

EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS EN EL ESPERMATOZOIDE DE RATAS DIABÉTICAS

¹Dra. Esmeralda Rodríguez-Miranda, ²Dr. Juan José Acevedo Fernández, ³Biol. Elizabeth Negrete León, ⁴Dr. Alberto Darszon, ⁵Dra. Carmen Beltrán.

Resumen— La diabetes es una enfermedad crónico-degenerativa que aparece cuando el páncreas no produce insulina suficiente o cuando el organismo no la utiliza eficazmente. El efecto de la diabetes no controlada es la hiperglucemia que con el tiempo daña gravemente muchos órganos y sistemas, especialmente los nervios y los vasos sanguíneos. Además la hiperglucemia crónica tiene efecto directo en la fisiología del espermatozoide que impacta negativamente en la fertilidad masculina. El objetivo principal de este trabajo es evaluar la expresión diferencial de algunas proteínas que participan en las funciones más importantes del espermatozoide: la movilidad y/o la reacción acrosomal en un modelo de rata con diabetes experimental. Nuestros resultados preliminares indican que existe una diferencia importante en el nivel de expresión de SNAP25, una proteína SNARE que juega un papel central en la fusión de membranas y que participa en la reacción acrosomal.

Palabras clave—Diabetes mellitus, reacción acrosomal, espermatozoide de rata

Introducción

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad metabólica crónico-degenerativa caracterizada por la hiperglicemia, la cual resulta de la absoluta o relativa deficiencia de la secreción o acción de la insulina en órganos periféricos. La DM se clasifica en cuatro categorías atendiendo al mecanismo subyacente que causa la hiperglucemia: DM tipo I (DM1) donde existe una insuficiencia absoluta de insulina; DM tipo 2 (DM2) el cuerpo no produce suficiente insulina o las células no hacen uso de ésta; DM gestacional (DMG) que aparece durante el embarazo. Existen otros tipos de DM causados por afecciones como endocrinopatías, defectos genéticos, uso de fármacos o sustancias químicas, entre otros. Existe evidencia clínica, preclínica y epidemiológica que indican a la hiperglucemia crónica derivada por la DM de cualquier tipo, afecta muchos órganos y puede causar complicaciones graves sobre los vasos sanguíneos y nervios, provocando la vasculopatía y neuropatía (retinopatía, nefropatía, enfermedad cardiovascular y neuropatía) (OMS, 2016). Además de estas complicaciones crónicas, también se ha reportado que la DM afecta la fertilidad masculina (Dinulovic y Radonjic, 1990). El aumento de la aparición de DM entre población cada vez más joven es preocupante ya que afecta la fertilidad en hombres en edad reproductiva. Además, estudios recientes en tasas de fertilidad revelan que el aumento de la incidencia de la DM está relacionada con la disminución de nacimientos y aumento de infertilidad masculina.

Fisiología del espermatozoide

Para que ocurra la fecundación, el espermatozoide tiene un largo proceso de preparación y maduración que ocurre durante su recorrido por el epidídimo y el tracto genital femenino. Aún se desconocen algunos aspectos importantes de los mecanismos moleculares que utiliza el espermatozoide durante su viaje para encontrar al óvulo y

¹ ¹Dra. Esmeralda Rodríguez-Miranda es profesor del Departamento de Medicina y Nutrición de la División Ciencias de la Salud de la Universidad de Guanajuato Campus León y actualmente se encuentra en estancia sabática en el Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México. esmermmx@yahoo.com.mx

² Dr. Juan José Acevedo Fernández es profesor de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Juan.acevedo@uaem.mx

³ Biol. Elizabeth Negrete León, es profesor de Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos. elizabeth.negrete@uaem.mx

⁴ Dr. Alberto Darszon es Investigador y Jefe del Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología Universidad Nacional Autónoma de México. darszon@ibt.unam.mx

⁵ Dra. Carmen Beltrán es Investigadora del Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología Universidad Nacional Autónoma de México. Autor corresponsal. beltran@ibt.unam.mx

fusionarse con él aún se desconocen. Se pueden definir tres procesos fundamentales previos a la fecundación: la activación de la movilidad, la capacitación y la reacción acrosomal (RA).

