

Trabajo Fin de Grado
Grado en Bioquímica y Biología Molecular

**Detección e inmunolocalización del receptor
Mas en los espermatozoides humanos**

Autora:

Paula Blázquez Sánchez

Director:

Asier Valdivia Palacín

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	<i>Estructura y fisiología de los espermatozoides humanos.</i>	<i>1</i>
1.2	<i>Sistema Renina-Angiotensina</i>	<i>2</i>
1.2.1	<i>El receptor Mas.....</i>	<i>3</i>
2	OBJETIVO.....	4
3	MATERIALES Y MÉTODOS.....	4
3.1	<i>Ensayo de inmunofluorescencia.....</i>	<i>4</i>
3.1.1	<i>Recogida de la muestra</i>	<i>4</i>
3.1.2	<i>Medida de la concentración de espermatozoides</i>	<i>5</i>
3.1.3	<i>Preparación de los porta, fijación, permeabilización y bloqueo de las células.....</i>	<i>5</i>
3.1.4	<i>Incubación con anticuerpo primario</i>	<i>5</i>
3.1.5	<i>Incubación con anticuerpo secundario</i>	<i>6</i>
3.1.6	<i>Tinción de núcleos.....</i>	<i>6</i>
3.1.7	<i>Montaje</i>	<i>6</i>
3.2	<i>Reacción en Cadena de la Polimerasa en Transcripción Reversa (RT- PCR)</i>	<i>7</i>
3.2.1	<i>Extracción del RNA.....</i>	<i>7</i>
3.2.1.1	<i>Determinación de la concentración y calidad de RNA extraído.....</i>	<i>7</i>
3.2.2	<i>Retrotranscripción</i>	<i>7</i>
3.2.3	<i>Amplificación</i>	<i>8</i>
3.2.4	<i>Electroforesis en gel de agarosa.....</i>	<i>8</i>
4	RESULTADOS	8
4.1	<i>Expresión del receptor Mas en los espermatozoides humanos</i>	<i>8</i>
4.2	<i>Expresión de los productos de PCR en gel de agarosa.....</i>	<i>10</i>
5	DISCUSIÓN.....	12
6	CONCLUSIONES.....	13
7	BIBLIOGRAFÍA.....	14

1 INTRODUCCIÓN

1.1 *Estructura y fisiología de los espermatozoides humanos.*

Los espermatozoides son células altamente diferenciadas. El espermatozoide humano tiene un tamaño de 60 μm y se suele dividir en dos partes principales: la cabeza y la cola. Dentro de la cabeza se encuentra el acrosoma, el citoplasma y el núcleo (Browder y cols., 1991). El acrosoma es una vesícula secretora de gran tamaño situada en la parte apical de la cabeza, dentro de ella se encuentran enzimas hidrolíticas encargadas de digerir la matriz extracelular del ovocito (zona pelúcida). El núcleo se sitúa en la zona post-acrosómica, es la única parte del espermatozoide que penetra en el ovocito durante la fecundación, en su interior se localiza el DNA, muy condensado gracias a las protaminas -unas proteínas espermáticas que remplazan a las histonas- y el RNA con funciones aún desconocidas. El citoplasma espermático se encuentra muy reducido debido a que una gran parte de él se pierde durante la espermiación, proceso por el cual los espermatozoides se liberan del epitelio de los túbulos seminíferos. Por otro lado, la cola se encuentra formada por cuatro partes: el cuello, la pieza media, la pieza principal y la pieza final. El cuello contiene un centriolo encargado de llevar a cabo la división celular en el embrión. La pieza media es una estructura tubular que contiene mitocondrias dispuestas en espiral. Estas sintetizan el ATP necesario para cubrir las demandas energéticas de la célula, especialmente las relacionadas con el movimiento flagelar. Las piezas principal y final son las encargadas de realizar el movimiento espermático. El batido flagelar es la forma de motilidad característica de los espermatozoides y este es posible gracias al axonema localizado lo largo de la cola con la estructura típica de microtúbulos 9+2 (Aitken, 2013; Ramalho-Santos, 2007).

El objetivo final de los espermatozoides es la fecundación, se define como capacidad fecundante a la habilidad que tienen estas células para fecundar un ovocito fisiológicamente normal y estructuralmente intacto (Yanagimachi, 1994). El proceso por el cual el espermatozoide adquiere la capacidad fecundante se llama capacitación, ocurre tras la eyaculación, cuando los espermatozoides entran en contacto con los diferentes fluidos del tracto genital femenino. Durante la capacitación se da un proceso de intercambio de proteínas y lípidos de la membrana plasmática espermática (Schuel y cols., 2005) como resultado, los espermatozoides adquieren movilidad hiperactiva, capacidad de unión a la zona pelúcida y capacidad para llevar a cabo la reacción acrosómica (Schuel y cols., 2005). La zona pelúcida es una capa extracelular compuesta por una matriz de glicoproteínas que rodea a los ovocitos de mamíferos y tiene un papel fundamental en la unión especie-específica del

espermatozoide al ovocito (Wassarman, 1995). Los residuos de carbohidratos de las glicoproteínas de la zona pelúcida actúan como ligandos para los receptores ZP de los espermatozoides (Talbot y cols., 2003) de esta manera se produce la unión y reconocimiento de ambas células. Los receptores ZP se exponen en la superficie del espermatozoide durante la capacitación. Cuando se une el espermatozoide al ovocito, este induce la reacción acrosómica en el espermatozoide y bloquea la poliespermia (Wassarman y cols., 1995). La reacción acrosómica es la liberación de los componentes del acrosoma al exterior y se produce por la fusión de la membrana acrosómica con la membrana externa del espermatozoide. Entre los componentes liberados se encuentran enzimas hidrolíticas tales como proteasas (acrosina) que permiten al espermatozoide penetrar en el ovocito (De los Reyes y Barros., 2000). El movimiento hiperactivo que adquieren los espermatozoides en el proceso de capacitación es necesario para optimizar el desplazamiento de los espermatozoides a través del oviducto (Kim y cols., 2005) y para penetrar a través de la zona pelúcida (Stauss y cols., 1995).

