

Facultad de Medicina y Enfermería
Departamento de Fisiología

Medikuntza eta Erizaintza Fakultatea
Fisiologia Saila

TESIS DOCTORAL

FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO Y SU RELACIÓN CON EL METABOLISMO PEPTÍDICO



MEMORIA PRESENTADA POR:

M^a Victoria Aparicio Prieto

DIRIGIDA POR LOS DOCTORES:

Luis Casis Saenz

Nerea Subirán Ciudad

2018

TESIS DOCTORAL



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

Facultad de Medicina y Enfermería
Departamento de Fisiología

Medikuntza eta Erizaintza Fakultatea
Fisiologia Saila

TESIS DOCTORAL

**FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO Y SU
RELACIÓN CON EL METABOLISMO PEPTÍDICO**

MEMORIA PRESENTADA POR:

M^a Victoria Aparicio Prieto

DIRIGIDA POR LOS DOCTORES:

LUIS CASIS SAENZ

NEREA SUBIRÁN CIUDAD

2018

M^a Victoria Aparicio Prieto

1

AGRADECIMIENTOS

No sólo los conocimientos científicos son importantes, sino que es tan importante tener al lado un gran equipo humano, generoso y entusiasta. Por lo que quiero decir "GRACIAS" a todas estas personas que han compartido conmigo este proyecto.

En primer lugar, me gustaría agradecer este estudio al profesor Dr. Luis Casis, mi director, una gran persona no solo en el ámbito profesional y académico sino también en la parte humana. Gracias a él he podido realizar esta investigación. Ha sido mi compañero en los momentos de bloqueo y un buen tutor cuando necesitaba orientación y apoyo científico. Su amistad, ayuda incondicional más allá de lo que su papel como director exige, interés, actitud siempre positiva y dispuesta para que este proyecto avanzara.

Mi agradecimiento a la Dra. Olga Ramón que fue mi codirectora de este proyecto hasta su fallecimiento. Mujer emblemática, luchadora incansable, que me dio la oportunidad de no declinar cuando las cosas se veían difíciles, y que a estas alturas de mi vida me animó a llevar a cabo este proyecto. Siempre tuve en ella un apoyo tanto en lo profesional como en lo personal, siempre sabré que está conmigo.

Mi agradecimiento a la Dra. Nerea Subirán, por su interés, apoyo y conocimientos, y a todo el personal del departamento de fisiología.

Quiero dar las gracias a mi familia, en primer lugar, a mis queridos padres a los cuales he perdido, pero que siempre me han apoyado y me han dado y me siguen dando fuerzas hasta en los momentos más difíciles, estoy segura que se sentirían felices de ver que había conseguido realizar este proyecto. Su mejor herencia ha sido la educación que me han dado con gran esfuerzo, frase que repito frecuentemente a mis tres hijos Gorka, Josu y Mikel a los cuales tengo que agradecer su apoyo, comprensión y ayuda. No quisiera olvidar a mi querida hermana Arantza que siempre me ha animado.

Mi agradecimiento a Julio Morales, gracias por tus atenciones y amistad.

Gracias, a mis amigos y compañeros que me han animado en este proyecto con su apoyo, y a los que no me han apoyado, también gracias, porque me ha dado fuerzas para continuar.

Esta tesis fue posible gracias al apoyo recibido por Biobanco.

No quisiera olvidar a nadie, pero pido disculpas si he olvidado sin querer a alguien. Sin vosotros esto no habría sido posible.

A todos GRACIAS!!!!

INDICE

INDICE

I INTRODUCCIÓN	
1. PEPTIDASAS	23
1.1. Clasificación y Nomenclatura de las Peptidasas	24
1.1.1. Las peptidasas como enzimas interconvertidoras de biopéptidos	25
1.1.2. Catabolismo proteico y acciones intracrinas de las Peptidasas	28
1.1.3. Otras acciones de las peptidasas	28
1.1.4. Las peptidasas en la fisiología y en la patología	29
1.2. Papel de las peptidasas en la fertilidad	30
1.2.1. Regulación del ciclo sexual: modelo de liberación gonadotrópica	31
1.2.2. Sistemas de comunicación celular y fertilidad	33
2. CARACTERÍSTICAS MOLECULARES DE LAS AMINOPEPTIDASAS ESTUDIADAS	35
2.1. Endopeptidasa Neutra (NEP, CD10) (E.C.3.424.11)	35
2.2. Aminopeptidasa neutra (APN, CD13) (EC 3.4.11.2)	36
2.3. Aminopeptidasa sensible a puromicina (PSA) (EC 3.4.11.14)	41
2.4. Aminopeptidasa B (APB) (EC 3.4.11.6)	42
2.5. Dipeptidil Peptidasa IV (DPPIV) (EC 3.4.14.5.)	43
2.6. Cistil aminopeptidasa (Cys-AP) (EC 2.4.11.3)	46
2.7. Aspartil aminopeptidasa (Asp-AP) (EC 3.4.11.21)	47
2.8. Glutamil aminopeptidasa (Glu-AP, APA) (EC 3.4.11.7)	48
2.9. Prolil endopeptidasa (PEP) (EC 3.4.21.26)	50
3. SISTEMA OPIOIDE	52
3.1. Características de los receptores opioides	52
3.2. Sistema opioide endógeno	55
3.3. Activación de los receptores de opioides	58
3.4. Señalización mediada por receptores de opioides	59
3.5. Biosíntesis, transporte, depósito, liberación y metabolismo de los péptidos opioides	60

3.6.	Acciones fisiológicas de los receptores de opioides	60
3.7.	Implicación del Sistema Opioide en la fertilidad masculina	61
3.7.1.	Control de las hormonas reproductoras mediante los opioides	61
3.7.2.	Control de la función testicular por los opioides	63
3.7.3.	Control de la función espermática por los opioides	68
3.8.	Regulación de la fertilidad femenina (opioides/aminopeptidasas)	70
4.	SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA (SRA)	74
4.1.	Sistema renina angiotensina (SRA): de su concepto clásico o sistémico al descubrimiento de SRA local o tisular	74
4.2.	SRA intracelular	77
4.3.	Ejes o vías que componen el SRA	77
4.4.	Componentes de SRA	79
4.4.1.	Angiotensinógeno y angiotensinas	79
4.5.	Receptores	80
4.6.	El SRA en la fertilidad masculina	83
4.6.1.	El SRA y su implicación en la función testicular	83
4.6.2.	El SRA y su implicación en la función espermática	85
5.	ESPERMATOGÉNESIS	88
5.1.	Espermatocitogénesis	89
5.2.	Espermiogénesis.....	90
5.3.	Regulación Endocrina y Paracrina de la Espermatogénesis ..	92
6.	ESTRUCTURA DE LOS ESPERMATOZOIDES	93
7.	FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO	97
7.1.	Mecanismos por los que se produce la fragmentación del ADN	100
7.1.1.	Inducción de la apoptosis durante el proceso de la espermatogénesis	100
7.1.2.	Rotura del ADN durante el proceso de espermiogénesis	102
7.1.3.	Fragmentación del ADN espermático post-testicular	103
7.1.4.	Activación de Caspasas y Endonucleasas	108
7.1.5.	Daño del ADN inducido por la radioterapia y quimioterapia ..	110
7.1.6.	Daño del ADN inducido por sustancias tóxicas ambientales.	110

II OBJETIVOS	113
III MATERIAL Y MÉTODOS	117
1. Consentimientos y autorizaciones	117
1.1. Comité ética Universidad	118
1.2. Comité ética Cruces	120
1.3. Carta Dra. Ramón	121
1.4. Consentimiento Dr. Matorras	122
1.5. Hoja informativa	124
1.6. Autorización	126
2. Aspectos clínicos	127
2.1. Inclusión	127
2.2. Estimulación ovárica	127
2.3. Recogida de las muestras seminales	128
2.4. Preparación de las muestras seminales para uso clínico	128
2.4.1. Evaluación de la muestra	128
2.4.2. Preparación de la muestra	129
2.4.3. Análisis de la movilidad espermática	130
2.5. Inseminación Intrauterina	133
2.6. Fase lutea	133
2.7. Definición de embarazo	133
2.8. Procesamiento de las muestras para el estudio	133
2.8.1. Protocolo congelación	134
2.8.2. Protocolo descongelación	134
3. Fragmentación del ADN espermático	134
4. Columnas de Anexina	137
5. Actividad enzimática	139
5.1. Actividad enzimática por espectrofluorimetría	139
5.1.1. Análisis de la actividad por ensayos enzimáticos	143
5.1.2. Determinación de la actividad de las aminopeptidasas	144
5.1.3. Fundamento general	145
5.1.4. Fundamento particular para cada enzima	146
5.1.5. Análisis de datos de las actividades peptidásicas	148
5.1.6. Técnica para la cuantificación de proteínas	148
5.2. Actividad enzimática por citometría de flujo	149

5.2.1. Fundamento	149
5.2.2. Preparación de las muestras (Citometría semi-cuantitativa).	150
6. Receptores	153
6.1. Receptores sistema renina angiotensina.	
Inmunocitoquímica	155
6.2. Receptores opioides. Inmunocitoquímica	156
IV RESULTADOS	159
1. Aspectos clínicos	159
2. Resultados actividad enzimática	163
2.1. Actividad enzimática por espectrofluorimetría	163
2.2. Actividad enzimática por citometría de flujo	171
3. Receptores	173
3.1. Receptores opioides. Inmunocitoquímica	173
3.2. Receptores Sistema renina angiotensina.	
Inmunocitoquímica	174
3.3. Receptores opioides. Citometría de flujo	176
3.4. Receptores sistema renina angiotensina.	
Citometría de flujo	178
V DISCUSIÓN	183
1. Sobre los resultados clínicos obtenidos	183
2. Sobre la distribución de actividad enzimática observada	187
3. Sobre las modificaciones espermáticas y seminales según el	
grado de fragmentación	196
4. Sobre los receptores de opioides	201
5. Sobre los receptores del SRA	204
6. Integración de resultados	208
6.1. Integración de resultados: sistema opioide	208
6.2. Integración de resultados: sistema renina-angiotensina	210
VI CONCLUSIONES	215
VII BIBLIOGRAFÍA	221

I INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. PEPTIDASAS

En los últimos años se ha venido describiendo el papel que diferentes péptidos bioactivos (también llamados biopéptidos) pueden tener en diversas situaciones fisio-patológicas, entre ellas cuestiones relacionadas con la fertilidad tanto masculina como femenina. Una de las formas más habituales de estudiar las alteraciones peptidérgicas consiste en analizar la actividad de los enzimas que los controlan y que, en general, reciben el nombre de peptidasas.

Los péptidos son hidrolizados por un número limitado de enzimas que presentan una especificidad de sustrato relativamente amplia, quedando descartado el concepto “una peptidasa un sustrato (Schwartz, 1983; Kenny, 1986). Las peptidasas se encuentran presentes en una gran variedad de tejidos y fluidos corporales por lo que se cree que deben de estar involucradas en el metabolismo de una gran cantidad de biopéptidos fundamentales en la comunicación intercelular del organismo (Fujiwara et al., 1999). En la actualidad, el conocimiento de la función de las peptidasas las ha llevado a su empleo como marcadores tumorales y dianas terapéuticas.

Últimamente, se han venido desarrollando diversos estudios sobre el comportamiento de las peptidasas en el sistema reproductor tanto femenino como masculino, muchos de ellos llevados a cabo por nuestro grupo de investigación (Fernandez et al., 2002; Irazusta et al., 2004; Valdivia et al., 2004; Subirán et al., 2008; Ramón, 2011; Romeu, 2014). Concretamente, en el presente proyecto analizamos diez peptidasas, en muestras seminales de varones cuyas muestras han sido utilizadas para técnicas de reproducción asistida (Inseminación Intrauterina Conyugal), Endopeptidasa Neutra (NEP), Aminopeptidasa N (APN), Aminopeptidasa B (APB), Cystil Aminopeptidasa (Cys-AP), Prolil Endopeptidasa (PEP), Glutamil Aminopeptidasaeptidasa (Glu-AP, APA), Piroglutamil Peptidasa (PGA I, PGLU), Dipeptil Peptidasa IV (DPP IV), Aminopeptidasa B (APB) y Aminopeptidasa A (APA).

1.1. Clasificación y Nomenclatura de las Peptidasas

Las peptidasas actúan sobre péptidos, y se dividen en exopeptidasas y endopeptidasas.

Las **exopeptidasas** hidrolizan el enlace peptídico del último, o de los 2 ó 3 últimos aminoácidos de la cadena (requieren carga negativa). Si la hidrólisis sucede en el extremo carboxilo terminal, las enzimas se denominan carboxipeptidasa o peptidil-dipeptidasas que hace referencia a exopeptidasas específicas para hidrolizar el enlace peptídico de los dipéptidos. Las omega-peptidasas son enzimas que eliminan residuos terminales que son sustituidos, ciclados o unidos por enlaces isopeptídicos formados por grupos diferentes de -amino y -carboxilo.

Las **endopeptidasas** cuya actuación hidrolítica es sobre el amino terminal del péptido (requieren carga positiva), catalizan la ruptura de enlaces peptídicos dentro de la cadena, y se clasifican en base a su mecanismo catalítico. Así, dentro de este grupo se encuentran la aspartil-endopeptidasa, la cystil- endopeptidasa, la metaloendopeptidasa, la serilendopeptidasa, la treonil- endopeptidasa, y en un último grupo se engloban aquellas peptidasas que aún no han sido clasificadas ("*unclassified-endopeptidases*").

En cuanto a las características catalíticas, tanto las aspartil-endopeptidasas como las metaloendopeptidasas emplean una molécula de agua activada como nucleófilo. El resto de los grupos de endopeptidasas emplean átomos de oxígeno o azufre de la propia cadena lateral.

Las bases de un sistema de clasificación según las secuencias y estructuras de las peptidasas se establecieron en los años 90, de esta clasificación surgió la base de datos MEROPS, que desde 1996 constituye en Internet una fuente de referencia con datos de todas las peptidasas. Dicha base de datos establece una clasificación jerárquica construida sobre los conceptos de Tipo Catalítico, Clan, Familia y Peptidasa (Barret et al., 2004), ver tabla 1.

En un primer paso, las peptidasas se agruparían según el Tipo Catalítico, es decir la naturaleza química de los grupos responsables de la catálisis anteriormente mencionados, de los cuales tomarían la letra mayúscula inicial (A,

C, M, S, T, U) de la clasificación. A continuación las peptidasas se agrupan en clanes o familias, atendiendo a grupos de peptidasas homólogas.

Cada Clan agruparía una o varias Familias, con un origen común. El nombre del Clan vendría determinado por una segunda letra mayúscula, que no se reutiliza en caso de desaparecer el Clan en posteriores reorganizaciones de la clasificación. No todas las Familias pueden clasificarse en Clanes.

Las Familias se agrupan por homología con el miembro del grupo “Más representativo”, en base a la unidad peptidásica. La Familia aporta un número secuencial a la nomenclatura. Este número tampoco se reutiliza. Por último, cada peptidasa tiene un identificador único, con 2 partes separadas por un punto (•).

Aunque existen diversas clasificaciones, las aportadas por la Enzyme Commission (EC), son las que estarían aceptadas actualmente. En esta clasificación las peptidasas se encontrarían dentro del grupo E.C. 3.4, que hace referencia a las hidrolasas que actúan sobre enlaces peptídicos. La subclasificación posterior estaría de acuerdo con la nomenclatura anteriormente mencionada, propuesta por Rawlings y Barrett en 1995 y 2010.

1.1.1. Las peptidasas como enzimas interconvertidoras de biopéptidos

La comunicación entre células es una condición indispensable para el funcionamiento coordinado de cualquier organismo. Esta comunicación se realiza principalmente mediante tres sistemas: el sistema hormonal, el sistema nervioso y los mediadores celulares. Los péptidos bioactivos son “moléculas mensajeras” empleadas por estos tres sistemas. Este tipo de moléculas se caracterizan por su ubicuidad, habiendo sido descritas en tejidos de todos los reinos de seres vivos, y por sus secuencias cortas de aminoácidos que pueden encontrarse libres o encriptadas en proteínas. Estos últimos requerirían la hidrólisis enzimática para su liberación (Sumitomo et al., 2005; Nasciment et al., 2008). La acción conjunta de estos biopéptidos con las enzimas y receptores involucrados forman los diferentes sistemas peptídicos, de vital importancia en la comunicación celular (Turner, 1986,1987; Angelisova et al., 1999; Sjostrom et al., 2000; Mina-Osorio, 2008).

Tipo	Clan	Familia	Nº EC	Enzima			
M	MA	M1	3.4.11.2	APN , CD13, Alanil-aminopeptidasa de membrana, Aminopeptidas amicrosomal, Aminopeptidasa M, Aminopeptidasa N, Aminopeptidasa unida a partículas, Amino-oligopeptidasa, Alanina ami-nopeptidasa, Aminopeptidasa de membrana I, Pseudoleucina aminopeptidasa, Aminopeptidasa específica de alanina Cisteinilglicina-dipeptidasa, Cisteinilglicinasa, L-Alanil-aminopeptidasa, Aminopeptidasa neutra			
			3.4.11.3	Cys-AP , CAP, Cistil-aminopeptidasa, Oxitocinasa, Cistina aminopeptidasa, L-Cistina aminopeptidasa, Peptidasa de oxitocina, Vasopresinasasa, P-LAP			
			3.4.11.6	APB , Aminopeptidasa B, Arilamidasa II, Arginina aminopeptidasa, Arginil- aminopeptidasa, Arginina aminopeptidasa activada por Cl-, Aminopeptidasa citosólica IV, L-Arginina aminopeptidasa			
			3.4.11.7	APA , Glu-AP, EAP, gp160, Aminopeptidasa A, Angiotensinasa A, Aspartato aminopeptidasa, Glutamil aminopeptidasa, Glutamato aminopeptidasa activada por Ca2+, Antígeno BP-1/6C3 de linfocitos B de ratón, Aminopeptidasa de membrana II, Aminopeptidasa MII, Angiotensinasa A2, L- aspartato Aminopeptidasa			
			3.4.11.14	PSA , Alanil-aminopeptidasa citosólica, Arilamidasa, Aminopolipeptidasa, Aminopeptidasa activada por tiol, Aminopeptidasa citosólica III, Aminopeptidasa de hígado humana, Aminopeptidasa sensible a la puromicina, Alanil-aminopeptidasa soluble, Alanina aminopeptidasa			
			3.4.24.11	M13	NEP (*) , Neprilisina, Endopeptidasa neutral, Endopeptidasa 24.11, Peptidasa neutra del borde en cepillo de riñón, Endopeptidasa 2, Antígeno CALLA, Endopeptidasa, Metaloendopeptidasa de membrana, Proteinasa neutra del borde en cepillo de riñón, Endopeptidasa -2, Glicoproteína CALLA, Metaloendopeptidasa neutra, Metaloendopeptidasa de membrana, Endopeptidas neutra 24.11, CD10		
			3.4.11.21	MH	Asp-AP , Aspartil aminopeptidasa		
			3.4.14.5	M18	DPPIV , CD26, Dipeptidil-peptidasa IV, Dipeptidil aminopeptidasa IV, Xaa-Pro- dipeptidil-aminopeptidasa,		
			S	SC	S9	3.4.21.26	Xaa-Pro natriamidasa, Postprolina dipeptidil aminopeptidasa N, Antígeno de linfocito CD26, Glicoproteína GP110, Dipeptidil dipeptidasa IV, Glicoproteína aminopeptidasa, X-prolil dipeptidil aminopeptidasa, Pep X, Antígeno de leucocito CD26 , Glicilprolil dipeptidilaminopeptidasa, Dipeptidil-peptidilaminopeptidasa, Glicoproteína aminopeptidasa, Dipeptidil-aminopeptidasa IV, DPPIV/CD26 Amino acil-prolil dipeptidil
						3.4.21.26	PEP , Prolil oligopeptidasa, Enzima de actuación post-prolina, Endopeptidas específica de prolina, Endopeptidasa post prolina, Endoprolilpeptidasa, Prolil endopeptidasa

Tabla 1. Clasificación jerárquica de las peptidasas objeto de estudio. (M) metaloendopeptidasa, (C) cisteinil- aminopeptidasa, (S) seril-aminopeptidasa. Tomado de IUBMB Biochemical Nomenclature home page (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme>)

El control peptídico es un fenómeno altamente complejo, y a la vez flexible y aplicable al control de muy diversas funciones fisiológicas y en tipos celulares muy distintos. Así, los péptidos bioactivos están regulados por “convertasas” específicas que los hidrolizan (Hallberg et al., 2005).

La función biológica más conocida de las peptidasas es la conversión de péptidos bioactivos (Fig. 1). Gracias a su actividad hidrolítica las peptidasas pueden modular las funciones de los mensajeros peptídicos, produciendo tanto formas activas, como inactivas (Antczak et al., 2001; Proost et al., 2007).

En su concepto clásico, las responsables de la conversión de biopéptidos son las peptidasas de superficie celular o ectopeptidasas. Éstas, tienen el centro catalítico dirigido hacia el exterior de la célula, regulando así las funciones de estos mensajeros peptídicos (Turner, 1986,1987; Taylor, 1993). No obstante, se ha descrito que tanto las formas unidas a la membrana como las formas solubles intracelulares pueden ser secretadas al exterior, donde participarían en la conversión de péptidos bioactivos (Balogh et al., 1998; Shrimpton et al., 2002). De hecho, los enzimas analizados en este trabajo son peptidasas presentes en la fracción soluble del líquido seminal y en la membrana del espermatozoide, por lo que su función no es otra que la de regular la actividad de péptidos bioactivos presentes en la muestra seminal y cuyo cometido podría ser crucial en el proceso de fertilización.