La RA es un evento esencial que involucra cambios en la permeabilidad a Ca^{2+} que dirigen la exocitosis del acrosoma, es decir, la fusión de la membrana del acrosoma con la membrana plásmática liberándose su contenido. El acrosoma, es una vesícula que proviene del aparato de Golgi durante el proceso de espermatogénesis; en el espermatozoide maduro el acrosoma es una poza que almacena Ca^{2+} con un pH luminal de ~ 5.3 (Nakanishi et al 2001), que contiene enzimas hidrolíticas cuya función es degradar las glucoproteínas de la matriz externa del óvulo. Se sabe que el pH en el lumen del acrosoma aumenta durante la capacitación y esta alcalinización es un paso crítico para la liberación de Ca^{2+} del acrosoma durante la RA (Chávez et al 2017). El acrosoma contiene proteínas secretoras empaquetadas formadas durante la espermatogénesis. Los trabajos realizados hasta el momento sobre el estudio de las proteínas que se encuentran en el acrosoma, se han enfocado particularmente en la identificación de proteínas solubles (Guyonnet et al., 2012).

La exocitosis es un proceso altamente regulado que consiste de múltiples etapas claramente definidas funcional y morfológicamente, como: el reclutamiento, la selección, el anclaje y el acoplamiento de vesículas secretoras con la membrana plasmática, el cebado de la maquinaria de fusión y la fusión de membranas activada por Ca^{2+} . Después de la fusión, la membrana alrededor de la vesícula secretora se incorpora a la membrana plasmática y el gránulo libera su contenido. Las proteínas involucradas en estos procesos pertenecen a varias familias altamente conservadas: Rab GTPasas, SNAREs (receptores solubles de proteína de unión a NSF), α -SNAP (proteína de unión a α -NSF), NSF (factor sensible a N-etilmaleimida), Munc13 y 18, complexinas y sinaptotagminas (Tomes 2015). La exocitosis del acrosoma, es impulsada por isoformas de la misma maquinaria de fusión proteica mencionada anteriormente, con sus funciones orquestadas en una cascada de señalización jerárquicamente organizada y unidireccional. Además del Ca^{2+} , regulador de la exocitosis universal, esta cascada incluye otros segundos mensajeros como el diacilglicerol, el inositol 1,4,5-trifosfato y el AMPc, así como las enzimas que los sintetizan y sus proteínas blanco. De especial interés es la proteína de unión a AMPc Epac (proteína de intercambio activada directamente por AMPc), debido en parte a su actividad enzimática hacia la proteína G, Rap. La activación de Epac y Rap conducen a una señal de Ca^{2+} altamente localizada que, junto con el ensamblaje del complejo SNARE, gobierna las etapas finales de la exocitosis. La fuente de este Ca^{2+} liberable es el propio acrosoma (Tomes 2015).

La DM y la fisiología del espermatozoide

Se ha observado en modelos animales que la DM afecta la fertilidad a varios niveles, la calidad espermática, la histopatología del testículo y en la síntesis y secreción de testosterona, en la eyaculación. Se sabe que en los hombres con esta enfermedad se afecta la producción de testosterona y por lo tanto la calidad de los espermatozoides. Estos pacientes tienen un índice 60 por ciento mayor de fragmentación de DNA espermático. Cuando la enfermedad no se controla existe una disminución progresiva de la movilidad de los espermatozoides, así como un mayor índice de alteraciones en su forma. Sin embargo, otros estudios reportan que en muestras de pacientes con diabetes el examen rutinario inicial con microscopio, las muestras de semen parecen normales, salvo por una ligera disminución del volumen. Los diabéticos tienen significativamente mermada su capacidad de reparar el ADN del espermatozoide, por lo cual, una vez dañado el mismo, no se puede restaurar. Se sabe que la calidad del ADN del espermatozoide, está asociada a una menor calidad del embrión, a una menor tasa de implantación de los embriones, a una mayor incidencia de abortos espontáneos, y a algunas enfermedades infantiles graves, en especial a algunos cánceres infantiles.

Por otro lado se han encontrado productos finales de glicación avanzada (AGE, por sus siglas en inglés) en el tracto reproductivo masculino en muchas complicaciones diabéticas están implicados de forma determinante en el deterioro del ADN.

Justificación

La DM es la enfermedad crónica que más aumenta en el mundo. Con el ritmo de crecimiento actual, se calcula que en 2025 unos 300 millones de personas serán diabéticas, el doble que en 1995 (Levine et al 2017), coincidiendo con este ascenso, la infertilidad masculina también se ha disparado en los últimos años. El incremento del número de

varones diagnosticados con diabetes a una edad cada vez más temprana ha coincidido con una preocupación mundial por la fertilidad masculina. La fertilidad en pacientes con diabetes se ha limitado a análisis clínicos convencionales, como la morfología, la concentración o la movilidad y en algunos casos la evaluación de la integridad del DNA, siendo este último solo para fines de investigación. En ese sentido, no existen estudios reportados que demuestren que la diabetes influye negativamente en la fertilidad masculina que involucre el nivel de expresión de proteínas que participen en la RA.