Los espermatozoides son células que no sintetizan RNA *de novo* ni llevan a cabo procesos de traducción proteica. Esto se debe a la alta condensación de la cromatina nuclear y a la escasez de citoplasma y orgánulos. Esto significa que los espermatozoides maduros no tienen capacidad de expresar proteínas ni sintetizar nuevos compuestos (Miller y cols., 2006) y deben llegar al ovocito con los elementos sintetizados durante la espermatogénesis. Sin embargo, la posibilidad de que algunos mRNA puedan ser traducidos mediante ribosomas mitocondriales hace que este tema está aún en debate (Millar y cols., 2006).

1.2 Sistema Renina-Angiotensina

El Sistema Renina-Angiotensina (SRA) es un sistema hormonal fundamentalmente conocido por su papel en el mantenimiento de la presión arterial y la homeostasis de electrolitos y fluidos. Este sistema ayuda a regular la presión arterial, el tono vascular y la volemia. Los componentes clásicos de este sistema son la renina, una proteasa sintetizada en las células yuxtaglomerulares renales y la Angiotensina II (Ang II), uno de los más potentes vasoconstrictores del organismo.

La renina actúa sobre un precursor, el angiotensinógeno, para generar angiotensina I. Esta molécula tiene pocos efectos presores y es convertida en su paso por el pulmón, en angiotensina II por la Enzima Convertidora de Angiotensina (ACE del inglés *Angiotensin-Converting Enzyme*) que se une a los receptores AT₁ y AT₂. A su vez, la AngII es convertida en angiotensina III (AngIII), mediante aminopeptidasas, con escaso efecto vasoconstrictor.

En los últimos diez años, la caracterización de nuevos componentes del SRA como el receptor Mas, el receptor renina/pro-renina y el enzima ACE2 y su presencia en diferentes tejidos, ha cambiado el concepto clásico de este sistema. Actualmente existen evidencias de que la funcionalidad del aparato reproductor masculino depende de la presencia de un sistema renina angiotensina local que juega un papel importante en la espermatogénesis (Costa y cols., 2003). Se han identificado distintos componentes del SRA en los testículos y el epidídimo de mamíferos tales como renina, angiotensina I y II, angiotensinógeno, las enzimas ACE, ACE2 y el receptor Mas (Langford y cols., 1993; Speth y cols., 1999; Leung y Sernia, 2003; Fuchs y cols., 2005; Alenina y cols., 2002). Además, se han caracterizado los receptores AT₁ y AT₂ en las espermátidas y en espermatozoides maduros de ratas y humanos (Vinson y cols. 1995; Könh y cols. 1998). Diversos estudios han demostrado la relación de estos componentes con la fertilidad masculina, así por ejemplo, la AngII está implicada en procesos de movilidad espermática como la hiperactivación (Vinson y cols., 1996), la velocidad (Vinson y cols., 1996) y la inducción de la reacción acrosómica (Gur y cols., 1998). De igual manera, el enzima ACE está involucrado en procesos de capacitación y el enzima ACE2 -que transforma la angiotensina II en angiotensina (1-7)- se cree que está implicado en la regulación de la estereidogénesis y otras funciones propias de las células de Leydig (Douglas y cols., 2004). De la misma forma, el receptor Mas está también implicado en diferentes procesos de la espermatogénesis.

1.2.1 El receptor Mas

El receptor Mas es un receptor acoplado a proteínas G cuyo ligando principal es la angiotensina-(1-7). En ratas y ratones se ha identificado este receptor en cerebro, riñón, corazón, endotelio y testículo (Alenina y cols., 2008). Dentro de los testículos se ha descrito concretamente en células de Leydig y de Sertolli aunque con menor abundancia en estas últimas (Alenina y cols., 2002; Leal y cols., 2009).

En humanos se ha detectado Ang-(1-7) y el receptor Mas en el compartimento intersticial y en el citoplasma de las células de Leydig y en menor cantidad en los túbulos seminíferos (Reis y cols., 2010). Sin embargo no se ha descrito aún en los espermatozoides maduros.

