



V. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2023ko maiatzaren 17, 18 eta 19a
Donostia, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)



Aitortu-PartekatuBerdin 3.0

OSASUN ZIENTZIAK

**Alterazio kromosomikoak dituzten
espermatozoideak identifikatzeko
biomarkatzaileen hautaketa**

*Ainize Odriozola Larrinaga,
Itziar Urizar Arenaza, Beatriz
Navarro, Irune Calzado Lopez,
Malen Zabala Goikoetxea
eta Nerea Subiran Ciudad*

139-144 or.

<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.v.04.17>

ANTOLATZAILEA:



BABESLEAK:



LAGUNTZAILEAK:



Alterazio kromosomikoak dituzten espermatozoideak identifikatzeko biomarkatzaileen hautaketa

Ainize Odriozola (1), Itziar Urizar (1), Beatriz Navarro (2), Iruñe Calzado (1), Malen Zabala (3), Nerea Subirán (1,3).

1. *Euskal Herriko Unibertsitatea EHU/UPV, Fisiologia departamentua, Leioa (Bizkaia).*
ainize.odriozola@ehu.eus; itziar.urizar@ehu.eus; irune.calzado@ehu.eus;
nerea.subiran@ehu.eus
2. *Quiron Bilbao, Laguntza Bidezko Ugalketa Unitatea, Bilbo (Bizkaia).*
3. *Mepro Medical Reproductive Solutions, ikerketa eta garapen departamentua, Donostia (Gipuzkoa).* *mzabala@meprolife.com*

Laburpena

Hornidura genetiko normala (kariotipo normala) duten gizonezko antzuek alterazio kromosomikoak izan ditzakete espermatozoideetan. Alterazio kromosomiko ohikoenak aneuploidiak dira, eta hauek FISH azterketaren bidez hautematen dira, baina analisi honek lagina suntsitzea dakar. Gainera, diagnostikoaren ondoren, ez dago tratamendu eraginkorrik, eta gizonari eta bikoteari eskaintzen zaion proposamen nagusia gameto maskulinoa semen emaile batekin ordeztzea da. Ikerketa honek proteomika teknikak erabiliz aneuploidiak dituzten espermatozoideak identifikatzeko erreminta berriak sortzea du helburu.

Hitz gakoak: espermatozoidea, aneuploidia, Lagundutako Ugalketa Teknikak (LUT)

Abstract

Infertile men with a normal genetic supply (normal karyotype) may have chromosomal alterations in their sperm cells. The most frequent chromosomal alterations are aneuploidies, which are detected by FISH study, but this analysis involves the destruction of the sample. Moreover, after diagnosis, there is no alternative treatment for these patients and the main option to the man and the couple is to replace the male gamete with a sperm donor. This study aims to create novel tools to identify sperm cells with aneuploidies using proteomic techniques.

Keywords: Sperm, aneuploidy, Assisted Reproduction Techniques (ART)

1. Sarrera eta motibazioa

Antzutasuna 12 hilabetez edo gehiagoz kontrazepziorik gabe ohiko sexu-harremanak izan ondoren, haurdunaldi klinikoa ez lortzea bezala definitzen da (Zegers-Hochschild et al., 2009). Gaur egun, mundu osoan 186 milioi pertsonari eragiten dion arazo mediko eta soziala bihurtu da antzutasuna (Inhorn & Patrizio, 2015). Bikotearen arazoa den arren, jakina da kasuen % 30ek jatorri maskulino hutsa dutela, eta gainerako kasuen % 20an (arrazoi mistoak) eragina dutela. Beraz, faktore maskulinoa antzutasun kasuen erdietan inplikaturik dago.

Gaur egun, semenaren azterketa da gizonezkoaren estatus ugalkorra aztertzeke erabiltzen den tresna nagusia. Hala ere, tresna honek hainbat muga ditu, ez baitu zehazten antzutasunaren jatorria (Garrido et al., 2008). Gainera, semenaren azterketa gainditzen duten gizonezkoen artean, % 20-30ak antzutasun arazoak pairatzen jarraitzen du. Kasu askotan, Lagundutako Ugalketa Teknikak (LUT) antzutasunaren kontrako tratamendu eraginkorra suposatzen duten arren, transferitutako enbrioien % 30 soilik iristen dira haurdunaldi ebolutibo batera (Macklon & Boomsma, 2010). LUTen arrakasta-tasa txiki horren arrazoi nagusietako bat, gizon antzuen diagnostikorako erreminta falta da.