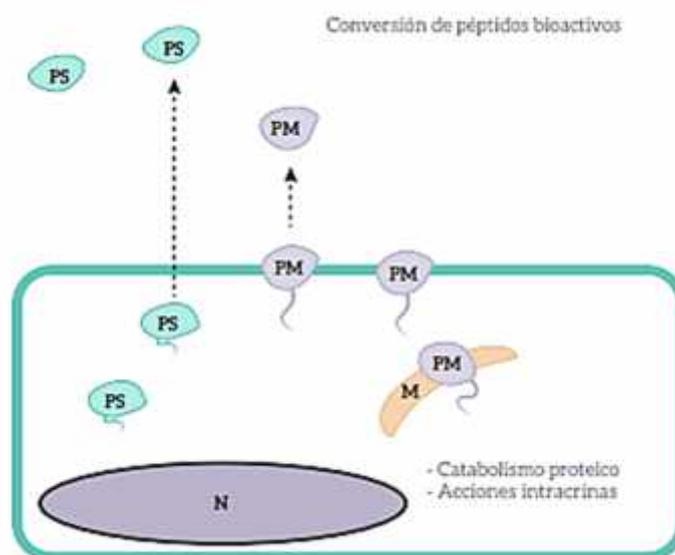


Fig. 1.- Representación gráfica de las diferentes localizaciones de las peptidasas y sus funciones en estos lugares. (PM) peptidasa anclada a la membrana; (PS) peptidasa soluble, tanto citosólica como secretada al espacio extracelular; (N) núcleo y (M) membrana citoplasmática (Blanco , 2010).

1.1.2. Catabolismo proteico y acciones intracrinas de las peptidasas

Hasta hace relativamente poco se pensaba que la función de las peptidasas en el interior de las células se limitaba a la última etapa del catabolismo proteico (Mantle, 1992; O'Cuinn, 1998). Así, y dado que la acción de los péptidos bioactivos ocurre en la superficie celular, las peptidasas citosólicas no tomarían parte en su regulación metabólica, salvo que se secretaran al exterior. Sin embargo, en la última década, se ha descrito que además de la función endocrina, paracrina y autocrina, estos mensajeros peptídicos podrían tener funciones dentro de la propia célula funciones intracrinas (Fig. 1).

Según algunos autores, muchos péptidos podrían actuar en el interior de la misma célula donde son sintetizados. Estos péptidos, mediante su unión a receptores intracelulares, regularían por acción intracrina funciones como el crecimiento celular (Re, 2002, 2003; Re y Cook, 2006). Siendo esto así, se ha propuesto que las peptidasas intracelulares realizarían funciones de regulación intracrina, además de su actuación en la última etapa del catabolismo proteico (Ferro et al., 2004; Linardi et al., 2004).

1.1.3. Otras acciones de las peptidasas

Gracias a su actividad catalítica, la acción de las peptidasas también forma parte de los procesos que conllevan a la degradación de la matriz extracelular. Se ha comprobado que tienen importancia en el proceso de rotura folicular (durante la ovulación), en el desarrollo de nuevos tejidos, en la inflamación y en procesos neoplásicos (Pérez et al, 2009; Blanco et al, 2010).

Además, algunas peptidasas pueden ejercer su función como moléculas de adhesión, proceso vital en el reconocimiento celular y necesario en fenómenos como la migración celular (Riemann et al., 1999; Antczak et al., 2001; Pro y Dang, 2004; Carl-McGrath et al., 2006). Otras tienen función receptora, se ha descrito que las estructuras de algunas de las ectopeptidasas estudiadas en este trabajo contienen dominios intracitoplasmáticos de pocos aminoácidos (Riemann et al., 1999; Sumitomo et al., 2005). De esta forma, estas peptidasas podrían dar lugar a señales intracelulares mediante la interacción con diferentes moléculas, condicionando funciones como el crecimiento o la migración celular (Antczak et al., 2001; Nanus, 2003; Sumitomo et al., 2005).

1.1.4. Las peptidasas en la fisiología y en la patología

Las peptidasas cumplen una tarea fundamental en la comunicación intercelular, condicionando diferentes funciones fisiológicas e influyendo en la génesis y evolución de diferentes procesos patológicos. A nivel del sistema nervioso central, se ha descrito que forman parte en funciones como la memoria, el comportamiento y la nocicepción (Hui, 2007). También es muy conocido su papel en el sistema cardiovascular y en la función renal, ya que las vías metabólicas del sistema renina-angiotensina (denominado SRA o sistema RA) están reguladas por peptidasas (Fyhrquist y Saijonmaa, 2008; Carrera et al., 2009; Varela González, 2015). Del mismo modo, han sido descritos cambios en la expresión y función de las peptidasas en: alteraciones de la memoria y del estado de ánimo, enfermedades cardiovasculares, renales, endocrinometabólicas y en procesos tumorales (Wiedeman y Trevillyan, 2003; Hui, 2007; Leung, 2007; Pérez, 2011). De hecho, está ampliamente descrito el empleo de determinadas peptidasas como marcadores tumorales (Murakami et al., 2005; Liu et al., 2007; Havre et al., 2008; Larrinaga et al., 2010, 2011a, 2011b, 2012).

Por otra parte, algunos inhibidores de peptidasas se emplean actualmente en terapia farmacológica. Por ejemplo, el captopril, enalapril, y lisinopril, son inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE), y se emplean en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares (Wilcox et al., 1988). Las gliptinas, inhiben la acción de la enzima dipeptidil-peptidasa IV (DPP-IV), y se emplean en el tratamiento de la diabetes tipo II (Wiedeman y Trevillyan, 2003; Drucker y Nauck, 2006). También existen estudios bastante avanzados sobre el empleo de otros inhibidores de peptidasas, como los de la prolil endopeptidasa (PEP) para el tratamiento de la demencia senil (Babkova et al., 2017) o los de la endopeptidasa neutra (NEP) y la aminopeptidasa N (APN) en el tratamiento del dolor, entre otros (García- Horsman et al., 2007; Noble y Roques, 2007).

Algunas de las enzimas mencionadas en el párrafo anterior han sido objeto de estudio en el trabajo que se presenta en esta Tesis. En páginas posteriores se llevará a cabo una descripción más amplia y detallada de algunas de sus funciones y características, así como su posible vinculación con la fertilidad. Destacar que la

está limitada al eje hipotálamo-hipofisario, ya que en todas las zonas cerebrales existen enzimas capaces de hidrolizar el decapeptido.

A finales de la década de los 80 nuestro departamento realizó un estudio sobre diferencias sexuales en la actividad aminopeptidásica tras orquidectomía y ovariectomía, en el que se observó un incremento de actividad enzimática mayor en machos que en hembras que coincidía con una mayor elevación de los niveles de LH plasmáticos en los primeros tras la castración (de Gandarias et al., 1989). A partir de los trabajos mencionados anteriormente, se realizaron numerosos estudios de seguimiento de la actividad proteolítica durante el ciclo sexual en el eje hipotálamo-hipofisario y en otras regiones cerebrales, observándose cambios cíclicos en estas actividades enzimáticas que podían ser paralelos o antiparalelos a los cambios cíclicos gonadotrópicos (de Gandarias et al., 1990, 1993, 1994a, 1996, 1999a, 1999b)

1.2.1. Regulación del ciclo sexual: modelo de liberación gonadotrópica

A pesar de las investigaciones realizadas no se conoce con exactitud el mecanismo por el cual se produce la liberación cíclica hormonal, es decir, no existe un modelo de liberación gonadotrópica plenamente establecido.

Debido a los cambios conductuales observados en el comportamiento de las mujeres durante el ciclo menstrual, durante mucho tiempo se pensó que debía existir una relación entre éste y el cerebro. Pero hasta que Sawyer (1955) detectó que diversos agentes neurotransmisores inhibían la ovulación, no se pudo comprobar experimentalmente. Actualmente se sabe que un gran número de neuropéptidos interviene en el control de la secreción de hormonas sexuales, tanto a nivel hipotalámico e hipofisario como en otras regiones cerebrales tales como la amígdala o la corteza. Así, existen numerosos trabajos que relacionan la actividad reproductiva con biopéptidos como la angiotensina II (A II), el neuropéptido Y, la colecistoquinina y los péptidos opioides (siendo estos últimos los más estudiados).

En ratas se ha observado cómo el tono opioide hipotalámico desciende bruscamente durante el proestro (momento en el que se produce el pico preovulatorio de la LH) (Sarkar y Yen, 1985), este evento es esencial en el mecanismo neural que provoca la secreción de LH, ya que un descenso del tono

opioide provocado previamente adelanta el pico hormonal. Parece ser que el sistema opioide se encuentra entre el reloj neural y las neuronas de GnRH, por lo que se plantea que el reloj neural debe restringir el tono opioide (Kalra, 1992). Otros autores proponen que los estrógenos pueden modular la síntesis y/o actividad de enzimas responsables de la degradación o síntesis de péptidos, pudiendo así intervenir en la secreción de gonadotropinas (Fink, 1988). También se ha descrito que el estradiol hace fluctuar la densidad sináptica en hipocampo durante el ciclo estral (Woolley y McEwen, 1992).

Las encefalinas son unos de los EOP más importantes del organismo y se encuentran involucradas en el control de la liberación cíclica hormonal. Se ha estudiado la actividad de tres enzimas degradadoras de encefalinas: la tyr-aminopeptidasa (soluble), la aminopeptidasa A (APA) y la APN (ambas unidas a membrana). Los resultados obtenidos mostraron cómo la actividad soluble cambiaba a lo largo del ciclo presentando mayores niveles de actividad durante la tarde del proestro a nivel hipotalámico, del mismo modo, se observó que la actividad de APN variaba a lo largo del ciclo presentando sus mayores cotas en la tarde del proestro a nivel de hipotálamo, hipófisis y amígdala. Todos estos picos de actividad peptidásica son coincidentes con un descenso en el tono opioide, pudiendo por ello estar implicadas en la regulación de ciclo sexual (de Gandarias et al., 1996; Fernández, 1996).

Los resultados comentados hicieron que nuestro grupo propusiera un mecanismo de liberación gonadotrópica del eje hipotálamo-hipofisario, complemento del reloj neural de Kalra (Kalra, 1992), en el que durante la fase de estro las encefalinas actuarían inhibiendo (sinaptando) la liberación de GnRH y catecolaminas (excitadoras de la liberación), produciendo una inhibición global. Esto se lograría con una menor degradación del péptido a nivel intracelular y sináptico (baja actividad aminopeptidásica soluble y de membrana). Por el contrario, durante el proestro habría una desinhibición encefalinérgica al producirse un incremento en la actividad enzimática degradadora (de Gandarias et al., 1994b) (Fig. 3)

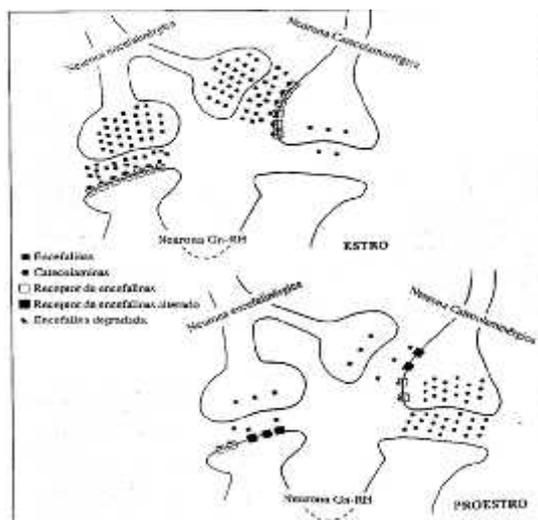


Fig. 3.- Durante la fase de estro habría un predominio de acción opioidérgica (PIPS), que inhibiría la liberación de GNRH y podría inhibir a la vez la liberación de catecolaminas. Durante el proestro, ante la caída de los niveles de encefalinas, se estimularía la producción de catecolaminas (PEPS) y se desinhibiría la liberación de GNRH (de Gandarias et al., 1994b).

1.2.2. Sistemas de comunicación celular y fertilidad

Los péptidos opioides y sus peptidasas, además de actuar sobre el eje hipotálamo-hipófisis modulando la secreción de GnRH, FSH y LH (Fabbri et al., 1989; Dobson y Smith, 2000; Parvizi, 2000), tienen también una acción directa sobre el folículo ovárico (Dell'Aquila et al., 2002; Kaminski et al., 2003).

En el ovario, procesos tan importantes como la oogénesis, la foliculogénesis y la ovulación están controlados tanto hormonalmente como por una gran variedad de sustancias producidas por el propio ovocito y por las células de la granulosa (Karlsson et al., 1997; Eppig, 2001; Gilchrist et al., 2004), por lo que existe una intensa comunicación bidireccional entre los distintos tipos celulares (Fig. 4). El líquido folicular contiene una gran cantidad de factores y sustancias que regulan la maduración folicular y ovocitaria. Del mismo modo, la fecundación del ovocito, el transporte del embrión resultante, su evolución y la capacidad de éste de implantarse en el endometrio estarán claramente influenciados por las características del microambiente que el embrión encuentre tanto en las trompas de Falopio como en la cavidad uterina (Facchinetti et al., 1986; Petraglia et al., 1986; Pardanaud y Dieterlenlievre, 1993; Hannoun et al., 2010; Bianchi et al., 2013).

En resumen, durante el ciclo sexual las células ováricas y endometriales sufren cambios dinámicos en cuanto a crecimiento, diferenciación y regresión celular, por lo que el órgano reproductor femenino representa un buen modelo para el estudio de la regulación peptidérgica (Fujiwara et al., 1999). Si lo que buscamos es una optimización de los tratamientos de reproducción asistida,

resultará imprescindible conocer todos estos sistemas de comunicación celular con el fin de conseguir el microambiente idóneo para el cultivo de gametos y embriones:

- Formación del folículo
- Crecimiento
- Bloqueo meiótico
- Transcripción
- Proliferación
- Maduración
- Diferenciación
- Expansión del cúmulo Ovulación

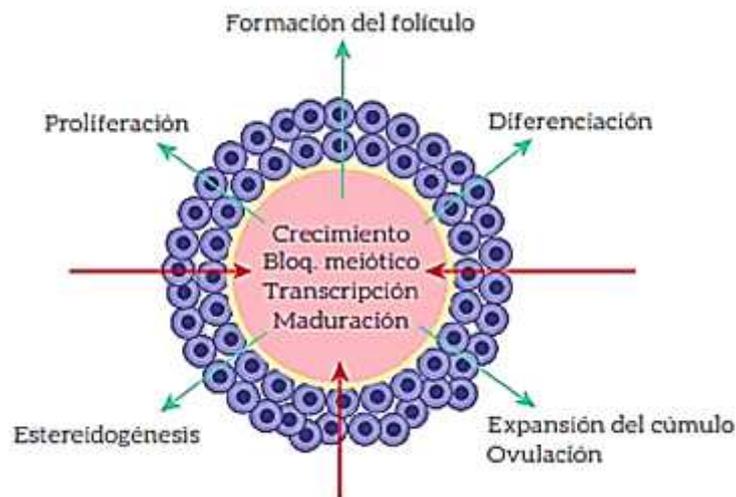


Fig. 4.- Comunicación bidireccional entre el ovocito y las células de la granulosa. Se observa la influencia de las células de la granulosa en el desarrollo ovocitario así como los procesos controlados por el ovocito que se llevan a cabo en las células de la granulosa (Eppig, 2001).

Uno de los sistemas de comunicación celular más estudiados es el sistema opioide, integrado por los péptidos opioides endógenos (EOP), sus receptores celulares y los enzimas que se encargan de su regulación (peptidasas). El sistema opioide se encuentra presente en órganos y tejidos del tracto genital masculino y femenino, interviniendo en la función reproductora.

Otro importante modelo de regulación fisiológica es el sistema Renina Angiotensina, presente en el ovario de múltiples especies (entre ellas la humana) (Nemeth et al., 1994), de hecho, se ha propuesto su intervención en procesos tan importantes como la esteroidogénesis, la ovulación, el síndrome de ovario poliquístico y el síndrome de hiperestimulación ovárica (Harata et al., 2006). En el presente proyecto de Tesis Doctoral ampliaremos el estudio de este sistema en espermatozoide humano.

2. CARACTERÍSTICAS MOLECULARES DE LAS AMINOPEPTIDASAS ESTUDIADAS

2.1. Endopeptidasa Neutra (NEP, CD10) (E.C.3.424.11)

Características moleculares

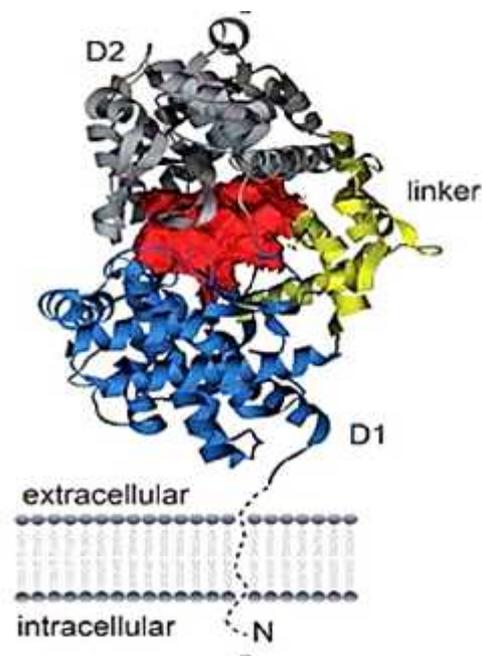
La NEP es una ectoenzima perteneciente a la familia de proteínas integrales de membrana tipo II, también se la conoce como neprilisina. Es considerada una metalopeptidasa dependiente de Zn^{2+} .

Es una endopeptidasa representativa de la Familia M13 cuya acción está restringida a péptidos de entre 40 y 50 aminoácidos de longitud, presenta alta especificidad por el extremo N-terminal de los aminoácidos hidrofóbicos, principalmente leucina, metionina y fenilalanina (Kerr, Kenny, 1974). Así, sus principales sustratos in vivo parecen ser las encefalinas, taquicininas, así como, sustancia P, endotelinas, bombesina y bradiquininas (McLellan et al., 1988; Roques y Beaumont, 1990).

El gen MME localizado en el cromosoma 3 (q25.1-25.2) es el encargado de codificar la NEP humana. Su purificación y clonación revelaron que esta proteína integral de membrana, posee un corto dominio citoplasmático, una región hidrofóbica transmembrana y un largo dominio extracelular que contiene el sitio activo (Malfroy et al., 1988). Normalmente aparece como un homodímero de membrana unido no covalentemente (Shimada et al., 1996). Cada cadena polipeptídica, con un peso molecular de unos 100 kDa aproximadamente, se encuentra altamente glicosilada y posee cuatro residuos conservados de cisteína que parecen estar implicados en el mantenimiento de la estructura y la actividad enzimática (Tam et al., 1985). Además, la NEP es idéntica al cluster de

diferenciación CD10 y al marcador de linfocitos llamado CALLA (Letarte et al., 1988; Roques et al., 1993).

Fig. 5.-Estructura tridimensional de la endopeptidasa neutra.



Localización (distribución celular)

Aunque la NEP se localiza principalmente en los botones axonales de neuronas, también se ha detectado en dendritas neuronales, oligodendrocitos, astrocitos y células de Schwann (Marcel et al., 1990; Matsas et al., 1989; Kioussi et al., 1992). Su distribución coincide con los receptores opiodes (Waksman et al., 1986).

2.2. Aminopeptidasa neutra (APN, CD13, EC 3.4.11.2)

Características moleculares

El gen que codifica para esta enzima (ANPEP) se encuentra localizado en el brazo largo del cromosoma 15, ocupa 35 kb (Look et al., 1989), y su expresión varía durante el crecimiento y la diferenciación celular (Sjostrom et al., 2000).

La APN es una metaloproteína que pertenece a la familia M1 de aminopeptidasas, y el Zn^{2+} es el único metal divalente que interviene en su centro activo. Es una verdadera aminopeptidasa integral de membrana de tipo II (McLellan et al., 1988; Riemann et al., 1999). También se presenta altamente glicosilada, y con el centro activo orientado hacia el exterior celular. Así, esta

ectoenzima suele aparecer descrita como un homodímero, con dos subunidades unidas no covalentemente, cada monómero tiene 967 aminoácidos y un peso molecular aproximado de unos 150 kDa (Sjostrom et al., 2000; Luan y Xu, 2007; Mucha et al., 2010; Wong et al., 2012). Los aminoácidos están agrupados en siete regiones: una cola intracelular corta, un pequeño segmento o región de transmembrana, un pequeño tallo extracelular y una región extracelular grande (Sjöström et al., 2000; Wong et al., 2012; Chen et al., 2012). Esta última región está organizada en cuatro secciones, también reconocidas como dominios acorde al plegamiento característico de las metalopeptidasas M1 (Thunnissen et al., 2001; Kyrieleis et al., 2005; Wong et al., 2012; Chen et al., 2012) (Fig. 6).

Las características estructurales generales de las siete regiones establecidas para la APN de mamíferos se describen a continuación y son el resultado de la integración de los informes previos relacionados con la secuencia de esta enzima y su topología en la membrana, con los datos obtenidos de la determinación de la estructura tridimensional por difracción de rayos X para las enzimas humana y porcina (Sjöstrom et al., 2000; Xu et al., 2005; Wong et al., 2012; Chen et al., 2012):

- Región I:** Región o extremo citoplasmático (amino-terminal) compuesto por 9 aminoácidos.

- Región II:** Constituida por una α -hélice de 24 aminoácidos hidrofóbicos que forman el segmento de transmembrana que le permite a la enzima mantenerse anclada a la misma.