Existen muchas evidencias sobre la implicación del receptor Mas en los procesos de fertilidad masculina. Un estudio llevado a cabo por Leal y colaboradores en 2009 demostró en ratones deficientes para el receptor Mas, una reducción significativa en el tamaño de los testículos y un aumento de células apoptóticas durante la meiosis en el epitelio seminífero. Además, tras la

administración de un antagonista de la Ang-(1-7) se apreció en estos ratones, un aumento de las células apoptóticas y de espermatoцитos primarios en determinadas etapas de la espermatogénesis. Sin embargo su déficit no causa esterilidad. Así mismo, se ha demostrado que la ausencia del receptor Mas no tiene efectos sobre la fase espermatogonial sino sobre el resto de fases posteriores de la espermatogénesis. Además, este receptor parece estar relacionado con procesos con el metabolismo androgénico puesto que deleciones en el gen *Mas* afectan a la expresión de las enzimas involucradas en la biosíntesis de testosterona en las células de Leydig (Xu y cols., 2007). Otros autores han demostrado en investigaciones en humanos, que deficiencias en los niveles de ACE2, Ang-(1-7) y Mas están relacionados con un deterioro severo de la espermatogénesis (Reis y cols., 2010; Leal y cols., 2009). Tomados en conjunto, todos estos datos indican claramente que el receptor Mas juega un papel fundamental en la regulación de la espermatogénesis.

La hipótesis de esta investigación sostiene que, al igual que otros componentes del SRA ya descritos como el receptor AT₁ y la angiotensina II, el receptor Mas está presente en los espermatozoides humanos.

2 OBJETIVO

El objetivo de este trabajo de investigación es caracterizar el receptor Mas en los espermatozoides humanos. Para ello, en primer lugar, se han llevado a cabo experimentos de inmunofluorescencia y posteriormente de RT-PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa en Transcripción Reversa) para determinar si existe mRNA del receptor Mas en el espermatozoide.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ensayo de inmunofluorescencia

3.1.1 Recogida de la muestra

Las muestras seminales empleadas en el estudio fueron obtenidas y procesadas, previo consentimiento informado, por personal de la Unidad de Reproducción Asistida del Hospital de Cruces (Barakaldo), a partir del sobrante de las muestras seminales de pacientes en terapia de Reproducción Asistida. Este proyecto fue aprobado por el Comité de Ética para las Investigaciones relacionadas con Seres Humanos (CEISH) y por El Comité de Ética en la Investigación con Agentes

Biológicos y organismos modificados genéticamente (CEIAB). Referencias: CEISH/61/2011; CEIAB, 57, 2011.

En primer lugar, se separó la fracción de espermatozoides del plasma seminal a partir de la muestra cruda mediante centrifugación en gradientes de densidad, mediante esta técnica se obliga a los espermatozoides a atravesar varios gradientes de distinta densidad, obteniendo los espermatozoides del pellet de más densidad (Gorus, 1981). Se hicieron dos centrifugaciones sucesivas: primera centrifugación a 1800 G durante 15 min y segunda centrifugación a 1600G durante 7 minutos.

3.1.2 Medida de la concentración de espermatozoides

Para medir la concentración las muestras se analizaron con un microscopio óptico de contraste de fases. Se utilizó un software de análisis de imagen para estudios seminales SCA (Sperm Class Analyzer®). Para hacer la medición se utilizó un hemocitómetro Makler. Las muestras se llevaron a una concentración final de 30 millones de espermatozoides por mililitro aproximadamente.

3.1.3 Preparación de los portas, fijación, permeabilización y bloqueo de las células

Se fijaron tres muestras de espermatozoides en tres cubres. Los cubres fueron previamente lavados con agua y etanol. Para mejorar la adhesión de los espermatozoides al porta se utilizó polilysina (una gota en cada cubre) y se añadió la muestra sobre ella. A continuación se dejó secar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente se colocaron los portas en una placa de cultivo de 24 pocillos y se fijaron con paraformaldehído al 4% (200µl en cada pocillo durante 10 minutos a temperatura ambiente). Una vez fijadas las muestras, se realizaron tres lavados con PBS (Phosphate Buffer Saline), en cada lavado se añadieron 200 µl por pocillo durante 5 minutos. Posteriormente se utilizó metanol glacial para permeabilizar las membranas celulares (200µl durante 10 minutos a temperatura ambiente), se realizaron otros tres lavados con PBS (200 µl durante 5 minutos) y se bloqueó con suero bovino fetal (SBF) al 10% (250µl) durante treinta minutos a temperatura ambiente.

3.1.4 Incubación con anticuerpo primario

Se utilizaron anticuerpos primarios de dos marcas comerciales diferentes (Anti-Angiotensin-(1-7) Mas Receptor de Alomone Labs® y Anti-MAS1 de Abcam®). Los primeros ensayos se realizaron con el anticuerpo de la marca Abcam® pero dado que esta casa comercial no suministra

péptido bloqueante no se podía comprobar la especificidad de la unión del anticuerpo, por este motivo se decidió utilizar los anticuerpos de Alomone Labs[®] que sí que proporcionan el péptido.

En el ensayo con el anticuerpo de Alomone[®] para la detección del receptor (dilución 1:100) se añadió: Anticuerpo primario Human Anti-Angiotensin-(1-7) Mas Receptor (2µl), PBS (100µl) y SBF 5% (5 µl). Para realizar un control negativo del anticuerpo primario (dilución 1:100) se añadió: Anticuerpo primario Human Anti-Angiotensin-(1-7) Mas Receptor (2µl), péptido control (2 µl), PBS (100µl) y SBF 5% (5 µl). El anticuerpo primario y el péptido control se preincubaron juntos durante una hora a 37º C a una dilución 1:1. Para realizar un control negativo del anticuerpo secundario se añadió: PBS (100µl) y SBF 5% (5 µl). En los tres casos se incubó durante toda la noche a 4ºC.

En el ensayo con el anticuerpo de Abcam[®] para la detección del receptor (dilución 1:100) se añadió: Anticuerpo Anti-MAS1 (2µl), PBS (100µl) y SBF 5% (100 µl). Para realizar el control negativo se añadió: PBS (100µl), SBF 5% (100 µl). Se incubaron los pocillos durante 24 horas a 4ºC.