Hornidura genetiko normala (kariotipo normala) duten gizonezko antzuen % 6-27k aneuploidiak izan ditzakete espermatozoideetan. Aneuploidiak alterazio kromosomiko ohikoenak dira, eta kromosoma bat edo batzuen galera (nulisomia) eta/edo irabazia (disomia) dakarte. Aneuploidien presentzia estu dago lotuta gizonen antzutasunarekin eta LUTen arrakasta-tasa txikiarekin. Gaur egun lagin espermaticoan aneuploidiak diagnostikatzeko erabiltzen den tresna

nagusia *Fluorescence In Situ Hybridization* (FISH) azterketa da. Teknika honetan, DNA zundak kolore ezberdinetako etiketa fluoreszenteekin markatzen dira, eta segmentu horiek sekuentzia osagarriekin bat egitean, espermatozoideen kromosomak identifikatzeko aukera ematen dute. Teknika honen eragozpen nagusia, besteak beste, azterketan erabiltzen den laginaren suntsipena da, eta ondorioz, espermatozoide aneuploideak laginetik baztertzeko ezintasuna LUTetan erabili ahal izateko. Gainera, lagin espermatozikoan aneuploidien portzentaia handia detektatzen denean, ez dago adostasunik honek izan ditzakeen ondorioetan, eta bikoteari eskaintzen zaion tratamendu nagusia gameto maskulinoa semen emaile batekin ordeztzea da.

Testuinguru honetan, ezinbestekoa da espermatozoideen aneuploidiak diagnostikatzeko erreminta berriak sortzea eta anomalia hauek dituzten gizonezkoen tratamendurako baliabide gehiago sortzea.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Azken urteotan, hainbat ikerketa egin dira gizonezkoen ugalkortasunean esku hartzen duten mekanismo molekularrak identifikatu eta ulertzeko. Aztertutako molekula gehienak gizonezkoen ugalkortasunarekin zeharka baino erlazionatu ez badira ere, beste batzuk zuzenean lotu dira bai ugalkortasunarekin eta baita LUTetan lortutako emaitzekin ere. Azken horien artean, estres oxidatzailearekin, apoptosiarekin edo DNAREN osotasunarekin lotutako hainbat molekula nabarmentzen dira (Garrido et al., 2008; Nohales et al., 2012). Hala ere, hainbat ikerketak eta meta-analisik agerian utzi dute horietako batek ere ez duela ugalkortasun potentziala handitzen (Garrido et al., 2008; Nohales et al., 2012; Zhang et al., 2015).

Zientzia “-omikoak”, hala nola, genomika, proteomika edo transkriptomika, organismo baten funtzionamenduan parte hartzen duten molekula ugari aldi berean aztertzeko aukera ematen duten zientziak dira. Zientzia hauen garapenak eta aplikazioak espermatozoideen funtzionamenduari eta prozesu biologikoetan parte hartzen duten molekulei buruzko ezagutza handiagoa lortzea ahalbidetzen ari dira. Honen ondorioz, analisi transkriptomikoak eta proteomikoak espermatozoideen ezaugarri molekularrak ugaltze arrakasta handiagoekin lotzeko erreminta erabilienetako bat bihurtu dira (Egea et al., 2014). Hala ere, teknika horietatik erator daitezkeen onurak oso urrun daude oraindik; izan ere, orain arte egindako azterlan guztiak ugalkortasunaren alderdirik orokorrenak deskribatzeari buruzkoak izan dira. Gainera, horien analisiak semen-laginak suntsitzea dakar, eta, beraz, ezingo lirateke erabili hautaketa espermatoziko markatzaile gisa.

Gaur egun, espermatozoide helduetan dauden ezaugarri morfologiko eta molekularretan oinarritzen diren hainbat metodologia daude semen laginetik espermatozoiderik onenak hautatzeko (Said & Land, 2011): 1) espermatozoideen isolamendua karga elektrikoaren bidez, 2) zelula apoptotikoen hautespen zelular immunomagnetikoa, 3) azido hialuronikoaren hartzaileak dituzten espermatozoide helduen hautaketa, 4) espermatozoideak ezaugarri morfologikoen arabera hautatzea magnifikazio handiko mikroskopio (IMSI) bidez, eta 5) espermatozoide birrefringenteen hautaketa, besteak beste. Espermatozoideak hautatzeko metodo horiek laginaren kalitatea hobetu dezaketen arren, emaitza klinikoen arabera, batek ere ez ditu hobetzen LUTen arrakasta-tasak. Gainera, hainbat desabantaila dituzte, hala nola, ekipamendu handiaren beharra, esperientzia sakonaren beharra edo entseguen iraupen luzea. Horregatik, teknika hauek ez ditu gomendatzen Munduko Osasun Erakundeak (MOE) laginen tratamendurako.