- Región III:** Se encuentra hacia el exterior de la célula, está compuesta por 33 residuos aminoacídicos, muchos de ellos residuos de serina y treonina y soporta el núcleo catalítico de la enzima.

- Región IV:** Posee un plegamiento en forma de barril β . No es significativo para la actividad enzimática (aminoácidos del 67 al 287).

- Regiones V y VI:** Forma el sitio catalítico con los ligandos del ion Zn^{2+} (aminoácidos 288 al 636). La región o dominio V tiene un plegamiento tipo termolisina, enzima modelo de la familia y en ella se encuentran los motivos típicos 352GXMEN356 y 388HEXXHX18E411 (la numeración de los residuos se sigue

acorde con la APNh (Thunnissen et al., 2001; Kyrieleis et al., 2005; Wong et al., 2012; Chen et al., 2012). Esta región está formada por dos subdominios, uno hacia el extremo amino que se pliega en forma de hoja , con una -hélice que lo conecta con el subdominio localizado hacia el extremo carboxilo, con plegamiento en superhélice . La región o dominio VI adopta un plegamiento en forma de sándwich .

- **Región VII:** Región carboxilo terminal (aminoácidos del 637 al 967).

Tiene un plegamiento en forma de superhélice , por lo que presenta un alto contenido de -hélices y de residuos polares relacionados con la dimerización de la enzima. Está implicado en la formación del dímero mediante fuerzas no covalentes. En el caso de la APNh, presenta un lazo flexible de 8 residuos aminoacídicos (891YGGGSFSF898) que solo se forma cuando la enzima está unida a un inhibidor o a un péptido sustrato (Pascual et al., 2015).

Localización (distribución celular)

A pesar de expresarse principalmente como enzima de membrana, en ocasiones, se puede encontrar de forma soluble en fluidos corporales tales como el plasma sanguíneo, la orina, el líquido seminal (Jung et al., 1984; Erbeznik y Hersh, 1997; Antczak et al., 2001; Fernández et al., 2002; Ramón, 2011; Subirán et al., 2011) y en el líquido folicular (Roméu, 2014). No obstante, se desconoce el mecanismo a través del cual la aminopeptidasa N es liberada de la membrana plasmática.

Su distribución es bastante amplia, es particularmente abundante en las membranas celulares del borde en cepillo del intestino delgado, el riñón y la placenta. También se encuentra presente en el hígado, si bien el mayor interés por esta enzima surgió con el descubrimiento de su participación en la hidrólisis e inactivación de encefalinas en el cerebro (Gros et al., 1985a; Matsas et al., 1985).

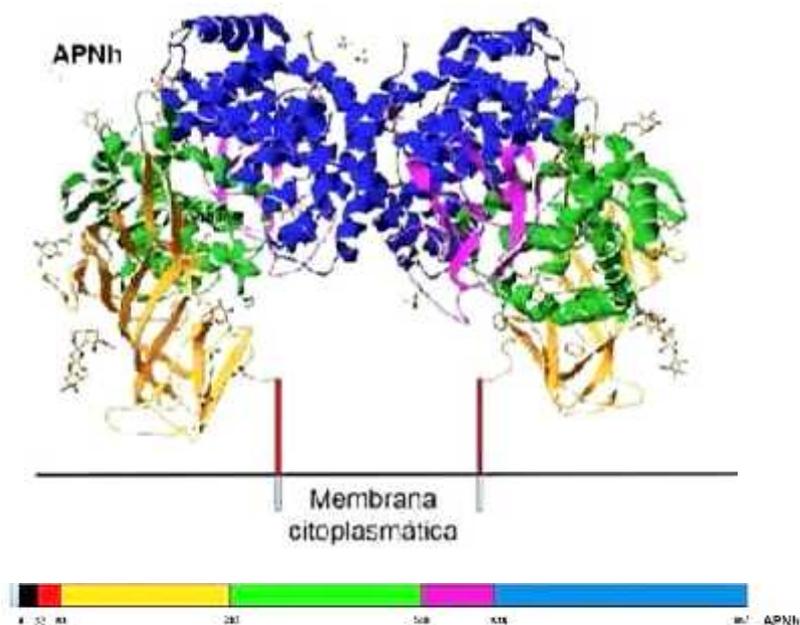


Fig. 6.- Representación esquemática de APN dimérica de mamíferos. Dímero en membrana de APN_h. I: organización en regiones de la cadena polipeptídica de APN_h. La región citoplasmática se muestra en azul claro, el segmento transmembrana en negro, el tallo rico en Ser/Thr es rojo, y las restantes regiones (que forman el ectodominio) IV, V, VI y VII se muestran en naranja claro, verde, magenta y azul, respectivamente. II diagrama de cintas del dímero APN_h representado en su probable orientación con respecto a la membrana plasmática. Los colores de las regiones corresponden a la representación en I. Las esferas rojas indican la localización de los iones Zn²⁺ de los centros activos.

En el sistema inmunológico, la APN se encuentra como marcador de superficie (CD13) en monocitos/macrófagos, células presentadoras de antígenos (APC), linfocitos T y B, y granulocitos. También esta enzima, participa en la degradación de citoquinas y antígenos presentados en la superficie celular por moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I y II, regulando indirectamente funciones del sistema inmune. La APN también participa en la transducción de señales en monocitos y en los linfocitos T (Scornik y Botbol, 2001; Luan y Xu, 2007; Mina-Osorio et al., 2008; Wickstrom et al., 2011). Además, se ha descrito como implicada en la regulación de la actividad de algunos péptidos como encefalinas, angiotensinas, bradiquininas, citoquinas y quimocinas entre otras (Gros et al., 1985b; Matsas et al., 1985).

La acción de su hidrólisis libera el aminoácido del extremo amino terminal de péptidos que poseen entre 3 y 16 residuos de aminoácidos. Su acción es mayor cuando este aminoácido es alanina, a pesar de que también actúa cuando se encuentran otros aminoácidos, incluida la prolina (si bien en este caso la acción es mucho más lenta). La presencia de un residuo hidrofóbico seguido de prolina, provoca la hidrólisis intacta del dipéptido resultante (Barrett y McDonald, 1986).

Además, hidroliza numerosos dipéptidos, pero no aquellos que contengan residuos aspartil, glutamil, histidil, glicil, prolil o valil en el extremo N-terminal (O’Cuinn, 1998).

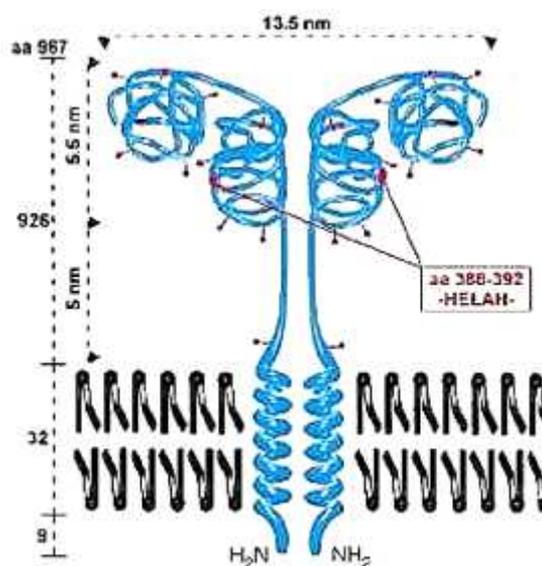
El papel biológico de esta enzima ha sido ampliamente descrito y se emplea como marcador histológico y/o de pronóstico en algunos tipos de cáncer (Bogenrieder et al., 1997; Ishii et al., 2001; Hashida et al., 2002).

Además, se conoce su papel en el sistema inmune (Riemann et al., 1999), así como su implicación en la angiogénesis (Bhagwat et al., 2001).

Se ha observado que la actividad óptima se da aproximadamente a pH 7 y es activada por la presencia de DTT. Además de los agentes metaloquelantes, los agentes thiol-reactivos, bestatina y particularmente la amastatina provocan la inhibición de la APN (O’Cuinn, 1998; Riemann et al., 1999; Sjostrom et al., 2000; Turner et al., 2004).

La implicación de la aminopeptidasa N en procesos fisiológicos como el control de la presión arterial y las respuestas analgésicas, así como en procesos patológicos, en los cuales se encuentra sobreexpresada su actividad, la han convertido en un blanco importante para el diseño de potenciales nuevos agentes terapéuticos para el tratamiento de la presión arterial en el sistema nervioso central, el manejo del dolor, el desarrollo de antivirales y diferentes etapas de los procesos cancerígenos y de inflamación (Pascual et al., 2015).

Fig. 7.- Estructura tridimensional de la Aminopeptidasa neutra.



2.3. Aminopeptidasa sensible a puromicina (PSA) (EC 3.4.11.14)

Características moleculares

Al igual que la APN, la PSA pertenece a la familia M1 de las metalopeptidasas. En este caso, es una sialoglicoproteína dependiente de Zn^{2+} , y aunque también se activa en presencia de Co^{2+} , en este caso, el complejo formado es menos estable.

Su acción aminopeptidásica es bastante amplia. Hidroliza preferentemente residuos de alanina del extremo N-terminal de muchos oligopéptidos, siempre y cuando tengan menos de 13 aminoácidos, aunque también puede hidrolizar leucina, arginina, tirosina, fenilalanina y metionina, entre otros, con elevada afinidad (Taylor, 1993). Por el contrario, los péptidos que presentan prolina en última o anteúltima posición no se ven afectados por su acción (Dando et al., 1997). Entre los sustratos de esta enzima, se encuentran las encefalinas, endorfinas y dinorfinas entre otros (Gros et al., 1985a; McLellan et al., 1988).

El gen que codifica para la PSA, denominado *NPEPPS*, se encuentra en el cromosoma 17 (17q21), ocupa 40 kb presenta 23 exones y 22 intrones (Thompson et al., 1999). Al igual que otros miembros de la familia M1, es una metaloproteína de cadena simple, de aproximadamente 100 kDa. Su actividad máxima se da a pH 7,5 y es activada por compuestos como tiol e iones calcio (Haeggström, 2004). Es inhibida por EDTA 1,10-fenantrolina, amastatina, bestatina y puromicina entre otros (Mantle et al., 1983; Dando et al., 1997). La sensibilidad a la puromicina, así como su activación por tioles, son hechos diferenciales de la PSA frente a otras metalopeptidasas (Mantle, 1992).

Localización (distribución celular)

Es una enzima principalmente citosólica (Tobler et al., 1997), lo que de forma clásica no sería consistente con su acción como enzima degradadora de péptidos bioactivos. Sin embargo, hay autores que proponen su participación en eventos proteolíticos esenciales para el crecimiento y la viabilidad celular (Constam et al., 1995). En este sentido, Stoltze y colaboradores (2000) considera que las exopeptidasas y oligopeptidasas citosólicas tienen su papel en la

degradación de oligopéptidos, incluyendo algunos péptidos antigénicos, resultantes del turnover proteico celular.

No obstante, PSA ha sido detectada en forma soluble en cerebro bovino (Hersh y McKelvy, 1981) y también se ha descrito actividad en líquido folicular ovárico (Roméu, 2014) por lo que se cree que puede estar involucrada en el proceso reproductivo (Osada et al., 2001a, 2001b).

Su presencia ha sido descrita mayoritariamente en el cerebro. También es abundante en intestino delgado, testículos (Tobler et al., 1997) e hígado (MoHiroi et al., 1992), así como en músculo esquelético y riñón (de Souza et al., 1991).

2.4. Aminopeptidasa B (APB) (EC 3.4.11.6)

Características moleculares

La aminopeptidasa B pertenece a la familia M1 de las metalopeptidasas, y al igual que otras enzimas de la misma familia, presenta un sitio de unión a Zn^{2+} (Suda et al., 1976; Ocain y Rich, 1987). De acuerdo con su dependencia por este ión, su acción se ve inhibida por sustancias quelantes, así como, por inhibidores típicos de enzimas con acción peptidásica, entre ellos, bestatina, agentes tiol-reactivos, arfamenina A y B (Hopsu et al., 1966; Cadel et al., 1995; O'Cuinn, 1998; Foulon et al., 2004). La actividad de esta enzima de 72 kDa es estimulada por iones clorados (Cl^-).

Al igual que otros genes que transcriben para enzimas con actividad peptidásica, el gen que transcribe para APB, RNPEP posee numerosos exones. Este gen, de 24 kb, se encuentra en el brazo largo del cromosoma 1 (Aurich-Costa et al., 1997) y su producto final es una proteína monomérica cuyo extremo amino terminal podría actuar como péptido señal (Fukasawa et al., 1996; Cadel et al., 1997).

Localización (distribución celular)

Su presencia ha sido mostrada en gran número de tejidos de mamíferos, si bien su nivel de expresión es diferente en los mismos (Foulon et al., 1996). Se ha detectado APB en cerebro, páncreas, corazón, tejido testicular y líquido seminal entre otros (Cadel et al., 1997; Taupenot et al., 2003; Hwang et al., 2007; Ramón,

2011). En cuanto a su localización subcelular, inicialmente fue descrita como una proteína citosoluble, y posteriormente ha sido localizada en el retículo endoplasmático, e incluso como enzima de secreción en la matriz extracelular (Lauffart et al., 1988; Tanioka et al., 2003; Cadel et al., 2004). Además, su actividad enzimática también ha sido medida en la fracción de membrana (Varona et al., 2007).

El intervalo de pH en el que actúa esta exopeptidasa de aproximadamente 72 kDa es bastante amplio, si bien desarrolla su actividad óptima alrededor de pH 7. Este hecho, junto con su ubicuidad, se presenta como argumento a favor de su adaptabilidad a diversos compartimentos subcelulares y su papel en un amplio espectro de fenómenos fisiológicos. Algunos autores, la relacionan incluso con fenómenos como la maduración post-traducciona l y otros procesos reguladores en la membrana plasmática (Foulon et al., 2004).

Su denominación como aminopeptidasa básica corresponde al hecho de que su acción libera los aminoácidos lisina o arginina del extremo amino terminal, siempre que el anterior aminoácido no sea una prolina (Gainer et al., 1984; Cadel et al., 1995). Así, entre sus sustratos naturales se encuentran las bradiquininas, encefalinas, somatostatina, A III y kalidinas (McLellan et al., 1988; Foulon et al., 2004).

2.5. Dipeptidil Peptidasa IV (DPPIV) (EC 3.4.14.5.)

Características moleculares

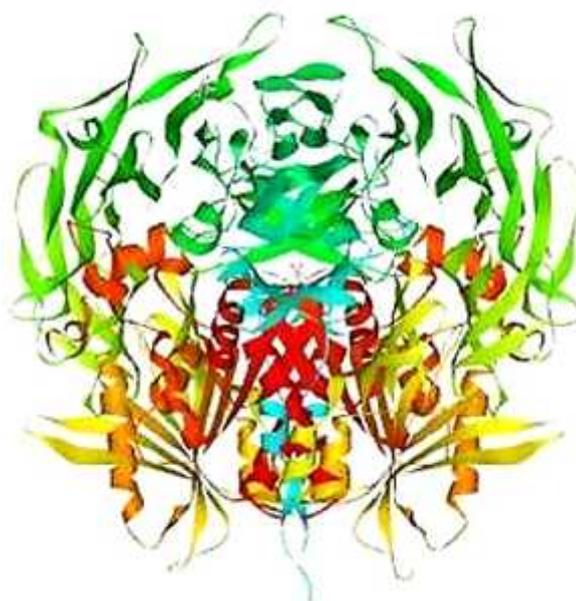
La dipeptidil aminopeptidasa IV es una exopeptidasa empleada como marcador tumoral que pertenece a la familia S9 de peptidasas, en la que se engloba un grupo bastante variado de seril-aminopeptidasas. Pertenece al grupo denominado “familia prolil oligopeptidasa” por lo que es incapaz de hidrolizar péptidos que contengan más de 30 residuos (Polgár, 2002). La acción de su hidrólisis libera un dipéptido del extremo amino terminal de algunos oligopéptidos y polipéptidos, siempre que el ante último residuo corresponda a una prolina (o alanina aunque con menor afinidad) y el anterior no sea ni prolina ni hidroxiprolina (O’Cuinn, 1998; Pro y Dang, 2004). La identidad del último aminoácido no es crítica para la acción de esta enzima, siempre que tenga el grupo amino libre (Yoshimoto et al., 1978).

A nivel bioquímico, se puede mencionar que esta seril-aminopeptidasa tiene una actividad óptima a pH 7,8 y que posee un peso molecular de aproximadamente 110 kDa en su forma madura glicosilada. Puede ser inhibida por fluoruro de fenilmetilsulfonilo, diprotina A, bacitracina, puromicina y por los agentes tiol-reactivos: p-cloromercuribenzoato y N-etilmaleimida (O’Cuinn, 1998; Kikkawa et al., 2005).

Localización (distribución celular)

Es una glicoproteína de membrana, que presenta un extremo amino terminal de tan sólo 6 aminoácidos hacia el citoplasma, un dominio hidrofóbico que la ancla a la membrana y un gran dominio extracelular en el que se haya el centro activo. También se ha visto, que en ocasiones, la pérdida del extremo amino terminal insertado en la membrana, puede originar su presencia en forma soluble en suero humano, líquido cerebroespinal, líquido seminal y otros fluidos coporales (Iwaki-Egawa et al., 1998; Carl-McGrath et al., 2006; Ramón, 2011). Se ha descrito que esta enzima está involucrada en la activación e inactivación de un gran número de citoquinas y quimosinas (Havre et al., 2008) y además de su acción sobre péptidos bioactivos y su papel en el sistema inmune, esta aminopeptidasa tendría especial relevancia en el transporte específico de algunos dipéptidos y tripéptidos (Tiruppathi et al., 1990).

Fig. 8. Estructura tridimensional de la dipeptidil peptidasa IV.



Consta de un gran dominio extracelular (C-terminus), conectado a un dominio transmembrana hidrofóbico y un corto dominio intracelular (N-terminal) (Engel et al., 2003; Lambeir et al., 2003). La dimerización de la DPP-IV (pm 240 kd) es un prerrequisito para su actividad enzimática. Esta forma molecular carece de componente transmembrana e intracelular. Típicamente está presente como un homodímero con pm 210-290 kd, pero también forma grandes complejos moleculares de 900 kd (Lambeir et al., 2003). Existe también un homólogo de la DPP-IV soluble, localizado a nivel intracelular y en el plasma sanguíneo. Estos diferentes niveles de expresión estarían relacionados con una característica de los genes que codifican para algunas seril-proteasas (Rawlings et al., 1991), y es el hecho de que el gen DPP4 (2q24.3) (Abbott et al., 1994) presente múltiples exones, hasta el extremo de que los aminoácidos que codifican para el centro activo se encuentren en 2 exones diferentes. Así, incluso se ha descrito que la mutación de un solo aminoácido de este centro activo provoca que, una vez sintetizada en el retículo endoplásmico, la DPPIV no migre hasta la membrana plasmática y sea degradada rápidamente (Tsuji et al., 1992).

Su presencia en algunos tejidos tiene lugar en una proporción bastante elevada, como en el riñón, intestino delgado o placenta. En otros tejidos se ha localizado en menor concentración, como en la lengua o en el hígado, mientras que en el corazón, páncreas y cerebro, su presencia es bastante menor.

Se ha encontrado actividad DPP en testículos y epidídimos de algunos mamíferos (bovinos y ratas). Esta actividad es causada por DPP 4 en el epidídimo, mientras que en los testículos es atribuida a DPP8/9. No se encontró actividad DPP en los espermatozoides a excepción de los incrustados en el epitelio, justo antes de su liberación a la luz y en las espermátides que presentaban una tinción específica para DPP9 (Dubois et al., 2009).

2.6. Cistil aminopeptidasa (Cys-AP) (EC 2.4.11.3)

Características moleculares

Esta enzima es una sialoglicoproteína, que como la APN, PSA, APB y APA pertenece a la familia M1 de las metalopeptidasa.

Como otras metalopeptidasas, su actividad es inhibida por agentes quelantes, como 1,10- fenantrolina, cationes divalentes, amastatina, bestatina y puromicina, estos dos últimos en menor medida (Kandror et al., 1994; Matsumoto et al., 2000; Nomura et al., 2004). Su actividad es óptima a pH 7,4 y poseen un peso molecular de 160 kDa. Los 18 exones y 17 intrones que constituyen el gen LNPEP que codifica para esta enzima, se encuentran en el cromosoma 5.

Su acción provoca la liberación de una cisteína del extremo amino terminal de un amplio espectro de sustratos, tales como oxitocina, vasopresina, somatostatina y A III (Sjoholm y Yman, 1967; Mitsui et al., 2004). La cistil-aminopeptidasa es la única aminopeptidasa de membrana descrita como degradadora de oxitocina, por lo que se le suele denominar oxitocinasa. También libera otros aminoácidos neutros o básicos, dependiendo de la identidad del siguiente aminoácido y de la longitud del péptido (Nomura S et al., 2005).

Localización (distribución celular)

Su presencia de forma soluble en suero de mujeres embarazadas ha sido descrita desde hace más de 50 años, si bien posteriormente se ha descrito su presencia como proteína transmembrana de tipo II, no solo en placenta, sino también en otros tejidos tales como cerebro, corazón, riñón, colon, próstata, ovario y músculo esquelético (Keller et al., 1995; Rogi et al., 1996; Laustsen et al., 1997; Czech y Corvera, 1999; Moeller et al., 1999; Demaegdts et al., 2004).

