

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER
en
Biología y Tecnología Aplicada a la
Reproducción Humana Asistida

Efecto del proteoma espermático en la citocinesis embrionaria temprana

Autora: Paula Ezpeleta Díaz de Quijano

Tutora: Marga Esbert Algam

Alcobendas, Septiembre 2023

ÍNDICE

Abstract	3
Introducción	5
Objetivos	9
Material y métodos	10
Resultados	14
Discusión	17
Conclusiones	20
Agradecimientos	21
Bibliografía	22
ANEXO I: Presupuesto del estudio	25

ABSTRACT

Proteomics is a science based on studying proteins and their interactions. Knowing the protein profile of the gametes allows us to understand their structure and provides us with the possibility of optimizing success rates, infertility diagnosis and treatment, and the development of molecular strategies to select the best blastocysts to be transferred. Likewise, 15% of the sterile population do not get pregnant, the cause still unknown. Those patients are diagnosed with idiopathic sterility. In consequence, we should continue investigating to find out the reasons involving this sterility.

Sperm provides the centrioles to the oocyte so that the zygote can divide. Our hypothesis is that irregular divisions in embryos can be promoted by altered sperm proteomics. Our study aims to compare the proteomics of 10 semen samples that have resulted in blastocysts with irregular divisions vs. the proteomics of 10 samples that have not been given them. The study will be conducted using an aliquot of a sperm sample (otherwise discarded) from patients who have obtained an embryo, whether with abnormal division or not.

Through the SWATH-MS technology the proteins present in both study groups (with or without irregular cleavage) to confirm our hypothesis. If we discover that this altered proteomics could be the origin of the irregular divisions, it may be possible in the future to make a selection of the spermatozoa that present the appropriate proteins, which in the long run, could have an impact on the success rates of implantation, pregnancy, newborns and reduce the number of embryos to be fertilized. The field of Assisted Reproduction needs to keep researching and developing new technologies and protocols to optimize clinical practice, guaranteeing that those embryos are the most likely to be healthy.

RESUMEN

La proteómica es una ciencia basada en el estudio de las proteínas y sus interacciones. Conocer el perfil proteico de los gametos nos permite entender su estructura, posibilitando la optimización de las tasas de éxito, el diagnóstico y tratamiento de la infertilidad y el desarrollo de estrategias moleculares para seleccionar a los mejores blastocistos para ser transferidos. Por otro lado, el 15% de la población estéril presenta esterilidad idiopática, siendo la causa de la no obtención del embarazo, aún desconocida; por lo que hay que seguir investigando para averiguar los motivos.

El espermatozoide aporta los centriolos al ovocito para que el cigoto pueda dividirse. Nuestra hipótesis es que una alterada proteómica espermática puede dar lugar a divisiones irregulares de los embriones. El objetivo de nuestro estudio es comparar la proteómica de 10 muestras de semen que han derivado en blastocistos con divisiones irregulares vs. la proteómica de 10 muestras sin irregularidades. El estudio se realizará utilizando una alícuota de una muestra de semen (que de otra forma sería descartada) de pacientes que hayan logrado un embrión, ya sea con anomalías en la división o no. Mediante la tecnología SWATH-MS, se van a comparar las proteínas que hay en los dos grupos de estudio (con divisiones irregulares o no) para poder responder a la hipótesis.

Si se descubre que esta proteómica alterada puede ser el origen de las divisiones irregulares, en un futuro se podrían seleccionar los espermatozoides que presentan las proteínas adecuadas. Lo que a la larga supondría un impacto en las tasas de éxito de implantación, gestación y recién nacidos vivos, reduciendo el número de embriones a fecundar. El ámbito de la Reproducción Asistida necesita seguir investigando e incorporando nuevas tecnologías y protocolos para lograr la optimización de la práctica clínica, garantizando que sean embriones con una mayor probabilidad de ser sanos.

Keywords: Proteomics, sperm, embryo cleavage, morphokinetics

INTRODUCCIÓN

La espermatogénesis es un proceso biológico que no solo depende del genoma, el epigenoma y el transcriptoma, sino que también del proteoma de la espermatogonia, las células de soporte y el espermatozoide generado (Carrell et al., 2016). El proceso consiste en la formación de un espermatozoide haploide a partir de células diploides, con la capacidad de contribuir en la formación de un embrión, el cual dará lugar a un individuo sano en el mejor de los casos.

El factor masculino es responsable en aproximadamente el 50% de las parejas infértiles (Turek, 2005; Zhu et al., 2023). Sin embargo, la subfertilidad masculina es un trastorno complejo y multifactorial cuya etiología aún es desconocida. Dentro de este desconocimiento, una esterilidad muy destacada, pues se diagnostica en el 15% de la población estéril (Gunn & Bates, 2016), es la esterilidad idiopática; las causas del fallo gestacional y la ausencia de nacido vivo, aún se desconocen.

A pesar de las mejoras en las condiciones de cultivo y las técnicas de laboratorio, únicamente alrededor del 50% de los embriones humanos alcanzan la etapa de desarrollo de blastocisto *in vitro*. Si bien muchos factores influyen en el desarrollo del embrión, lo que se ha podido demostrar recientemente es que la división aberrante afecta directamente el genoma en células individuales de embriones humanos, lo que resulta en la pérdida de cromosomas, el mosaicismo y la detención celular.