Duela urte batzuetatik hona proteomika teknikak asko hobetu dira. Espermatozoideak bereziki egokiak dira analisi mota horretarako oso eskuragarriak direlako, erraz purifikatzen direlako eta transkripzioa eta itzulpengintza inaktibatuta daudelako (Oliva et al., 2008). Analisi mota horren bidez, gizonezko ugalkorrek profil proteiko desberdina dutela ezarri ahal izan da, eta hori da gizonezkoen ugalkortasunarekin lotutako proteinak identifikatzeko lehen urratsetako bat (Martínez-Heredia et al., 2008; Oliva et al., 2008; Xu et al., 2012). Ikerketa proteomiko horietako ia guztiek, ordea, zelula barneko proteinak identifikatzen dituzte, haien erabilera diagnostiko eta/edo pronostiko baliara mugatuz.

Testuinguru honetan, ezinbestekoa da espermatozoideen ezaugarrien azterketan sakontzen jarraitzea, bai funtzioa eta bai erregulazioa ulertzeko, eta baita gizonen ugalkortasuneko biomarkatzaileak bilatzeko ere, espermatozoiderik onenak hautatu ahal izateko espermatozoideak suntsitu gabe.

Ildo honetan, lan honen ardatza proteomika diferentzialeko teknikak erabiliz aneuploidiak dituzten espermatozoideak identifikatzeko biomarkatzaile berriak aurkitzea da. Horretarako, honakoak dira lan honen **helburu nagusiak**:

- 1) **Espermatozoideen mintz plasmaticoko proteinak identifikatzea proteomika diferentzialeko tekniken bidez.** Horretarako, emaille emankorren, eta aneuploidiak dituzten gizonezko antzuen semen laginak erabiliko dira.
- 2) **Biomarkatzaile espermatico gisa identifikatutako xede-proteinen balio klinikoa aztertzea.**

3. Ikerketaren muina

3.1 Espermatozoideen mintz plasmaticoko proteina espezifikoaren bilaketa

3.1.1 Laginen inklusio-irizpideak

Gure ikerketarako erabilitako laginen inklusio irizpideak honakoak izan ziren:

- **Ugalkortasun frogatuko emailleak:** Quironsalud Bilbao Klinikako semen emaille programako laginak lortu ziren eta indarrean dagoen legediak (14/2006 Legea, 2006) ezarritako baldintzak bete zituzten, semen-parametroak erreferentziako estandarren barruan aurkeztuta (MOE, 2021).
- **Espermatozoideetan aneuploidiak dituzten gizon antzuak:** Semen-laginak Quironsalud Bilbao Klinikatik lortu ziren. Praktika klinikok, gizonezkoei FISH espermaticoaren azterketa egin zitzaizen honako indikazio hauek zituztenean: a) jatorri ezezaguneko abortu errepikakorrak, b) faktore maskulino larria, c) LUTen porrota eta d) beste arrazoi batzuk (enbrioi-garapen txarra eta ernalketa-tasa baxua). FISH espermaticoaren azterketan alterazio-tasa handiena duten 9 kromosomak aztertu ziren.

3.1.2. Proteomika diferentziala

Espermatozoideen mintz plasmaticoko proteina espezifikoaren bilaketa egiteko 10 semen emaillearen eta 35 aneuploidiadun pazienteren semen laginak erabili ziren. Lehenik, bi taldeetako laginetatik proteinak erauzi ziren. Horretarako, proteasa eta fosfatasen inhibitzaileak zituen RIPA lisi medioa gehitu eta zelula homogeneizatzailearekin espermatozoideak apurtu ziren. Horren ostean, zelulak sonikatu ziren eta 15 minutuz zentrifugatu ziren proteina zatiki solugarria eta solugaitza banatzeko.