En su forma transmembranal presenta un dominio citoplasmático, un pequeño dominio transmembrana y un dominio de mayor tamaño en la cara externa de la célula (Rogi et al., 1996; Laustsen et al., 1997). En esta forma la Cys-AP ha sido identificada como el receptor AT4, que une A IV inhibiendo la actividad enzimática del receptor. Su conversión en enzima sérica durante el embarazo corresponde a la acción de metaloproteasas, que por su acción catalítica liberan el dominio carboxilo terminal (Nomura et al., 2005).

Además de en el mantenimiento de la homeostasis durante el embarazo (Rogi et al., 1996), se ha visto involucrada en muchos procesos fisiopatológicos, incluyendo algunos procesos tumorales (Ito et al., 2001; Suzuki et al., 2003). Es también una de las múltiples proteínas relacionadas con el metabolismo de la insulina, se ha descrito que dicha hormona regularía los mecanismos de translocación de Cys-AP (Sumitani et al., 1997).

2.7. Aspartil aminopeptidasa (Asp-AP) (EC 3.4.11.21)

Características moleculares

Asp-AP es una metalopeptidasa de la familia M18. Posee elevado peso molecular y se presenta en forma de oligómero, en este caso 8 subunidades idénticas de 53 kDa cada una.

Su acción radica en la hidrólisis de ácido glutámico, o aspártico (preferentemente) del extremo amino terminal, con preferencia de la presencia de aminoácidos neutros o hidrofóbicos en la siguiente posición. El gen que codifica para esta enzima (DNPEP) está ubicado en el cromosoma 2, y su secuencia se encuentra altamente conservada, siendo la única peptidasa de la familia M18 que se ha descrito en mamíferos. Como en el caso de otras metalopeptidasas, su acción es inhibida por EDTA, 1,10-fenantrolina y DTT (Sanderink et al., 1988; O'Cuinn, 1998), y activada por Ca^{2+} . Su pH óptimo se encuentra en 7,5 (Wilk et al., 2004).

Localización (distribución celular)

Esta enzima constituye más del 0,1% de las proteínas citosólicas solubles de varios tejidos, por lo que debería ser considerada como la principal peptidasa intracelular. Sin embargo, además de su descripción como enzima citosólica, se ha encontrado actividad aspartil-aminopeptidasa ligada a la membrana (Ramirez-Expósito et al., 2000; Varona et al., 2007; Blanco et al., 2008; Carrera et al., 2009). Su elevada concentración y su amplia distribución sugieren un papel importante en el proceso final del metabolismo intracelular de péptidos y proteínas, de forma coordinada con el proteosoma y otras peptidasas (Wilk et al., 1998, 2002). Sin embargo, se cree que podría tener otras funciones más especializadas en base a

que interviene en el metabolismo de péptidos biológicamente activos, tales como A II, colecistoquinina-8 ó neuropéptido-K (Kelly et al., 1983; Wilk et al., 1998).

2.8. Glutamil aminopeptidasa (Glu-ap, APA) (EC 3.4.11.7)

Características moleculares

Es una metalopeptidasa de 160 kDa que pertenece a la familia M1 de las aminopeptidasas, unida a membrana ZINC-dependiente que cataliza el clivaje de péptido N-terminal del glutamato (y en menor extensión al aspartato).

Su denominación como aminopeptidasa ácida corresponde al hecho de que esta ectopeptidasa libera aminoácidos ácidos del extremo amino terminal. De hecho, hidroliza principalmente residuos glutamil, aunque también puede hidrolizar con menor especificidad residuos aspartil (Glennner et al., 1962; Hwang et al., 2007; Wang J et al., 2004).

En humanos, el gen que codifica para la Glu-ap, *ENPEP*, se encuentra ubicado en el brazo largo del cromosoma 4, ocupa 100 kb y posee 20 exones, así como numerosos intrones (Vazeux et al., 1996; Wang et al., 1996).

Inicialmente la Asp-AP y la APA se describieron como una misma enzima, pero al avanzar el conocimiento sobre ellas, se descubrió que tenían características propias, y actualmente se clasifican en diferentes familias (Wilk y Thurston, 1990). En mamíferos, ha sido descrita como una enzima con dos subunidades de un peso molecular aproximado de unos 140 kDa cada una (Wang et al., 2004).

Desarrolla su actividad óptima alrededor de pH 7,2 y es activada por la presencia de iones Ca^{+2} con los sustratos glu- - naftilamida y asp- - naftilamida. Así mismo, la hidrólisis de glu- - naftilamida pero no la de asp- - naftilamida es también activada por iones Ba^{+2} . La actividad de la aminopeptidasa ácida citosólica es inhibida por quelantes metálicos (EDTA y 1,10 fenantrolina) y tioles (DTT: ditiotreitól) (McDonnell M et al., 1997; Sanderink GJ et al., 1988).

Localización (distribución celular)

Se ha descrito su expresión en linfocitos B de ratón, siendo idéntica a la BP-1/6C3 y empleada como antígeno marcador de diferenciación.

Es una proteína de membrana tipo II, y al igual que otras metalopeptidasas, presenta un sitio de unión a Zn^{+2} orientado hacia el exterior celular. Aunque se clasifica como una enzima de membrana, su actividad enzimática también ha sido descrita tanto en la fracción soluble como en suero. En este último caso, su liberación al medio extracelular es consecuencia de la hidrólisis de proteínas de membrana (Carrera et al., 2004; Goto et al., 2006). La Aminopeptidasa A se expresa en muchos tejidos, especialmente en el cerebro, el borde en cepillo de las células del epitelio intestinal y renal, y en el endotelio vascular (Lojda y Gossrau, 1980; Marchio et al., 2004; Goto et al., 2006; de Mota et al., 2008). Un conocido sustrato de esta enzima es la Angiotensina II, octapéptido que resulta ser también un importante regulador de la presión sanguínea (Marchio et al., 2004; Ruiz-Ortega et al., 2007). Además, ha sido relacionada con numerosos tipos de neoplasias, entre ellas, de próstata, de útero, de riñón y células escamosas de cabeza y cuello, así como con el linfoma (Fujimura et al., 2000; Ino et al., 2003; Blanco et al., 2008; Pérez et al., 2009).

La Aminopeptidasa A convierte la angiotensina II en angiotensina III, rompiendo el N-terminal de aminoácidos ácidos (aspartato), sirviendo como paso limitante en el metabolismo de la Angiotensina II. La aminopeptidasa A, regula el sistema renina angiotensina intrarrenal, estando distribuida en la superficie de las células endoteliales glomerulares, mesangiales y podocitos a lo largo de la nefrona, teniendo la más alta expresión en el túbulo proximal renal. Además, la Aminopeptidasa A es uno de los péptidos efectores principales del sistema renina angiotensina cerebral, ejerciendo un efecto tónico estimulante sobre el control de la presión arterial, habiéndose establecido líneas de investigación, en busca de fármacos antihipertensivos por bloqueo de esta aminopeptidasa (Bodineau et al., 2008). Componentes del SRA se han encontrado en los testículos, epidídimo, conductos deferentes, próstata y semen. Las funciones del SRA en los procesos locales en estos sitios, son todavía inciertos y aún no se han dilucidado totalmente, aunque hay pruebas de la participación en la contractilidad tubular, la espermatogénesis, la maduración de espermatozoides, la capacitación, la exocitosis acrosomal y la fertilización (Leung y Sernia, 2003).

2.9. Prolil endopeptidasa (PEP) (EC 3.4.21.26)

Características moleculares

Junto a la DPPIV, la PEP es una enzima perteneciente a la familia S9 de las peptidasas del Clan SC.

Se trata de una peptidasa monomérica de aproximadamente 75 kDa, cuya actividad resulta óptima en un pH entorno a 7,5. El incremento de dicha actividad es posible con NaCl, potasio, fosfato e iones nitrato. Por el contrario, resulta inhibida con Z-thio-prolina-thioprolinal (Gass y Khosla, 2007). El gen PREP, que codifica para la enzima PEP, se encuentra ubicado en el brazo largo del cromosoma 6, descrito por Goossens (Goossens et al., 1996a, 1996b) Esta endopeptidasa posee la capacidad de hidrolizar péptidos en el residuo prolina interno, de su extremo carboxilo unido al péptido (Gass y Khosla, 2007).

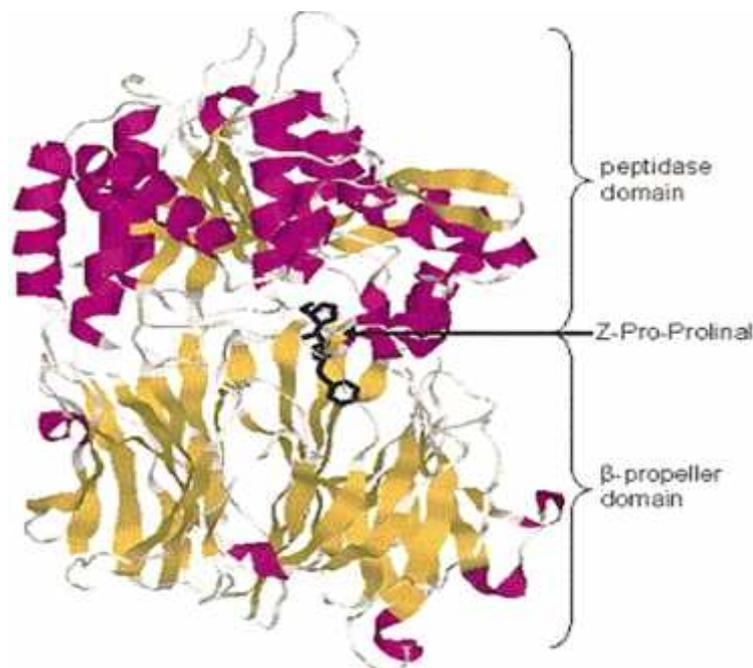


Fig. 9.- Estructura tridimensional de la Prolil oligopeptidasa

Al pertenecer a la familia prolil oligopeptidasa no es capaz de hidrolizar moléculas de mayor tamaño, por lo que su especificidad viene dada no sólo por la presencia del aminoácido prolina en la penúltima posición del extremo carboxilo

terminal, sino que también viene determinada por el peso de la molécula (Polgár, 2002).

Localización (distribución celular)

Esencialmente, se trata de una peptidasa citosólica que ha sido descrita además, como enzima de membrana y también en líquidos corporales, siendo más abundante en plasma que en suero (Gotoh et al., 1988; Oleary et al., 1996; Momeni et al., 2003; Szeltner y Polgar, 2008).

Inicialmente se descubrió su presencia en el útero, como enzima degradadora de oxitocina (Walter et al., 1971), y en la actualidad se conoce su acción sobre otros péptidos bioactivos. Así, rompe específicamente la unión prolina, en péptidos tales como, sustancia P, vasopresina, neurotensinas, angiotensinas I y II, dinorfinas, bradiquininas, TRH, hormona liberadora de de hormona luteinizante (LHRH) y hormona estimuladora de alfa-melanocitos (Welches et al., 1991; Ito et al., 2004; Ruiz-Ortega et al., 2007; Myohanen et al., 2011).

La prolil endopeptidasa se encuentra ampliamente distribuida en el organismo, localizándose principalmente en cerebro, músculo, testículo, riñón y glándula submaxilar (Goossens et al., 1996a; Gass y Khosla, 2007; Myohanen TT et al., 2009). Respecto a sus posibles funciones, se cree que participa en la regulación del metabolismo de las sustancias peptídicas mencionadas, y que su acción podría estar relacionada con el aprendizaje, la memoria, el estado de ánimo y otros procesos neurológicos (Li et al., 1996; Morain et al., 2000, 2007; Agirregoitia N et al., 2003b; Babkova et al., 2017). A nivel reproductivo, se ha involucrado a PEP con la meiosis de los espermatoцитos, la diferenciación de las espermátidas, y motilidad de los espermatozoides (Kimura et al., 2002).

3. SISTEMA OPIOIDE

El opio es la resina obtenida de la adormidera o planta del opio (*Papaver Somniferum* L.) y la morfina de aquí extraída es la responsable de la mayoría de sus efectos bioactivos (de Lorenzo et al., 1999). Debido a los efectos psicoactivos del opio, éste ha sido utilizado mucho más que cualquier otro narcótico (excluyendo el alcohol). De hecho, esta resina siempre ha tenido un lugar privilegiado en la medicina y, por lo que se ha podido saber, al menos en los últimos 4000 años ha sido muy utilizada en terapéutica (Snyder, 1993). Los efectos químicos de los opiáceos se empezaron a entender científicamente una vez aislados los compuestos activos del opio.

En 1805, el químico alemán Friedrich Sertürner, consiguió morfina pura desde la adormidera y bautizó a esa sustancia con el nombre de *morphium* en homenaje al dios del sueño Morfeo. En general, la cantidad cruda de opio que puede dar una adormidera es de 5-10 gramos. El 75-80% de ese opio son sustancias inactivas y el 20-25% restante lo forman las sustancias activas. Las más importantes son la morfina (10%), la narcotina (6%), la papaverina (1%) y la codeína (0,5%). La heroína no es más que un derivado semisintético de la morfina al que se le añaden dos grupos acetilo, obteniendo, gracias a éstos, una gran liposolubilidad. Así, llega con más facilidad a los tejidos y los efectos que producen son más intensos que los producidos por la morfina.

3.1. Características de los receptores opioides

En 1973, se descubren en el sistema nervioso central de animales y en el hombre los receptores opioides.

Los péptido opioides se unen a tres tipos de receptores farmacológicamente diferentes según la afinidad aparente que tiene cada receptor por los ligandos: receptor de opioides μ (μ = mu, por la morfina; MOP-R), receptor de opioides δ (= delta, por la palabra “deferens” ya que fue identificado en el conducto deferente del ratón; DOP-R) y receptor de opioides κ (= kappa, por la ketociclazocina; KOP-R) (Lord et al., 1977). Esos receptores metabotrópicos son monoméricos (en principio), están formados por 7 hélices y se acoplan a proteínas Gi/o (Picutoste et al., 1996). Entre los diferentes receptores de opioides hay un 60-70% de homología (73-76% en los dominios transmembrana) (Minami

y Satoh, 1995). En la última década, se ha descrito el receptor que une nociceptina y que guarda una gran homología con los receptores de opioides (la nociceptina es un péptido parecido a la dinorfina; NOP-R) (Wick et al., 1994). Los receptores de opioides se expresan tanto en invertebrados como en vertebrados (Waldhoer et al., 2004).

➤ **Receptores de opioides μ**

Aunque la distribución de receptor δ como la del receptor μ es muy parecida en el sistema nervioso central, existen algunas diferencias. En el cortex, el nivel del mRNA para δ es alto mientras el de μ es escaso (aunque a nivel de receptor, los dos tipos aparecen de manera abundante). Por el contrario, en el tálamo y el hipotálamo el nivel del mRNA para δ es bajo mientras el de μ es alto (Mansour et al., 1994). Los receptores μ se localizan en las dendritas y en los cuerpos celulares sugiriendo una acción postsináptica (Elde et al., 1995). El receptor μ también se ha descrito en tejidos periféricos tales como conducto deferente (Lemaire et al., 1978), bazo, glándulas adrenales y riñón de la rata (Wittert et al., 1996), así como en intestino de ratón (Pol et al., 2001).

Los receptores μ se definieron al principio por su afinidad con la morfina. No se han establecido otros ligandos endógenos para este receptor, pero varios de los péptidos opioides interactúan con los receptores μ . La β -endorfina tiene gran afinidad con los receptores μ , que también poseen gran afinidad por las encefalinas. Del mismo modo, la dinorfina A se fija con gran avidez a los receptores μ , pero no tanto como a los receptores δ .

Se ha demostrado la presencia en el SNC de más de un subtipo de receptores μ . La β -funaltrexamina bloquea con carácter irreversible a los receptores μ_2 (a nivel raquídeo), en tanto que la naloxonazina antagoniza de manera selectiva a un subtipo de receptor μ , denominado μ_1 (localizado nivel suprarraquídeo).

Algunas consecuencias de la activación de los receptores μ , incluyen depresión respiratoria, miosis, reducción de la motilidad gastrointestinal y sensación de bienestar y placer (euforia).

➤ **Receptores de opioides**

A nivel del sistema nervioso central, los receptores de opioides se observan en la amígdala y en el claustró (Pilapil et al., 1987). El mRNA para aparece en el cortex, tálamo, hipotálamo y núcleo accumbens, entre otros (Peckys y Landwehrmeyer, 1999). Los receptores se localizan en las dendritas y en los cuerpos celulares sugiriendo una acción postsináptica (Elde et al., 1995). En los tejidos periféricos, los receptores se expresan en los intestinos (Wittert et al., 1996) y sobre todo en las células del sistema inmune (Rivière, 2004).

Los receptores producen analgesia a nivel raquídeo, y la dinorfina A es el ligando endógeno más selectivo del receptor . Sin embargo, se han propuesto varios subtipos del receptor mediante estudios de fijación con agonistas y antagonistas en animales de experimentación (Reisine T, Pasternak G 1996).

➤ **Receptores de opioides**

En el sistema nervioso central del ser humano, se observa una gran densidad del receptor en el cortex así como en el caudado-putamen (Pilapil et al., 1987). El mRNA del receptor se distribuye en el cortex, el caudado-putamen, el hipocampo y la amígdala (Simonin et al., 1994). Los receptores se localizan mayoritariamente en los axones, lo que sugiere que tienen una acción presináptica (Elde et al., 1995). En los tejidos periféricos, los receptores se expresan en los linfocitos (Sharp et al., 1998), en los intestinos y en las glándulas adrenales (Wittert et al., 1996).

Las encefalinas resultan ser los ligandos endógenos de los receptores . Varios investigadores han logrado producir analgesia dental a niveles tanto raquídeo como supraespinal, si bien el sistema espinal parece estar más involucrado en este proceso. Se han identificado y propuesto dos subtipos de receptores de los opioides, con base en su sensibilidad diferencial para el bloqueo por diversos antagonistas selectivos (Reisine, Pasternak, 1996; Bodnar et al., 1991).

3.2. Sistema opioide endógeno

En 1975 se identifican los ligados endógenos para estos receptores (Colasanti, 1990; Lord et al., 1977), descubriendo la presencia en cerebro de una sustancia endógena que parecía comportarse como un ligando (agonista) de los receptores opiodes. Están involucrados en el control de la homeostasia, la regulación del dolor, en la proliferación celular, en el control cardiovascular, el estrés y en la respuesta inmune; se ha demostrado que también participan en la adicción a varias drogas como la nicotina, alcohol y la cocaína e incluso a ciertas actividades, como el sexo. Con estos descubrimientos se amplían los conocimientos de los mecanismos neurofisiológicos y bioquímicos.

El sistema opioide endógeno se agrupa en tres familias: endorfinas, encefalinas y las dinorfinas.

- Encefalinas: Fueron descubiertas en 1975 (Hugues et al., 1975; Cox et al., 1975). Son pentapéptidos que solo difieren en el aminoácido terminal, así está la metionina-encefalina y leucina-encefalina.
- Endorfina: Guillemin identificó y aisló la beta endorfina.
- Dinorfina: Identificada en 1980 por Goldstein.

Cada familia deriva de un polipéptido precursor diferente y tiene una distribución anatómica característica. Estos precursores se designan con los nombres de proencefalina (proencefalina A), proopiomelanocortina (POMC) y prodinorfina (proencefalina B). La POMC se fracciona en el organismo mediante procesos enzimáticos y da origen a la hormona estimulante de los melanocitos (HEM), hormona adrenocorticotrópica (ACTH) y beta-lipotropina (-LPH). Péptidos opioides y sus precursores (Mario Villarejo-Díaz et al., 2000).

El sistema opioide endógeno lo componen los receptores de opioides, sus ligandos endógenos (péptidos opioides endógenos: POE) y las moléculas que participan en la síntesis y la degradación de opioides.

Todos los péptidos que se conocen en el sistema nervioso central (excepto el dipéptido carnosina y el tripéptido glutatión) se sintetizan en los ribosomas de los cuerpos neuronales como una *pre-pro-proteína*, molécula precursora de gran

tamaño (Siegel et al., 1993). Tras la hidrólisis mediada por una Metallo-endopeptidasa, el precursor se transporta al aparato de Golgi en forma de *pro-proteína* que será trasladada mediante vesículas a través del axón hasta la terminación presináptica. En ese trayecto, los precursores sufren cambios hasta generar el péptido activo. Una vez excitada la neurona peptidérgica, ocurre la despolarización de la membrana presináptica, lo que conlleva una apertura de los canales de calcio voltaje- dependientes y un aumento del calcio intracelular (Thorn et al., 1978). De este modo, las vesículas repletas de neuropéptidos se liberan al espacio sináptico mediante exocitosis.

En el caso del sistema opioide endógeno, una vez encontrados los receptores de opioides, se identificaron sus ligandos endógenos así como los genes que codifican para los precursores de esos ligandos.

a) Proencefalina (PE) (Comb et al., 1982); se sintetiza en el sistema nervioso central así como en la corteza adrenal. Por acción de enzimas como la tripsina, la endopeptidasa y la N-carboxipeptidasa, desde esta proteína de 243 aminoácidos se generan siete péptidos. Los más importantes son las encefalinas (met- o leu-encefalina), creadas por cinco aminoácidos. El enzima responsable de la síntesis de estos pentapéptidos es la carboxipeptidasa denominada encefalina convertasa (Hughes y Kosterlitz, 1983).

b) Prodinorfina (PD) (Kakidani et al., 1982); desde este precursor se generan, entre otras, la dinorfina A (1-17), la dinorfina B (1-13) y la -neodorfina.

c) Proopiomelanocortina (POMC) (Nakanishi et al., 1979); este precursor contiene péptidos endógenos que no son opioides. De hecho, a parte del péptido opioide -endorfina, es precursor de la hormona adenocorticotropa (ACTH), la y -lipotropina (LPH) y la y -melanotropina (MSH), entre otros péptidos. El enzima que sintetiza todos esos péptidos es el enzima convertidor de POMC (Turner et al., 1987).