3.1.5 Incubación con anticuerpo secundario

Tras la incubación con el anticuerpo primario se hicieron tres lavados con PBS y se añadió SBF 5% (100 µl), PBS (100µl), y 2 µl de anticuerpo secundario ALEXA Fluor 488 Goat AntiRabbit IgG (Invitrogen Molecular Probes[®]) (dilución 1:500). Se incubó una hora a temperatura ambiente y se realizaron tres lavados con PBS.

3.1.6 Tinción de núcleos

En el segundo lavado, tras la incubación con el anticuerpo primario se añadió al PBS Hoechst para teñir el DNA (200 µl). Para preparar la tinción se utilizó: Hoechst 1mg/ml (25 µl), PBS (5ml), PVA (PolivinylAcohol) 1g/l.

3.1.7 Montaje

Se montaron los cubres sobre un porta y se añadió Fluoromont como medio de montaje. Por último, se sellaron los cubres con laca de uñas.

3.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa en Transcripción Reversa (RT- PCR)

3.2.1 *Extracción del RNA*

A partir de una muestra cruda de espermatozoides se separaron aquellos con mejor movilidad mediante centrifugación en gradientes de densidad. Se centrifugó durante 15 minutos a 600G y se descartó el sobrenadante. Para aislar el RNA se añadió TriZOL[®] (500µl), se utilizó una jeringuilla para disgregar las células y seguidamente se añadieron otros 500µl de TriZOL[®], 200 µl de cloroformo y se incubó durante 3 minutos. Se hizo una centrifugación a 10000G durante 10 minutos a 4°C y se recogió la fase acuosa superior (donde se esperaba que se encontrase el RNA). Seguidamente, se añadió isopropanol (500 µl) y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó durante 10 minutos a 10000G y se descartó el sobrenadante. Por último se añadió etanol al 70% (500 µl) al pellet, se dejó secar durante 3 minutos a temperatura ambiente y se resuspendió en 15 µl de agua.

3.2.1.1 *Determinación de la concentración y calidad de RNA extraído*

Se determinó la concentración de RNA de las muestras midiendo su absorbancia a 260 nm con el espectrofotómetro NanoDrop ND-100 (Molecular Imager[®], Chemi Doc[™] XRS 170-8071). La pureza de RNA de la muestra se determinó a través del ratio de absorbancias a 260 y 280 nm (260nm/280nm). Se consideró como bueno un ratio de 1,8 a 2. La calidad se examinó por electroforesis en gel de agarosa.

3.2.2 *Retrotranscripción*

Para realizar la retrotranscripción se utilizó el enzima retrotranscriptasa SuperScriptII (Invitrogen[™]). Se utilizó mRNA de la muestra y mRNA de células de tejido de córtex cerebral como control positivo. A cada tubo se añadió 1 µl de mRNA, 2 µl de cebadores "Random hexamers" (Invitrogen[™]) y agua miliQ autoclavada (hasta 12 µl). Después se calentó durante 10 minutos a 65°C y se enfrió en hielo durante 1 minuto. A continuación se añadieron 4 µl de tampón RT 5x (First-Strand Buffer), inhibidor de RNAsas (0,5 µl), 1 µl de dNTPs (Desoxinucleótidos trifosfatos), MgCl₂ (1,5 µl) como cofactor de la Retrotranscriptasa (RT) y SuperScriptII (1 µl). Se mezcló la muestra y se eliminaron las burbujas. Seguidamente se llevó la muestra al termociclador (Bio-Rad[®]) con las siguientes condiciones: 95°C durante 5 minutos, luego 40 ciclos de 95°C durante 30 segundos, 59°C durante 30 segundos, 72°C durante 1 minuto y finalmente un paso a 72 °C durante 5 minutos.

3.2.3 Amplificación (PCR)

Para llevar a cabo la amplificación se añadió a 1 μ l de cDNA, agua (30,5 μ l), buffer 10x (5 μ l), $MgCl_2$ (7 μ l), dNTPs (1 μ l), 2,5 μ l de Primer forward Mas: 5'-TGTTGTTGAGGAACCCACGA-3', 2,5 μ l de Primer reverse Mas: 5'-GGAAGCACAGGAACCAGAGG-3' (Sigma-Aldrich®), 2,5 μ l Primer forward β -actina: 5'-TCCCTGGAGAAGAGCTACGA-3', 2,5 μ l Primer reverse β -actina: 5'-ATCTGCTGGAAGGTGGACAG-3' (Invitrogen™) y DNA polimerasa (0,5 μ l). Las condiciones para la PCR fueron: desnaturalización inicial a 95°C durante 2 minutos, seguido por 25 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, hibridación a 50°C durante 25 minutos y extensión a 72°C durante 1 minuto seguido por una extensión final a 72°C durante 5 minutos.

3.2.4 Electroforesis en gel de agarosa

Se empleó un gel de agarosa al 1,5% (p/v). Para la preparación del gel se utilizaron 1,5 gramos de agarosa en 100 mL de tampón TAE (Trisbase 0,4M; Ácido acético 5,7% (v/v); EDTA 10mM, pH 8,4) y 2,5 μ l de Midori Green (Nippon Genetics®) como tinción para el DNA. Se añadió, a 1 μ l de la muestra producto de la PCR, agua (2 μ l) y buffer de carga 5x (1 μ l). Se cargaron 10 μ l por calle. Paralelamente, se añadieron 7 μ l del marcador de pares de bases EZ Load™ 100 bp (Bio-Rad®). El voltaje aplicado fue de 115V. Se dejó correr el gel durante 20 minutos y se observaron las bandas mediante un analizador de geles ChemiDoc™ XRS (Bio-Rad®) de luz ultravioleta.

