

# Búsqueda de inhibidores de serina proteasas en glándulas accesorias del sistema reproductor masculino

Lucía Zalazar,<sup>1</sup> Marisa Clementi,<sup>2</sup> Miguel W Fornes,<sup>2</sup> Andreina Cesari<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Investigaciones Biológicas (IIB), Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata, CCT-Mar del Plata, CONICET.

<sup>2</sup> Laboratorio de Investigaciones Andrológicas de Mendoza (LIAM, IHEM-CONICET), Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo, CCT-Mendoza, CONICET, Mendoza, Argentina.

Reproducción 2012;27:79-88

## Resumen

Los inhibidores de serina proteasas modulan la fisiología espermática por mecanismos no conocidos. La redundancia de moléculas con actividad similar en el tracto reproductor masculino denota su importancia. Con el objetivo de caracterizar los inhibidores en glándulas accesorias del sistema reproductor masculino se realizó la búsqueda de inhibidores de serina proteasas en distintos órganos de ratón. A partir de fracciones enriquecidas en actividad inhibitoria tanto de tripsina como de proteasas espermáticas provenientes de órganos y glándulas accesorias de ratones machos, se seleccionaron aquellos tejidos con mayor actividad (vesícula seminal y epidídimo). Se emplearon distintas herramientas de proteómica para analizar estas fracciones, como cromatografía de afinidad y electroforesis en 1 y 2 dimensiones seguidas por espectrometría de masa. Este conjunto de metodologías permitió la identificación de SVS IV y SPINK3 en vesícula seminal, además de PI16 en epidídimo. Por otro lado, se realizó una búsqueda *in silico* de inhibidores de serina proteasas a partir de 4 bases de datos cuya expresión se ha predicho o detectado en el tracto reproductor masculino. Los 20 inhibidores de tripsina/quimotripsina que se encontraron se clasificaron según las familias MEROPS o los dominios Pfam. Los resultados de ambas estrategias fueron complementarios.

**Palabras claves.** Inhibidores de serina proteasas, espermatozoide, glándulas sexuales, reproducción.

**Correspondencia:** Andreina Cesari  
E-mail: acesari@mdp.edu.ar

## Screening for serine protease inhibitors in male reproductive accessory glands

### Summary

Serine protease inhibitors modulate sperm physiology through unknown mechanisms. Redundancy of molecules bearing the same activity within the male duct denotes their significance. In order to characterize the population of this kind of inhibitors in accessory glands of the male duct, different approaches were employed to search for serine protease inhibitors in male mice tissues. Tissues with the highest activities were selected from extracts enriched in trypsin inhibitor activity and sperm protease inhibitor activity. Proteomic tools as affinity chromatography and 1D and 2D electrophoresis followed by mass spectrometry were performed on seminal vesicle and epididymis fractions. These methodologies allowed us to identify SVS IV and SPINK3 in seminal vesicle and PI16 in epididymis. On the other hand, *in silico* search for serine protease inhibitors with predicted or demonstrated expression within the male duct of *Mus musculus* was performed using 4 databases. Twenty trypsin/chemotrypsin inhibitors were found and they were classified according to their families (Merops) or their Pfam domains. The results obtained by both strategies were complementary.

**Key words.** Sperm, serine protease inhibitors, sexual glands, reproduction.

## Introducción

El estudio de la infertilidad masculina ha propiciado la realización de trabajos de investigación que permitan comprender las bases celulares y moleculares de la fisiología espermática. Existen dos factores claves que determinan el potencial reproductivo en el hombre: la eficiencia de la espermatogénesis y el funcionamiento de las glándulas accesorias. Por otro lado, se conoce que la adquisición de la capacidad fertilizante del espermatozoide depende de procesos fisiológicos denominados maduración y capacitación espermática.<sup>1-3</sup> La regulación de estos procesos está dada por modificaciones postraduccionales de proteínas pre-existentes o por la adquisición y remoción de proteínas en la superficie espermática, provenientes de secreciones del conducto masculino y de las glándulas accesorias a medida que el espermatozoide transita por el tracto reproductor masculino.<sup>4</sup> La remoción de moléculas de la superficie espermática ocurre en el tracto reproductor femenino, iniciando así la capacitación, evento que regula la señalización espermática.<sup>3</sup> La capacitación del espermatozoide se completa tras un proceso que involucra diversos cambios moleculares, desencadenados por la presencia de altas concentraciones de  $\text{HCO}_3^-$  y  $\text{Ca}^{2+}$  tanto en el fluido seminal como en el tracto reproductor de la hembra, a la vez que se produce una inmediata activación de la motilidad flagelar. El movimiento transmembrana de estos iones regula diferentes vías incluyendo el aumento del pH intracelular y vías dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ .<sup>5</sup>

Existen en el plasma seminal y en las secreciones de las glándulas accesorias inhibidores de serina proteasas que a su vez tienen actividad de tipo *caltrin* (inhibidor de transporte de  $\text{Ca}^{2+}$ ) y se cree que pueden regular la capacitación mediante mecanismos moleculares aún no conocidos. La existencia de los inhibidores de serina proteasas en las glándulas sexuales masculinas de mamíferos ha sido reportada,<sup>6,7</sup> sin embargo, aun cuando las serina proteasas están ampliamente distribuidas en la cabeza del espermatozoide y se ha demostrado que la fertilización se inhibe en presencia de inhibidores de serina proteasas exógenos,<sup>6</sup> las bases moleculares de esta regulación no han sido elucidadas y se desconoce si existe una relación entre la actividad inhibitoria de proteasas y la regulación del calcio.

Los inhibidores de serina proteasas son proteínas ricas en puentes disulfuro, de cadena corta (3-21 kDa) con excepción de las serpinas que per-

tenecen a una clase particular de inhibidores cuyas masas están entre los 45 y 55 kDa. Se clasifican en tres grupos (canónicos, no canónicos y serpinas) dependiendo de su mecanismo de acción<sup>8</sup> y en 20 familias, en base a su homología estructural con proteínas ya caracterizadas.<sup>9</sup>

El objetivo de este trabajo fue el estudio de inhibidores de serina proteasas presentes en fracciones proteicas de glándulas accesorias del tracto reproductor masculino utilizando el modelo de ratón. Para ello se empleó un abordaje de proteómica utilizando fracciones de tejidos del tracto reproductor de ratones machos enriquecidas en actividad inhibitoria contra tripsina y proteasas espermáticas, complementado con un análisis *in silico*.