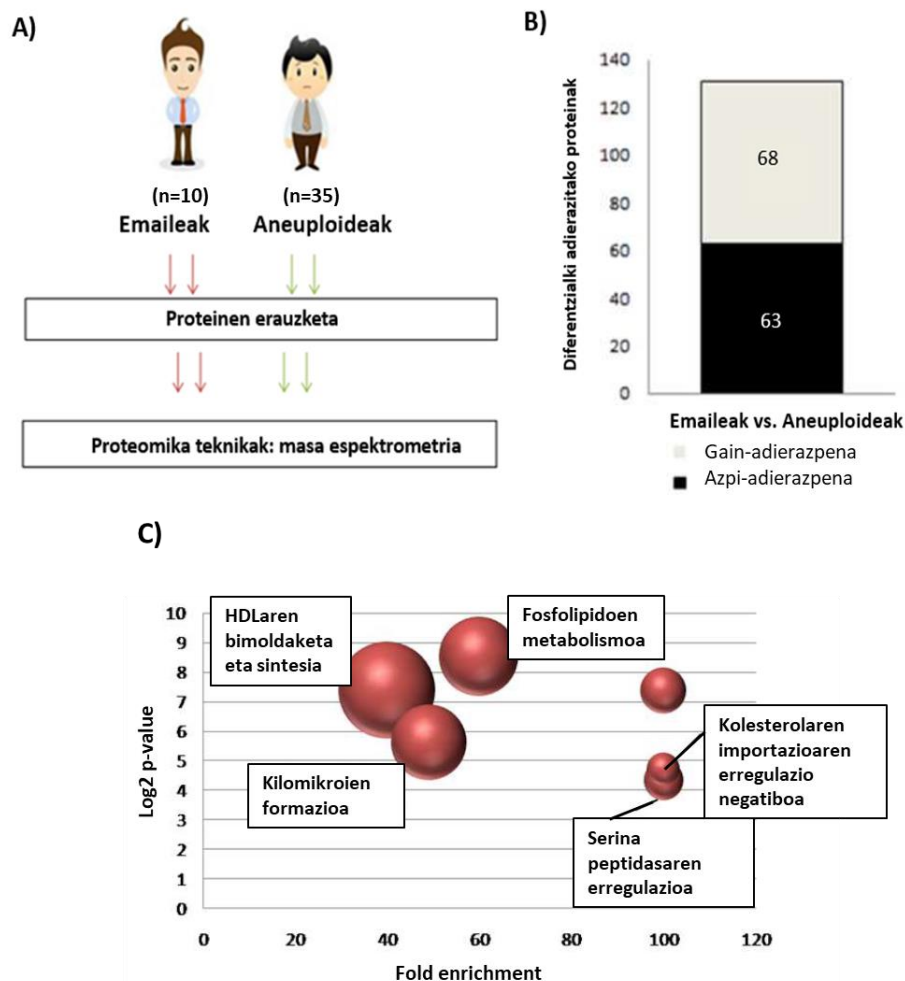
Taldeen arteko proteinak konparatzeko, proteomika kuantitatiboa egin zen, markatze isotopikoan oinarritutako Tandem Mass Tag 6-plex (TMT) erreaktiboa erabiliz. Ondoren, peptidoak zatikatu ziren eta alderantzizko faseko kromatografia likidoaren bidez bereizi ziren. Azkenik, tandem-masa espektrometria bidez aztertu ziren (LC-MS/MS) Euskal Herriko Unibertsitateko Ikerketa Zerbitzu Orokorretako Proteomika Unitatean (SGIker) (**1A Irudia**).

Masa espektrometriatik eratorritako emaitzen estatistika egiteko eta laginen arteko ratioak kalkulatzeko Perseus programa erabili zen. Modu honetan, bi taldeen artean diferentzialki adierazitako 131 proteina aurkitu ziren, hauetako 68 gain-adierazita eta 63 behe-adierazita zeudelarik pazienteen taldean (**1B Irudia**).

Horrez gain, gene ontologian oinarritzen diren analisiak egiteko Panther tresna informatikoa erabili zen, eta energia metabolismoarekin erlazionatutako proteinak izan ziren bi taldeen artean

aldaketa gehien pairatzen zituztenak. Konkreteki, lagin aneuploideek metabolismo lipidikoa osatzen duten proteinen gehiegizko adierazpena zutela aurkitu genuen (**1C Irudia**).

1. Irudia. A) Ikerketako lan fluxua. B) Semen emaileen eta aneuploidiadun pazienteen artean diferentzialki adierazitako proteinak. C) Gene ontologia analisia diferentzialki adierazitako proteinak parte hartzen duten prozesu biologikoak aztertuz.