4 RESULTADOS

4.1 Expresión del receptor Mas en los espermatozoides humanos

Los inmunoensayos se llevaron a cabo con dos anticuerpos de diferente marca comercial (Abcam® y Alomone Labs®). La primera marca no proporcionaba péptido control, por ese motivo se decidió utilizar anticuerpos de otra casa comercial que suministraba péptido control gracias lo cual se pudo realizar un control de especificidad de la unión (Figura 1A). En ambos ensayos se obtuvo fluorescencia cuando se incubó el receptor Mas con anticuerpo primario y secundario (Figuras 1 y 2). Estos resultados indican que el receptor Mas se encuentra expresado en los espermatozoides.

El péptido control se une al anticuerpo primario anti-receptor Mas e impide que se una al receptor en el inmunoensayo. Si el anticuerpo primario se uniese de forma inespecífica a otras

proteínas obtendríamos señal. La ausencia de inmunofluorescencia en A y A' nos indica que el anticuerpo primario no se está uniendo a otras proteínas de manera inespecífica. En el caso de Abcam® no pudimos comprobar la especificidad del anticuerpo primario (Figura 2). La ausencia de señal en el control negativo (Figura 1 B) nos indica que el anticuerpo secundario no se está uniendo de forma inespecífica a otras proteínas.

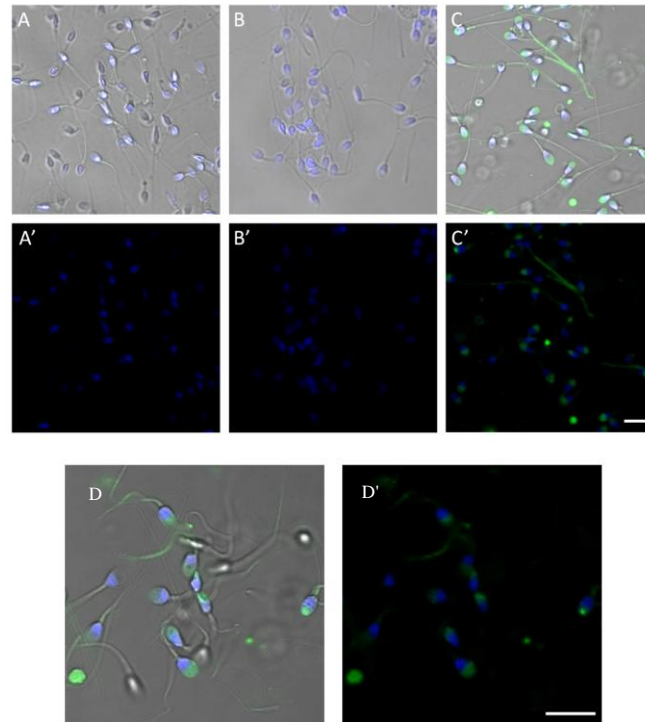


Figura 1. Inmunolocalización del receptor Mas (verde) y marcaje del DNA (azul) en espermatozoides humanos con el anticuerpo Anti-Angiotensin-(1-7) Mas Receptor de Alomone Labs®. En la fila de abajo (A', B', C') se excluye la imagen de luz transmitida. A) Control negativo: incubación con el péptido bloqueante y el anticuerpo para Mas. B) Control negativo: incubación sin anticuerpo primario. C) Incubación con el anticuerpo para Mas. D y D') Inmunolocalización detallada con el anticuerpo para Mas. En la foto de la derecha se excluye la imagen de luz transmitida. n= 5. Imágenes representativas. Barra de escala: 10 µm.

En cuanto a su localización, parece estar situado predominantemente en la zona apical de la cabeza del espermatozoide (Figura 1D). Serían necesarios estudios funcionales para sugerir una explicación a esta distribución espacial del receptor.

En el inmunoensayo llevado a cabo con anticuerpo Anti-MAS1 (Abcam®) también se aprecia señal para el receptor en la cabeza del espermatozoide. La falta de péptido control para este anticuerpo nos impide comprobar si se dan uniones inespecíficas de este anticuerpo con otras

proteínas de la membrana pero el marcaje en la misma zona con los dos anticuerpos nos da una idea de que el receptor Mas efectivamente se encuentra expresado en esa zona del espermatozoide.

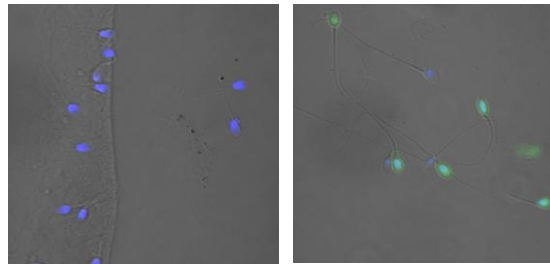


Figura 2. Inmunolocalización del receptor Mas (verde) y marcaje del DNA (azul) en espermatozoides humanos con el anticuerpo Anti-MAS1 de Abcam®.