## Materiales y métodos

### Material biológico

Se emplearon ratones machos adultos de la especie *Mus musculus* de la cepa BalbC y CF-1 (8-12 semanas de edad) mantenidos a temperatura constante (22° C), con un fotoperíodo de 12 horas luz/12 horas oscuridad, a los que se les suministró alimento balanceado y agua *ad libitum*. Los protocolos experimentales están aprobados por el Comité de Ética de la Universidad de Mar del Plata y se llevaron a cabo de acuerdo a las recomendaciones del Instituto de Salud de Estados Unidos (NIH *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*).

Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical e inmediatamente se removieron los epidídimos (E), la vesícula seminal (VS), próstata (P) y testículo (Te). Los órganos se cortaron en segmentos de 0.5 cm<sup>2</sup>, se sumergieron en solución *RNAlater*<sup>®</sup> (Ambion) y se conservaron a -80° C hasta su utilización.

### Obtención de extractos enriquecidos en proteínas de bajo peso molecular

Los tejidos descongelados se colocaron en *buffer* TEN (10 mM Tris-HCl pH 7.5; 1 mM EDTA; 10 mM NaCl) en una relación de 1.5 µl/mg de tejido y luego se realizaron homogenatos empleando el homogeneizador *IKAWERKE T10 basic Ultra-Turrax*<sup>®</sup> con el elemento de dispersión S10N-8G (2 pulsos de 60 segundos con intervalo de 2 minutos). Los homogenatos se centrifugaron a 20.000 x g durante 25 minutos y los sobrenadantes obtenidos se ultracentrifugaron a 76.000 x

g durante 40 minutos a 4° C. Los extractos (sobrenadantes) fueron filtrados a 4° C a través de membranas que retienen moléculas  $\geq 50$  kDa (Biopore) y la fracción no retenida ( $< 50$  kDa) fue concentrada a través de membranas de 3 kDa de corte (Biopore), obteniendo una fracción de proteínas en un rango de 3-50 kDa.

#### *Cuantificación de la actividad inhibitoria sobre serina proteasas*

Medición de la actividad inhibitoria sobre tripsina: extractos totales (T) y fracciones enriquecidas en proteínas de 3-50 kDa (2  $\mu$ g) provenientes de VS, P, E y Te se incubaron durante 4 hs a 37° C, con tripsina (0.1 UI) y 0.5% de azocaseína como sustrato, en 0.1 M *buffer* Tris HCl pH 8.

Medición de la actividad inhibitoria sobre proteasas espermáticas: extractos totales (2  $\mu$ g) y fracciones enriquecidas en proteínas de 3-50 kDa (2  $\mu$ g) se incubaron durante 16 hs a 37° C, con un extracto proteico de espermatozoides capacitados y no capacitados obtenidos a partir de  $0.4 \times 10^6$  células como fuente de enzima y 0.5% de azocaseína como sustrato en 0.1 M *buffer* Tris HCl pH 8.

Se usaron como control 10  $\mu$ g de inhibidor de tripsina de soja (SBTI), 5 mM benzamidina o 3  $\mu$ M  $\alpha$ -1-antitripsina. Las reacciones se detuvieron con 10% TCA y la actividad se cuantificó como la Abs<sub>335nm</sub> en la fracción TCA soluble. Una unidad de actividad proteolítica se definió como la cantidad de proteasa que produce un  $\Delta$ Abs 335 nm = 1.

#### *Cromatografía de afinidad tripsina agarosa*

Proteínas de cada extracto proveniente de los diferentes tejidos (500  $\mu$ g, 3-50 kDa) se incubaron *over night* con 200  $\mu$ l de matriz (Sigma, T 0677) equilibrada con 0.1 M Tris-HCl pH 7.5 a 4° C en un volumen final de 400  $\mu$ l. Luego se recuperó el excedente y se eliminaron las proteínas no retenidas lavando la matriz con 20 volúmenes de *buffer* de equilibrio. Finalmente, se realizaron tres eluciones sucesivas con 200  $\mu$ l de *buffer* 0.1 M glicina- HCl pH 2.2; se neutralizaron con 5  $\mu$ l de 2M Tris HCl pH 9 y dichas fracciones se juntaron en una sola fracción (fracción retenida).

#### *SDS-PAGE*

Se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Laemmli.<sup>10</sup> El porcentaje de acrilamida usado fue de 15% (p/v). La electroforesis se corrió a 20 mA por gel. Las proteínas fueron teñidas con *Coomassie blue coloidal (SimplyBlue™ SafeStain, Invitrogen)*.

#### *Electroforesis en dos dimensiones*

Brevemente, alícuotas de fracciones de epidídimo y vesícula seminal conteniendo 200  $\mu$ g de proteínas se precipitaron con un volumen de 100% acetona fría durante toda la noche a -20° C. Luego se centrifugaron a 20.780 x g a 4° C durante 20 minutos, se realizaron tres lavados con 80% de acetona, centrifugando nuevamente en las mismas condiciones y, finalmente, se realizó un lavado con 100% de acetona, se centrifugó y secó. Dado que la pérdida en masa de proteínas luego de la precipitación es del 50%, cada alícuota contenía aproximadamente 100  $\mu$ g de proteínas. Las proteínas precipitadas se suspendieron en 125  $\mu$ l de *buffer* de rehidratación [8 M urea, 2% p/v CHAPS, 18 mM Dithiothreitol (DTT), 0.5% v/v IPG-*buffer* y azul de bromofenol].

**Primera dimensión:** Las muestras conteniendo 100  $\mu$ g de proteínas fueron sembradas durante la rehidratación (12 hs a temperatura ambiente) en tiras de 7 cm con un rango de pH 3-10 (*Immobiline DryStryp*, GE). El isoelectroenfoco se llevó a cabo en un equipo *Ettan IPGPhor* (GE, *Healthcare*) según el siguiente protocolo: paso I) 300 V, 30 min; paso II) 1.000 V, 30 min en gradiente; paso III) 5.000 V, 80 min en gradiente; y paso IV) 5.000 V, 15 min. Una vez finalizada la corrida, las tiras fueron lavadas con agua bi-destilada y guardadas a -20° C hasta el momento de su utilización. Además de las muestras, se sembró una tira con un estándar de peso molecular en un rango 17.000-89.000 Da y punto isoelectro entre 7.6-3.8 (M3411-1VL, *Sigma-Aldrich*) según las indicaciones del fabricante.

**Segunda dimensión:** Previo a la electroforesis, las tiras fueron incubadas en 8 ml de *buffer* de equilibrio [50 mM Tris-HCl pH 8.8; 6 M urea; 30% (v/v) glicerol; 2% (p/v) SDS y azul de bromofenol], conteniendo 65 mM DTT durante 15 minutos y luego en 8 ml de *buffer* de equilibrio conteniendo 135 mM iodoacetamida por otros 15 minutos a temperatura ambiente. La segunda dimensión fue llevada a cabo mediante SDS-PAGE en un gel 15% (p/v) acrilamida; sellando las tiras al gel vertical (SE250, GE *Healthcare*) con una solución de 25 mM Tris; 250 mM glicina; 0.1% (p/v) SDS; 0.5% (p/v) agarosa y azul de bromofenol. Se realizaron 3 réplicas independientes de cada tejido.

