

LA PROTEÍNA QUINASA ACTIVADA POR AMP, AMPK, EN EL ESPERMATOZOIDE HUMANO

Calle Guisado, Violeta

El grupo de investigación SINTREP (Señalización intracelular y Tecnología de la reproducción), al cual pertenezco desde enero de 2015, tiene una larga trayectoria en el estudio de la fisiología del espermatozoide y de la calidad seminal en diversas especies. Está conformado por investigadores de distintas áreas como fisiología, bioquímica, reproducción animal, veterinaria... esto consigue que podamos aunar la ciencia básica, en la que utilizamos sobre todo técnicas experimentales de biología molecular y señalización, con la aplicación directa de los resultados, transfiriendo estos al campo veterinario y, en esta última etapa al campo de la reproducción asistida humana. Los investigadores debemos estar concienciados con el valor que podemos dar a nuestros resultados de laboratorio y aprender a transferir, no solo esos datos sino la importancia intrínseca de la investigación científica para la sociedad.

1. El espermatozoide de mamíferos y la proteína AMPK

El origen de la vida forma parte de las preguntas esenciales que siempre se ha formulado el ser humano. Teorías, fábulas, supersticiones y todo tipo de imaginario popular giraban en torno a esta materia y aunque había alguna aproximación científica, esta se basaba únicamente en la observación de los fenómenos naturales.

En cuanto al factor masculino en la reproducción, no fue hasta el desarrollo de los primeros microscopios y gracias a Anton van Leeuwenhoek en 1677, que se tuvo real constancia de la existencia de una célula a la que él llamó *espermato-zoos* o animales del semen. De ahí en adelante, tras polémicas de todo tipo, se fue arrojando luz sobre la función del espermatozoide y el proceso fundamental que lleva a cabo: la fecundación del óvulo.

El espermatozoide es una célula altamente especializada cuyas vías de regulación intracelular están basadas fundamentalmente en las modificaciones post-traduccionales de las proteínas, ya que este gameto en su etapa madura no puede llevar a cabo la traducción, y, por tanto, es incapaz de sintetizar nuevas proteínas. Entre esas modificaciones post-traduccionales, una de las más frecuentes es la fosforilación, que está

catalizada por enzimas denominadas quinasas, y es especialmente relevante en la función del espermatozoide, incluyendo el de la especie humana. Adicionalmente, para poder desempeñar su función primordial, que es la fecundación del óvulo, el espermatozoide debe ser capaz de llevar a cabo una serie de procesos fisiológicos como la adquisición de la motilidad, la hiperactivación, la capacitación y la reacción acrosómica, que ocurren durante su paso por el tracto reproductor femenino.

En los años 70 se identificó la proteína quinasa activada por AMP (AMPK), que actúa como un sensor que detecta el estado energético celular y, de manera consecuente, regula el metabolismo. Esta proteína se activa por diferentes mecanismos, por ejemplo, por el aumento intracelular de AMP cíclico (Hardie, Schaffer y Brunet, 2016).

2. El trabajo de investigación

No existía ninguna investigación sobre la AMPK en el espermatozoide hasta el año 2012, en que nuestro grupo de investigación, SINTREP, identificó por primera vez la proteína AMPK en espermatozoides de cerdo (Hurtado de Llera, Martín-Hidalgo, Gil, García-Marín y Bragado, 2012). Desde entonces, nuestro grupo ha mostrado que la AMPK ejerce una función relevante en la regulación de procesos fisiológicos esenciales para la función de este gameto, fundamentalmente en la motilidad espermática (Martín-Hidalgo *et al.*, 2018). A partir de 2012, varios grupos han ampliado la investigación sobre AMPK en espermatozoides, realizando estudios sobre su identificación y función en otras especies de mamíferos o de aves, pero ninguno se había centrado en el espermatozoide de la especie humana. Este hecho cobra relevancia si tenemos en cuenta que en los últimos años ha habido un incremento notable del uso de las técnicas de reproducción asistida en los países desarrollados debido, mayoritariamente, a los cambios en los hábitos reproductivos y al empeoramiento progresivo de la calidad seminal.

En último término, nuestro objetivo es la transferencia de nuestros resultados y de las técnicas utilizadas al campo de la reproducción asistida. En relación a esta posible transferencia de resultados a la reproducción asistida en humanos tenemos una colaboración con clínicas de reproducción asistida humana en Extremadura y con el grupo de reproducción del Centro de Cirugía de Mínima Invasión, favoreciendo la transmisión del conocimiento y la colaboración científica entre los distintos grupos.

En mi tesis doctoral, propusimos la hipótesis de que la AMPK puede representar una nueva vía de señalización intracelular que podría regular las funciones del espermatozoide humano, probablemente

las que dependan en mayor medida del estado energético celular. En los estudios realizados durante estos cinco años, hemos obtenido una serie de resultados experimentales muy interesantes, que han sido publicados en cuatro trabajos en revistas internacionales. Para llevar a cabo los objetivos propuestos, en nuestro laboratorio disponemos de distintas técnicas experimentales como son, entre otras: a) análisis de proteínas en lisados de espermatozoides humanos; b) localización celular de proteínas mediante inmunofluorescencia; c) determinación de la movilidad espermática mediante CASA (Computer Assisted Sperm Analysis); d) determinación de diferentes parámetros como la estabilidad de la membrana plasmática y acrosomal, la viabilidad celular, entre otros, por citometría de flujo.