Todos estos resultados nos permiten afirmar que el receptor Mas se encuentra expresado en los espermatozoides humanos.

4.2 Determinación de la concentración y pureza del RNA extraído

La concentración del RNA extraído se midió con el espectrofotómetro NanoDrop ND-100. Para la determinación de la pureza se estableció el ratio de absorbancias a 260 y 280 nm. Este ratio nos informa de la cantidad de RNA que hay respecto a proteínas dado que el RNA absorbe a 260 nm y las proteínas a 280 nm. Se consideró un ratio adecuado entre 1,8 y 2. Por otro lado, la calidad del RNA se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa (Figura 3) con luz ultravioleta. Se utilizó una muestra de córtex como control positivo. Puesto que los espermatozoides no poseen ribosomas, no tienen RNA ribosomal, por este motivo no aparecen las bandas características de 28S (4,5 Kb) y 18S (1,9 Kb) del rRNA.

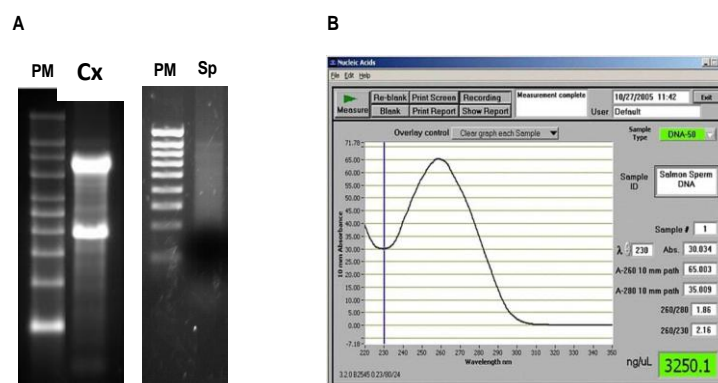


Figura 3. A) estimación de la calidad del RNA extraído. PM: estándar de peso molecular de nucleótidos: Cx: cortex, Sp: espermatozoides. B) Curva de absorbancia del RNA extraído medida mediante espectrofotómetro. El punto máximo de absorbancia se da en 260 nm, que corresponde a la del RNA.

4.3 Expresión de los productos de PCR en gel de agarosa

Con el objetivo de determinar la presencia de mRNA del receptor Mas en los espermatozoides humanos se llevó a cabo una RT-PCR. En los resultados se puede apreciar la banda del receptor Mas correspondiente a 152 pb (Figura 4, flecha amarilla) tanto en espermatozoides como en el córtex. Se utilizó una muestra de tejido de córtex cerebral como control positivo puesto que se ha descrito la presencia del receptor Mas en este tejido (Young y cols., 1988).

Para comprobar que la amplificación es del cDNA y no del DNA genómico se realizó un ensayo paralelo de retrotranscripción negativa (RT-) en donde no se añadió la enzima retrotranscriptasa. Los resultados muestran que no se amplificó nada (Figura 4). Es necesario este control porque el receptor Mas tiene un único exón, por tanto, no habría diferencia en la amplificación de DNA genómico y de cDNA en cuanto a su peso molecular.

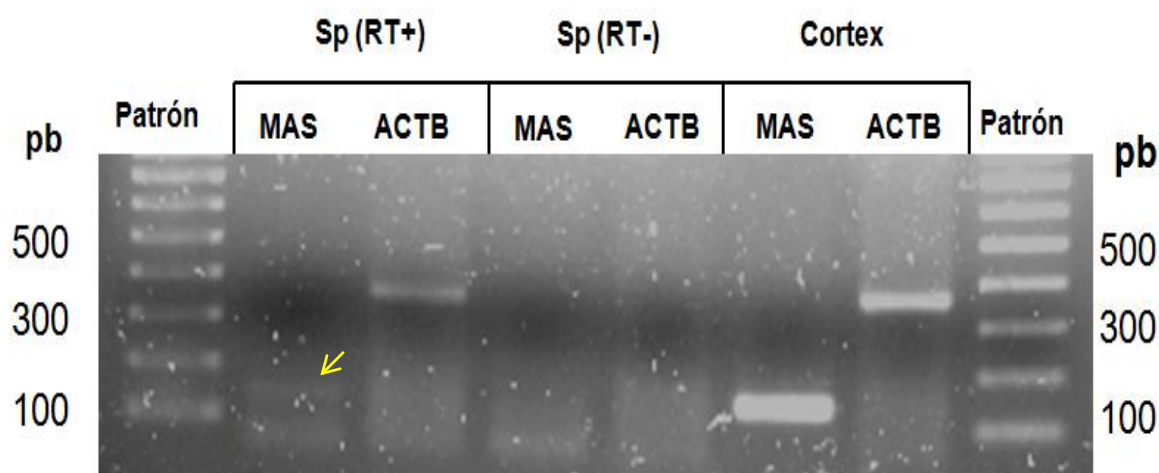


Figura 4. Gel representativo de agarosa al 1,5% revelado con Midori Green para los genes que codifican para el receptor Mas (MAS) y para la β -actina (ACTB) en espermatozoides (sp) y córtex cerebral. La flecha indica la banda correspondiente el receptor Mas. RT⁺= Retrotranscripción positiva. RT- = Retrotranscripción negativa.

El gen de la β -actina, por ser un gen *housekeeping* y tener una expresión constitutiva, se utilizó como control interno para comprobar que la PCR estaba bien realizada. Se puede observar la banda amplificada a 362 (Figura 4.) tanto en espermatozoides como en el córtex cerebral humano.