Hoy en día se conocen 20 POE y pueden tener un tamaño de 5-32 aminoácidos. La característica común de todos ellos es la secuencia aminoacídica que se repite del extremo amino al extremo carboxilo (“Tyr-Gly-Gly-Phe-Met” o “Tyr-Gly-Gly-Phe- Leu”); esas, son las secuencias de la Met- y la Leu-encefalina.

Las excepciones son la nociceptina, y la endomorfina (esta última compuesta por cuatro aminoácidos). Los péptidos opioides naturales de los mamíferos son la Met-enkefalina, Leu-encefalina, β -endorfina, Dinorfina A, Dinorfina B, α -Neoendorfina, Nociceptina y Endomorfina (Flórez, 1998).

En general, se puede decir que las encefalinas se conocen como los ligandos de los receptores δ aunque también se unen a los receptores μ . Las dinorfinas se unen a receptores δ y las β -endorfinas a receptores μ y también a receptores δ (Roques, 1999). En la tabla 2 podemos ver las afinidades que presentan los péptidos opioides por cada receptor.

Ligando	δ	K	μ	Referencia
Opioides endógenos				
[Leu ⁵]-encefalina	3	835	20	Chang <i>et al.</i> , 1981
Dinorfina A (1-17)	3,2	0,12	0,7	Leslie, 1987
Dinorfina B (1-8)	4,4	9	3,4	Leslie, 1987
β -endorfina	2,7	57	2	Leslie, 1987
α -Neoendorfina	0,57	0,20	1,3	Leslie, 1987
Endomorfina	>500	>500	0,67	Goldberg <i>et al.</i> , 1998
Opioides sintéticos				
DPDPE	1,4	790	>10000	Hunter <i>et al.</i> , 1990
	19 (Kd)	-	>3000 (Kd)	Fukuda <i>et al.</i> , 1995
Naltrindol	0,13	>5000	>10000	Fang <i>et al.</i> , 1994
U50,488	8690	0,72	941	Leslie, 1987
Nor-binaltorfimina	10,2	0,038	16,7	Metcalfe y Coop, 2005
Morfina*	>1000	163	1,4	Satoh y Minami, 1995
	390 (Kd)	-	23 (Kd)	Fukuda <i>et al.</i> , 1995
Naloxona	27	17,2	1,78	Leslie, 1987

Tabla 2.- Perfiles de afinidad de ligandos opioides obtenidos mediante experimentos de binding (modificado de Agirregoitia, 2008).

*La morfina no es un opioide endógeno del ser humano y tampoco es un opioide sintético. Es un alcaloide opioide proveniente de la resina de la adormidera.

La inactivación de los péptidos opioides se da mayoritariamente debido a la degradación metabólica llevada a cabo por enzimas denominadas peptidasas. Al romper los péptidos biológicamente activos, se generan fragmentos inactivos (Iversen, 1987). La degradación de las encefalinas (secuencia repetida en casi todos los POE) está catalizada por dos enzimas mayoritariamente: la alanina

aminopeptidasa N (APN), que rompe el enlace Tyr-Gly de la encefalina (Waksman et al., 1985), y la endopeptidasa neutra (NEP), que rompe el enlace Gly-Phe (Relton et al., 1983). A través de esas degradaciones se regula la actividad de las encefalinas.

3.3. Activación de los receptores de opioides

Entre los diferentes receptores de opioides hay un 60-70 % de homología y aunque los dominios transmembrana y los bucles intracelulares presentan una gran homología entre receptores (73-76 % y 86-100 % respectivamente), la homología entre receptores de los extremos amino y carboxilo, así como de los bucles extracelulares dos y tres es pequeña (9-10 %, 14-72% y 14-20% respectivamente) (Chen et al., 1993). De esta manera, es fácil entender que alguno de esos dominios con baja homología esté implicado en el reconocimiento de los diferentes ligandos. (Jordan y Devi, 1998) (Fig. 10).

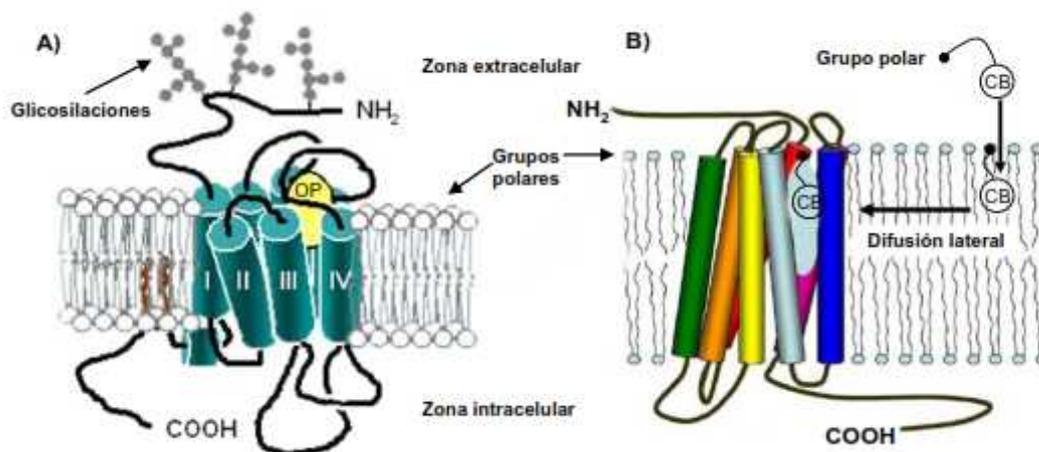


Fig. 10.- Modelos propuestos para la unión de los opioides y los cannabinoides a sus receptores. a.) El lugar de unión de los péptidos opioides lo conforman los dominios transmembrana, el extremo amino y los bucles extracelulares de los receptores. b.) El ligando se integra en la bicapa lipídica y, mediante difusión lateral, se une a la proteína heptahelicoidal. Aunque no se aprecie en el dibujo, los CBR también pueden glicosilarse en el extremo amino. OP: Opioides; CB: Cannabinoide (modificado de Carracedo, 2006a).

Experimentos de sustitución por mutagénesis dirigida de determinados aminoácidos en la estructura del receptor, han permitido identificar los residuos que participan en dicha unión. Así, se ha sabido que la sustitución de un solo residuo (Lys 108) permite la unión de agonistas específicos μ a receptores de opioides portadores de dicha sustitución (Minami et al., 1996) o que la sustitución

de un solo residuo de serina en los tres receptores de opioides (Ser177 en κ , Ser187 en δ y Ser196 en μ) confiere propiedades de agonista a antagonistas opioides inespecíficos como la naloxona (Claude et al., 1996).

El segundo y tercer lazo citoplasmáticos, así como parte del extremo carboxilo terminal del receptor de opioides están implicados en el reconocimiento de la proteína G transductora.

3.4. Señalización mediada por receptores de opioides

Los receptores de opioides se unen principalmente a proteínas G inhibitoras. En general, una vez que los agonistas activan esas proteínas G inhibitoras, se da la inhibición de la enzima adenilato ciclasa (AC) y como consecuencia, bajan los niveles de cAMP y baja la activación de la PKA. Ese hecho, en las neuronas, cambia el estado de fosforilación de proteínas intracelulares e intranucleares; como consecuencia se dan cambios en varios procesos de transcripción y puede que esos cambios sean los responsables de la tolerancia y del síndrome de abstinencia a opiáceos (de Lorenzo et al., 2003).

En lo que respecta al tejido nervioso, la respuesta a opioides se resume en (1) inhibición de la actividad bioeléctrica e (2) inhibición en la liberación de neurotransmisores.

En cuanto a la respuesta molecular, la activación de MOR y DOR conlleva a la hiperpolarización de la membrana y a la inhibición de la actividad bioeléctrica neuronal, de manera directa mediante la apertura de canales potasio (subiendo la conductancia para ese ion) o, de manera indirecta, debido a que los agonistas liberan calcio intracelular y ese calcio genera la apertura de canales potasio (Williams et al., 1982). Por otra parte, la activación de KOR puede traer la inactivación de canales de calcio voltaje-dependientes y como consecuencia, se impide la entrada de calcio a la célula y por tanto se inhibe la liberación de neurotransmisores (Surprenant et al., 1990; de Lorenzo et al., 1999). Aún así, también se ha descrito la unión de receptores de opioides a proteínas G activadoras de AC (Gs) (Crain y Shen, 1990; Ammer y Schulz, 1997). Cabe destacar que, en ocasiones, a bajas concentraciones (nM) de agonistas δ o μ opioides se potencia la síntesis de cAMP, mientras que los efectos inhibitorios se establecen a mayores concentraciones (μ M) (Fields y Sane, 1997).

3.5. Biosíntesis, transporte, depósito, liberación y metabolismo de los péptidos opioides

Los precursores de los péptidos opioides son sintetizados en los cuerpos neuronales, siendo divididos en pequeños péptidos a lo largo de su migración axonal. A nivel de la terminación axonal, los péptidos son almacenados en vesículas y liberados en respuesta a ciertos estímulos. Los péptidos opioides endógenos ejercen una acción inhibitoria de su propia liberación, a través de autorreguladores presinápticos (retroalimentación negativa). (Feldman et al., 1997). Estos efectos presinápticos de las neuronas encefalinérgicas podrían ofrecer al menos en parte, una explicación de los efectos analgésicos paradójicos de la naloxona, observados en circunstancias especiales.

El metabolismo o inactivación de los péptidos opioides endógenos es de naturaleza enzimática y en él participan aminopeptidasas y carboxipeptidasas.

Por otro lado, aunque los péptidos opioides endógenos parecen actuar como neurotransmisores, moduladores de la neurotransmisión o neurohormonas, su función fisiológica (en ausencia de estrés o presencia de dolor) no ha podido dilucidarse en toda su extensión.

3.6. Acciones fisiológicas de los receptores de opioides

Los receptores de opioides han sido relacionados con la modulación de muchas actividades fisiológicas. En general, los péptidos opioides o los alcaloides opiáceos, al penetrar en el sistema nervioso central o periférico, generan un espectro de acción parecido, pero la intensidad varía en relación al tipo de opioide y al tipo de receptor activado (Tabla 3).

Como ya hemos mencionado, en el SNC se encuentran las tres clases principales de receptores de opioides, designados mu (μ), kappa (κ) y delta (δ). Cualquiera de las tres familias pueden estar involucradas con la inhibición de la liberación del factor liberador de gonadotropinas (GnRH), ya que no se ha podido demostrar específicamente por algún POE responsable del mecanismo fisiológico. Sin embargo se ha podido determinar que al aplicar naloxona (Nx) se antagonizan los receptores μ que junto con los ligandos fisiológicos podrían ser mediadores de la secreción tónica de GnRH, aumentando así la liberación pulsátil de LH en la

hembra y de testosterona en el macho. Por otro lado, diversos trabajos indican que aunque los POE de las tres familias parecen ser secretados por neuronas diferentes a las de GnRH; así, de esta forma en distintas especies animales se ha visto que los cambios en la concentración de esteroides en el plasma sanguíneo ocasionan cambios en el contenido de los POE en el hipotálamo y en el sistema hipotálamo-hipofisario. Por lo que el tratamiento con Nx podría ser utilizado para mejorar la calidad del semen, y en las hembras para mejorar la receptividad, fertilidad y prolificidad sexual, ya que los POE son susceptibles a ser regulados con antagonistas como la Nx utilizando dosis bajas (Hernández et al., 2006).

3.7. Implicación del Sistema Opiode en la fertilidad masculina

3.7.1. Control de las hormonas reproductoras mediante los opioides

El primer punto de control que los opioides ejercen en la función reproductora es a través del eje hipotálamo-hipofisario, controlando la liberación de las hormonas sexuales. La hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona leutinizante (LH) son secretadas por la hipófisis anterior y actúan directamente en los testículos estimulando las células somáticas que contribuyen a la espermatogénesis. La síntesis y liberación de ambas hormonas reproductoras está controlada hipotalámicamente por la hormona liberadora gonadotrópica (GnRH). La principal función de la FSH es la de estimular la proliferación de las células de Sertoli durante la pubertad donde se expresa exclusivamente el receptor de la FSH (Rannikki et al., 1995). Mientras, la LH regula la síntesis de testosterona de los testículos en adultos, actuando sobre las células de Leydi donde se expresa principalmente el receptor de la LH (Heckert y Griswold, 2002). Además, también se ha detectado una ligera expresión del receptor de la LH en las células espermatogénicas (Eblen et al., 2001; Lei et al., 2001).

Acción	Receptores	Acción	Receptores
Inhibición del dolor	μ, δ, κ	<u>Diuresis</u>	
Depresión respiratoria	μ, δ	Inhibición	μ
Dependencia psíquica	$\mu > \kappa$	Activación	κ
Dependencia física	$\mu > \kappa; \delta?$	Bradycardia	$\mu > \delta = \kappa$
Tolerancia	μ, δ, κ	Hipotensión	$\delta = \kappa > \mu$
Euforia y sedación	μ	<u>Acciones endocrinas</u>	
Disforia	κ	Liberación de PRL	μ
Miosis	μ, κ	Liberación de GH	$\delta > \mu$
Rigidez muscular	μ	Liberación de ACTH	μ, κ
Movilidad gastrointestinal	$\mu, \delta?$	Inhibición de ADH	κ
Movilidad de la vejiga	μ	Inhibición de LH	μ, δ

Tabla 3. Acciones de los opioides y sus receptores (Flórez, 1998).

Los péptidos opioides controlan la función reproductora actuando en el sistema nervioso. La adición de morfina está asociada con una supresión de la liberación de LH y, antagonistas opioides como la naloxona y la naltrexona, producen un incremento de los niveles séricos de LH en humanos y numerosas especies animales (Cicero et al., 1979; Sirinathsinghji et al., 1983; Fraioli et al., 1985). Sin embargo, la supresión de la liberación de LH, por los péptidos opioides, es decir la acción hipotalámica, ya que por un lado, la liberación de la LH basal ó estimulada por GnRH no se ve alterada por la acción de la naloxona en hemipituitarias de rata (Wilkes et al., 1981) y, por otro lado, tratamientos *in vivo* con antagonistas de GnRH bloquean completamente la liberación de GnRH inducida por naloxona (Wilkes et al., 1981; Blank y Roberts, 1982). En base a estos estudios, se sabe que los péptidos opioides regulan la función reproductora desde el sistema nervioso central al inhibir la secreción de la GnRH (Delitala et al., 1981, Fraioli et al., 1982; Sirinathsinghji et al., 1983; de Gandarias et al., 1993, 1996).

3.7.2. Control de la función testicular por los opioides

La espermatogénesis, además de estar regulada por mecanismos endocrinos del eje hipotálamo-hipofisario, está controlada por mecanismos paracrinós y autocrinós entre los diferentes tipos celulares presentes en los testículos.

Las células de Sertoli proporcionan un soporte metabólico y estructural necesario para la diferenciación de las células germinales. Un fallo funcional del receptor de la FSH produce una disminución del tamaño de los testículos, debido a una disminución del número de células de Sertoli (Dierich et al., 1998). Los hombres con dicho fallo funcional, presentan anomalías espermatogénicas y producen sémenes con oligozoospermia y teratozoospermia, aunque pueden ser fértiles (Tapanainen et al., 1997).

Las células de Leydig son las responsables de la producción de testosterona testicular. La testosterona y sus metabolitos (dihidrosterona y estradiol) son las hormonas sexuales masculinas que regulan principalmente la función reproductora. Los niveles de testosterona en el túbulo seminífero son 100 veces mayores que en sangre periférica (Morse et al., 1973) y son necesarios para que se produzca una correcta espermatogénesis.

Los péptidos opioides presentes en los testículos regulan la función testicular participando como mediadores en la comunicación intercelular, por un lado la concentración de testosterona intratesticular se alcanza gracias a la producción de testosterona cerca de los túbulos, en las células de Leydig estimuladas por la LH; y por otro lado, a la síntesis de ABP (androgen-binding proteína) en las células de Sertoli estimulada por la FSH, que transporta la testosterona hacia el lumen del túbulo seminífero. (Hansson et al., 1973; Ritzén et al., 1975; Huang et al., 1991). Los péptidos opioides ejercen su acción a través de la activación de los receptores opioides. Estudios de binding detectaron los tres tipos de receptores opioides, DOR, MOR y KOR, en testículos de rata, aunque su localización es exclusivamente en las células de Sertoli. (Fabbri et al., 1985; Zhou et al., 1990; Gaveriaux-Ruff y Kieffer, 1999).

Además, debido a que los genes que codifican para los precursores opioides proencefalina (PENK), proopiomelanocortina (POMC) y prodinorfina

(PDYN) se expresan también en los testículos de rata y ratón, la función testicular puede ser regulada mediante la síntesis *de novo* de los péptidos opioides (Pintar et al., 1984; Chen et al., 1986; Kilpatrick et al., 1986; Douglass et al., 1987). Por otro lado, la sobreexpresión de PENK en testículos de ratones transgénicos, tiene como resultado ratones con fertilidad reducida, testículos morfológicamente anormales y baja movilidad espermática, sugiriendo que el sistema opioide podría estar implicado en la regulación de la espermatogénesis (O'Hara et al., 1994).

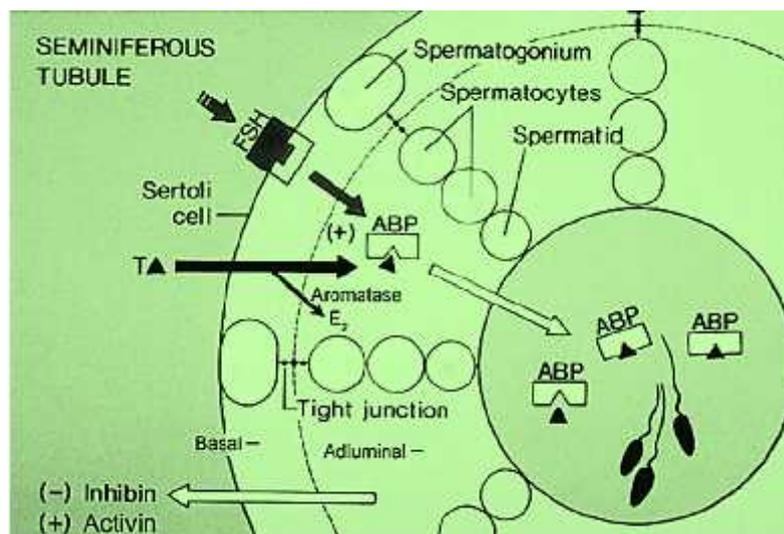


Fig. 11.- Sistema ABP

Los genes que codifican los precursores opioides poseen una expresión diferencial en las células germinales y en las células somáticas de los testículos. (Garrett et al., 1989). En ratas y ratones, la PENK presenta transcritos de diferente tamaño que se expresan de manera diferencial en las células germinales y las células somáticas de los testículos (Garrett et al., 1989). Las células germinales del testículo presentan un transcrito de mayor tamaño de la PENK de 1,7 kb que se expresa bajo un promotor específico (Kilpatrick et al., 1990), mientras que las células de Leydig, las células de Sertoli y las células peritubulares expresan un mRNA de menor tamaño (1,45 kb) (Kilpatrick et al., 1985, 1987; Kew et al., 1989; Garret et al., 1989; Yoshikawa et al., 1988, 1989). Ambos transcritos presentan intacta la secuencia codificante y difieren en la región 5' no codificante (Kilpatrick et al., 1990). Sin embargo, perfiles polisómicos indican que el transcrito específico de la PENK que se expresa en células germinales no se traduce eficientemente y que es el mRNA de menor tamaño de germinales no se traduce eficientemente y que es el mRNA de menor tamaño de las células de Leydig el principal responsable

de la síntesis *de novo* de péptidos opioides en los testículos (Kew et al., 1989). Esto explicaría el hecho de que la concentración de productos derivados de la PENK detectados en homogeneizados de testículos de rata sea relativamente baja (< 2 pmol/g) si se compara con los niveles de mRNA detectados para el gen de la PENK (Kilpatrick et al., 1985). Esto explicaría el hecho de que la concentración de productos derivados de la PENK detectados en homogeneizados de testículos de rata sea relativamente baja (< 2 pmol/g) si se compara con los niveles de mRNA detectados para el gen de la PENK (Kilpatrick et al., 1985). Sin embargo, las células de Sertoli también contribuirían a la síntesis *de novo* de los péptidos derivados de la PENK en los testículos, puesto que en células de Sertoli en cultivo, la expresión del gen de la PENK y los niveles de met-enkefalina se incrementan por la acción de la FSH (Kew et al., 1989). Además, Mehta y colaboradores (1994) observaron que, durante la espermatogénesis, la expresión del mRNA de menor tamaño transcrito de 1,45 kb de la PENK está regulada a la baja en las células intersticiales de los testículos, coincidiendo con la aparición de los espermatozoides paquitenos. Por tanto, dichos autores han sugerido que las células germinales podrían regular los niveles de péptidos opioides durante la espermatogénesis controlando la expresión de la PENK en las células vecinas.