Adicionalmente, otro factor a considerar en el estudio de la división celular es el centrosoma: el principal centro organizador de microtúbulos o MTOC de la célula. Este centro está compuesto por dos centriolos rodeados de lo que se conoce como material pericentriolar (PCM), una red de proteínas. La importancia del centrosoma recae en su funcionalidad, puesto que se encarga de la organización intracelular y el ensamblaje del huso. Es por ello que tiene un peso importante en la división celular y en el establecimiento de la polaridad, lo que puede conllevar a la división asimétrica celular.

Las imágenes de embriones no invasivas con *time-lapse* han proporcionado información sobre errores de división anormales que ya se sabía que ocurrían, a pesar de que el origen es todavía variable y desconocido, las cuales resultaban difíciles de detectar sin una visualización constante de los embriones en desarrollo dentro de la incubadora. Una de las divisiones aberrantes más comúnmente observadas en embriones humanos es lo que llamamos división directa, lo que significa que más de dos células resultaron de un evento de división de una

sola célula. Los embriones derivados de divisiones directas se han correlacionado con tasas de competencia e implantación más pobres.

Las Técnicas de Reproducción Asistida (TRA) han aumentado significativamente en los últimos años sus tasas de éxito. Sin embargo, reducir el número de embriones sanos seleccionados para transferir sigue siendo un objetivo que estamos dispuestos a alcanzar. Si solo se va a transferir un embrión, es imperativo que el embrión seleccionado sea el que tenga el mayor potencial para producir un niño (Poli et al., 2015). Hasta la fecha, la selección de gametos y embriones se basa principalmente en criterios morfológicos que han sido muy debatidos (Esteves et al., 2012), ya que se sabe que un embrión morfológicamente normal no significa que lo sea genéticamente o que vaya a implantarse. Las pruebas que se utilizan de forma rutinaria para evaluar las características de los espermatozoides incluyen concentración espermática, motilidad, vitalidad y morfología. Sin embargo, siguen siendo incapaces de ayudar a explicar posibles defectos en los espermatozoides, como la detección temprana del desarrollo.

Para lograr una alta tasa de embarazo, es importante comprender las proteínas involucradas en el microambiente folicular, así como las proteínas espermáticas involucradas en la fecundación y el desarrollo del embrión (Smith G et al., 2007). La proteómica es una ciencia impulsada por la tecnología que estudia las proteínas y sus modificaciones postraduccionales, así como sus interacciones. Asimismo, proporciona la oportunidad de elucidar procesos biológicos complejos y sus condiciones, incluyendo la fecundación, la implantación y el embarazo (Kolialexi et al., 2008; Tsangaris, 2009).

¿Por qué usar la proteómica en la Reproducción Asistida? Las ómicas, y en concreto la proteómica, ofrecen una gran cantidad de información en referencia a procesos biológicos involucrados en el éxito reproductivo, por ende, aportando una visión más amplia de sistemas biológicos complejos con un coste y esfuerzo relativamente bajo (Egea et al., 2014). La proteómica clínica es una área emergente de las ciencias biológicas que tiene como objetivo la aplicación de esta ciencia en la búsqueda e investigación de biomarcadores, además de la generación de perfiles proteicos que ayuden en la predicción, el diagnóstico y la monitorización de patologías humanas, como lo puede ser la infertilidad (Verrills, 2006). Por lo tanto, la proteómica comparativa de muestras normales y enfermas se considera un factor importante en el desarrollo de biomarcadores para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades (Agarwal et al., 2016).

Con el fin de poder analizar la proteómica espermática y poder responder a los objetivos de este estudio, se propone la *Sequential Window Acquisition of All Theoretical fragmentation ion Mass Spectra* o SWATH-MS como la tecnología idónea para ser implementada.

La SWATH-MS es una innovadora y revolucionaria tecnología que se basa en la aplicación de la espectrometría de masas en el campo de la proteómica. Esta tecnología se caracteriza por cuantificar de una sola vez, la gran mayoría de péptidos y proteínas que pueden haber en una muestra compleja. Es decir, a partir de Datos Independientes (DIA) y datos específicos, tiene la capacidad de generar mapas de proteínas globales y de alta especificidad; los DIA son todos los iones dentro de un intervalo de masa los cuales se fragmentan y analizan.

La tecnología SWATH-MS deja atrás el mecanismo de detección y activación de MS/MS para pasar a una metodología sistemática. Se caracteriza por la transmisión mediante una pequeña ventana de la muestra para que se puedan fragmentar las proteínas y péptidos. Posteriormente, se da la medición de alta resolución por el espectrómetro de masas. Es una estrategia que combina la velocidad, la sensibilidad y el rango dinámico en el modo MS/MS. Es decir, lo que hace es ofrecer datos cuantitativos de MS/MS para cada uno de los péptidos o proteínas de la muestra a analizar.

Entre las ventajas de esta tecnología se encuentra que esta cuantificación es imparcial y reproducible, por lo que no se tienen que desarrollar métodos específicos cada vez que se analiza una muestra. En adición, después del fragmentado y el análisis, se obtiene un archivo digital y permanente que se puede comprobar retrospectivamente en todo momento y sin modificar los datos; además de conseguir mediciones más precisas como resultado final.