### Identificación de proteínas por espectrometría de masa

Las proteínas obtenidas en la fracción retenida de la cromatografía de afinidad tripsina agarosa y los *spots* que fueron escindidos de los geles en dos dimensiones, se identificaron mediante espectrometría de masa. Las muestras fueron enviadas al CEQUIBIEM (Centro de estudios Químicos y Biológicos por espectrometría MALDI-TOF), Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales-UBA. Allí, los fragmentos escindidos del gel fueron decolorados con 10 mM  $\text{NH}_4\text{CO}_3\text{H}$  en acetonitrilo al 50%. Las piezas de gel se dejaron secar al aire y posteriormente se redujeron las proteínas presentes con 10 mM DTT y se alquilaron con 55 mM iodoacetamida, ambos en 50 mM  $\text{NH}_4\text{CO}_3\text{H}$ . Los fragmentos de gel fueron deshidratados con acetonitrilo y rehidratados con el mínimo volumen posible del *buffer* de digestión que contiene 10 ng/ $\mu\text{l}$  tripsina en 50 mM  $\text{NH}_4\text{CO}_3\text{H}$ . La digestión se realizó durante toda la noche con incubación a 37° C. Los péptidos fueron recobrados de la mezcla de digestión y posteriormente extraídos y sonicados con 30% de acetonitrilo y 0.1% de ácido trifluoroacético (TFA). El extracto peptídico resultante se concentró en *Speed Vac*®, se re-disolvió por sonicación en una solución de la matriz constituida por 3 mg/ml de ácido  $\alpha$ -Ciano-4- Hidroxicinámico disuelto en 70% de acetonitrilo y 0.1% de TFA.

Luego, las muestras peptídicas fueron analizadas en modo TOF-MS y TOFMS/MS en un equipo *MALDI - TOF Ultraflex II* con un láser YAG de 355 nm a una tasa de repetición de 200Hz. Los espectros MS y MS/MS se analizaron utilizando el programa *Mascot* y fueron comparados con la Base de Datos de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

### Búsqueda in silico de inhibidores de serina proteasas

Se realizó una búsqueda *in silico* de inhibidores de serina proteasas presentes en órganos y glándulas accesorias del tracto reproductor de *Mus musculus* empleando la información de 4 bases de datos (*Protein NCBI*, *Unigene NCBI*, *Ensembl* y *MGI*). Los inhibidores se clasificaron de acuerdo a las familias MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk>) o de los dominios Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>).

### Análisis estadístico

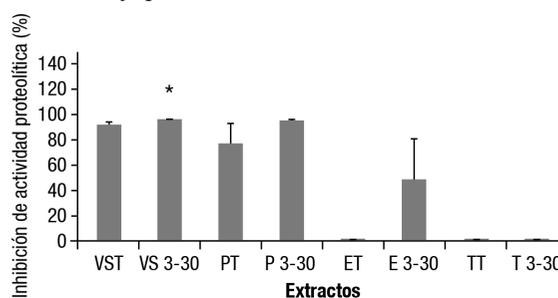
Se analizaron los datos mediante un *test* de *Student's T*. Los resultados se expresaron como el promedio  $\pm$  el error estándar (SEM), y se consideró significativo a partir de un valor de  $p < 0.05$ . Todos los experimentos fueron repetidos 3 veces.

### Resultados

#### Obtención de fracciones enriquecidas en inhibidores de serina proteasas

Se llevó a cabo la caracterización de las fracciones de bajo peso molecular conteniendo inhibidores de serina proteasas en órganos del aparato reproductor en ratones machos. Dado que los inhibidores de proteasas son generalmente moléculas de pequeño tamaño, se seleccionaron las proteínas en un rango de PM 3-50 kDa a partir de fracciones proteicas de vesícula seminal (VS), epidídimo (E), testículo (Te) y próstata (P) de ratón. Se midió la capacidad de estas fracciones de bajo PM de inhibir la actividad de tripsina y se comparó con la de los extractos proteicos totales (T). Se observó que las fracciones de bajo peso molecular presentaban un porcentaje mayor de actividad sobre tripsina en comparación a las respectivas fracciones totales, confirmando el enriquecimiento en actividad inhibitoria de las fracciones de bajo peso molecular (Figura 1), a excepción de la fracción de testículo que no presentó actividad inhibitoria.

**Figura 1.** Actividad inhibitoria sobre tripsina de las fracciones de bajo peso molecular.



Se determinó la capacidad de los inhibidores de reducir la actividad de tripsina sobre azocaseína. Las muestras ensayadas corresponden a la fracción total (T) y a la fracción de 3-50 kDa de vesícula seminal (VS), próstata (P), epidídimo (E) y testículo (Te) de *Mus musculus*. Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición: se consideró el 100% a la actividad de tripsina, siendo el porcentaje de inhibición = 100% - porcentaje de actividad observada en presencia de las distintas fracciones. Una unidad de actividad proteolítica se definió como la cantidad de tripsina que produce un Abs 335 nm = 1, a 37° C en 4 hs. El asterisco indica diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las fracciones de bajo peso molecular y las respectivas fracciones totales.

Por otro lado, se observó que la mayor actividad inhibitoria sobre proteasas espermáticas tanto en espermatozoides capacitados como no capacitados se encontró también en las fracciones de proteínas de bajo peso molecular (Figura 2 A y B). La actividad inhibitoria de estas fracciones fue superior a la observada para inhibidores comerciales (Figura 2 A y B, recuadros) que se sabe que son capaces de inhibir la fertilización.<sup>11</sup> Si bien como era esperable la actividad proteolítica fue más alta en espermatozoides capacitados respecto de los no capacitados (datos no mostrados), los porcentajes de inhibición observados fueron similares a excepción de la fracción de bajo peso molecular de E, que fue más efectiva sobre la actividad proteolítica de espermatozoides capacitados (Figura 2A).