Estudios mediante hibridación *in situ* demostraron que el gen que codifica para la POMC se expresa en las células de Leydig (Pintar et al., 1984) y en las células germinales (Kilpatrick et al., 1987). En testículos de ratón, el transcrito de POMC presenta dos formas de diferente tamaño. Un transcrito largo de unos 675-750 nucleótidos que se expresa principalmente en las células de Leydig y en algunos estadios de células germinales, y un transcrito de menor tamaño que se expresa específicamente en espermatozoides paquitenos. En testículos de ratón, el transcrito de POMC presenta dos formas de diferente tamaño. Un transcrito largo de unos 675-750 nucleótidos que se expresa principalmente en las células de Leydig y en algunos estadios de células germinales, y un transcrito de menor tamaño que se expresa específicamente en espermatozoides paquitenos. Como ocurre con los transcritos de PENK, los transcritos de las células de Leydig son los responsables de sintetizar los péptidos derivados de la POMC, mientras que el mRNA de la POMC presente en la espermatogénesis se traduce de manera

menos eficiente (Kilpatrick et al., 1987). Esto concuerda con estudios anteriores donde la β -endorfina, principal péptido opioide generado por el procesamiento de la POMC, se ha inmunodetectado en las células de Leydig de numerosas especies (Tsong et al., 1982). La síntesis de β -endorfina en las células de Leydig está controlada, por un lado, hormonalmente, mediante la acción de la LH secretada de la hipófisis en ratas adultas (Chen et al., 1987) y, por otro lado, localmente, mediante la acción del factor CRF (corticotropin-releasing factor). El CRF regula autocrinamente la función de las células de Leydig (Audhya et al., 1989; Ulisse et al., 1990) donde se expresa específicamente su receptor (Ulisse et al., 1989) y cuya producción es estimulada por la LH. Los niveles de β -endorfina se incrementan en células de Leydig en cultivo tras la estimulación por CRF y dicho efecto es revertido completamente en presencia del antagonista β -hélice CRF (Eskeland et al., 1989).

A pesar de que su síntesis *de novo* tiene lugar principalmente en las células de Leydig, los péptidos opioides no ejercen ningún efecto en la producción de testosterona basal o estimulada por hCG, ni en células de Leydig en cultivo, ni en tejido testicular de rata (Scher et al., 1982; Margioris et al., 1983; Fabbri et al., 1986). Estudios de *binding* no demuestran la presencia de los receptores opioides en las células de Leydig (Fabbri et al., 1988), confirmando dichos resultados. Sin embargo, en ratas, la administración intratesticular de los antagonistas opioides naloxona y nalmefene, desciende la secreción basal de testosterona y reduce los niveles séricos de testosterona (Gerendai et al., 1986), sugiriendo que los péptidos opioides puedan regular indirectamente la secreción de testosterona.

Por otra parte, mediante una acción paracrina, la β -endorfina sintetizada en las células de Leydig produce un efecto inhibitorio de la función de las células de Sertoli (Gerendai et al., 1986). Esto es consistente con el hecho de que los receptores opioides han sido descritos sólo en las células de Sertoli (Fabbri et al., 1985; Zhou et al., 1990). Concretamente, la β -endorfina inhibe la producción de ABP estimulada por la FSH en las células de Sertoli y dicha inhibición es revertida en presencia de naloxona (Fabbri et al., 1985). La ABP sintetizada en las células de Sertoli regula los niveles de testosterona intratubular necesarios para una correcta espermatogénesis al transportar la testosterona hacia el lumen del túbulo seminífero (Hansson et al., 1973; Ritzén et al., 1975; Huang et al., 1991).

Además de regular indirectamente los niveles de testosterona intratubular controlando la producción de ABP en las células de Sertoli, se ha observado que la β -endorfina endógena, sintetizada en los testículos, inhibe la proliferación y diferenciación de las células de Sertoli estimuladas por FSH (Orth et al., 1986) y que, el tratamiento *in vivo* con el antagonista opioide nalmefene estimula la producción de ABP en testículos de ratas neonatas (Gerendai et al., 1986). Por tanto, los péptidos opioides, además de inhibir la función de las células de Sertoli, podrían mantener en estado quiescente la maduración sexual de los testículos al inhibir la proliferación y desarrollo de las células de Sertoli antes de la pubertad (Fabbri et al., 1985).

En lo que se refiere a la PDYN, a consecuencia de un *splicing* alternativo del mensajero, el transcrito de PDYN presente en testículos de rata es de menor tamaño que el descrito en cerebro. El corto transcrito de 65 nucleótidos posee inalterada la secuencia codificante de la proteína y, perfiles polisómicos, indican que el mRNA testicular de la PDYN se traduce eficientemente, al igual que el transcrito de mayor tamaño presente en el cerebro (Garrett et al., 1989). Esto es consistente con la presencia de los péptidos dinorfina A y dinorfina B en extractos testiculares (Douglas et al., 1987). Dicho precursor, se expresa y se traduce principalmente en las células de Sertoli. Debido a que productos derivados de la PDYN han sido inmunolocalizados en las células de Sertoli (Collard et al., 1990) y en el compartimento intersticial de testículos de rata, se ha sugerido que las dinorfinas pueden ser secretadas y regular autocrinamente la función de las células de Sertoli (Douglas et al., 1987).

En resumen, los péptidos opioides están presentes en diferentes células de las gónadas masculinas pudiendo intervenir en los mecanismos que regulan la espermatogénesis. Los precursores opioides se expresan de manera diferencial en las células somáticas y germinales de los testículos indicando que los péptidos opioides pueden regular localmente la función testicular mediante su síntesis *de novo*. Concretamente, las gonadotropinas y el factor CRF estimulan, en las células de Leydig, la producción de los péptidos opioides que inhiben paracrinamente la función de las células de Sertoli.

3.7.3. Control de la función espermática por los opioides

La presencia de los receptores opioides DOR, MOR y KOR en la membrana espermática humana (Agirregoitia et al., 2006) indica que los péptidos opioides podrían regular la función reproductora ejerciendo un efecto directo sobre los espermatozoides. En un reciente estudio se ha demostrado por primera vez que las células germinales masculinas expresaron MOR activo, DOR y KOR en ratón, y las principales conclusiones han sido que los receptores activos opioides, delta-opioides y kappa-opioides estaban presentes en las células germinales masculinas en los testículos de ratón. Por otro lado, que los receptores opioides mu-opioides, delta-opioides y kappa-opioides están implicados en la regulación de la espermatogénesis del ratón, y que los tres receptores opioides parecían estar implicados en la regulación de la meiosis masculina en ratón modificando la expresión génica de las proteínas del complejo sinaptonémico. Estos estudios contribuyen a resolver varias cuestiones relativas al papel de los receptores opioides en la espermatogénesis para el diagnóstico y tratamiento de la infertilidad masculina (Estomba et al. 2016), cómo la administración crónica de morfina puede reducir la fertilidad en ratas (Cicero et al., 2002) o la administración de metadona durante 3 días puede producir espermatozoides con aberraciones cromosómicas en el ratón (Badr et al., 1979).

En semen, además, se han descrito otros componentes del sistema opioide. Diferentes péptidos opioides, como las encefalinas y las endorfinas, están presentes en líquido seminal y su concentración es entre 6-12 veces mayor que la detectada en plasma sanguíneo (Sharp et al., 1981). Se ha detectado también inmunoreactividad de la met-enkefalina, la leu-enkefalina y la μ -endorfina (Sastry et al., 1982) en espermatozoides, y productos del precursor PENK se han inmunolocalizado en la región acrosómica (Kew et al., 1990).

Los péptidos opioides parecen estar implicados en la movilidad espermática, aunque los resultados encontrados hasta la actualidad son contradictorios. Por un lado, la movilidad espermática desciende en presencia de altas concentraciones de encefalinas y en presencia de la μ -endorfina (Fraiooli et al., 1982, Sastry et al., 1991). Además, se ha visto que, análogos sintéticos de la met-enkefalina (DAMME) produjeron también un descenso de la movilidad

espermática debido a una reducción en el consumo de O₂, sin afectar en la viabilidad del espermatozoide (Foresta et al., 1985). Sin embargo, otros autores han observado que las encefalinas a bajas concentraciones son necesarias para mantener la movilidad espermática (Fujisawa et al., 1992). Finalmente, algunos estudios, incluso, no detectan efecto alguno de la met- encefalina sobre la movilidad espermática (Fraiooli et al., 1985). Agirregoitia y colaboradores (2006) propusieron que el efecto bivalente de los opioides podría ser debido a la activación de distintos receptores ya que la incubación de espermatozoides humanos con morfina (agonista del receptor μ -opioides) o con naltrindol (antagonista del receptor μ -opioides) inhibe la movilidad espermática. Además, la naloxona, antagonista con afinidad diferencial por los receptores opioides, modula la movilidad dependiendo de la dosis del antagonista utilizado (Albrizio et al., 2005; Mari et al., 2005).

Aunque el efecto de los péptidos opioides es contradictorio, algunos autores sugieren que un nivel adecuado de encefalinas sería necesario para el mantenimiento de la movilidad espermática ya que pacientes con déficit en la movilidad espermática (astenozoospermia) presentan unos niveles de met-encefalina significativamente menores en su plasma seminal (Fujisawa et al., 1996). En recientes estudios, se ha visto un incremento en el reconocimiento del papel que juegan los péptidos presentes en el plasma seminal sobre la motilidad espermática, así las peptidasas, tales como la endopeptidasa neutra (NEP) y la aminopeptidasa N (APN), poseen efectos adversos significativos sobre la motilidad espermática. Curiosamente, varios estudios recientes demuestran que existe un péptido endógeno inhibidor de NEP/ APN llamado opiorphin presente en el plasma seminal humano, que sugiere que promueve la motilidad del espermatozoide pudiendo influir positivamente en la motilidad del espermatozoide (Jayme et al., 2014).

Como hemos comentado anteriormente, las células espermáticas del eyaculado no son capaces de fertilizar y necesitan ser activadas y capacitadas para llevar a cabo la fecundación del ovocito una vez se produzca la reacción acrosómica. En estudios *in Vitro* de espermatozoides de caballo, se ha visto que la naloxona induce la capacitación sin afectar a la reacción acrosómica (Albrizio et al., 2005). Sin embargo, otros estudios demuestran que el DAMME, un análogo de la met-encefalina, inhibe la reacción acrosómica espontánea de manera

dosis-dependiente (Foresta et al., 1985). Actualmente, no hay estudios suficientes que relacionen al sistema opioide en éstos procesos.

Los tres tipos de receptores opioides han sido descritos en la membrana de espermatozoides humanos (Agirregoitia et al., 2006; Albrizio et al., 2006), lo que indicaría una acción directa de los EOP sobre las células espermáticas, y por lo tanto, sobre la capacidad reproductora del hombre. Es más, Ragni y colaboradores describieron en 1988 que los adictos a las drogas opiáceas solían padecer astenozoospermia (bajo porcentaje de movilidad espermática). Sin embargo, un grupo japonés refirió bajos niveles de met-enkefalina en plasma seminal en pacientes astenozoospermicos (Fujisawa et al., 1996). Intentando llegar a un consenso, en estudios posteriores han sugerido que para que los espermatozoides mantengan la movilidad es necesario un adecuado nivel de encefalinas, e incluso, que el efecto de estos péptidos depende de su concentración en el medio. Por lo que las peptidasas degradadoras de encefalinas, presentes en el líquido seminal, tendrían un papel clave en la movilidad espermática (Subirán et al., 2011).

A lo largo del oviducto el espermatozoide humano obtiene su capacidad fecundante. En vaca se ha descrito cómo la concentración de met-enkefalinas y -endorfinas varía a lo largo de las distintas partes de su aparato reproductor (Facchinetti et al., 1986; Petraglia et al., 1986). No obstante, el papel que juega el sistema opioide en la capacitación, hiperactivación y reacción acrosómica del espermatozoide es hoy en día desconocido.

3.8. Regulación de la fertilidad femenina (opioides/aminopeptidasas)

Los receptores de péptidos opioides han sido hallados en varias partes del sistema reproductor femenino, como las células de la granulosa porcina (Slomczynska et al., 1997) o la placenta humana (Belisle et al., 1988). Recientemente se ha demostrado la presencia del receptor opioide MOR en el complejo oocito-cúmulo, proponiéndose como uno de los principales intermediarios en la comunicación bidireccional ovocito-células de la granulosa cuya finalidad es la maduración ovocitaria (Dell'Aquila et al., 2008; Minoia et al., 2008; Iorga et al., 2009). Más concretamente, se ha descrito la presencia de los

tres tipos de receptores opioides en la membrana de ovocitos humanos, así como una distribución dependiente del grado madurativo del ovocito para los receptores MOR y KOR (Dell'Aquila et al., 2003; Agirregoitia et al., 2012a).

La distribución del receptor δ es periférica en todos los estadios madurativos del ovocito. El receptor δ y el μ se distribuye por la periferia del ovocito en el estadio de vesícula germinal pero pasa a ser más homogénea, por todo el citoplasma, en las siguientes fases madurativas (Peralta, 2012).

En el útero y ovario de distintas especies se han encontrado precursores de péptidos opioides (incluida la humana), de hecho, existe una producción localizada de proopiomelanocortina (POMC), prodinorfina (PDYN) y proencefalina (PENK) en estos órganos (Chen et al., 1986; Douglass et al., 1987; Zhu et al., 1998a, 1998b). El RNAm de POMC está presente en folículos antrales, en el cuerpo lúteo y en las células de la granulosa y de la teca, y su expresión está regulada principalmente por la FSH, variando a lo largo del ciclo menstrual. La LH induce la expresión de PENK en las células de la teca en folículos pequeños. Por último, citar que las gonadotropinas modulan también la expresión de PDYN, la FSH actúa sobre las células de la granulosa y la LH sobre las células de la teca (Melner et al., 1986; Sanders et al., 1990; Staszkiwicz et al., 2007).

Los opioides endógenos, presentes tanto en el líquido folicular como en el fluido de trompas y útero (Petraglia et al., 1985, 1986, 1987; Zhu y Pintar, 1998), podrían tener un papel fundamental en la maduración nuclear final del ovocito, actuando directamente vía receptor (Subirán et al., 2011; Agirregoitia et al., 2012a).

En la membrana uterina de ratas se ha detectado actividad aminopeptidásica, la cual se correlaciona de forma positiva con la concentración de estradiol sérico, sugiriendo que estaría regulada por estradiol y sería específica de tejido, influyendo indirectamente en el estado endometrial (Neves et al., 2006). En relación al ovario, en 1996 el grupo de Tachibana describió cómo la bestatina aumentaba la esteroidogénesis (dependiente de FSH) de las células de la granulosa porcina. Años más tarde, Carrera colaboradores (2009) hallaron en ovario de rata actividad enzimática tanto en forma soluble como asociada a

membrana para APN, aminopeptidasa B (APB), APA y aspartil aminopeptidasa (Asp-AP).

En mujeres sometidas a cirugía se ha detectado actividad para APN en la membrana de las células del estroma endometrial, la teca interna del folículo y el cuerpo lúteo (Fujiwara et al., 1992a; Imai et al., 1992a, 1992b, 1996). Sin embargo, no se ha descrito actividad APN en las células de la granulosa, no obstante, si se ha descrito actividad *APN-like* (Fujiwara et al., 1999). Del mismo modo, se refirió actividad para DPPIV en la membrana de las células glandulares del endometrio y células luteínicas (Fujiwara et al., 1992b; Imai et al., 1992c). Todo ello hizo que, a finales de los años noventa, se propusiera a las ectopeptidasas expresadas en ovario como enzimas determinantes en la función y diferenciación de las células ováricas ya que regulaban las concentraciones extracelulares (intrafoliculares) de péptidos bioactivos, estableciendo un sistema de regulación peptidérgica en la propia cavidad antral (Yoshioka et al., 1998).

En cerebro bovino la aminopeptidasa sensible a puromicina (PSA) ha sido caracterizada y purificada *in vivo* como una encefalinasa extracelular (Hersh y McKelvy, 1981), no obstante, al ser considerada una enzima citoplasmática se desconoce su función en el metabolismo opioidoinérgico (Dyer et al., 1990; Constam et al., 1995). El grupo de Tomoharu Osada (Osada et al., 2001a) demostró que ratas transgénicas deficientes de PSA presentaban infertilidad ya que eran incapaces de formar y mantener el cuerpo lúteo del embarazo.

Se ha referido presencia de APA a nivel de tejido endometrial, ovárico y placentario (Vinson et al., 1997; Hassan et al., 2000; Ando et al., 2002). La APA es uno de los principales enzimas que regulan la concentración de A II en el ovario humano, es más, se ha detectado en líquido folicular una inmunoreactividad *AngII-like* 10 veces mayor que en plasma (Culler et al., 1986). En 2006 Harata describió por primera vez la expresión y distribución celular de APA en el ovario de mujeres a lo largo de su ciclo menstrual. Durante el proceso de foliculogénesis se detectó presencia débil de APA en la membrana del ovocito y en las células de la granulosa, en el cuerpo lúteo presencia moderada en las células luteínicas grandes y débil en las células luteínicas pequeñas, en el cuerpo amarillo no se observó presencia de

APA. Estos resultados han hecho que se especule con la posibilidad de que la A II intervenga en procesos como la foliculogénesis y la función del cuerpo lúteo.

La Cys-AP u oxitocinasa, única aminopeptidasa de membrana degradadora de oxitocina, ha sido descrita en tejidos tan dispares como cerebro, corazón, riñón, músculo liso, células adiposas, colon, próstata y ovario (Czech y Corvera, 1999; Moeller et al., 1999; Demaegdt et al., 2004). Considerada en humanos la peptidasa placentaria más importante a nivel de membrana, durante el embarazo se ha detectado en plasma una forma circulante de Cys-AP, resultante del corte proteolítico llevado a cabo en el dominio extracelular de la peptidasa (Nomura et al., 2005). La actividad de Cys-AP en plasma aumenta significativamente durante el tercer trimestre de gestación, para experimentar un efecto *plateau* justo antes del parto (Mizutani et al., 1982; Mustafa et al., 2004; Pham et al., 2009). Debido a que dos de sus principales sustratos, oxitocina y vasopresina, generan contracción y vasoconstricción uterina, se ha establecido que la Cys-AP contribuye al desarrollo normal del embarazo y suprime el dolor mediante la regulación del nivel de estas hormonas en suero (Rogi et al., 1996; Horio et al., 1999).

Se ha observado elevada actividad de la enzima PEP en el córtex renal, células epiteliales, fibroblastos, testículos, linfocitos, trombocitos, placenta y ovario porcino (Mizutani et al., 1984; Pereira et al., 2009) mientras que en fluidos corporales ha sido baja (Goossens et al., 1996a). En 1998 el grupo de Kimura encontró mayor actividad PEP en folículos antrales tanto en líquido folicular como en células de la granulosa. Además, la hibridación *in situ* reveló mayor expresión de prolil oligopeptidasa RNAm en las células de la granulosa de folículos preantrales. Lo cual viene a sugerir la importancia de PEP en el desarrollo de las primeras etapas de la foliculogénesis.

Por tanto, las peptidasas ejercen diferentes acciones en distintas etapas del proceso reproductivo femenino. Y es por ello que son moléculas de gran interés para una mejor comprensión de la fertilidad humana, así como para su estudio como posibles marcadores de calidad folicular y ovárica.

4. SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA (SRA)

4.1. Sistema renina angiotensina (SRA): de su concepto clásico o sistémico al descubrimiento de SRA local o tisular

En su concepto clásico, el SRA es un sistema hormonal circulante regulador del tono vascular y del balance hidroelectrolítico. Como se ve en la Fig. 12, el angiotensinógeno, producido en el hígado, es transformado por la renina del aparato yuxtglomerular del riñón en angiotensina I. Esta es a su vez convertida en angiotensina II (A II) por la enzima convertidora de angiotensina (ACE) presente en el endotelio vascular pulmonar (Fyhrquist y Saijonmaa, 2008).

La A II se une a receptores AT1 y AT2, que pertenecen a la amplia familia de receptores asociados a proteínas G y que se encuentran distribuidos en distintos tejidos. Esta unión produce una potente contracción de la musculatura lisa vascular y, de forma directa e indirecta, reabsorción de sodio y agua en el riñón. El conocimiento de este sistema endocrino ha sido de vital importancia para el desarrollo de fármacos claves en el tratamiento de una gran variedad de enfermedades cardiovasculares y renales. Entre estos se encuentran los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACEi) o los antagonistas de los receptores de A II (ARA-II) (Danilczyk et al., 2004, Lambert et al., 2008).

Sin embargo, hoy en día se sabe que ni este esquema es tan sencillo ni las acciones del SRA se limitan a su función endocrina. Con el tiempo se ha ido descubriendo el papel de otros péptidos bioactivos, enzimas conversoras y receptores, lo que demuestra la complejidad de este sistema y el potencial de los fármacos que actúan o podrían actuar sobre él (Danilczyk et al., 2004).

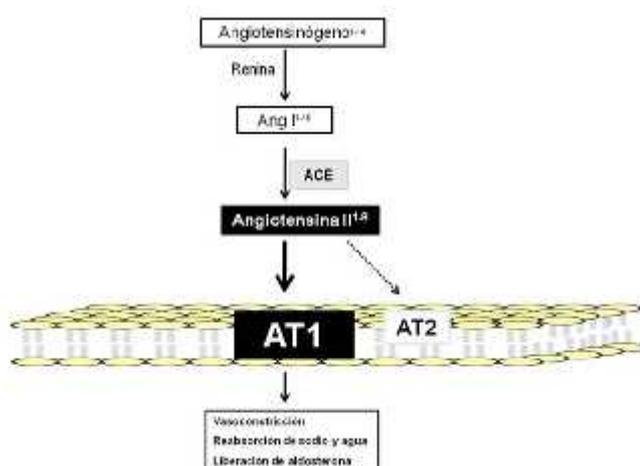


Fig. 12. Sistema renina angiotensina (SRA)

Aunque el péptido que clásicamente ha sido reconocido como efector del sistema es la angiotensina II, puede verse que el sistema está compuesto por varios péptidos con actividad biológica (angiotensinas III, IV, 1-7 y 1-9) que se producen por la acción de diversas peptidasas: ACE, ACE2, APA, NEP/CD10, APN/CD13, Prolil endopeptidasa (PEP), etc. Más aún, se trata de un sistema en el que además de los clásicos receptores AT-1 y AT-2, existen otros tipos de receptores que median la acción de otras angiotensinas: receptor Mas, receptor renina/prorenina y receptor AT4 o IRAP (Fyhrquist y Saijonmaa, 2008) (Fig. 13).