La tecnología de espectrometría de masas de alta resolución puede descifrar características complejas de expresión de proteínas espermáticas, proporcionar información sobre los procesos moleculares asociados con la infertilidad masculina y puede usarse para identificar posibles biomarcadores diagnósticos y terapéuticos para la infertilidad masculina (Lv et al., 2019).

Sabiendo que el espermatozoide es el gameto que proporciona los centríolos al ovocito para que el cigoto pueda dividirse y comenzar el desarrollo del embrión, creemos que las divisiones irregulares en los embriones podrían ser causadas por proteómica espermática del centriolo alterada, pues el mecanismo preciso por el que este orgánulo contribuye en el desarrollo embrionario en humanos, es aún desconocido. Tras realizar una revisión de la literatura existente, no encontramos estudios que comparen el proteoma de los

espermatozoides que han derivado en blastocistos con clivajes aberrantes vs. los que se han dividido correctamente.

OBJETIVOS

Este trabajo tiene 3 objetivos principales:

- Revisar la bibliografía en referencia a la proteómica espermática.
- Redactar el protocolo del proyecto para conseguir la aprobación del Comité ético del Hospital Clínic.
- Estandarizar el protocolo del laboratorio para que permita realizar la parte experimental.

MATERIAL & MÉTODOS

El presente Trabajo de Fin de Máster se ha dividido en 3 partes diferenciadas. En primer lugar, se realizó una búsqueda bibliográfica del *state of the art* tanto de la proteómica espermática como de los centriolos.

En segundo lugar, se redactó un protocolo con el fin de conseguir la aprobación del Comité Ético.

Finalmente, se llevó a cabo la validación de la parte experimental del estudio diseñado para poder ver si el departamento de proteómica era capaz de identificar y comparar el proteoma a la espera de la respuesta por parte del Comité.

Parte I: Búsqueda bibliográfica

Mediante el uso de databases como Uniprot y PubMed se pudo recolectar el conjunto de proteínas claves para el procesado en el estudio y seleccionar aquellas vinculadas con el centriolo espermático.

Parte II y III: Protocolo del estudio y validación de la parte experimental

Pacientes y muestras

Este estudio piloto constará de 10 muestras de semen para cada uno de los grupos (divisiones regulares vs. irregulares), alcanzando un total de 20 muestras.

Debe tenerse en cuenta que las muestras de semen que se dividan correctamente, serán usadas como el grupo control del estudio.

Se incluirán muestras de semen de pacientes de IVIRMA Barcelona que hayan sido sometidos a un ciclo de Fecundación In Vitro en dicha clínica y cuyos embriones resultantes hayan sido cultivados en el *ECOPE*, además de ser ciclos con semen en fresco.

Por otro lado, aquellos pacientes con ciclos con muestras de semen de banco, con biopsias testiculares, con procesos de capacitación como el *Fertile Chip*, así como sin cultivo en *ECOPE*, serán excluidos del estudio.

Previamente a la realización de toda la metodología del estudio, se enviarán un conjunto de muestras como probatina al Laboratorio de Proteómica del SCSIE, con el fin de validar la parte experimental del presente estudio. Dichas muestras se obtendrán de un banco de muestras de IVI-RMA Barcelona.

Protocolo de capacitación del banco de muestras

Para cada capacitación se prepararán 2 tubos de muestra, y ese valor se multiplicará por 0,8. Los gradientes se prepararán con una mezcla de medios de Sisgrad y Flushing. En función del volumen que se necesite, las proporciones de los medios variarán.

Los gradientes van en orden 95% > 70% > 45% y siempre preparándose en una proporción 2:1, con un mínimo de 2 ml para los lavados.

En base a la movilidad de los espermatozoides y la viscosidad de la muestra, se determinará el volumen y el tiempo de centrifugado necesario para el gradiente. El volumen máximo que puede tener la muestra es 1 ml (para muestras excelentes), mientras que el mínimo es de 0,3 ml (para muestras pobres). El tiempo de centrifugado oscila entre los 15 min en los casos en el que la muestra es excelente y los 20 min en los casos en los que la muestra no es tan buena. No obstante, casi nunca es tanto tiempo.

Se usarán dos tubos por seguridad y para optimizar los valores finales de la muestra, dado que se tratan de técnicas muy subjetivas con las que se requiere del máximo de precisión.

El gradiente debe prepararse con los tubos falcon inclinados y depositando muy lentamente contra la pared del tubo. En cuanto a la muestra de semen, se añadirá hasta un máximo de 1.5 ml por tubo de muestra, siempre teniendo en cuenta el volumen recibido de muestra.

Se efectuará un lavado a 1100 rpm durante el tiempo estipulado. Pasado el tiempo, se decantará el sobrenadante y el pellet se aspirará con una pipeta de cristal con la punta redonda y se vertirá en un tubo falcon con 2 ml de medio. Se hará un nuevo lavado a 1300 rpm durante 5 min, se decantará y se repetirá el lavado.

