

*Caracterització proteòmica de l'espermatozoide
humà. Proteïnes diferencials trobades en pacients
astenozoospèrmics.*

Per Juan Martínez Heredia



TESI DOCTORAL

CARACTERITZACIÓ PROTEÒMICA DE L'ESPERMATOZOIDE
HUMÀ. PROTEÏNES DIFERENCIALS TROBADES EN PACIENTS
ASTENOZOOSPÈRMICS.

Memòria presentada per

Juan Martínez Heredia

per optar al grau de

Doctor



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

Programa de Doctorat: Biopatologia en Medicina. Departament de Ciències Fisiològiques I.

Bienni: 2005-2006

El director de la Tesi

L'interessat

Dr. Rafael Oliva

Juan Martínez

Agraïments

Tot i que només el meu nom figura a la portada, aquesta tesi ha pogut ser realitzada gràcies a l'ajut de molta gent. Així, des d'aquestes pàgines, vull agrair a tothom que m'ha ajudat, en un moment o altra, a realitzar-la.

Primer de tot, agrair al Dr. Rafael Oliva, el haver confiat en mi i haver-me donat la possibilitat de provar com és el món de la ciència; per saber mirar més enllà de la nota, per saber escoltar i per ser tan accessible: moltes gràcies, Rafael.

Després, a tots els companys que he tingut durant aquest anys: a Maite, per compartir amb mi els primers mesos, mentre fèiem els primers passos dins d'aquest món. Al Jordi i la Màrian, d'Oncologia; si no hagués estat per vosaltres, potser no hauria durat més de tres mesos. A la Montse, per ser un enorme dipositari de coneixement (i no només científic). A l'Agustí; sempre recordaré les nostres converses amb un cafè al davant. I a les meves companyes de laboratori, Sara i Cristina: anar de congressos sense vosaltres no serà el mateix.

També agrair a la gent de Reproducció Assistida, i en especial a l'Espe. Gràcies a ella, anar a buscar les mostres era un plaer. Gràcies a tu, tinc un munt d'anècdotes que em permeten ser l'ànima de les festes...

Igualment, a la Secció de Gastroenterologia de l'Hospital Clínic, en especial als seus infermers i infermeres. Sense la vostra ajuda i ànims, potser encara estaria al hospital ingressat...

Per últim, a la meva família, i, sobretot, a la meva dona. Tot i no entendre a vegades de que parlo, o per què tinc l'horari que tinc, han estat al meu costat sempre, als bons i als mals moments.

A tots, gràcies.

Índex

ÍNDEX

1.- INTRODUCCIÓ

1.1. Espermatogènesis.....	15
1.2. Infertilitat masculina.....	19
1.2.1. Definició, freqüència i etiologia.....	19
1.2.2. Anàlisi bàsica del semen.....	20
1.2.3. Causes primàries de la infertilitat masculina.....	25
1.3. Proteòmica.....	32
1.3.1. Definició.....	32
1.3.2. Història i evolució.....	32
1.3.3. Tincions clàssiques.....	39
1.3.4. Tècniques actuals.....	39
1.3.4.1 Tinció amb 2D-DIGE.....	40
1.3.4.2 Tinció amb “Flamingo stain”.....	41

2.- OBJECTIUS

2. Objectius.....	45
-------------------	----

3.- MATERIAL I MÈTODES

3.1. Procedència i selecció de mostres.....	49
3.2. Preparació de les mostres.....	49
3.2.1. Gradient de Percoll.....	49
3.2.2. Decapitació d'espermatozoides i separació dels caps.....	51
3.2.3. Extracció de proteïnes.....	54
3.3. Gels mono i bidimensional.....	57
3.3.1. Gels monodimensionals àcids.....	57

3.3.2. Gels bidimensionals. Preparació de la primera dimensió.	58
3.3.3. Gels bidimensionals. Preparació de la segona dimensió.	60
3.4. Identificació de proteïnes.	72
3.4.1. Selecció de proteïnes a identificar.	72
3.4.2. Tripsinització i anàlisi per MALDI-TOF.	72
3.4.3. Comparació amb bases de dades.	73
3.5. Comparació de gels.	74
3.5.1. Matchset.	74
3.5.2. Comparació estadística.	79
3.5.3. “Clustering”.....	80

4.- RESULTATS

4.1. Preparació d'espermatozoides mitjançant centrifugació en gradient de Percoll i obtenció i purificació de caps per tal de procedir a l'extracció de les proteïnes nuclears i altres anàlisis.	85
4.1.1. Preparació d'espermatozoides mitjançant centrifugació en gradient de Percoll.....	85
4.1.2. Obtenció i purificació de caps per tal de procedir a l'extracció de les proteïnes nuclears i altres anàlisis.....	87
4.2. Descripció del proteoma total de l'espermatozoide humà mitjançant 2D i identificació de les proteïnes utilitzant la tecnologia MALDI-TOF.	92
4.3. Determinació de les proteïnes presents en menor o major abundància en mostres de semen de pacients mitjançant l'anàlisi de mostres independents i tinció argèntica.	107
4.3.1. Astenozoospermics en comparació amb donants de semen.	107

4.3.2. Normozoospermics en comparació amb donants de semen de fertilitat provada.....	111
4.4. Estudi de la capacitat predictiva del patró d'expressió de les proteïnes quantitativament diferent mitjançant l'agrupació en clústers.....	113
4.5. Posada en marxa del sistema d'anàlisi DIGE en espermatozoides humans.	114

5.- DISCUSSIÓ

5.1. Preparació d'espermatozoides mitjançant centrifugació en gradient de Percoll i obtenció i purificació de caps per tal de procedir a l'extracció de les proteïnes nuclears i altres anàlisis.	119
5.1.1. Preparació d'espermatozoides mitjançant centrifugació en gradient de Percoll.....	119
5.1.2. Obtenció i purificació de caps per tal de procedir a l'extracció de les proteïnes nuclears i altres anàlisis.....	120
5.2. Descripció del proteoma total de l'espermatozoide humà mitjançant 2D i identificació de les proteïnes utilitzant la tecnologia MALDI-TOF.	122
5.3. Determinació de les proteïnes presents en menor o major abundància en mostres de semen de pacients mitjançant l'anàlisi de mostres independents i tinció argèntica.	129
5.3.1. Astenozoospermics en comparació amb donants de semen.	129
5.3.2. Normozoospermics en comparació amb donants de semen de fertilitat provada.....	134
5.4. Estudi de la capacitat predictiva del patró d'expressió de les proteïnes quantitativament diferent mitjançant l'agrupació en clústers.....	137
5.5. Posada en marxa del sistema d'anàlisi DIGE en espermatozoides humans.	138

6.- CONCLUSIONS

6. Conclusions.	141
----------------------	-----

7.- BIBLIOGRAFIA

7. Bibliografia.....	143
----------------------	-----

8.- ANNEXOS

8.1 Annex I.	169
-------------------	-----

8.2 Annex II.	176
--------------------	-----

8.3 Annex III.	179
---------------------	-----