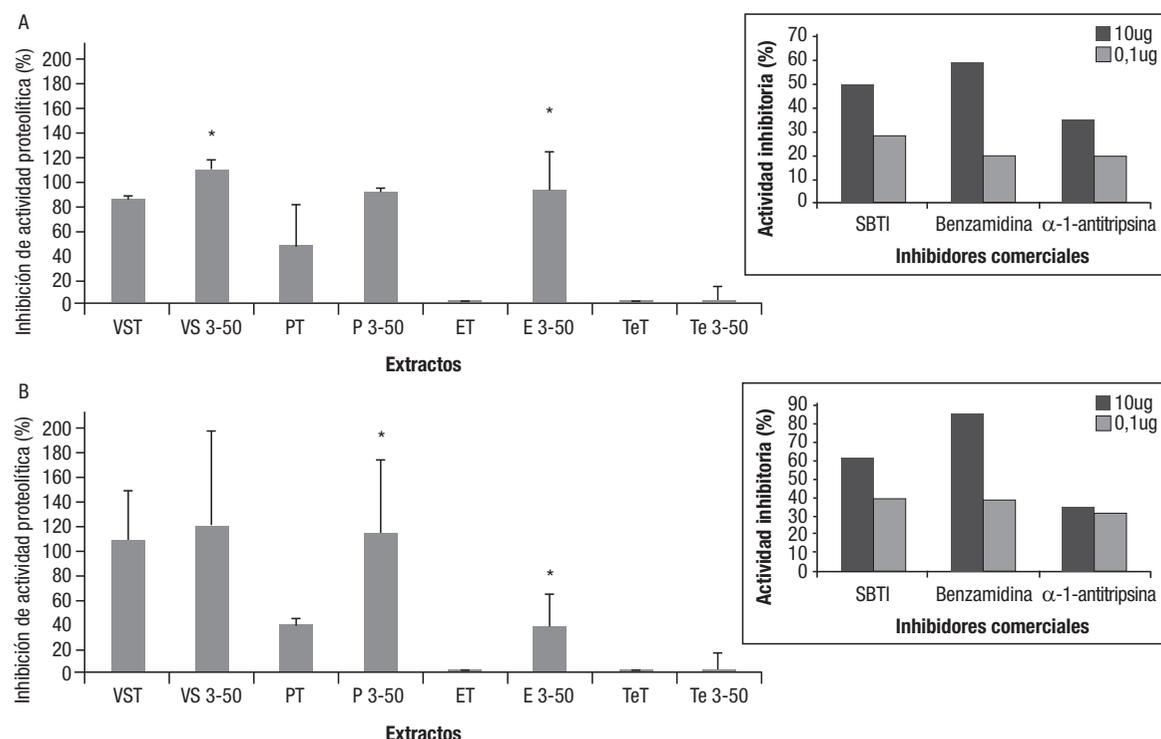
La mayor actividad inhibitoria sobre ambos tipos de actividad proteolítica se observó en la VS, P y E (Figuras 1 y 2), sugiriendo que serían los órganos más ricos en inhibidores de serina proteasas.

**Identificación de inhibidores de serina proteasas en las fracciones enriquecidas en actividad inhibitoria**

Con la finalidad de aislar y hallar la identidad de los inhibidores de serina proteasas contenidos en las fracciones de bajo peso molecular de los tejidos con mayor actividad, cada extracto fue sometido a una cromatografía de afinidad tripsina-agarosa. La fracción retenida en cada columna se analizó mediante huella peptídica identificándose en la fracción de bajo peso molecular de VS, el precursor del inhibidor de serin proteasas, *Serine Protease Inhibitor Kazal type 3* (SPINK3; Gi 6678105; 8.824 kDa), resultado que fue confirmado por la fragmentación de sus péptidos mayoritarios (MS/MS) (Figura 3).

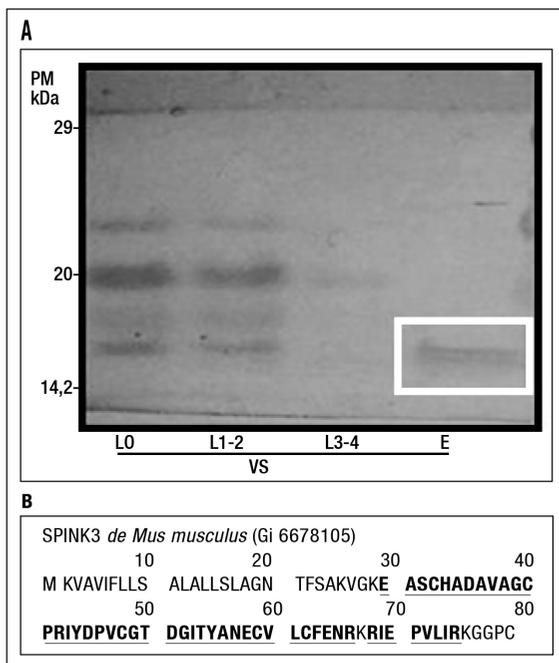
Empleando la misma metodología se analizaron las 4 bandas mayoritarias contenidas en la fracción completa de bajo peso molecular de VS (Figura 4). Mediante huella peptídica y confir-

**Figura 2.** Actividad inhibitoria de las fracciones de bajo PM e inhibidores comerciales sobre proteasas endógenas de espermatozoides capacitados (A) y no capacitados (B).



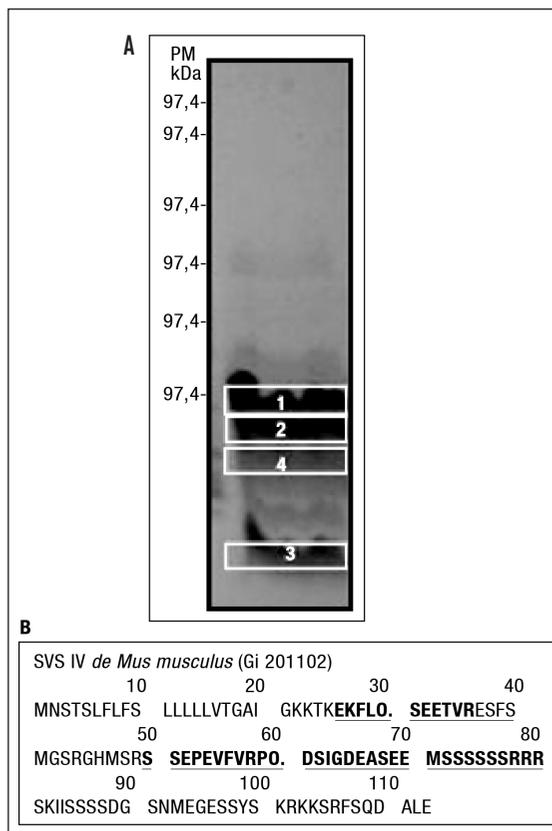
Actividad inhibitoria de la fracción total (T) y la fracción de 3-50 kDa de vesícula seminal (VS), próstata (P), epidídimo (E) y testículo (Te) de ratón sobre proteasas espermáticas. Extractos se incubaron con azocaseína. Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición considerando como se describió en la Figura 1. Recuadro. Actividad inhibitoria de inhibidores comerciales: SBTI, benzamidina, α-1 antitripsina. Una unidad de actividad proteolítica se definió como la cantidad de proteasa que produce un Abs 335 nm = 1, a 37° C en 24 hs. El asterisco indica que los valores de las fracciones de bajo peso molecular difieren significativamente (p<0.05) respecto de las respectivas fracciones totales.