Protocolo de congelación del banco de muestras

Una vez realizado el ICSI, se inicia el protocolo de congelación, únicamente para aquellos ciclos en fresco que van a ir a ECOPE y que tienen semen en fresco. El tubo falcon que tiene la muestra capacitada, se le añade PBS en proporción 2:1, con un mínimo de 2 ml. En el caso de que la muestra sea inferior a 1 ml, se añade PBS hasta 2 ml. Se realiza un primer lavado a 1100 r.p.m. durante 10 min. Se decanta y se vuelve a añadir PBS en proporción 2:1 con un mínimo de 2 ml. Se procede a un segundo lavado a 1100 rpm durante 10 min; pasado el tiempo, se decanta y añade con una pipeta de cristal redondeada en los criotubos. Se procede a guardar en el congelador a -180°C sin rampa de congelación ni crioprotector. Los criotubos deben rotularse con la fecha de congelación y ProtoBcn#, siendo # el número que le corresponda (p.e.: ProtoBcn1 en el caso de ser el primero para congelar). En adición, se

prepara un portaobjetos con una gota de 5 μ l y se extiende, para proseguir con la tinción de panóptico rápido.

El registro se realizará en un Excel donde se tendrá en cuenta determinados parámetros, entre los que destacan: el número de historia del paciente, la edad del gameto masculino, la etiqueta asignada, la ubicación del ECOPE en el que se incubó el/los potencial/es embrión/es tras el ICSI, el tipo de divisiones que presentan los embriones resultantes (regulares o irregulares), el origen del gameto femenino (ovodon/propio), el número de ovocitos maduros obtenidos así como el número de embriones fecundados y si se le hace PGT.

Proteómica SWATH-MS

Se tratará de un estudio basado en la aproximación de la expresión diferencial de proteínas por medio de adquisición de datos en un espectrómetro de masas TIMS TOF Flex con movilidad iónica acoplado a un sistema de cromatografía Evosep.

Se realizará una probatina de 3 muestras de cada grupo de interés. Se partirá de la lista de las proteínas cuantificadas con anterioridad bibliográfica con un valor del área calculada de la proteína en cada muestra analizada. En función del rango dinámico de las muestras de espermatozoides y la abundancia de las proteínas de interés, se podrá saber si se pueden identificar y cuantificar o no.

En caso afirmativo, las muestras de semen se lavarán varias veces con PBS para eliminar cualquier contaminante del medio. La extracción de proteínas proseguirá con la rotura de los espermatozoides en tampón Laemmli 1,5X, se agitará en vórtex durante 30 min, y centrifugará 15 min a 15.000 r.p.m. guardando el extracto (sobrenadante) aparte.

Posteriormente se cuantificará el extracto total con el kit Machery Nagel para tomar la misma cantidad de cada muestra (10 μ g), que se digerirá en solución después de limpiar las muestras con el método de bola magnética SP3. Una vez obtenida la digestión en solución con tripsina, 250 ng de los péptidos tripticos serán cargados en una punta Evotip para introducirlos en el espectrómetro de masas a través del sistema cromatográfico Evosep utilizando su método de adquisición de muestras 60 SPD.

Seguidamente, mediante la tecnología SWATH-MS se realizará el estudio de expresión diferencial. Con las muestras pinchadas en modo DIA serán analizadas en el software libre de la plataforma DIANN con el cual se obtiene la tabla de cuantificación de las muestras analizadas que es la que permite la comparación entre las áreas de las proteínas identificadas.

Variables

Las principales variables que se medirán son:

Código	Tipología	Descripción
N_ABNORM	Numérica discreta	Número de embriones con anomalías en la división
T_PROTS	Numérica discreta	Número total de proteínas diferentes entre espermatozoides
ANEU_RATE	Numérica continua	Tasa de aneuploidía/mosaicismo (en caso de PGT)
BLAS_RATE	Numérica continua	Tasa de blastulación

Periodo de estudio

Tras ser aprobado por el comité de ética, el estudio necesita de un año para concluirlo. Las muestras de semen congelado de los bancos IVI BARCELONA se enviarán a la Universitat de Valencia, donde se realizará la valoración de la proteómica. El análisis y la presentación de los resultados de proteómica se realizará con la colaboración de la Fundación IVI.

Cronograma

Fase I: Diseño, redacción y aprobación del proyecto

- Diseño del proyecto: Marga Esbert.
- Redacción del proyecto: Jose Manuel Molina, Paula Ezpeleta.
- Aprobación del proyecto: Francisco Dominguez, Marga Esbert.

Fase II: Recolección de muestras y análisis experimental: Jose Manuel Molina, Paula Ezpeleta, Universidad Valencia.

Fase III: Análisis estadístico e interpretación de los resultados: Jose Manuel Molina, Paula Ezpeleta and Marga Esbert, Francisco Dominguez

Fase IV: Presentación de los resultados en conferencias y manuscritos: Jose Manuel Molina, Paula Ezpeleta, Marga Esbert, Francisco Dominguez

	2023											
	Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dec
Fase I												
Fase II												
Fase III												
Fase IV												

RESULTADOS

Parte I: Búsqueda bibliográfica

Con el fin de evaluar si existe una correlación entre el proteoma del espermatozoide y la división anormal del embrión, se realizó una búsqueda bibliográfica exhaustiva con el fin de poder seleccionar aquellas proteínas espermáticas vinculadas al centriolo del espermatozoide (Tabla 1).