Por otro lado, en la última década se ha ido demostrando que múltiples órganos y tejidos poseen la maquinaria molecular necesaria para la síntesis de los diferentes componentes del SRA. Se piensa que estos SRA “locales” son regulados de forma independiente al circulatorio, aunque pueden interactuar con él (Paul et al., 2006; Kobori et al., 2007). De este modo, además de sus funciones clásicas, las angiotensinas producidas a nivel local conducen a cambios a medio-largo plazo en los tejidos, regulando el crecimiento y diferenciación celular, y participando en procesos proliferativos en situaciones de desequilibrio del sistema.

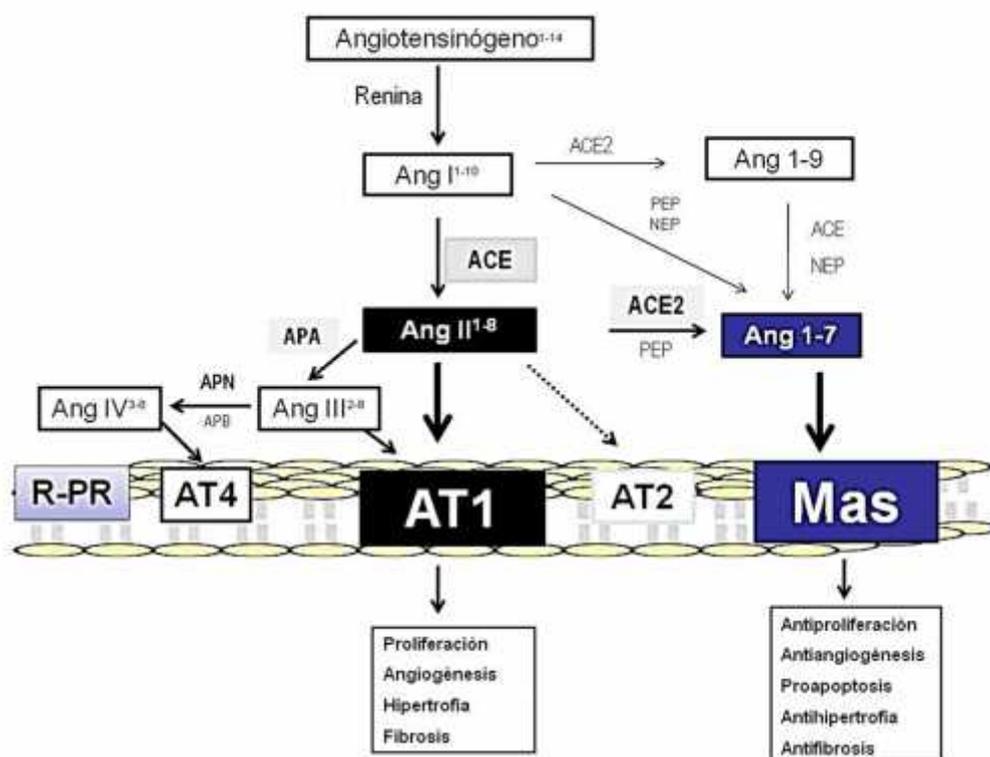


Fig. 13. SRA: Eje ACE-A II-receptor AT1 y eje ACE2/A 1-7/Mas

Cabe destacar que el riñón es uno de los órganos donde mejor se ha identificado este SRA local (Kobori et al., 2007; Rosivall, 2009). Según diversos autores, en este SRA intrarrenal, las angiotensinas podrían estar regulando distintos procesos tanto por vía autocrina y paracrina como por mecanismos intracrininos, ya que se ha demostrado la existencia de receptores de angiotensina en el núcleo de células tubulares renales (Gwathmey et al., 2010; Zhuo y Li, 2011).

En este “nuevo” contexto, se ha propuesto la existencia de dos ejes complementarios en el SRA, cuyo desequilibrio podría inducir o afectar al desarrollo de distintas enfermedades crónicas (Santos et al., 2008). Un primer eje, el mejor conocido y constituido por la ACE-A II-receptor AT1, que además de la vasoconstricción y aumento de la volemia típicos, induciría, a nivel local, proliferación celular, hipertrofia, inflamación, estrés oxidativo, fibrosis, etc. Y un segundo eje, constituido por la ACE2, que a partir de la A II produce angiotensina 1-7, péptido que actúa sobre el receptor Mas. Este eje ACE2/A 1-7/Mas contrarresta los efectos del anterior gracias a su acción vasodilatadora, antihipertrófica, antiangiogénica y antiproliferativa. Este descubrimiento ha convertido las ratios ACE/ACE2 y A II/A 1-7 en “switchs” moleculares a tener en cuenta en el desarrollo y evolución de distintas enfermedades cardiovasculares y renales, campo en el que han sido investigados en mayor profundidad (Wysocki et al., 2006; 2008; Kobori et al., 2007; Wakahara et al., 2007; Santos et al., 2008; Varela, 2015) (Fig. 14).

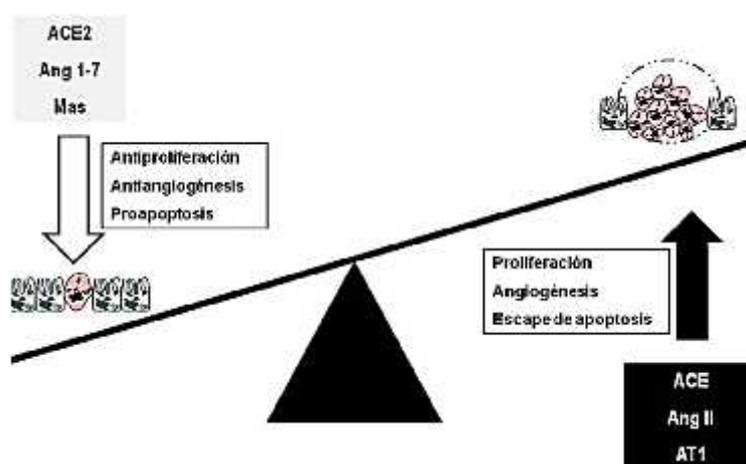


Fig. 14. Balance sistemas SRA y su implicación en el cáncer.

4.2. SRA intracelular

El SRA intracelular se caracteriza por la presencia de los distintos componentes de SRA en el interior de las células, así como por la síntesis de A II en una localización intracelular. Este concepto surgió al observar la existencia de diferentes formas de AGT y renina (resultado de glicosilaciones o splicing alternativo, respectivamente), diferentes formas de ACE (intracelular y secretada), la existencia de enzimas alternativas para la síntesis de A II (como catepsinas y quimasas), y finalmente por la detección intracelular de estos componentes bajo unas condiciones celulares determinadas (Kumar et al., 2007).

Al igual que en los otros SRA, la A II es el principal péptido bioactivo del SRA intracelular. El hecho de que se hayan comprobado efectos de la A II intracelular en una amplia variedad de tipos celulares (células cardíacas, renales, hepáticas o vasculares) indica que se trata de un sistema muy relevante (Kumar et al., 2007). Este mecanismo de acción intracelular de la A II involucra a las reservas de calcio intracelulares, a distintas rutas de señalización intracelular (como la de fosfatidil-inositol-3-quinasa (PI3K) y la de quinasas activadas por mitógenos (MAP quinasas o MAPK), así como a los receptores intracelulares de la A II. Sin embargo, aunque la A II es el principal péptido bioactivo del SRA intracelular, también la renina o la prorenina, pueden tener efectos intracelulares, ya que existe un receptor intracelular para éstos, el receptor de prorenina-renina (PRR), que se acopla a un sistema de transducción de señales en cascada a través de vía de las proteínas quinasas reguladas por señales intracelulares 1 y 2 (ERK1/ERK2) (Re, 2003).

4.3. Ejes o vías que componen el SRA

En su concepto clásico, el SRA es un sistema hormonal circulante, formado por el conocido como eje o vía clásica. Posteriormente han ido incorporándose nuevos componentes, proporcionando una visión mucho más compleja de este sistema, apareciendo así tres nuevos ejes, denominados vías alternativas o no clásicas del SRA (Paul et al., 2006) (Fig. 15).

Eje Renina/ACE/A II/AT1R/AT2R. Este eje o vía clásica, está formado por el AGT, la renina, la enzima ACE, la A I y A II, y sus receptores, AT1R y AT2R. Además, a partir de la A II por la acción de la enzima Aminopeptidasa A (APA), se

produce angiotensina III (Angiotensina 2–8 o A III), que también ejerce su acción, a través de AT1R y AT2R (De Gasparo et al., 1999; Paul et al., 2006; Herr et al., 2013). Este eje, aunque en un principio fue descrito como la vía efectora del SRA a nivel sistémico, también se ha visto que actúa tanto a nivel local como intracelular (Paul et al., 2006; Kumar et al, 2007).

Eje ACE2/A (1–7)/Receptor Mas. La A I, además de transformarse en A II, también tiene potencialidad para transformarse en A (1–9) a través de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2). La A (1-9) es a su vez transformada por las enzimas neprilisina (NEP) o ACE en Angiotensina (1–7) para, finalmente, ejercer su acción a través de la unión al receptor Mas (MasR) (Santos et al., 2003).

Eje A IV/AT4R-IRAP. En éste eje, la A III es transformada a angiotensina (3-8), también denominada angiotensina IV (A IV), por la acción de la aminopeptidasa N (APN) y la aminopeptidasa B (APB). Ejerciendo su acción, finalmente, a través de la unión al AT4R o IRAP (aminopeptidasa regulada por insulina) (Albiston et al., 2001).

Eje prorenina-renina/PRR. La observación de la existencia de los receptores de renina (Nguyen et al., 2002), sugirió que tanto la prorenina, proteína precursora de la renina, como la propia renina, actúan sobre el PRR de forma independiente al eje clásico (Zhuo et al, 2013).

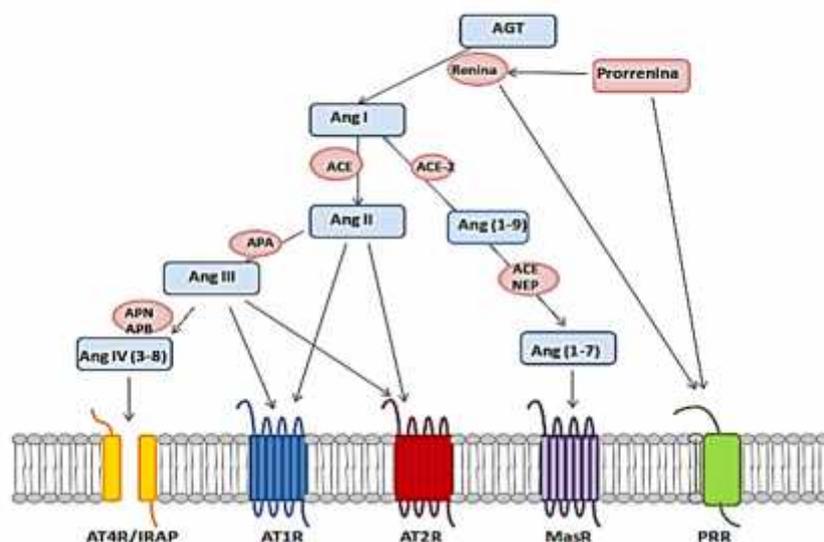


Fig. 15. Visión actual del sistema renina angiotensina. **Péptidos:** AGT: Angiotensinógeno; A I: angiotensina I, A II: angiotensina II; A III: angiotensina III; A VI: angiotensina (3-8) o VI; A (1-9): angiotensina (1-9); A (1-7): angiotensina (1-7). **Receptores:** AT1R: receptor de A II tipo 1; AT2R: receptor de A II tipo 2; AT4R/IRAP: receptor de A IV; MasR: receptor de A (1-7) o receptor Mas; PRR: receptor de prorenina-renina. **Enzimas:** ACE: enzima convertidora de angiotensina; ACE2: enzima convertidora de angiotensina 2; APN: aminopeptidasa N; NEP: endopeptidasa neutra; APA: Aminopeptidasa A; APB: Aminopeptidasa B.

4.4. Componentes de SRA

Como se ha descrito, el SRA es un sistema complejo, que está compuesto por AGT, numerosos péptidos de A, receptores específicos de estas A, y distintas enzimas. A continuación, se detallan los componentes del SRA considerados como más relevantes en el sistema reproductor masculino, y las funciones más destacables de dichos componentes a nivel global (Figuras 15 y 16).

4.4.1. Angiotensinógeno y angiotensinas

El angiotensinógeno (AGT) es una glicoproteína perteneciente a la familia de la α_2 - globulinas. Es el péptido iniciador de este sistema y es el único sustrato conocido de la renina. La mayoría del AGT circulante se produce y secreta por el hígado. Tras su expresión hepática, este se libera constitutivamente viajando por la circulación sanguínea, actuando tanto en el SRA sistémico como en los distintos SRA locales. Sin embargo, también puede ser sintetizado en otros órganos y tejidos, como el riñón o el tejido adiposo blanco, actuando de forma local (Kobori et al., 2007).

La angiotensina I (A I) o angiotensina (1-10), es un decapeptido inestable, por lo que es rápidamente hidrolizado por la ACE formándose la A II (Fournier et al., 2012). Sin embargo, cuando la ACE está inhibida, la A I puede ejercer acciones similares a la producidas por la A II, aunque con una menor eficacia (Fyhrquist y Saijonmaa, 2008). Se ha observado que la A I es capaz de estimular la liberación de catecolaminas de la médula adrenal e inducir sed (efecto dipsogénico), cuando se inyecta directamente en el sistema nervioso central (Hertting y Meyer, 1974).

La angiotensina II (A II) o angiotensina (1-8), es el principal péptido bioactivo del SRA. Es un octapeptido con una vida media de aproximadamente un minuto (Kobori et al., 2007). Ejerce su acción a través de sus receptores AT1R y AT2R, los cuales, por lo general, desempeñan funciones opuestas (De Gasparo et al., 2000; Fyhrquist y Saijonmaa, 2008). La A II es el principal regulador de la hemostasis de sodio y fluidos, pero también participa en el crecimiento celular y la remodelación vascular (Fyhrquist y Saijonmaa, 2008).

La angiotensina III (A III) o A (2-8), es un heptapeptido que ejerce su acción, en principio similar a la de la A II, vía AT1R y AT2R. Aunque la A II se considera

el principal efector del SRA, la A III puede resultar igual o incluso a veces más relevante en algunas de las acciones mediadas por el AT1R, tal como la liberación de vasopresina. Se ha observado que la A III está implicada en la secreción de aldosterona, la excreción de sodio y la regulación de la PA (Fyhrquist y Saijonmaa, 2008). Sin embargo, la vida media de este péptido es tan corta que sus efectos globales son débiles (De Gasparo et al., 2000; Fyhrquist y Saijonmaa, 2008).

La angiotensina IV (A IV) o angiotensina (3-8) es un hexapéptido que actúa mediante la activación del AT4R/IRAP (Albiston et al., 2001). Varios estudios sugieren que la A IV desempeña un papel muy importante en la regulación de las funciones cognitivas, del metabolismo renal y del daño cardiovascular, así como en la regulación del crecimiento de distintos tipos celulares (fibroblastos cardiacos, células endoteliales y células del músculo liso). Además, está implicada en la respuesta inflamatoria vascular, y posiblemente en la fisiopatología cardiovascular (Fyhrquist y Saijonmaa, 2008).

La angiotensina (1-7) (A 1-7) es un heptapéptido que ejerce sus acciones a través de su unión al receptor Mas. Aunque se forma por acción de la ACE2 sobre la A II, también puede ser producida a partir de la A I o la A II por la acción de otras enzimas (Santos et al., 2003). Durante mucho tiempo se pensó que esta angiotensina carecía de efectos biológicos, pero posteriormente se vio que tiene efectos tanto vasodilatadores como antiproliferativos, y que también desempeña acciones opuestas a la A II (Paul et al., 2006; Fyhrquist y Saijonmaa, 2008).

4.5. Receptores

El receptor de A II tipo 1 (AT1R) pertenece a la familia de receptores unidos a proteínas G, con siete dominios transmembrana, y es considerado como el principal efector de la A II. Aunque se une preferentemente a la A II, también puede unirse a la A III (De Gasparo et al., 2000). Muestra una amplia distribución en el organismo, siendo muy abundante en los tejidos periféricos y el cerebro (Paul et al., 2006; Williams et al., 2010). El AT1R principalmente ejerce funciones potencialmente perjudiciales, estando implicado en la proliferación celular o el estrés oxidativo (Paul et al., 2006; Fyhrquist y Saijonmaa, 2008).

El receptor de A II tipo 2 (AT2R) también pertenece a la familia de receptores unidos a proteínas G, aunque durante mucho tiempo no fue

considerado como tal al no cumplir todas las características típicas de estos receptores (Porrello et al., 2009). Se activa principalmente por la A II, aunque también puede unirse a otras A, como la A III (De Gasparo et al., 2000). Se expresa de forma abundante en los tejidos fetales y uteroplacentarios, así como en el corazón, cerebro, endotelio vascular y tejidos adrenales y pancreáticos de adultos (Paul et al., 2006; Williams et al., 2010). Este receptor comparte con el AT1R, una homología del 30%, y tradicionalmente se ha establecido que desempeña funciones opuestas a las del AT1R, ejerciendo distintas acciones protectoras como son la vasodilatación, la liberación de NO, la inhibición de la proliferación celular, y la natriuresis (De Gasparo et al., 2000; Paul et al., 2006; Fyhrquist y Saijonmaa, 2008). Posteriores estudios demostraron que en algunos casos el AT2R puede ejercer acciones similares a las del AT1R, como las que lleva a cabo en los procesos de inflamación (Levy, 2004).

El receptor de A IV (AT4R) ha sido identificado como la aminopeptidasa de membrana regulada por insulina (IRAP) (Albiston et al., 2001), siendo su principal ligando la A IV. La IRAP (EC 3.4.11.3), es una metalopeptidasa de Zn que puede localizarse en la membrana plasmática celular o de forma soluble, conociéndose esta última como leucina aminopeptidasa placentaria (P-LAP) u oxitocinasa (Chai et al., 2004). El AT4R ha sido identificado en distintos tejidos como nervioso y renal, y el reproductor femenino y masculino, sobre los que ejerce funciones como la adquisición de la memoria, la angiogénesis, la invasión uterina por parte de las células de trofoblasto embrionario, el aumento de la actividad nerviosa simpática en la próstata y la contractibilidad de la próstata y del epidídimo (De Gasparo et al., 2000; Paul et al., 2006; Williams et al., 2010).

El receptor de A (1-7) o receptor Mas (MasR) pertenece a la familia de los receptores unidos a proteínas G, que recientemente ha sido identificado como el protooncogen Mas, un conocido factor tumorigénico, razón por lo que se le pasó a denominar MasR (Santos et al., 2003). Está ampliamente distribuido en el organismo, encontrándose en cerebro, testículos, corazón, riñón, pulmón, hígado y músculo esquelético (Iwai y Horiuchi, 2009). Entre sus funciones, destacan el mantenimiento de la homeostasis durante el embarazo, la vasodilatación y la inhibición de la proliferación celular, antagonizando así los efectos del AT1R (Iwai y Horiuchi, 2009; Paul et al., 2006).

El receptor de prorenina-renina (PRR), también denominado ATP6AP2, es una proteína transmembrana que actúa asociada a una proteína sintasa vacuolar pudiendo funcionar como subunidad H⁺-ATPasa (V-ATPasa) (Nguyen et al., 2002; Zhuo et al., 2013). Aunque hay una única proteína ATP6AP2, se puede encontrar en tres diferentes formas moleculares como consecuencia de modificaciones intracelulares: 1) como una proteína integral de membrana; 2) en forma soluble, en plasma y orina; y 3) como una forma truncada compuesta por los dominios transmembrana y citoplasmático (Nguyen y Muller, 2010; Nguyen, 2011). El PRR se expresa en gran variedad de tejidos, entre los cuales destacan el cerebro, el corazón y la placenta (Paul et al., 2006; Fyhrquist y Saijonmaa, 2008). El receptor de prorenina-renina ejerce una doble función, por un lado, el PRR puede ser activado directamente por prorenina o renina, como ya se ha comentado, desencadenando una señal intracelular al activar la vía de las ERK1/ERK2, y por otro lado, cuando este receptor está unido a renina, puede actuar como cofactor en la lisis del AGT, aumentando la eficiencia con la que se produce este proceso, y facilitando así la formación de A I (Nguyen et al., 2002; Paul et al., 2006). Además, recientemente se ha descrito una nueva función del PRR, participando en la actividad de la H⁺-ATPasa constituyendo el complejo del receptor Wnt y regulando varios procesos de homeostasis celular, incluida la autofagia (Balakumar y Jagadeesh, 2011; Binger y Muller, 2013).