5 DISCUSIÓN

En los últimos años el concepto del SRA como un sistema endocrino limitado a regular la función renal y cardiovascular ha cambiado. La caracterización de nuevos componentes en diversos tejidos ha transformado el planteamiento clásico de este sistema dándole un enfoque multifuncional. La identificación de compuestos como la angiotensina II y las enzimas ACE y ACE2 en el tracto reproductor masculino de humanos y mamíferos, al igual que la caracterización del receptor AT₁ en espermatozoides de rata y ratón, sugieren la existencia de un SRA local involucrado en la función reproductiva masculina (Passos-Silva y cols., 2013).

En este estudio se llevó a cabo un inmunoensayo y una PCR reversa (RT-PCR) para comprobar la presencia del receptor Mas y de su mRNA en los espermatozoides humanos. Los resultados obtenidos en el inmunoensayo confirman que este receptor efectivamente se encuentra expresado en los espermatozoides. Aunque no se puede determinar su ubicación exacta, lo más probable es que se encuentre inserto en la membrana plasmática si bien podría encontrarse en la acrosómica dado que los espermatozoides fueron sometidos a un proceso de permeabilización de la membrana citoplasmática para poder teñir los núcleos.

En cuanto a la localización del receptor en el espermatozoide, este parece estar encontrarse predominantemente en la zona apical de la cabeza. Esto sugiere que podría estar relacionado con procesos como la reacción acrosómica ya que el espermatozoide al ser una célula muy polarizada suele ubicar las proteínas en el lugar donde generan el efecto (Agirregoitia, 2008). Son necesarios estudios funcionales para determinar el papel que este receptor desempeña en el espermatozoide y en los procesos de fertilidad. En ese sentido sería interesante comprobar si cuando los espermatozoides sufren la reacción acrosómica pierden el marcaje del receptor Mas debido a que pierden la zona donde hemos detectado dicho receptor.

Los resultados de la RT-PCR indican que mRNA del receptor Mas se encuentra dentro de los espermatozoides maduros. Sin embargo, los espermatozoides no sintetizan proteínas *de novo* ni llevan a cabo procesos de traducción, por tanto, la presencia de mRNA no es concluyente para determinar la presencia del receptor Mas. A pesar de ser desconocido el papel que desempeña el mRNA del receptor Mas en los espermatozoides, una hipótesis que se plantea es que se haya expresado en etapas anteriores de la espermatogénesis y que en espermatozoides maduros se trate de RNA vestigial, es decir, que no se exprese. Otra hipótesis es que ese mRNA sea importante para las primeras etapas del embrión, cuando este carece aún de su maquinaria propia activa.

En todo caso, la presencia de este RNA en los espermatozoides refuerza el hecho de que esta vía de señalización juegue un papel determinante en los procesos de fertilidad masculina.

Dado que el gen del receptor Mas en humanos está formado por un único exón, los cebadores no amplificarían intrones del DNA y por tanto no habría diferencia de peso molecular entre el fragmento de DNA amplificado respecto al de cDNA, por esta razón, se llevó a cabo un control (RT⁻) donde no se hizo retrotranscripción con el fin de observar si aparecía la banda del receptor MAS. Dado que no aparece, podemos afirmar que la banda corresponde al mRNA y que este mRNA se encuentra en los espermatozoides.

De esta manera, los resultados obtenidos en la RT-PCR apoyan los resultados obtenidos en el ensayo de inmunofluorescencia.

En conclusión, los resultados de la presente investigación demuestran que el receptor Mas de la angiotensina-(1-7) se encuentra en los espermatozoides humanos. Son necesarios estudios adicionales de carácter funcional para determinar el papel que juega este receptor en los procesos de fertilidad masculina.

6 CONCLUSIONES

- 1.- El Receptor Mas de la angiotensina-(1-7) está presente en los espermatozoides humanos.
- 2.- El mRNA del receptor Mas de la angiotensina-(1-7) está presente en los espermatozoides humanos.