Proteínas vinculadas al centriolo espermático	
Proteína	UNIPROT
BRDT	Requerido para la organización de cromocentro
CEP135	Proteína centrosomal implicada en la biogénesis del centriolo. Actúa como una proteína de andamiaje durante la biogénesis temprana del centriolo.
CEP63, CEP152	Desempeña un papel clave en la duplicación de centriolos dependiente de centriolo madre; la función también parece involucrar a CEP152, necesaria para la duplicación del centrosoma.
CEP57	Proteína centrosomal que puede ser necesaria para la unión de los microtúbulos a los centrosomas.
CEP250	Probablemente juega un papel importante en la cohesión del centrosoma durante la interfase.
CSPP1	Puede desempeñar un papel en la organización de microtúbulos dependiente del ciclo celular.
DZIP1	Adaptador molecular que recluta los complejos proteicos necesarios para el ensamblaje y la función del cilio en el cuerpo basal del cilio.
POC1A, POC1B	Involucrado en los primeros pasos de la duplicación del centriolo, así como en los pasos posteriores del control de la longitud del centriolo. Actúa junto con POC1B para garantizar la integridad del centriolo y la formación adecuada del huso mitótico.
PLK4	Proteína quinasa serina/treonina que juega un papel central en la duplicación del centriolo
ODF2	Proteína de andamiaje general que se localiza específicamente en los apéndices distales/subdistales de los centriolos madre.

Proteínas vinculadas a la espermatogénesis	
Proteína	UNIPROT
HOOK1	Requerido para la diferenciación de espermátidas.
SUN5	Ancla la cabeza del espermatozoide a la cola
PMFBP1	Proteína de andamiaje que une la pieza de conexión de la cabeza y la cola del espermatozoide a la envoltura nuclear, manteniendo así la integridad de la cabeza y la cola del espermatozoide.
TSGA10	Juega un papel en la espermatogénesis.
CCDC42	Necesaria para el desarrollo de los espermatozoides.

Tabla 1. Selección de las proteínas centriolares de interés para analizar en el estudio de proteómica.

Parte II: Redacción del protocolo del estudio

La redacción del protocolo de estudio, con la respectiva Letter Of Intent (LOI) fueron redactadas con éxito, a pesar de que a día de hoy se sigue a la espera de la aprobación por parte del Comité Ético.

Parte III: Validación de la parte experimental

Debido a la ausencia de aprobación por parte del comité, no se pudo analizar el proteoma de las muestras en el tiempo designado para este TFM. No obstante, se envió una probatina de 6 muestras previamente congeladas para otro estudio. Dicha probatina contenía 3 muestras seminales que habían dado lugar a embriones con divisiones irregulares y 3 muestras con embriones de divisiones regulares. Fue enviada el 26 de julio de 2023 al Laboratorio de Proteómica del SCSIE para poder ser procesada y analizada.

En el procesado y análisis de dicha probatina, se obtuvo un gel de un pool de lisados de las muestras de espermatozoides (Figura 1). Como consecuencia de la rotura de la célula por el proceso de descongelación, los resultados correspondían a la albúmina presente en el medio, dado que es una de las proteínas mayoritarias. Dadas las condiciones, se tuvo que parar el análisis de las muestras. Sin embargo, el análisis de la probatina ha permitido ver las carencias en la parte experimental y mejorar el procedimiento. De modo que habrá que modificar el protocolo para incluir los lavados del medio de las muestras más exhaustivos y deberán hacerse con más volumen de PBS, así como resuspender más el pellet y centrifugar a 1300 rpm.

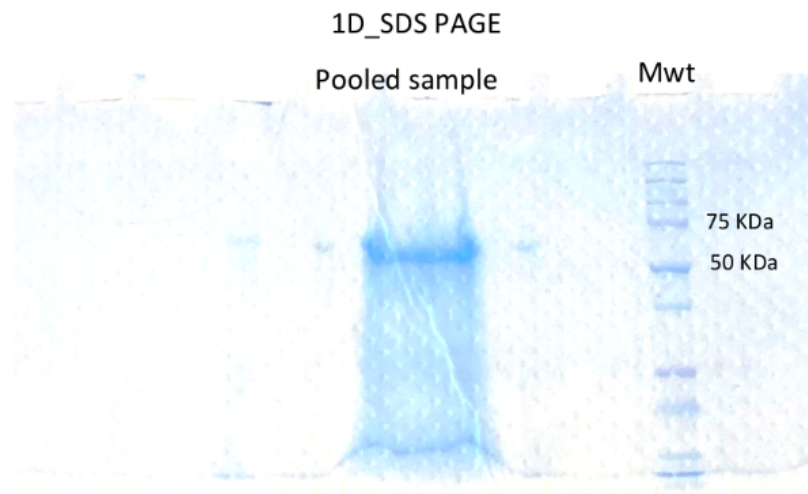


Figura 1. 1D SDS PAGE de las muestras seminales enviadas.

DISCUSIÓN

El proteoma del espermatozoide humano ha sido localizado en la región del cuello o pieza intermedia, junto a los centriolos. Lo que ha llevado a sugerir que el espermatozoide también proporciona una gran cantidad de proteínas centrosómicas al cigoto.