**Figura 3.** Identificación de la banda de la fracción retenida del extracto VS (3-50 kDa) a través de la columna de afinidad.



A) SDS-PAGE de las distintas fracciones de la columna de tripsina-agarosa. L0: excedente de proteínas sembradas en la columna; L1-2 y L3-4: fracciones no retenidas obtenidas de sucesivos lavados de la matriz; E: fracción retenida. Se recuadró en blanco la banda secuenciada. B) Resultado de la fragmentación de los péptidos (MS/MS). La secuencia en negrita subrayada corresponde a los péptidos identificados.

**Figura 4.** Secuenciación de las bandas de la fracción de bajo PM del extracto VS (3-50kDa) identificadas a partir del SDS-PAGE.



A) Se marcaron con recuadros blancos numerados del 1 al 4 las proteínas seleccionadas. B) Resultado del análisis de la fragmentación de los péptidos (MS/MS) de las bandas 1, 2, 3 y 4. La secuencia en negrita y subrayada representa los péptidos identificados.

mación de las secuencias por MS/MS de la fracción comprendida entre 3-50 kDa del extracto de proteínas de VS se identificó al precursor de la proteína de vesícula seminal IV (SVS IV, GI 201102) con peso molecular de 11,957 kDa. La actividad inhibitoria de esta proteína no ha sido demostrada, sin embargo, se sabe que está incluida en un *cluster* de genes que contienen motivos WFDC, presentes en algunos inhibidores de serina proteasas. No se pudieron identificar proteínas en P y E por esta metodología.

Con el objetivo de continuar la búsqueda e identificar inhibidores de serina proteasas en glándulas accesorias mediante otro enfoque metodológico, se emplearon aquellas fracciones proteicas de bajo peso molecular (entre 3 kDa y 50 kDa) de los órganos donde se encontró mayor actividad VS, P y E y se analizaron mediante electroforesis en dos dimensiones, 2D (Figura 5).

En las muestras de proteínas de VS de ratón

se observaron en total 23 *spots* diferentes, en un rango de pI 3.5-9 y de PM 3-50 kDa (Figura 5A). Los *spots* se seleccionaron del gel y se identificaron por MS y MS/MS. Los resultados del análisis de los espectros MS y MS/MS revelaron que sólo uno de los *spots* de la muestra proteica perteneciente a la fracción de VS, con pI obs 7.5 y PM obs 8.5 kDa, correspondía nuevamente al inhibidor de serina proteasas: *Serine protease inhibitor Kazal type 3* (SPINK3) de pI teórico 8.26 y de PM teórico 8.824 daltons (Figura 5A), la misma proteína purificada por medio de la columna de afinidad a partir de esta fracción (Figura 3).

En las muestras proteicas provenientes de E se observaron 7 *spots* en un rango de pI 4-6 y de PM 17 kDa->38 kDa (Figura 5B). El análisis por huella peptídica de los mismos permitió la identificación

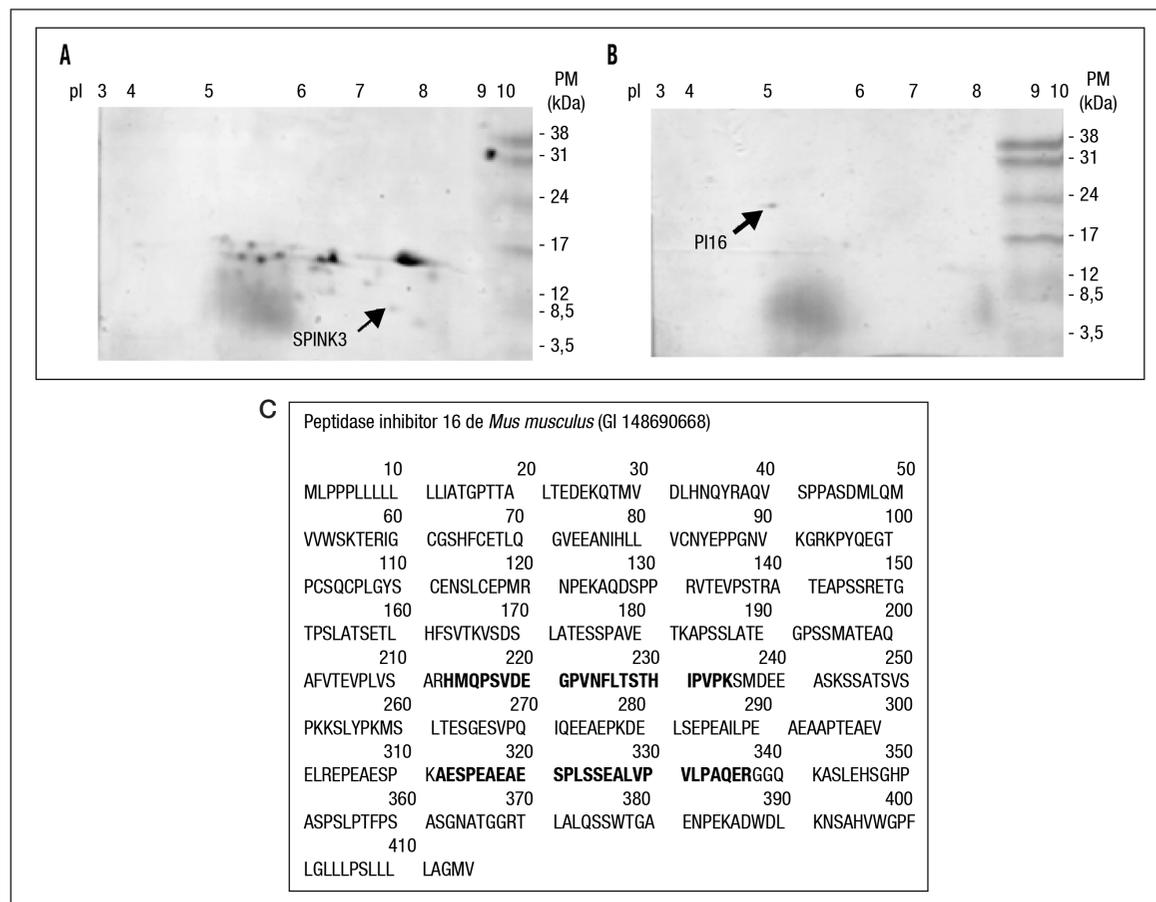
de un spot con pIobs ~5 y PMobs 24 kDa como la proteína *Peptidase inhibitor 16*, también conocida como *cysteine-rich protease inhibitor*, aunque su pI teórico es de 4.63 y su PM teórico 44.500 daltons (Figura 5B). No se obtuvieron resultados a partir de la fracción de P.