En este proyecto se plantea comparar el nivel de expresión de SNAP25, de las RabGTPases, Rab3A, Rab27, en espermatozoides de ratas sanas y diabéticas.

Descripción del Método

Animales

Se utilizaron seis ratas macho de la cepa Wistar, con un peso de 350 - 450 g, las cuales se dividieron en dos grupos (Control y Diabéticas). Las ratas las proporcionó el bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos. La manipulación y eutanasia de los animales se realizó de acuerdo a las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio señalado en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

Inducción de diabetes experimental

A las ratas se les administraron 200 mg/kg de aloxana (2244-11-3 Sigma-Aldrich) vía intraperitoneal. Se registró el peso corporal y el nivel de glucosa antes de la inducción y posterior a esta cada tercer día durante las siguientes dos semanas. Los animales con valores de glucosa > 150 mg/dl se consideraron como diabéticas.

Obtención de muestra

Los espermatozoides de las ratas Control y Diabéticas se obtuvieron del epidídimo de acuerdo a lo reportado por Tulsiani *et al* (1989). Brevemente, las células móviles obtenidas por la técnica de swim up en medio TYH no capacitante pH 7.4 (en mM: 119.3 NaCl, 4.7 KCl, 0.51 Piruvato de sodio, 1.71 CaCl₂ · 2H₂O, 1.2 KH₂PO₄, 1.2 MgSO₄ · 7H₂O, 5.56 Glucosa, 20.0 HEPES), se colocaron sobre un gradiente discontinuo de percoll (80, 60, 40 y 10%), obteniéndose el pico en la interfase 60/40%. Para la obtención de acrosomas, se siguió el protocolo reportado (Walensky y Snyder, 1995) como se describe a continuación. La muestra de espermatozoides se sonicó seis veces durante 10 segundos a 4°C, posteriormente se diluyó con igual volumen de sacarosa 1.8 M y se colocó sobre un gradiente discontinuo de sacarosa conteniendo volúmenes iguales de las soluciones: 2.2 M/2.05 M de Sacarosa/PBS/EGTA. Después de centrifugar a 100,000 xg durante 90 minutos se recuperaron por la parte superior del tubo, cuatro fracciones (I-IV) de las cuales la primera contiene los acrosomas. Las bandas se resuspendieron en Triz 50 mM-HCl pH 7.4, EGTA 1mM y β- mercaptoetanol 1mM y se lavaron por centrifugación a 35 000g x 40 min. Las fracciones colectadas se almacenaron a -70 °C hasta su uso.

Determinación de proteína

La concentración de proteína de las muestras obtenidas del gradiente de sacarosa se cuantificó con un método semicuantitativo utilizando papel filtro y azul de Coomassie R-250 (Loza-Huerta *et al.*, 2013). Brevemente, se dejó secar 1 µl de proteína en papel filtro (3MM, Whatman) y posteriormente se tiñó con 0.5% de azul de Coomassie R-250 en metanol 50%/ácido acético 50% incubando por 10 minutos con agitación suave. Después de este tiempo, el papel filtro se destiñó con Metanol 20%/ácido acético 7.5% incubando con agitación suave durante 30 minutos. La determinación de proteína se hizo comparando la intensidad de coloración azul de cada mancha con una curva estándar de albumina de suero bovino (BSA; 0.1-2 mg/ml) que se hizo en paralelo.

Western blot (WB)

Las proteínas de las fracciones obtenidas del gradiente de sacarosa de las ratas Control y Diabéticas se separaron en un gel de poliacrilamida desnaturalizante (PA-SDS) al 10 %, transfirieron a una membrana de polifluoruro de vinilideno (Immobilone-P) durante 30 minutos a 0.5 Amp en una cámara de transferencia semiseca (Bio-Rad). Los sitios inespecíficos de las proteínas transferidas se bloquearon con leche al 5% en amortiguador salino (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl pH 7.6) TBS conteniendo 0.1% de Tween 20 (TBS-T), por 1 hora a temperatura ambiente. Después de este tiempo, la membrana se incubo toda la noche con el anticuerpo primario anti SNAP25 (sc 7534 Santa Cruz Biotechnology Inc.) (1:200) diluido en leche al 5% en TBS-T. Después de lavar el anticuerpo primario tres veces con-TBS-T, se incubó con el anticuerpo secundario anti cabra durante 1 hora.