No obstante, este hecho no ha sido todavía estudiado en humanos. Nuestro estudio defiende la hipótesis que las divisiones irregulares de los embriones pueden ser promovidas por una proteómica alterada del espermatozoide, puesto que es el gameto que aporta los centriolos al ovocito.

Los resultados bibliográficos han llevado a la selección de un conjunto de proteínas centrosómicas que podrían resultar claves en el estudio proteómico de los espermatozoides. Teniendo en cuenta los inconvenientes en el procesamiento de la probatina, se procederá a la discusión de resultados obtenidos por otros equipos dada la similitud o bien en la metodología del estudio o en los objetivos definidos.

Rivera-Egea et al., 2021 se propusieron como objetivo describir los perfiles proteómicos en muestras de semen y definir las diferencias en los perfiles proteómicos espermáticos entre dos grupos de interés: si lograron el embarazo (P) o no lo lograron (NP) mediante ICSI. A partir de la técnica SWATH-MS y con un total de 8 muestras (4 muestras por grupo de interés), se obtuvieron un total de 2228 proteínas espermáticas relacionadas con la espermatogénesis y/o la fertilidad. Del total de proteínas, únicamente 53 proteínas obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Este mismo estudio comparó los resultados obtenidos con el estudio de Azpiazu et al., 2014, el cual obtuvo 1717 proteínas, siendo 66 significativas estadísticamente, relacionadas con la fertilidad y no siendo compartidas con el primer estudio. Por lo que ambos estudios demostraron que existe una gran variabilidad de proteínas presentes en el proteoma espermático, además de contar con una gran abundancia proteómica. Es decir, a pesar de haber analizado un grupo proteico relacionado con la fertilidad en dos grupos de estudio muy parecidos en ambos estudios, los resultados divergieron entre estudios.

Otro estudio que vale la pena valorar es el de Amargant et al., 2021, en el cual se quiso determinar la composición proteica del cuerpo basal del espermatozoide humano mediante el uso de la proteómica y MS. Dicho estudio, a través del uso de técnicas de espectrometría de masas permitió obtener la identificación de 3210 proteínas a lo largo del cuerpo basal y la cola del gameto masculino. Del total de estas proteínas, 251 proteínas correspondían según

los términos de Gene Ontology (GO), al centrosoma o el centriolo. Entre estas proteínas, los autores destacaron la Nek9 (encargada de la fosforilación de múltiples factores), POC1B (encargada de la regulación de la estructura centriolar), Cep135 y Cep170 (encargadas de la regulación del ciclo centrosómico) y la ODF2 y la PCMI (encargadas de la regulación del PCM).

Los resultados de los estudios previamente mencionados permiten llegar a la conclusión, que en el caso del presente estudio, a pesar de estar analizando un grupo de proteínas relacionadas con el centriolo y el centrosoma espermático y zigótico, probablemente aportarían nuevos resultados y la definición de proteínas que puede ser que todavía no se hayan descrito. En adición, se debe considerar que el proteoma centriolar consta de una baja abundancia, por lo que detectar dichas proteínas es todo un reto.

El uso de las técnicas de espectrometría de masas (MS-MS) han demostrado la contribución de numerosas proteínas espermáticas al desarrollo del embrión (Amaral et al., 2014). Sin embargo, en la presente situación, al utilizar la tecnología SWATH-MS, cabe la posibilidad que al analizar la proteómica diferencial, no se obtengan las proteínas que son de interés. En este caso, supondría una gran limitación para este estudio, puesto que habría que replantear el enfoque proteómico o ampliar el análisis de proteínas de interés.

El patrón hereditario del centrosoma en cuanto a la fecundación y a la formación del cigoto, ha sido establecida como biparental en distintos modelos de mamíferos, entre los cuales se encuentran los primates (Amargant et al., 2021; Avidor-Reiss et al., 2019). El centriolo es proporcionado por parte del espermatozoide, mientras que el ovocito contiene PCM apropiado para la unión de dicho centriolo. A pesar de que aún se desconoce cómo estos orgánulos podrían estar contribuyendo, se cree que podrían jugar un papel importante en el desarrollo del cigoto (Avidor-Reiss et al., 2019).

Sin embargo, se ha descrito en otros estudios la posibilidad de que los centriolos no siempre sean heredados o requeridos para el desarrollo embrionario, siendo así, específicos de la especie (Vallet-Buisan et al., 2023). Sha et al., 2017 presentaron unos datos en los que se sugería que los centriolos de los espermatozoides no son necesarios para las divisiones de división cigóticas, pero sí participan en etapas posteriores del desarrollo embrionario en humanos.

Es decir, estos estudios proponen que las implicaciones funcionales de estas proteínas para el desarrollo embrionario temprano aún no están resueltas. A pesar de que los centrosomas son

esenciales para los organismos sanos, pueden no ser necesarios durante las primeras divisiones celulares del embrión, que puede depender de las vías acentrosómicas del ensamblaje del huso que actúan durante la meiosis de los ovocitos (Amargant et al., 2021).

Se necesita seguir investigando para determinar el mecanismo y el papel preciso del proteoma centriolar del espermatozoide y su influencia en el cigoto, así como en las etapas de desarrollo preimplantacional. Múltiples estudios han concluido que el proteoma espermático de los hombres infértiles difiere del de los hombres fértiles (Légaré et al., 2014). Estudiar la proteómica espermática podría potenciar la identificación de biomarcadores de infertilidad masculina y aportar, por tanto, posibles causas de esterilidad idiopática.