**Búsqueda in silico de inhibidores de serina proteasas**

A partir de la búsqueda *in silico* de inhibidores de serina proteasas para la cual se empleó información de las bases de datos de *Protein NCBI*, *Unigene NCBI*, *Ensembl* y *MGI*; se encontraron 20 inhibidores de serina proteasa cuya expresión está predicha en algún órgano o glándula accesoria del tracto reproductor, varios de ellos presentes en próstata, epidídimo y/o vesícula seminal de

ratón, humano y/o rata (Tabla I). De la totalidad de los inhibidores encontrados sólo 9 fueron identificados experimentalmente (Tabla I, última columna). Uno de los inhibidores de serina proteasa presente en vesícula seminal, SPINK3, que fue encontrado con la búsqueda *in silico* (Tabla I, # 15), coincidió con la identificación realizada a través de espectrometría de masa de uno de los inhibidores de la fracción de bajo peso molecular de VS analizada en este trabajo mediante columna de afinidad tripsina agarosa y la electroforesis bidimensional (Figuras 3 y 5). Sin embargo, la búsqueda *in silico* no mostró que la expresión de la proteína PI16 hallada en este trabajo mediante electroforesis bidimensional estuviese predicha en epidídimo.

**Figura 5.** Electroforesis bidimensional de fracciones enriquecidas en proteínas entre 3 y 50 kDa a partir de vesícula seminal y epidídimo de ratón.



Proteínas obtenidas a partir de VS (A) y E (B) de ratón fueron sembradas en tiras de 7 cm con un rango de pH de 3-10 para el isoelectrofoque. En la segunda dimensión las tiras fueron separadas por SDS-PAGE. Los spots detectados (Flecha) fueron analizados por espectrometría de masa. Los gels fueron teñidos con Coomassie Blue Coloidal (R250). Se indican los valores de PM (kDa) a la derecha y los valores de pI en la parte superior de cada gel. Las figuras son representativas de tres réplicas de cada muestra. C) Resultado del análisis de la huella peptídica (MS) del spot identificado en epidídimo (MS). Las secuencias en negrita representan los péptidos identificados.

**Tabla 1.** Lista de inhibidores de tipo tripsinalquimotripsina.

#	Descripción (Unigene)	NCBI: gen/proteína referencia	MEROPS: clan/familia o Pfam DOMAIN	Expresión	Ortólogos	Ref.
1	Amyloid beta (A4) precursor protein	<a href="#">Mm.277585</a>	Kunitz/bovine pancreatic trypsin inhibitor domain	Próstata, epidídimo	<i>M. musculus</i> <i>H. sapiens</i>	-
2	Caltrin I, Seminal vesicle protein, secretion 7 (SVS7)	<a href="#">Mm.390143</a>	IA, I1	Próstata	<i>M. musculus</i> <i>H. sapiens</i> ; <i>B. taurus</i> ; <i>R. Norvegicus</i>	[12]
3	Follistatin-like 1 (FST1)	<a href="#">Mm.182434</a>	Kazal type serine protease inhibitor domain	Testículo, próstata	<i>M. musculus</i> ; <i>R. Norvegicus</i>	-
4	HONGRES1	<a href="#">Rn.96134</a>	ID, I4	Epidídimo	<i>H. sapiens</i> ; <i>M. musculus</i> ; <i>R. Norvegicus</i>	[13]
5	Insulin-like growth factor binding protein 7	<a href="#">Mm.233470</a>	Kazal type serine protease inhibitor domain	Testículo, próstata, espermátide redonda	<i>M. musculus</i>	-
6	Nexin-1 (plasminogen activator inhibitor)	<a href="#">Mm.271891</a>	ID, I4	Tracto genital, espermátocitos	<i>M. musculus</i> ; <i>H. sapiens</i> ; <i>B. taurus</i> ; <i>R. Norvegicus</i>	[14]
7	RKIP, Raf kinase inhibitor protein	<a href="#">Hs.491242</a>	I51	Testículo, próstata,	<i>H. sapiens</i> ; <i>M. musculus</i> ; <i>R. Norvegicus</i>	[15]
9	Secreted acidic cysteine rich glycoprotein (SPARC)	<a href="#">Mm.291442</a>	Kazal type serine protease inhibitor domain	Testículo, próstata, espermátide redonda	<i>M. musculus</i>	-
10	Serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 6a (SERPINB6A)	<a href="#">Mm.252210</a>	ID, I4	Próstata, testículo, epidídimo	<i>M. musculus</i>	-
11	Serine peptidase inhibitor, Kazal type 5 (SPINK5)	<a href="#">NP_006837</a>	compound inhibitor, IA, I1	Próstata, testículo	<i>H sapiens</i> ; <i>B taurus</i> ; <i>M musculus</i> ; <i>R Norvegicus</i>	-
13	Serine peptidase inhibitor, Kunitz type (SPINT2)	<a href="#">NP_066925</a>	compound inhibitor, IB, I2	Espermátocitos próstata, testículo, epidídimo	<i>H sapiens</i> ; <i>B taurus</i> ; <i>M musculus</i> ; <i>R norvegicus</i>	[16]
14	Serine protease inhibitor, Kazal type, 2 (acrosin-trypsin inhibitor) (SPINK2)	<a href="#">NP_066937</a>	IA, I1	Próstata, testículo, espermátocito espermátide redonda	<i>H sapiens</i> ; <i>R norvegicus</i> ; <i>M musculus</i>	[17]
15	Serine protease inhibitor Kazal type 3 (SPINK3, prostatic secretory glycoprotein, P12)	<a href="#">NP_033284</a>	IA, I1	Próstata, vesícula seminal	<i>H. sapiens</i> ; <i>M. musculus</i> ; <i>R. Norvegicus</i>	-
16	Serine protease inhibitor, Kazal types, (SPINK8, 10, 11y12)	<a href="#">Mm.99613</a> <a href="#">Mm.312675</a> <a href="#">Mm.117440</a> <a href="#">Mm.99782</a>	IA, I1	Epidídimo, vesícula seminal	<i>M. musculus</i>	[18]
17	Serine protease inhibitor-like, with Kunitz and WAP domains 1 (EPPIN) (SPINLW1)	<a href="#">Q9DA01</a>	compound inhibitor, IB, I2/IP, I17	Tracto genital, epidídimo	<i>H sapiens</i> ; <i>R norvegicus</i> ; <i>M musculus</i> ; <i>B taurus</i>	-
18	Serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antitrypsinase, antitrypsin), member 5 (SERPINA5). Homologous to PCI, PAI3 (Acrosomal serine protease inhibitor).	<a href="#">P05154</a>	ID, I4	Próstata, testículo	<i>M. musculus</i> ; <i>H. sapiens</i> ; <i>R. Norvegicus</i>	[19]
19	Serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antitrypsinase, antitrypsin), member 1 (SERPINA1)	<a href="#">BX161449.1</a>	ID, I4	Próstata, testículo	<i>M. musculus</i> ; <i>H. sapiens</i> ; <i>R. norvegicus</i>	-
20	Serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 5 (SERPINB5)	<a href="#">NM002639</a>	ID, I4	Epidídimo	<i>M. musculus</i> <i>H. sapiens</i>	[20]