Posteriormente, el anticuerpo secundario e lavo (Tres veces/10 min), con TBS y las proteínas unidas al anticuerpo primario se revelaron por quimioluminiscencia (SuperSignal West Pico Chemiluminiscent Substrate Cat. 34080 Thermo Sc.), exponiendo las membranas por diferentes tiempos a un film de autoradiografía.

Disposición final de Residuos Peligrosos Biológicos Infecciosos

Todos los residuos peligrosos se dispusieron de acuerdo a la norma oficial mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002 que refiere a la Protección ambiental- Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.

Resultados y Discusión

La RA es un proceso que se lleva a cabo en los espermatozoides de mamíferos e involucra la fusión de las membranas del acrosoma y plasmática que resulta en la exocitosis del contenido de éste. En condiciones fisiológicas, si la RA no ocurre, el espermatozoide es incapaz de fecundar al óvulo. Se ha demostrado que en la RA participan las mismas moléculas que actúan en la fusión y exocitosis de vesículas en otros sistemas celulares, tales como SNAP25, Rab3, RAb27. Por otro lado, se tiene evidencia en el laboratorio que en ratas diabéticas la RA disminuye ~ 40 aproximadamente (datos no publicados). En una primera aproximación y con la idea de empezar a evaluar la expresión diferencial de proteínas en espermatozoides de ratas diabéticas, decidimos evaluar la presencia de la proteína SNAP25 en las diferentes fracciones de un gradiente de sacarosa donde se separaron espermatozoides sonicados tanto de ratas control como de diabéticas. Como se mencionó en la introducción, SNAP25 juegan un papel central en la fusión de membranas y en la exocitosis de las vesículas (Kádková et al 2018), que ocurre en la RA. La tabla 1 muestra que el peso corporal de las ratas diabéticas (con 11 semanas de evolución de la enfermedad) es menor comparado con el de las ratas control mientras que el nivel de glucosa de las ratas del grupo experimental previo a la eutanasia aumentó más de 4 veces (de 108 ± 6 a 440 ± 212 mg/dl).

Tabla 1. Peso y nivel de glucosa de ratas macho control y diabéticas.

Grupo	Peso (g)	n	Glucosa (mg/dl)	n
Control	445 ± 9	3	108 ± 6	3
Diabéticas	374 ± 34	3	440 ± 212	3

Los espermatozoides sonicados de las ratas, se separaron en un gradiente de sacarosa del cual se obtuvieron las fracciones I, II y III que contienen acrosomas, flagelos y cabezas + flagelos respectivamente (Walensky y Snyder, 1995). La fig. 1A muestra el patrón electroforético (PA-SDS al 10%) de las proteínas de las fracciones I-III, el WB de las mismas revelado con anti-SNAP25 (Fig. 1B) y como control de carga, la membrana usada para el WB teñida con negro de amido (Fig. 1C). Sorprendentemente en el WB podemos ver que se muestra que SNAP25 está en las fracciones II y III de proteína de ratas control pero no en las de ratas diabéticas. Estos resultados están de acuerdo y apoyan los datos clínicos de pacientes diabéticos no controlados donde se observa una disminución en la calidad espermática. Es importante hacer notar que aunque SNAP25 debería verse también en la fracción acrosomal (I), no se observa debido a que la cantidad de proteína obtenida es mucho menor comparada con la de las fracciones II y III.