CONCLUSIONES

La subfertilidad masculina es un trastorno complejo y multifactorial cuya etiología aún es desconocida. El presente estudio ha tratado de evaluar si existe una correlación entre el proteoma del espermatozoide y la división anormal del embrión, con el fin de poder aportar nuevos diagnósticos para poder reducir los casos de esta esterilidad.

Teniendo en cuenta que se trata de un estudio que requiere de aprobación por parte del Comité Ético y tiene una gran parte burocrática, únicamente se ha podido llevar a cabo la redacción del protocolo y el análisis de unas probatinas, las cuales no han podido ser analizadas como estaba planeado debido a la elevada presencia de albúmina en las muestras seminales, por lo que habrá que seguir perfeccionando la técnica de congelación de dichas muestras.

No hay que olvidar que se trata de un estudio piloto, por lo que el tamaño muestral es pequeño y se deberá tener precaución al interpretar y extrapolar los hallazgos.

Aún así, si logramos profundizar nuestro conocimiento de la proteómica del espermatozoide y su composición, junto con su participación en la infertilidad y las primeras divisiones embrionarias, podríamos obtener nuevas perspectivas sobre la información que ya tenemos y obtener nuevos conocimientos para la comunidad científica. En adición, podría contribuir en la optimización de los resultados reproductivos, con el fin de perfeccionar la predicción de la fertilidad, mejorar su diagnóstico y tratamiento, así como desarrollar estrategias moleculares que permitan seleccionar al mejor embrión.

Este estudio no solo podría mejorar el conocimiento del proteoma espermático y su impacto en el desarrollo embrionario, sino que también podría ser el primer paso en la investigación para iniciar un nuevo protocolo de selección de embriones basado en la proteómica espermática.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo es el resultado de varios meses de trabajo y de muchos altibajos que hemos tenido que ir resolviendo. Es por ello que me gustaría agradecer a mi tutora, Marga Esbert, por haberme ayudado en todo momento y de la que he podido aprender muchísimo en este tiempo. Y también a Jose Manuel Molina por su gran ayuda en la realización del trabajo.

Agradecer a Oreto y a Francisco por haber hecho posible el análisis de las probatinas y por habernos aconsejado en la metodología.

Y agradecer al equipo del Laboratorio de Andrología de IVI Barcelona por toda la colaboración y por haber sido un apoyo en mis momentos de frustración.

Finalmente, gracias a mi familia por ser mi mayor apoyo siempre y por confiar en mí.

BIBLIOGRAFÍA

- Agarwal, A., Bertolla, R. P., & Samanta, L. (2016). Sperm proteomics: Potential impact on male infertility treatment. *Expert Review of Proteomics*, 13(3), 285-296. <https://doi.org/10.1586/14789450.2016.1151357>
- Amaral, A., Castillo, J., Ramalho-Santos, J., & Oliva, R. (2014). The combined human sperm proteome: Cellular pathways and implications for basic and clinical science. *Human Reproduction Update*, 20(1), 40-62. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmt046>
- Amargant, F., Pujol, A., Ferrer-Vaquero, A., Durban, M., Martínez, M., Vassena, R., & Vernos, I. (2021). The human sperm basal body is a complex centrosome important for embryo preimplantation development. *Molecular Human Reproduction*, 27(11), gaab062. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaab062>
- Avidor-Reiss, T., Mazur, M., Fishman, E. L., & Sindhvani, P. (2019). The Role of Sperm Centrioles in Human Reproduction – The Known and the Unknown. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 7, 188. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00188>
- Azpiazu, R., Amaral, A., Castillo, J., Estanyol, J. M., Guimerà, M., Ballescà, J. L., Balasch, J., & Oliva, R. (2014). High-throughput sperm differential proteomics suggests that epigenetic alterations contribute to failed assisted reproduction. *Human Reproduction*, 29(6), 1225-1237. <https://doi.org/10.1093/humrep/deu073>
- Carrell, D. T., Aston, K. I., Oliva, R., Emery, B. R., & De Jonge, C. J. (2016). The “omics” of human male infertility: Integrating big data in a systems biology approach. *Cell and Tissue Research*, 363(1), 295-312. <https://doi.org/10.1007/s00441-015-2320-7>
- Egea, R., Escrivá, M., Puchalt, N., & Varghese, A. (2014). OMICS: Current and future perspectives in reproductive medicine and technology. *Journal of Human Reproductive Sciences*, 7(2), 73. <https://doi.org/10.4103/0974-1208.138857>
- Esteves, S. C., Zini, A., Aziz, N., Alvarez, J. G., Sabanegh, E. S., & Agarwal, A. (2012). Critical Appraisal of World Health Organization’s New Reference Values for Human Semen Characteristics and Effect on Diagnosis and Treatment of Subfertile Men. *Urology*, 79(1), 16-22. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2011.08.003>
- Gunn, D. D., & Bates, G. W. (2016). Evidence-based approach to unexplained infertility: A systematic review. *Fertility and Sterility*, 105(6), 1566-1574.e1. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.02.001>
- Kolialexi, A., Mavrou, A., Spyrou, G., & Tsangaris, G. Th. (2008). Mass spectrometry-based proteomics in reproductive medicine. *Mass Spectrometry Reviews*, 27(6), 624-634.

