6% y el 4%, respectivamente (KW Lovercamp, resultados no publicados). Estos resultados sugieren que el CD distal puede tener el efecto más importante sobre la tasa de partos en comparación con el CD proximal y CD DMR. Verracos que obtuvieron una tasa de parto por debajo del promedio tenían un mayor número de CDs distal y CD total, en comparación con los verracos que estaban por encima del porcentaje del promedio de partos. Para generalizar, la existencia de una relación entre la tasa de partos y el CD sugiere que en los verracos con mayor porcentaje de CD total adjunto se producen las tasas más bajas de partos y viceversa.

Conclusiones

En conjunto, nuestros estudios mostraron la utilidad de los marcadores negativos de fertilidad en la evaluación de la fertilidad de grandes animales machos. El objetivo fue determinar qué indicadores coincidían más estrechamente con las tasas de fecundación y el tamaño de la camada de cerdos. Ahora, estamos trabajando activamente en la comercialización y la

difusión de métodos sencillos para la industria de genética y reproducción, así como para los productores de animales de granja. También estamos desarrollando los ensayos para medir la actividad del esperma proteasómico, posiblemente reflejo del esperma fecundante potencial. Igualmente trabajamos en métodos basados en nanopartículas magnéticas para el agotamiento de los espermatozoides defectuosos de las muestras de esperma durante el procesamiento de semen para la criopreservación.

Por último, promovemos el desarrollo de nuevos instrumentos de citometría para su uso en animales de granja y andrología humana. Este esfuerzo incluye las aplicaciones andrológicas del instrumento ImageStream combinado con un citómetro de flujo para la adquisición rápida de imágenes con una cámara de gama alta, y el sencillo análisis de esperma con el citómetro de flujo Guava EasyCyte, distribuido por IMV Inc.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido apoyado por subvenciones del USDA-NRI, Fondo para las Ciencias de la Vida de Missouri, y Pfizer Inc. Nos gustaría agradecer a los colaboradores académicos y a la industria por su contribución esencial a la investigación realizada: al Dr. Tim Safranski (MU), Dr. Klaus van Leyen (U. de Harvard), William Herring (Smithfield, Inc.), Cliff Mariscal y el Dr. Mel de Jarnette (Select Sires Inc.), Eliza Roberts (ABS Global), Dr. John Diehl (Clemson U.), Dr. Bill Plummer (Calpoly), el Dr. Mark Tengowski (Pfizer), la Dra. Regina Turner (U. Penn), y el Dr. Enrique Clemente (Clemente Associates). Un agradecimiento especial para el Dr. Young-Joo Yi, el Dr. Gauri Manandhar, Katie Fischer, Kathleen Baska, Kathy Craighead y Miriam Sutovsky por su contribución esencial a nuestra investigación sobre biomarcadores de la calidad del esperma.

Datos de los autores

*Associate Professor of Animal Science and Clinical Obstetrics & Gynecology, Division of Animal Sciences, and Departments of Obstetrics, Gynecology and Women's Health. University of Missouri-Columbia.

** Assistant Professor of Animal Science, Department of Agriculture,

University of Central Missouri.

Bibliografía

- **Baska KM, Sutovsky P.** Protein modification by ubiquitination and its consequences for spermatogenesis, sperm maturation, fertilization and pre-implantation embryonic development. In: *New impact on protein modifications in the regulation of reproductive system*. Tokumoto, T, Ed., 2005. *Research Signpost*, Kerala; 83-114.
- **Baska KM, Manandhar G, Feng D, Agca Y, Tengowski MW, Sutovsky M, Yi Y-J, Sutovsky P.** Mechanism of extracellular ubiquitination in the mammalian epididymis. *J. Cell Physiol.* 2008; 215:684-696.
- **Fischer KA, et al.** 2005. 15-lipoxygenase is a component of the mammalian sperm cytoplasmic droplet. *Reproduction* 130: 213-222.
- **Glickman MH, Ciechanover A.** The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol. Rev.* 2002; 82:373-428.
- **Jiménez A, Zu W, Rawe VY, Pelto-Huikko M, Flickinger CJ, Sutovsky P, Gustafsson J-A, Oko R, Miranda-Vizueté A.** Spermatoocyte/spermatid-specific thioredoxin-3, a novel Golgi apparatus-associated thioredoxin, is a specific marker of aberrant spermatogenesis. *J. Biol. Chem.* 2004; 279(33):34971-34982.
- **Lovercamp KW, et al.** 2007a. Arachidonate 15-lipoxygenase and ubiquitin as fertility markers in boars. *Theriogenology* 67: 704-718.
- **Lovercamp KW, et al.** 2007b. High resolution light microscopic evaluation of boar semen quality sperm cytoplasmic droplet retention in relationship with boar fertility parameters. *Syst Biol Reprod Med* 53: 219 - 228.
- **Sutovsky P, Moreno R, Ramalho-Santos J, Dominko T, Thompson WE and Schatten G.** A Putative, Ubiquitin-Dependent Mechanism for The Recognition and Elimination of Defective Spermatozoa in the Mammalian Epididymis. *J. Cell Sci.* 2001a; 114:1665-1675.
- **Sutovsky P, Terada Y and Schatten G.** Ubiquitin-based sperm assay for the diagnosis of male factor infertility. *Human Reprod.* 2001b; 16: 250-258.
- **Sutovsky P, Neuber E and Schatten G.** Ubiquitin-Dependent, Sperm Quality Control Mechanism Recognizes Spermatozoa with DNA Defects, as Revealed by Dual Ubiquitin-TUNEL Assay. *Mol. Reprod. Dev.* 2002; 61: 406-413.
- **Sutovsky P, Turner RM, Hameed S, Sutovsky M.** Differential ubiquitination of stallion sperm proteins: Possible implications for infertility and reproductive seasonality. *Biol. Reprod.* 2003 68, 688-698.
- **Sutovsky P, Plummer W, Baska K, Peterman K, Diehl JR, Sutovsky M.** Relative Levels of semen platelet activating factor-receptor (PAFr) and ubiquitin in yearling bulls with high content of semen white blood cells: Implications for breeding soundness evaluation. *J. Androl.* 2007; 28(1):92-108.
- **Tengowski MW, Feng D, Sutovsky M, Sutovsky P.** (2007) Differential expression of genes encoding constitutive and inducible 20S proteasomal core subunits in the testis and epididymis of theophylline- or 1,3-dinitrobenzene-exposed rats. *Biol. Reprod.* 2007; 76(1):149-163.
- **Waberski D, et al.** 1994. Fertility of long-term-stored boar semen: Influence of extender (Androhep and Kiev), storage time and plasma droplets in the semen. *Anim. Reprod. Sci.* 36: 145-151.