El análisis de la motilidad del espermatozoide mediante el programa informático ISAS permite evaluar de una manera totalmente objetiva la velocidad y calidad del movimiento de los espermatozoides de una muestra de semen. Mediante el estudio digitalizado y el análisis computarizado del movimiento del espermatozoide se obtiene una aproximación objetiva a las características de la movilidad de estas células germinales. Por otra parte, en nuestro grupo de investigación disponemos de un citómetro de flujo y una gran experiencia en su manejo, lo que nos permite analizar los procesos funcionales de los espermatozoides optimizando los protocolos desarrollados y comprobados en otros laboratorios. El uso de la citometría de flujo está introduciéndose con fuerza en los últimos años en los laboratorios de andrología debido principalmente al elevado número de aplicaciones derivadas de esta técnica, su facilidad de utilización con estas células germinales y el alto número de células analizadas en muy poco tiempo, lo que hace aumentar significativamente la fiabilidad de los análisis.

Los resultados obtenidos por el momento nos han permitido llegar a las siguientes conclusiones:

- 1- Que la proteína AMPK y su forma activa están presentes en el espermatozoide humano como se observa en la Imagen 1.

- 2- Que la proteína AMPK se localiza en el acrosoma, la pieza media y el flagelo y su forma fosforilada (activa) se restringe al flagelo y al acrosoma del espermatozoide humano.

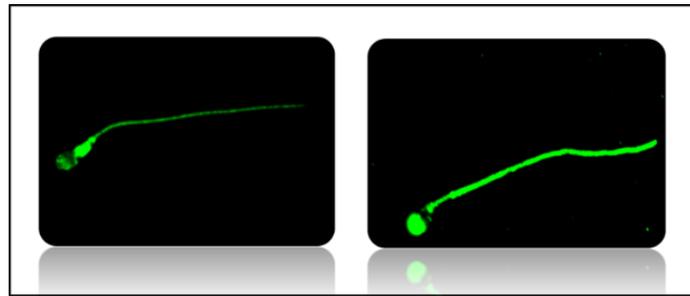


Imagen 1. Proteína AMPK (primera fotografía) y AMPK activa en color verde, en el espermatozoide humano. Esta imagen se consiguió con inmunohistoquímica y microscopía de fluorescencia (Calle, 2019)

- 3- Que la AMPK está más activa en la población de espermatozoides humanos (Shabani Nashtaei *et al.*, 2017). de mayor calidad, lo que nos indica una relación entre esta proteína y la calidad espermática.
- 4- Que la proteína AMPK regula la motilidad del espermatozoide humano.

Estos resultados nos acercan a nuestro objetivo más aplicado que sería optimizar las técnicas de reproducción asistida mediante la modificación del estado de actividad de la AMPK. En última instancia, esto puede ser relevante para los casos en que la motilidad de los espermatozoides está claramente comprometida, como puede darse en la infertilidad por astenozoospermia o baja motilidad espermática.

El desarrollo del trabajo de laboratorio ha dado unos resultados prometedores y con posibilidad de abrir una línea amplia de investigación. Esperamos poder seguir trabajando por este camino, poder generar nuevo conocimiento y seguir aportando a la sociedad con la transferencia de estos resultados.

REFERENCIAS

- Calle Guisado, V (2019). Función y expresión de la proteína quinasa activada por AMP, AMPK, en el espermatozoide humano (Tesis Doctoral). Universidad de Extremadura, Cáceres, España.
- Hardie, D. G., Schaffer, B. E. y Brunet, A. (2016). AMPK: An Energy-Sensing Pathway with Multiple Inputs and Outputs. *Trends in cell biology*, 26, 190-201.
- Hurtado de Llera A, Martín-Hidalgo D, Gil, M. C., García-Marín, L. J. y Bragado, M. J. (2012). AMP-Activated Kinase AMPK Is Expressed in Boar Spermatozoa and Regulates Motility. *PLoSOne*

Martín-Hidalgo, D., Hurtado de Llera, A., Calle-Guisado, V., González-Fernández, L., García-Marín, L. y Bragado, M. J. (2018). AMPK Function in Mammalian Spermatozoa. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(11), 3293, <https://doi.org/10.3390/ijms19113293>

Shabani Nashtaei, M., Amidi, F., Sedighi Gilani, M. A., Aleyasin, A., Bakhshalizadeh, S. Naji, M. y Nekoonam, S. (2017). Protective features of resveratrol on human spermatozoa cryopreservation may be mediated through 5' AMP-activated protein kinase activation. *Andrology*, 5, 313-26.

APUNTES BIOGRÁFICOS

Violeta Calle Guisado (Cáceres, 24 de agosto de 1989). Nació en Cáceres y allí reside actualmente. Licenciada en Biología por la Universidad de Extremadura y de Granada. Máster de Investigación en Ciencias, Máster de Formación del Profesorado en Educación Secundaria y Especialista Universitaria en Reproducción Asistida. Desde junio del 2019, doctora en Salud Pública y Animal, por la universidad de Extremadura y premio extraordinario de doctorado. Perteneciente al grupo de investigación SINTREP (Señalización Intracelular y Tecnología de la Reproducción). Miembro fundador de la asociación ADuEx (Asociación de doctorandos de la Universidad de Extremadura).

Contacto: [**violetacalleguisado@gmail.com**](mailto:violetacalleguisado@gmail.com)