<https://doi.org/10.1002/mas.20181>

- Légaré, C., Droit, A., Fournier, F., Bourassa, S., Force, A., Cloutier, F., Tremblay, R., & Sullivan, R. (2014). Investigation of Male Infertility Using Quantitative Comparative Proteomics. *Journal of Proteome Research*, 13(12), 5403-5414. <https://doi.org/10.1021/pr501031x>
- Lv, S., Wang, N., Lv, H., Yang, J., Liu, J., Li, W.-P., Zhang, C., & Chen, Z.-J. (2019). The Attenuation of Trophoblast Invasion Caused by the Downregulation of EZH2 Is Involved in the Pathogenesis of Human Recurrent Miscarriage. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 14, 377-387. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2018.12.011>
- Poli, M., Ori, A., Child, T., Jaroudi, S., Spath, K., Beck, M., & Wells, D. (2015). Characterization and quantification of proteins secreted by single human embryos prior to implantation. *EMBO Molecular Medicine*, 7(11), 1465-1479. <https://doi.org/10.15252/emmm.201505344>
- Rivera-Egea, R., Sota, N., González-Martín, R., Meseguer, M., Remohí, J., Garrido, N., & Dominguez, F. (2021). Differential sperm proteomic profiles according to pregnancy achievement in intracytoplasmic sperm injection cycles: A pilot study. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 38(6), 1507-1521. <https://doi.org/10.1007/s10815-021-02098-0>
- Sha, Y.-W., Xu, X., Mei, L.-B., Li, P., Su, Z.-Y., He, X.-Q., & Li, L. (2017). A homozygous CEP135 mutation is associated with multiple morphological abnormalities of the sperm flagella (MMAF). *Gene*, 633, 48-53. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.08.033>
- Smith G, R., Kaune G, H., Parodi Ch, D., Madariaga A, M., Morales D, I., Ríos S, R., & Castro G, A. (2007). Aumento del daño en el ADN y estrés oxidativo en espermatozoides de pacientes con oligozoospermia idiopática y antecedentes de criptorquidismo. *Revista Médica de Chile*, 135(3). <https://doi.org/10.4067/S0034-98872007000300001>
- Tsangaris, G. T. (2009). From Proteomics Research To Clinical Practice. *Expert Review of Proteomics*, 6(3), 235-238. <https://doi.org/10.1586/epr.09.14>
- Turek, P. J. (2005). Practical approaches to the diagnosis and management of male infertility. *Nature Clinical Practice Urology*, 2(5), 226-238. <https://doi.org/10.1038/ncpuro0166>
- Vallet-Buisan, M., Mecca, R., Jones, C., Coward, K., & Yeste, M. (2023). Contribution of semen to early embryo development: Fertilization and beyond. *Human Reproduction Update*, 29(4), 395-433. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmad006>
- Verrills, N. M. (2006). Clinical proteomics: Present and future prospects. *The Clinical*

Biochemist. Reviews, 27(2), 99-116.

Zhu, C.-H., Wei, Y., Chen, F., Li, F., Zhang, S.-M., Dong, N.-J., Xue, T.-M., Liu, K.-F., Cui, H.-M., & Lu, J.-C. (2023). Investigation on the mechanisms of human sperm DNA damage based on the proteomics analysis by SWATH-MS. *Clinical Proteomics*, 20(1), 2. <https://doi.org/10.1186/s12014-022-09391-9>

ANEXO I: Presupuesto del estudio

PROJECT ID	2304-BCN-060-JM	CENTER	IVIRMA Barcelona
PRINCIPAL INV	Jose Manuel Molina	DATE LAS MODIF	27/04/2023
PROJECT TITLE	Effect of sperm proteome on early embryo cyotkinesis		
PROJECT BUDGET (MARGINAL COSTS + GRANTS)			

PROJECT TOTAL MARGINAL COST (€)		% Staff time	COST
Cost concept	Names and descriptions	2023	2023
CONSUMABLES	Consumable description		220,00 €
Laboratory supplies			120,00 €
Reagents / Kits			
Culture media			100,00 €
Animals			
Drugs			
Other costs			
SUBCONTRACTING / SERVICES	Subcontracting cost description		2.870,00 €
Technological platforms (-omics)			
Microscopy & Imaging			
Animal facilities & Veterinary Services			
Cellular Techniques			
Bioinformatic & Statistic tools			
Manuscript Editing & Correction Services			1.200,00 €
Genetic & Molecular Analysis	PROTEÓMICA: análisis de expresión diferencial DIA n=20, 60 SPD		1.570,00 €
Biomedical & Drug tests			
Other services			
Other services			
Other services	Envío muestras a Valencia		100,00 €



OTHER COSTS (travel, publication costs, IPR...)	Other costs description		1.500,00 €
Travel costs			
Publication costs			
Intellectual Property Right costs			
Insurance costs			
Ethics Committee costs			1.500,00 €
Other costs			
TOTALS PER YEAR			4.590,00 €
TOTAL PROJECT BALANCE			4.590,00 €