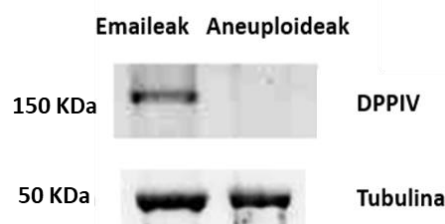


3.2 Biomarkatzaile espermatozoiden gisa identifikatutako xede-proteinen balio klinikoa aztertzea

Bi taldeen artean diferentzialki adierazita zeuden proteinen artean, mintzeko proteinetan zentratu genuen gure analisia, biomarkatzaile gisa baliogarria izan zitekeen proteina bat aukeratzeko. Identifikatutako mintzeko proteina guztien artean, dipeptidil-peptidasa (DPPIV) hautatzea erabaki zen, antigorputz komertziala zuelako eta taldeak harekin esperientzia zuelako. DPPIV, adenosina deaminasa proteina konplexu sortzailea 2 edo CD26 (26. bereizpen-klusterra) izenez ere ezagutzen dena, II. motako glikoproteina bat da, eta espermatozoiden gainazalean dago. Funtzio anitzeko entzima gisa jokatzen du, substratu ugari degradatuz, eta diabetesa eta obesitatea bezalako gaixotasun metabolikoekin erlazionatuta dago.

DPPIV proteinen balio klinikoa aztertzeko, bi taldeen artean proteina honek duen adierazpen diferentziala aztertu genuen. Western blot bidez, DPPIV mintz plasmatikoko proteinak aneuploidiak dituzten espermatozoidetan bere adierazpena galtzen duela balioztatu genuen, emaileetan adierazpena mantentzen duelarik (**2.Irudia**).

2. Irudia. DPPIV proteinaren adierazpena emaille eta aneuploideen taldeetan kontrol positiboarekiko (Tubulina).



4. Ondorioak

Espermatozoideen aneuploidiak errutinazko semen analisisian aztertzen ez direnez eta hauek hautematean tratamendu eraginkorrik eskaini ezin denez, beharrezkotzat jotzen dugu diagnostiko espermatikoko teknika berriak garatzea.

Lan honetan aneuploidiak dituzten espermatozoideen eta semen emailleen mintz plasmatikoko proteinen artean desberdintasunak daudela frogatu dugu proteomika teknikak erabiliz. Gainera, aldaketak jasaten dituzten proteinen artean gehienak metabolismo energetikoarekin lotuta daudela ikusi dugu. Beraz, aneuploidiak dituzten espermatozoideetan metabolismo energetikoa asaldatuta dagoela ondorioztatu dezakegu.

Bestalde, bi taldeen artean aldaketak jasan dituzten proteinei erreparatuz, DPPIV proteinaren jarrera aztertzean, aneuploidiak dituzten espermatozoideetan adierazpena galtzen duela frogatu dugu. Hau kontuan izanda, eta DPPIV espermatozoidearen mintz plasmatikoko proteina bat dela gehituz, kromosomikoki normalak diren espermatozoideak aukeratzeko biomarkatzaile gisa erabili ahal izango litzateke. Honela, lagin seminaletik espermatozoide aneuploideak baztertu ahal izango genituzke lagina suntsitu gabe eta espermatozoideetan aneuploidiak dituzten gizonezkoei lehen baliabide terapeutikoa eskainiz.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Ikerketa honen bidez, espermatozoideen fisiologia gehiago ezagutzea eta hautaketa espermatikoko teknikak hobetzea dugu helburu. Gure lanetik abiatuta, kromosomikoki normalak diren espermatozoideak hautatzeko gailu mediku bat sortzeko teknologia aurkeztzen dugu. Gailu horrek, espermatozoideetan aneuploidiak dituzten gizonezkoentzako lehen baliabide terapeutikoa suposatuko luke eta LUTen arrakasta-tasak hobetzen lagunduko luke. Horrela, ugalketa-osasuna hobetzen eta familia-plangintza hobetzen lagunduko genioke gizarteari. Gainera, LUTen arrakasta-tasak hobetzeak pazienteen eta osasun-zerbitzu publiko eta pribatuen kostu pertsonal eta ekonomikoak murriztea eragingo luke. Guzti horrek eragin positiboa izango luke osasun, gizarte eta ekonomia mailan, prozesu terapeutikoak laburtzea eta aurrezpen ekonomikoa ekarriko bailuke.