7 BIBLIOGRAFÍA

- Agirregoitia E. (2008) Opioide-hartzaileak eta kannabinoide-hartzaileak giza espermatozoideetan espresatzen dira eta haien mugikortasunean eragiten dute. UPV/EHU. País Vasco.
- Aitken R.J. (2013). Human spermatozoa: Revelations on the road to conception. *F1000Prime Reports*.
- Alenina N, Baranova T, Smirnow E, Bader M, Lippoldt A, Patkin E, Walther. (2002). Cell type-specific expression of the Mas proto-oncogene in testis. *J Histol Cytol*, **50**, 691–696.
- Alenina N, Xu P, Rentzsch B, Patkin EL, Bader M. Genetically altered animal models for Mas and angiotensin-(1–7) (2008). *Exp Physiol*. **93**, 528–537.
- Browder LW, Ericsson CA, Jeffery WR. (1991) *Developmental Biology*. cap 3.
- Costa, A. P., Fagundes-Moura, C. R., Pereira, V. M., Silva, L. F., Vieira, M. A., Santos, R. A. and Dos Reis, A. M. (2003) Angiotensin-(1–7): a novel peptide in the ovary. *Endocrinology*. **144**, 1942–1948
- De los Reyes M., Barros C. Immunolocalization of proacrosin/acrosin in bovine sperm and sperm penetration through the zona pellucida. (2000) *Anim Reprod Sci*. **58**, 215–228.
- Douglas G.C., O'Bryan M.K., Hedger M.P., Lee D.K., Yarski M.A., Smith A.I., Lew R.A. (2000) The novel angiotensin-converting enzyme (ACE) homolog, ACE2, is selectively expressed by adult Leydig cells of the testis. (2004) *Endocrinology*. **145**, 4703–4711.
- Fuchs S, Frenzel K, Hubert C, Lyng R, Muller L, Michaud A, Xiao HD, Adams JW, Capecchi MR, Corvol P, Shur BD, Bernstein KE. (2005) Male fertility is dependent on dipeptidase activity of testis ACE. *Nature Med*. **11**, 1140–1142.
- Gorus F.K., Pipeleers D.G. (1981). A rapid method for the fractionation of human spermatozoa according to their progressive motility. *Fertil Steril*. **35(6)**, 662–5.
- Kim E, Baba D, Kimura M, Yamashita M, Kashiwabara S, Baba T. Identification of a hyaluronidase, hyal5, involved in penetration of mouse sperm through cumulus mass. (2005) *Proc Natl Acad*. **102(50)**, 18028–33.
- Langford KG, Zhou Y, Russell LD, Wilcox JN, Bernstein KE. Regulated expression of testis angiotensin-converting enzyme during spermatogenesis in mice. (1993) *Biol Reprod*. **48**, 1210–1218
- Leal, M. C., Pinheiro, S. V., Ferreira, A. J., Santos, R. A., Bordoni, L. S., Alenina, N., Bader, M. and Franca, L. R. The role of angiotensin-(1–7) receptor Mas in spermatogenesis in mice and rats. (2009) *J Anat*. **214**: 736–743
- Leung OS, Sernia C. The renin-angiotensin system and male reproduction: new functions for old hormones. (2003) *J Mol Endocrinol*. **30(3)**, 263–270.
- Miller D, Ostermeier GC. Towards a better understanding of RNA carriage by ejaculate spermatozoa. (2006) *Hum Reprod Update*. **12(6)**, 757–67.
- Ramalho-Santos J, Amaral A, Sousa AP, Rodrigues AS, Martins L, Baptista M., Mota P.C., Tavares R., Amaral S., and Gamboa S. Probing the structure and function of mammalian sperm using optical and fluorescence microscopy. *Modern Research and Educational Topics in Microscopy. FORMATEX*. 394–402.

- Passos-Silva D.G., Verano-Braga T. & Santos R.A. Angiotensin-(1–7): beyond the cardio-renal actions. (2013) *Clin Sci.* **124**, 443–456.
- Reis, A. B., Araujo, F. C., Pereira, V. M., Dos Reis, A. M., Santos, R. A. and Reis, F. M. Angiotensin (1–7) and its receptor Mas are expressed in the human testis: implications for male infertility (2010). *J Mol Histol.* **41**, 75–80
- Reis, A. B., Araujo, F. C., Pereira, V. M., Dos Reis, A. M., Santos, R. A. and Reis, F. M. Angiotensin (1–7) and its receptor Mas are expressed in the human testis: implications for male infertility. (2010) *J Mol Histol.* **41**, 75–80
- Schuel H, Burkman LJ. A tale of two cells: endocannabinoid-signaling regulates functions of neurons and sperm. (2005) *Biol Reprod.* **73(6)**, 1078–86.
- Speth RC, Daubert DL, Grove KL. Angiotensin II: a reproductive hormone too? (1999) *Regul. Pept.* **79**, 25–40.
- Stauss CR, Votta TJ, Suarez SS. Sperm motility hyperactivation facilitates penetration of the hamster zona pellucida. (1995.) *Biol Reprod.* **53(6)**, 1280–5.
- Talbot P., BD. Shur, GD Myles. Cell adhesion and fertilization: steps in oocyte transport, sperm-zona pellucida interactions, and sperm-egg fusion. (2003) *Biol Reprod.* **68**, 1–9.
- Vinson GP, Mehta J, Evans S, Matthews S, Puddefoot JR, Saridogan E, Holt WV, Djahanbakhch O. Angiotensin II stimulates sperm motility. (1996) *Regul Pept.* **67**, 131–135
- Vinson GP, Puddefoot JR, Ho MM, Barker S, Mehta J, Saridogan E and Djahanbakhch O. Type 1 angiotensin II receptors in rat and human sperm. (1995) *J Endocrinol.* **144(2)**, 369–78.
- Wassarman, P. M. Towards molecular mechanisms for gamete adhesion and fusion during mammalian fertilization. (1995) *Curr Opin Cell Biol.* **7**: 658–664.
- Xu P, Santos RAS, Bader M, Alenina N . Alterations in gene expression in the testis of angiotensin-(1–7)-receptor Mas-deficient mice. (2007) *Regul Pept.* **138**, 51–55.
- Xu Q, Lin HY, Yeh SD, et al . Infertility with defective spermatogenesis and steroidogenesis in male mice lacking androgen receptor in Leydig cells. *Endocrine* 2007b . **32**: 96–106.
- Yanagimachi R. Mammalian fertilization. In: Knobil E, & Neill JD, eds. *The Physiology of Reproduction.* (1994) *2nd ed.* New York: Raven Press, 189–317.
- Young D, O'Neill K, Jessell T & Wigler M. Characterization of the rat mas oncogene and its high-level expression in the hippocampus and cerebral cortex of rat brain. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 5339–5342.
-