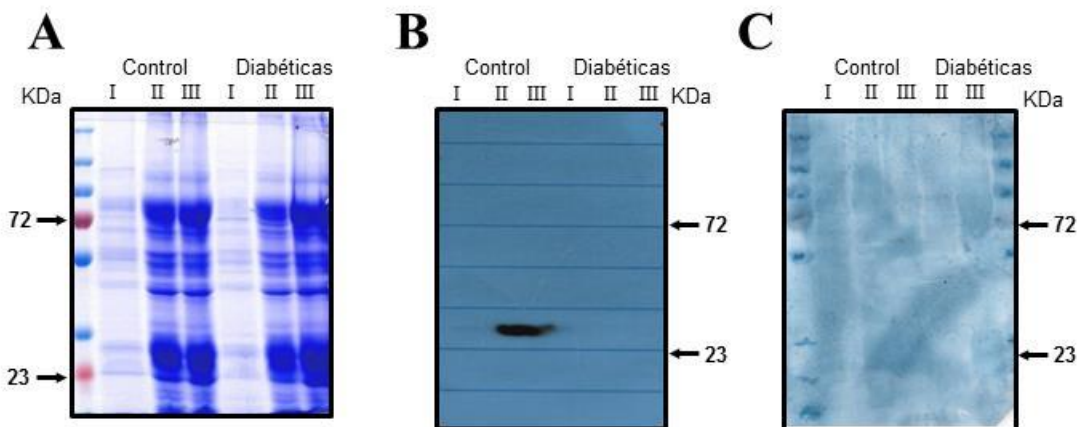


Figura 1 Perfil electroforético (A) y westernblot con anti-SNAP25 (B) de las fracciones I, II y III de un gradiente de sacarosa, tinción con negro de amido (C). Las muestras se separaron en un gel de PA-SDS al 10% y cada carril se cargó con 5 µl de proteína.

Dentro de nuestras perspectivas se encuentra identificar las RabGTPases, Rab3A, Rab27, en espermatozoides de ratas sanas y diabéticas con el fin de dilucidar los mecanismos afectados por la diabetes.

Bibliografía

- Chávez JC, De la Vega-Beltrán JL, José O, Torres P, Nishigaki T, Treviño CL, Darszon A (2017) Acrosomal alkalization triggers Ca²⁺ release and acrosome reaction in mammalian spermatozoa. *J Cell Physiol*. Nov 14. doi: 10.1002/jcp.26262.
- Dinulovic D, Radonjic G (1990) Diabetes Mellitus/Male Infertility, *Archives of Andrology*, 25:3, 277-293, DOI: 10.3109/01485019008987617
- Guyonnet B, Zabet-Moghaddam M, Susan SanFrancisco S, Cornwall GA (2012) Isolation and Proteomic Characterization of the Mouse Sperm Acrosomal Matrix Molecular & Cellular Proteomics 11: 10.1074/mcp.M112.020339, 758-774
- Kádková A, Radecke J, Sørensen JB. 2018 The SNAP-25 protein family. *Neuroscience*. Sep 26. pii: S0306-4522(18)30618-3. doi: 10.1016/j.neuroscience.2018.09.020. Review
- Levine H, Jørgensen N, Martino-Andrade A, Mendiola J, Weksler-Derri D, Mindlis , Pinotti R, Swan SH. 2017 Temporal trends in sperm count: a systematic review and meta-regression analysis. *Hum Reprod Update*. 1;23(6):646-659. doi: 10.1093/humupd/dmx022. Review
- Loza-Huerta A, Vera-Estrella R, Darszon A, Beltrán C (2013) Certain *Strongylocentrotus purpuratus* sperm mitochondrial proteins co-purify with low density detergent-insoluble membranes and are PKA or PKC-substrates possibly involved in sperm motility regulation. *BBA-General Subjects* 1830 (11) 5305-5315.
- Nakanishi T1, Ikawa M, Yamada S, Toshimori K, Okabe M. (2001) Alkalinization of acrosome measured by GFP as a pH indicator and its relation to sperm capacitation *Dev Biol*. 1;237(1):222-31.
- Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Recuperado de : <http://www.sagarpa.gob.mx/Dgg/NOM/062zoo.pdf>
- Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo. Recuperado de: <http://biblioteca.semarnat.gob.mx/janium/Documentos/Ciga/agenda/DOFsr/DO3015.pdf>
- Organización Mundial de la Salud 2016 Informe Mundial sobre la diabetes Resumen de orientación. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/204877/1/WHO_NMH_NVI_16.3_spa.pdf?ua=1
- Tomes CN. 2015 The proteins of exocytosis: lessons from the sperm model. *Biochem J*. Feb 1;465(3):359-70. doi: 10.1042/BJ20141169. Review.
- Tulsiani DR, Skudlarek MD, Orgebin-Crist MC. (1989) Novel alpha-D-mannosidase of rat sperm plasma membranes: characterization and potential role in sperm-egg interactions. *J Cell Biol*. 109(3):1257-67.

Walensky LD and Snyder SH 1995 Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptors Selectively Localized to the Acrosomes of Mammalian Sperm. *J Cell Bio*, **130**(4):857-869