Búsqueda *in silico* de inhibidores de serina proteasas presentes en el tracto reproductor de mamíferos en 4 bases de datos: Protein NCBI, Unigene NCBI, Ensembl y MGI. Clasificación de acuerdo a las familias MEROPS o los dominios Pfam. Se utilizó la nomenclatura de UniGene.

## Discusión

La presencia de inhibidores de serina proteasas en plasma seminal (PS) y secreciones de glándulas accesorias ha sido reportada en muchas especies de mamíferos.<sup>6,21</sup> En este trabajo se utilizaron herramientas experimentales y bioinformáticas para la búsqueda de inhibidores de serina proteasas que se expresan en los tejidos cuyas secreciones componen el fluido seminal del ratón. Se identificaron los órganos con mayor actividad inhibitoria sobre tripsina y proteasas endógenas de espermatozoides, y mediante diferentes técnicas experimentales se realizó la búsqueda de inhibidores de serina proteasas en dichas fracciones: vesícula seminal (VS), próstata (P) y epidídimo (E) de ratón. Se identificaron mediante electroforesis en 1D o 2D y posterior análisis por espectrometría de masa los inhibidores: *Peptidase inhibitor 16* (Pi16) en E y *seminal vesicle protein IV* (SVS4) y *Serine protease inhibitor Kazal type III* (SPINK3) en VS. Esta última fue identificada también al analizar la fracción retenida de VS mediante cromatografía de afinidad tripsina-agarosa.

Nuestros abordajes experimentales no fueron capaces de detectar la totalidad de inhibidores de serina proteasas reportados en las bases electrónicas de datos, aunque, por otro lado, nos permitieron identificar dos proteínas no predichas en la búsqueda *in silico*.

La proteína *peptidase inhibitor 16*, también conocida como *cysteine-rich protease inhibitor*, forma parte de la superfamilia de proteínas CAP de mamíferos. En ratón su presencia sólo se ha detectado en piel y aorta, con bajos niveles en tejido adiposo.<sup>22</sup> Sin embargo, este es el primer reporte de *peptidase inhibitor 16* en epidídimo, aunque la proteína identificada por nosotros difiere en masa molecular y punto isoeléctrico respecto de lo demostrado para esta molécula. Todavía no se ha reportado si esta proteína tiene actividad como inhibidor de proteasas.<sup>23</sup> Sin embargo, podría considerarse un inhibidor putativo de proteasas ya que posee un dominio rico en cisteínas y además estaría relacionado con el bloqueo de canales de calcio.<sup>23</sup> Por otra parte, SVS4 identificada en este trabajo como una proteína de PM 11,957 kDa (GI 201102), no tiene actividad inhibitoria demostrada, sin embargo, está incluida en un *cluster* de genes que contienen motivos WFDC presentes en algunos inhibidores de serina proteasas.<sup>24</sup>

No obstante, el inhibidor de serina proteasas SPINK3, también denominado P12, caltrin I o PSTI1 (*pancreatic secretory inhibitor 1*), está mucho más caracterizado. Se conoce que SPINK3, sintetizado en la VS bajo regulación de testosterona,<sup>25</sup> es secretado al plasma seminal al momento de la eyaculación con el resto del contenido de esta glándula y se une luego a la superficie de espermatozoides eyaculados.<sup>26</sup> Las secreciones de la VS representan la mayor proporción del PS y la remoción de la glándula reduce en gran parte la fertilidad.<sup>27,28</sup>

Además de poseer características que definen a SPINK3 como un inhibidor de serina proteasas (posee actividad inhibitoria sobre proteasas de tipo tripsina), se une a la región acrosomal de la cabeza de espermatozoides y es considerado un factor discapacitante ya que inhibe la incorporación de aproximadamente entre 30% y 50% del  $\text{Ca}^{+2}$  extracelular.<sup>29,30</sup> Algunos trabajos han señalado que los inhibidores de proteasas del tracto reproductor del macho, como es el caso de SPINK3, se unen a los espermatozoides durante la eyaculación y son removidos de la superficie espermática durante la capacitación.<sup>31</sup> Sin embargo, nuestro grupo no pudo detectar la presencia de SPINK3 en muestras de plasma seminal (datos no mostrados), tal como está descrito.<sup>32</sup> Por otra parte, aún no se conocen los mecanismos moleculares mediante los cuales este putativo factor decaapacitante regularía la capacitación espermática.

Si bien se sabe que SPINK3 disminuye los niveles de reacción acrosomal dada la inhibición de la entrada de calcio,<sup>29,33</sup> se ha demostrado que la actividad inhibitoria de tipo tripsina reportada para este inhibidor sería independiente de su rol en los procesos fisiológicos espermáticos que regula mediante la reducción de los niveles de óxido nítrico endógeno.<sup>29</sup> Así, SPINK3, secretada desde la VS, es considerada una proteína multifuncional ya que tiene dos actividades reportadas. Por un lado, la actividad inhibitoria de serina proteasa, la cual aún no ha sido bien caracterizada ni se conoce la proteína blanco sobre la que SPINK3 estaría actuando. Por otro, la actividad de tipo *caltrin* que podría considerarse un importante punto de regulación en las cascadas de señalización espermática manteniendo al espermatozoide en un estado latente hasta el momento de la reacción con el ovocito.

La utilización del modelo de ratones ha permitido la obtención de mutantes en genes que codifican proteínas requeridas para mantener la capacidad reproductiva del macho.<sup>34</sup> Sin embargo, hay poca información disponible sobre el rol de proteínas que se expresan en glándulas accesorias. Entre las proteínas encontradas en el tracto masculino de humanos y roedores se encuentran proteasas espermáticas y secretorias.<sup>25,35,36</sup> Su función precisa es desconocida por lo que el conocimiento del o los inhibidores que las regulan es importante para comprender su rol en la reproducción.