6. Erreferentziak

- Aran, B., Blanco, J., Vidal, F., Vendrell, J. M., Egozcue, S., Barri, P. N., Egozcue, J., & Veiga, A. (1999). Screening for abnormalities of chromosomes X, Y, and 18 and for diploidy in spermatozoa from infertile men participating in an in vitro fertilization-intracytoplasmic sperm injection program. *Fertility and Sterility*, 72(4), 696-701. [https://10.1016/S0015-0282\(99\)00307-6](https://10.1016/S0015-0282(99)00307-6)
- Egea, R., Puchalt, N., Escrivá, M., & Varghese, A. (2014). OMICS: Current and future perspectives in reproductive medicine and technology. *Journal of Human Reproductive Sciences*, 7(2), 73-92. <https://10.4103/0974-1208.138857>

- Egozcue, J., Blanco, J., Anton, E., Egozcue, S., Sarrate, Z., & Vidal, F. (2003). *Genetic Analysis of Sperm and Implications of Severe Male Infertility—A Review*. Elsevier BV. [https://10.1016/s0143-4004\(03\)00186-3](https://10.1016/s0143-4004(03)00186-3)
- Garrido, N., Garrido, N., Remohí, J., Antonio Martínez-Conejero, J., García-Herrero, S., Pellicer, A., & , M. (2008). *Garrido et al*
- Inhorn, M. C., & Patrizio, P. (2015). Infertility around the globe: new thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21st century. *Human Reproduction Update*, 21(4), 411-426. <https://10.1093/humupd/dmv016>
- Macklon, N. S., & Boomsma, C. M. (2010). Recurrent implantation failure. *Early Pregnancy* (pp. 213-226). Cambridge University Press. <https://10.1017/CBO9780511777851.021>
- Martínez-Heredia, J., de Mateo, S., Vidal-Taboada, J. M., Ballescà, J. L., & Oliva, R. (2008). Identification of proteomic differences in asthenozoospermic sperm samples. *Human Reproduction (Oxford)*, 23(4), 783-791. <https://10.1093/humrep/den024>
- Nohales, M., Remohí, J., Pellicer, A., & Garrido, N. (2012). *Factores moleculares de infertilidad en el espermatozoide más allá del Manual de la Organización Mundial de la Salud de 2010 Spermatozoa infertility molecular factors beyond the World Health Organization 2010 manual*
- Oliva, R., Martínez-Heredia, J., & Estanyol, J. M. (2008). Proteomics in the Study of the Sperm Cell Composition, Differentiation and Function. *Archives of Andrology*, 54(1), 23-36. <https://10.1080/19396360701879595>
- Said, T. M., & Land, J. A. (2011). Effects of advanced selection methods on sperm quality and ART outcome: a systematic review. *Human Reproduction Update*, 17(6), 719-733. <https://10.1093/humupd/dmr032>
- Xu, W., Hu, H., Wang, Z., Chen, X., Yang, F., Zhu, Z., Fang, P., Dai, J., Wang, L., Shi, H., Li, Z., & Qiao, Z. (2012). Proteomic characteristics of spermatozoa in normozoospermic patients with infertility. *Journal of Proteomics*, 75(17), 5426-5436. <https://10.1016/j.jprot.2012.06.021>
- Zegers-Hochschild, F., Adamson, G. D., de Mouzon, J., Ishihara, O., Mansour, R., Nygren, K., Sullivan, E., & van der Poel, S. (2009). The International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) Revised Glossary on ART Terminology, 2009. *Human Reproduction (Oxford)*, 24(11), 2683-2687. <https://10.1093/humrep/dep343>
- Zhang, Z., Zhu, L., Jiang, H., Chen, H., Chen, Y., & Dai, Y. (2015). Sperm DNA fragmentation index and pregnancy outcome after IVF or ICSI: a meta-analysis. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 32(1), 17-26. <https://10.1007/s10815-014-0374-1>

7. Eskerrak eta oharrak

Ainize Odriozolak doktoretza aurreko beka bat jaso zuen Eusko Jaurlaritzaren eskutik proiektu hau osatzeko. Proiektu hau Carlos III Osasun Institutuaren (SCIII), Osasun Ministerioaren eta Eusko Jaurlaritzako Osasun Sailaren laguntzekin egin zen. Proteomika teknikak SGiker-eko Analisi Zerbitzuarekin elkarlanean egin ziren.