### Referencias

1. Deppe M, Morales P y Sanchez R. Effect of Protease Inhibitors on the Acrosome Reaction and Sperm-Zona Pellucida Binding in Bovine Sperm. *Reprod Domest Anim* 2008;43:713-719.
2. Visconti PE, Galantino-Homer GD, Moore GD y col. The molecular basis of sperm capacitation. *J Androl* 1998;19:242-248.
3. Yanagimachi R. Mammalian fertilization. En: *Physiology of Reproduction*, JDNE Knobil Editor, New York: Raven 1994:152-162.
4. Wang Z, y Zhang W. Characterization of an eppin protein complex from human semen and spermatozoa. *Biol Reprod* 2007;77:476-484.
5. Bendahmane M, Zeng HT y Tulsiani DR. Assessment of acrosomal status in rat spermatozoa: studies on carbohydrate and non-carbohydrate agonists. *Arch Biochem Biophys* 2002;404:38-47.
6. Cesari A, Monclus MA, Tejon GP y col. Regulated serine proteinase lytic system on mammalian sperm surface: there must be a role... *Theriogenology* 2010;74:699-711.
7. Cechova D y Jonakova V. Bull seminal plasma proteinase inhibitors. En: *Methods in Enzymol*, L Lorand Editor 1981:729-803.
8. Krowarsch D, Cierpicki T, Jelen F y col. Canonical protein inhibitors of serine proteases. *Cell Mol Life Sci* 2003;60:2427-2444.
9. Rawlings ND, Barrett AJ y Bateman A. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res* 2012;40:343-350.
10. Laemmli UK, Beguin F y Gujer-Kellenberger G. A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation. *J Mol Biol* 1970;47:69-85.
11. Pillai MC y Meizel S. Trypsin inhibitors prevent the progesterone-initiated increase in intracellular calcium required for the human sperm acrosome reaction. *J Exp Zool* 1991;258:384-393.
12. Winnica DE, Novella ML, Dematteis A y col. Trypsin/acrosin inhibitor activity of rat and guinea pig caltrin proteins. Structural and functional studies. *Biol Reprod* 2000;63:42-48.
13. Hu ZH, Liu Q, Shang Q y col. Identification and characterization of a new member of serpin family- HongrES1 in rat epididymis. *Cell Res* 2002;12:407-410.
14. Murer V, Spetz JF, Hengst U y col. Male fertility defects in mice lacking the serine protease inhibitor protease nexin-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:3029-3033.
15. Keller ET, Z Fu y M Brennan. The role of Raf kinase inhibitor protein (RKIP) in health and disease. *Biochem Pharmacol* 2004;68(6):1049-1053.
16. Odet F, Verot A y Le Magueresse-Battistoni B. The Mouse Testis Is the Source of Various Serine Proteases and Serine Proteinase Inhibitors (SERPINs): Serine Proteases and SERPINs Identified in Leydig Cells Are under Gonadotropin Regulation. *Endocrinology* 2006;147:4374-4383.
17. Moritz A, Lilja H y Fink E. Molecular cloning and sequence analysis of the cDNA encoding the human acrosin-trypsin inhibitor (HUSI-II). *FEBS Lett* 1991;278:127-130.
18. Jalkanen J, Kotimaki M, Huhtaniemi I y col. Novel epididymal protease inhibitors with Kazal or WAP family domain. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;349:245-254.
19. Suzuki K, Deyashiki Y, Nishioka J y col. Characterization of a cDNA for human protein C inhibitor. A new member of the plasma serine protease inhibitor superfamily. *J Biol Chem* 1987;262:611-616.
20. Freeman T, Dixon A, Campbel E y col. Expression Mapping of Mouse Genes. En: *MGI Direct Data Submission* (Reviewed by MGI Editorial Staff); MGI Accession ID: MGI:1199209; J:46439, 1998.
21. Mills JS, Needham M y Parker MG. A secretory protease inhibitor requires androgens for its expression in male sex accessory tissues but is expressed constitutively in pancreas. *Embo J* 1987;6:3711-3717.
22. Frost RJ y Engelhardt S. A secretion trap screen in yeast identifies protease inhibitor 16 as a novel antihypertrophic protein secreted from the heart. *Circulation* 2007;116:1768-1775.
23. Gibbs GM, Roelants K y O'Bryan MK. The CAP superfamily: cysteine-rich secretory proteins, antigen 5, and pathogenesis-related 1 proteins--roles in reproduction, cancer, and immune defense. *Endocr Rev* 2008;29:865-897.
24. Clauss A, Lilja H y Lundwall A. The evolution of a genetic locus encoding small serine proteinase inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;333:383-389.
25. Chen LY, Lin YH, Lai ML y col. Developmental profile of a caltrin-like protease inhibitor, P12, in mouse seminal vesicle and characterization of its binding sites on sperm surface. *Biol Reprod* 1998;59:1498-1505.
26. Lardy H. Happily at work. *J Biol Chem* 2003;278:3499-3509.
27. Peitz B y Olds-Clarke P. Effects of seminal vesicle removal on fertility and uterine sperm motility in the house mouse. *Biol Reprod* 1986;35:608-617.
28. Pang SF, Chow PH y Wong TM. The role of the seminal vesicles, coagulating glands and prostate glands on the fertility and fecundity of mice. *J Reprod Fertil*, 1979;56:129-132.
29. Zalazar L, Saez Lancellotti TE, Clementi M y col. SPINK3 modulates mouse sperm physiology through the reduction of nitric oxide level independently of its trypsin inhibitory activity. *Reproduction* <http://dx.doi.org/10.1530/REP-11-0107>, 2012.
30. Coronel CE, Winnica DE, Novella ML y col. Purification, structure, and characterization of caltrin proteins from seminal vesicle of the rat and mouse. *J Biol Chem*, 1992;267:20909-20915.
31. Irwin M, Nicholson N, Haywood JT y col. Immunofluorescent localization of a murine seminal vesicle proteinase inhibitor. *Biol Reprod* 1983;28:1201-1206.
32. Rufo GA Jr, Singh JP, Babcock DF y col. Purification and characterization of a calcium transport inhibitor protein from bovine seminal plasma. *J Biol Chem* 1982;257:4627-4632.
33. Dematteis A, Miranda SD, Novella ML y col. Rat caltrin protein modulates the acrosomal exocytosis during sperm capacitation. *Biol Reprod* 2008;79:493-500.
34. Bruning JC, Gautam D, Burks DJ y col. Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science* 2000;289:2122-2125.
35. Clements JA, Matheson BA, Wines DR y col. Androgen dependence of specific kallikrein gene family members expressed in rat prostate. *J Biol Chem* 1988;263:16132-16137.
36. Charlesworth MC, Young CY, Miller VM y col. Kininogenase activity of prostate-derived human glandular kallikrein (hK2) purified from seminal fluid. *J Androl* 1999;20:220-229.