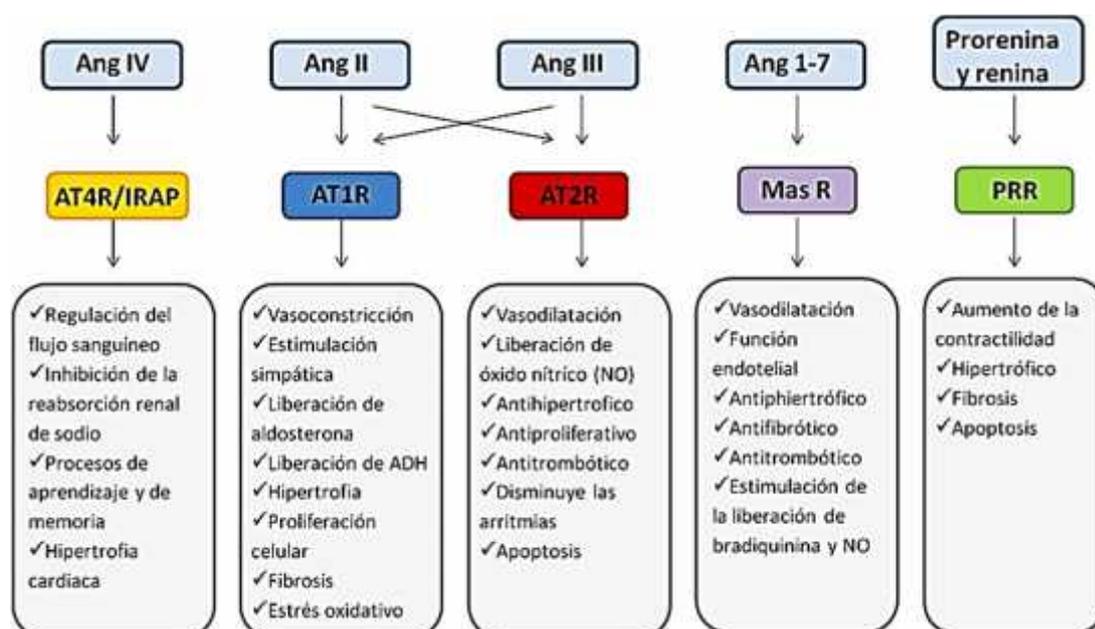


Figura 16.-Efectos que producen los distintos péptidos de angiotensinas, la renina y su péptido precursor, la prorenina, a través de sus correspondientes receptores. Imagen modificada de Fyhrquist y Saijonmaa, 2008.

4.6. El SRA en la fertilidad masculina

Este sistema local fue descrito tras observar que varios componentes del SRA estaban presentes en los distintos órganos y tejidos reproductivos, entre los que se encuentran los testículos, el epidídimo, los conductos deferentes, la próstata, el fluido seminal y los espermatozoides (Leung y Sernia, 2003). Además, existen múltiples datos que indican que el SRA participa en la regulación de la fertilidad masculina interviniendo a múltiples niveles (Leung y Sernia, 2003; Paul et al., 2006). De esta forma se ha visto que este SRA local puede ser regulado por las hormonas del eje hipotálamo-hipofisario-testicular, y que a su vez, el SRA local puede modular tanto la función testicular, como la función espermática (Okuyama et al., 1988; Vinson et al., 1997; Paul et al., 2006).

4.6.1. El SRA y su implicación en la función testicular

El primer punto de control de la función reproductora masculina se produce a través del eje hipotálamo-hipofisario-testicular, mediante el control de la liberación de hormonas sexuales. La regulación a través de este eje comienza con la secreción por parte del hipotálamo, de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), que actúa directamente en la adenohipófisis, produciendo la síntesis y liberación de dos hormonas gonadotróficas o gonadotrofinas, la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH). Finalmente, estas hormonas actúan sobre los testículos ejerciendo distintas acciones. La LH actúa sobre las células de Leydig regulando la síntesis de testosterona, mientras que la FSH actúa principalmente en las células de Sertoli, que se encuentran en el interior de los túbulos seminíferos, regulando el proceso de espermatogénesis. Asimismo, la testosterona regula su síntesis a través de distintas vías de retroalimentación negativa que actúan sobre el hipotálamo y la hipófisis (Waites, 1993).

Se ha observado que los niveles de AGT y los receptores de la A II aumentan, de forma fisiológica, al inicio de la pubertad, con la aparición de la LH y la FSH en el torrente circulatorio (Parmentier et al., 1983). Además, se ha observado que la administración de gonadotropinas exógenas, resulta en un aumento de la concentración de A II en el testículo (Okuyama et al., 1988), así como en las células de Leydig (Pandey e Inagami, 1986), la A II actúa sobre estas mismas células inhibiendo la vía del cAMP (Khanum y Dufau, 1988).

Contrariamente, también se ha observado que tras la supresión hipofisaria (hipofisectomía), la expresión de los genes que codifican para el AT1R y el AT2R aumentan significativamente, mientras que la administración de hCG (hormona gonadotrófica que desencadena las mismas acciones que la LH) y gonadotropina menopáusica humana reducen su expresión. Lo que sugiere que la expresión génica de los transcritos de estos receptores también es dependiente de la adenohipófisis (Hirai et al., 1998).

Se ha visto que en varones tratados con hCG, al igual que produce un aumento de la renina, la actividad de la renina mantiene una correlación positiva con la testosterona. De forma que la hCG indirectamente produce un aumento de la testosterona (Parmentier et al., 1983).

Cuando se administran gonadotropinas exógenas, las variaciones de los niveles de gonadotropinas no afectan de forma significativa a los niveles de renina plasmática, sustenta la existencia de una regulación independiente del SRA sistémico y el testicular (Paul et al., 2006).

En las células de Leydig, la formación de renina también está regulada por las gonadotropinas LH y hCG, observándose unos efectos similares a los descritos en el testículo, su actividad aumenta tras la estimulación con gonadotropinas y la inmunoreactividad de la renina, es completamente eliminada tras la hipofisectomía y el tratamiento con estrógenos (Parmentier et al., 1983; Pandey et al., 1985).

Respecto a las funciones de los receptores del SRA sobre la función testicular, se ha observado la presencia del AT1R en el interior de los túbulos seminíferos, y más concretamente en espermatozoides en distintos estadios madurativos (espermatogonias y espermatidas), tanto murinos como humanos (Vinson et al., 1995a; Vinson et al., 1995b). Por lo que el AT1R podría estar implicado tanto en la inhibición de la producción de testosterona, como en la espermatogénesis. El MasR, al igual que su ligando, ha sido localizado en los testículos humanos, con independencia del estatus fértil del varón (Alenina et al., 2002; Leal et al., 2009; Reis et al., 2010). Este receptor ha sido observado en el citoplasma de células de Leydig, coincidiendo con la principal localización de su ligando, y en el interior de los túbulos seminíferos, siendo su expresión, igual de intensa a lo largo de todo el epitelio seminífero, desde la zona basal, donde se

encuentran células de Sertoli y las espermatogonias, hasta la luz del túbulo, donde se localizan los espermatozoides (Reis et al., 2010). Además, también se ha detectado mRNA del MasR en las células de Leydig, y adicionalmente en las de Sertoli, siendo su expresión mucho más pronunciada en las primeras, aunque no ha sido detectado en las células germinales (Alenina et al., 2002). Por otra parte, su localización en el interior del túbulo seminífero y el hecho de que su expresión está alterada cuando la espermatogénesis está gravemente afectada, sugieren que puede actuar regulando de este proceso (Reis et al., 2010).

En cuanto a la regulación de la espermatogénesis, la presencia de A (1-7), su receptor MasR, ACE, NEP2 y APN en el interior de los túbulos seminíferos, tanto en las células germinales en formación como en las células de Sertoli, sugieren un posible papel de estas moléculas en la regulación de este proceso (Alenina et al., 2002; Speth et al., 1999; Bonvouloir et al., 2001; Osada et al., 2001). Por otra parte, aunque se ha observado la presencia de ACE2 en las células de Sertoli, su expresión es independiente del estatus fértil del varón (Reis et al., 2010), por lo que *a priori*, no estaría implicada en este proceso.

4.6.2. El SRA y su implicación en la función espermática

Los espermatozoides para llevar a cabo correctamente su función, deben pasar por una serie de procesos como son la adquisición de la movilidad, la capacitación, la reacción acrosómica, y el reconocimiento, unión y fecundación del oocito (Yoshida et al., 2008; Sakkas et al., 2015). Estos procesos están regulados por la actuación conjunta de diversos mecanismos moleculares, entre los cuales se encuentra el SRA (Yoshida et al., 2008; Vinson et al., 1997; Speth et al., 1999). Así, tanto la presencia y distribución de los componentes del SRA en los espermatozoides, como la actividad de las angiotensinas asociadas, sugieren que este sistema estaría regulando la función reproductora, actuando directamente sobre la capacidad fértil de los espermatozoides (Leung y Sernia, 2003).

Se ha descrito que la A II es un modulador de la actividad espermática, ya que está implicada en procesos como la movilidad y la reacción acrosómica (Foresta et al., 1991; Vinson et al., 1997; Gur et al., 1998; Kohn et al., 1998a; Wennemuth et al., 1999; Sabeur et al., 2000). En cuanto a su implicación en la

movilidad, la A II aumenta tanto el porcentaje de espermatozoides móviles, como su velocidad lineal (Vinson et al., 1996).

Aunque la A (1-7) no ha sido localizada en espermatozoides maduros, la existencia de su receptor sugiere que éstos podrían ser influidos por modificaciones en la producción local de este péptido (Reis et al., 2010).

En cuanto a los receptores específicos de la A II, el AT1R ha sido detectado en la cola de espermatozoides tanto murinos como humanos (Vinson et al., 1995a; Vinson et al., 1995b).

Se cree que el AT1R está implicado en la movilidad espermática, ya que el uso de antagonistas de este receptor, como el losartán, inhibe la movilidad, mientras que tras la adición de A II se produce un aumento tanto del porcentaje de espermatozoides móviles, como de su velocidad lineal (Vinson et al., 1996). De igual manera, también se ha evidenciado su implicación en la reacción acrosómica, ya que tras la adición de captopril, inhibidor específico de la ACE, ésta queda inhibida (Foresta et al., 1991; Gur et al., 1998). Por su parte, el AT2R ha sido localizado en la región acrosomal de la cabeza de espermatozoides de ratón, aunque, por ahora, no se le ha atribuido ninguna función (Wennemuth et al., 1999).

El líquido seminal humano contiene prorrenina y renina activas en cantidades mayores que el plasma sanguíneo. Curiosamente, esta renina no proviene de los testículos, sino de la próstata u otras glándulas sexuales accesorias (Craven et al., 1981). Por otra parte, se ha observado una correlación directa entre el contenido prorrenina seminal y la calidad seminal (densidad y movilidad espermática) (Mukhopadhyay et al., 1995).

En cuanto a la ACE presente en el líquido seminal, se ha observado que se corresponde con la sACE (El-Dorry et al., 1983; Speth et al., 1999). Esto se debe a que no se sintetiza en el testículo, sino que es secretada al líquido seminal tras formarse en las células de los conductos deferentes. Por otra parte, la concentración de ACE del plasma seminal se correlaciona positivamente tanto con la concentración de espermatozoides como con su movilidad (Speth et al., 1999), aunque paradójicamente, también se ha visto que los niveles de ACE del plasma seminal de varones con oligospermia son similares a los de varones

normozoospermicos (Hohlbrugger et al., 1984). En cuanto a su localización en los espermatozoides, la tACE está presente en la membrana plasmática de las espermátidas y espermatozoides de distintas especies (Vanha-Pertulla et al., 1985; Brentjens et al., 1986; Dobrinski et al., 1997), principalmente en la membrana plasmática de la región acrosomal, en el segmento ecuatorial, en la región postacrosomal y en la pieza intermedia (Ganong, 1995; Kohn et al., 1998b). Su actividad es baja en animales inmaduros sexualmente, pero va aumentando progresivamente conforme van alcanzando la madurez sexual, lo que sugiere que su presencia es dependiente de la maduración sexual (Jaiswal et al., 1983). El mecanismo a través del cual la tACE participa en la función espermática todavía no se conoce en detalle, aunque, distintos estudios han demostrado su implicación en la movilidad, la capacitación, la reacción acrosómica y en la capacidad fecundante (Singh et al., 1985; Foresta et al., 1987; Foresta et al., 1991; Kohn et al., 1995; Shibahara et al., 2001; Li et al., 2014). Estos efectos de la ACE sobre la fertilidad masculina, y atribuidos a la tACE, han sido corroborados mediante distintos estudios en animales, en los que mientras la eliminación de la sACE a ratones macho no afectaba a la fertilidad, los que carecen de ambas isoformas, sACE y tACE, muestran una fertilidad reducida, a pesar de que tanto el desarrollo testicular, como los espermatozoides y su movilidad, y la conducta de apareamiento son normales (Krege et al., 1995; Esther et al., 1996; Hagaman et al., 1998).

En cuanto a la regulación por las distintas angiotensinas (A) y sus receptores, se ha descrito como la A II, probablemente a través de su unión al AT1R, modula la actividad espermática, estando implicada en la movilidad y la reacción acrosómica. Los antagonistas de la A II inhiben tanto la movilidad como la reacción acrosómica (Wennemuth et al., 1999; Foresta et al., 1991; Vinson et al., 1996; Gur et al., 1998; Sabeur et al., 2000). Sin embargo, aunque el AT2R, la A (1-7) y el MasR, han sido localizados en los espermatozoides se desconoce las funciones que desempeñan (Wennemuth et al., 1999; Reis et al., 2010). La tACE ha sido localizada en la membrana plasmática de las espermátidas y espermatozoides, y se considera una enzima muy relevante en la fertilidad masculina debido a su implicación en la capacitación, la reacción acrosómica y en

la capacidad fecundante (Singh et al., 1985; Foresta et al., 1987, 1991; Kohn et al., 1995; Shibahara et al., 2001; Li et al., 2014).

5. ESPERMATOGÉNESIS

La espermatogénesis es un complejo y ordenado proceso de diferenciación de las células madres germinales primordiales (espermatogonias) hacia espermatozoides. Este proceso ocurre en tres fases distintas (Sharpé, 1994), dicho proceso ocurre concretamente en los túbulos seminíferos. En la infancia, la creación de gametos esta en reposo, pero en la pubertad, junto a la subida de la concentración de las hormonas gonadotróficas (FSH y LH) las células de Leydig secretan testosterona y así da comienzo la espermatogénesis. En el ser humano, cada ciclo espermatogénico dura 64 días. Pero, antes de acabar cada ciclo, con una regularidad de 2-3 semanas, empiezan nuevos ciclos, que producen unos 120 millones de espermatozoides diarios cada ciclo espermatogénico dura 64 días. Pero, antes de acabar cada ciclo, con (Amann y Howard, 1980; Sharpe, 1994). Es por esto que en cada túbulo seminífero encontramos células en diferente estado de maduración y las más desarrolladas aparecen en el lumen de los túbulos (Fig. 16). En la parte basal de los túbulos se encuentran las células de Sertoli que son la barrera entre el túbulo y la sangre (Clermont, 1963). El proceso se mantiene activo durante toda la vida aunque en la vejez se nota un descenso en la producción de espermatozoides (Marina, 2003). La espermatogénesis comienza con la división de las células madre y finaliza con la formación de los espermatozoides maduros. Se completa en tres fases.

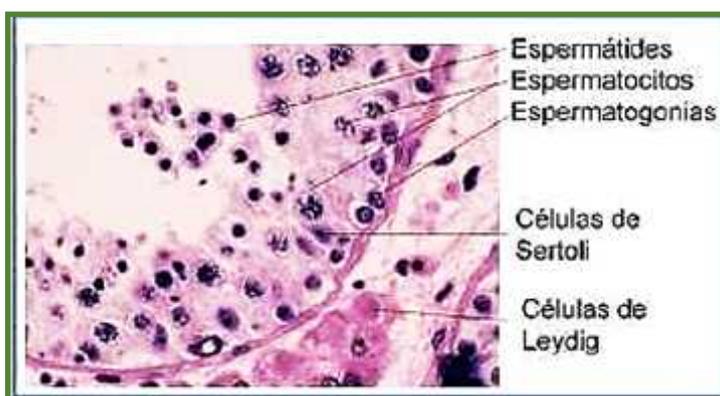


Fig. 17.- Diferentes estados de maduración.

(Matsumoto et al., 1996). división mitótica, los espermatocitos secundarios, se dividen, dando lugar a las espermátides (23, 1N) (Matsumoto et al., 1996).

5.2. Espermiogénesis

Es el proceso por el cual las espermátides se transforman en espermatozoides maduros, a través de cambios morfológicos y funcionales, sin que haya división celular. Estos cambios son: la formación del acrosoma, mediante la transformación del aparato de Golgi; condensación y elongación del núcleo, eliminación de la mayor parte del citoplasma y formación de la cola adaptando organelas citoplasmáticas como el centríolo distal (flagelo) y las mitocondrias (pieza intermedia). El proceso de maduración termina con la espermiación o liberación de los espermatozoides a la luz del túbulo seminífero.

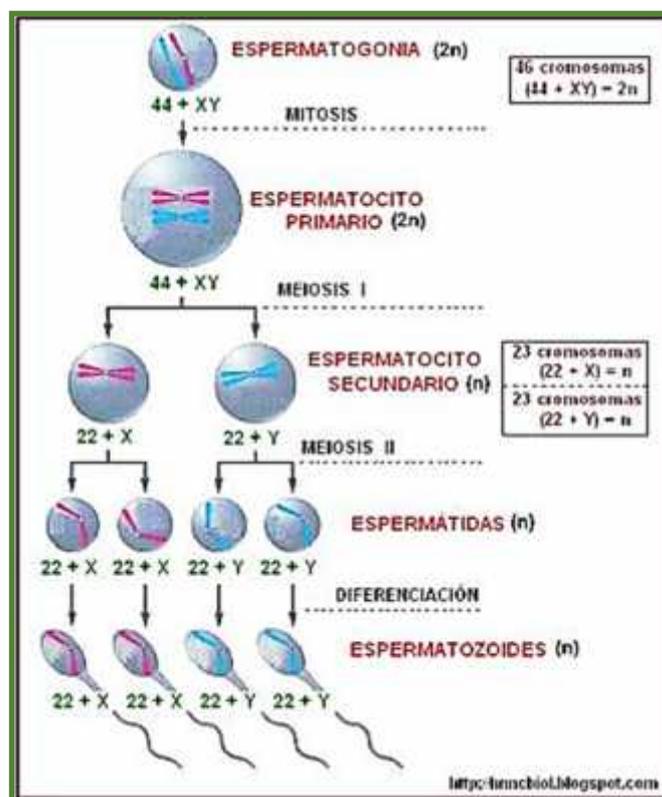


Fig. 19.- Espermatogénesis

Durante este proceso actúan proteínas nucleares, primero las histonas compactan el ADN formando nucleosomas y, las protaminas se unen al ADN espermático permitiendo el enrollamiento y condensación del ADN en subunidades mucho más grandes conocidas como toroides (Aoki & Carrell, 2003).

La cromatina espermática experimenta una fuerte compactación, llegando a compactarse 6 veces más que una célula somática (Shaman & Ward, 2006). El primer evento en esta transformación ocurre en estadio de espermátides redondas, donde las histonas somáticas son hiperacetiladas y reemplazadas por las proteínas de transición nuclear (TP1 y TP2); luego en el estadio de espermátide elongada, éstas son reemplazadas por otras proteínas, conocidas como protaminas (P1 y P2) (Carrell et al., 2007). Este remodelamiento de la cromatina es acompañado de cambios en la forma del núcleo espermático, desenrollamiento del ADN, inducción de quiebras transitorias en el ADN y condensación de la cromatina (Carrell et al., 2007). En un estudio realizado con ratones con sólo una copia de estos genes demostraron, su importancia en la fisiología espermática (Cho et al., 2001; Yu et al., 2000; Zhao et al., 2001). Se han descrito cambios estructurales en los túbulos seminíferos de rata (*Rattus norvegicus*) (Levy et al., 1999) y hámster (*Mesocricetus auratus*) (Morales et al., 2004) y la alteración de la expresión génica en células madre espermátogonias murinas en relación al aumento de la edad (Kokkinaki et al., 2010). En consideración de la gran cantidad de divisiones celulares que experimentan las células de la línea espermática masculina durante toda su vida, podría sugerir que el acumulado de mutaciones en el ADN de la línea germinal disminuye la salud reproductiva del individuo. Existen escasos trabajos sobre la influencia de la edad avanzada sobre los parámetros reproductivos masculinos en los murinos (Zubkova & Robaire, 2006). Actualmente, es totalmente desconocido si la protaminación espermática está influenciada por la edad. Tanto la edad como la protaminación espermática son características de enorme influencia sobre la fertilidad masculina (Carrell et al., 2007; Aitken et al., 2009).

Mediante movimientos peristálticos los espermatozoides son transportados de la rete testis a los conductos eferentes y de allí al epidídimo (Bustos-Obregon et al., 1975). Aun así, estos espermatozoides no serán capaces de fecundar hasta sufrir los procesos de capacitación y reacción acrosómica, en el tracto reproductor femenino.

En el ser humano, cada ciclo espermatogénico dura 64 días. Pero, antes de acabar cada ciclo, con una regularidad de 2-3 semanas, empiezan nuevos ciclos. Es por esto que en cada túbulo seminífero encontramos células en

diferente estado de maduración y las más desarrolladas aparecen en el lumen de los túbulos. En la parte basal de los túbulos se encuentran las células de Sertoli que son la barrera entre el túbulo y la sangre (Clermont, 1963).

5.3. Regulación Endocrina y Paracrina de la Espermatogénesis

La producción de andrógenos y la maduración de los gametos son reguladas en el testículo por el hipotálamo y la hipófisis a través de un mecanismo de retroalimentación negativo. La testosterona inhibe la secreción de FSH y LH; y la FSH tiene otro regulador que es la Inhibina. La LH estimula la producción de Testosterona en las células de Leydig, mientras que la FSH controla la espermatogénesis a través de las células de Sertoli.

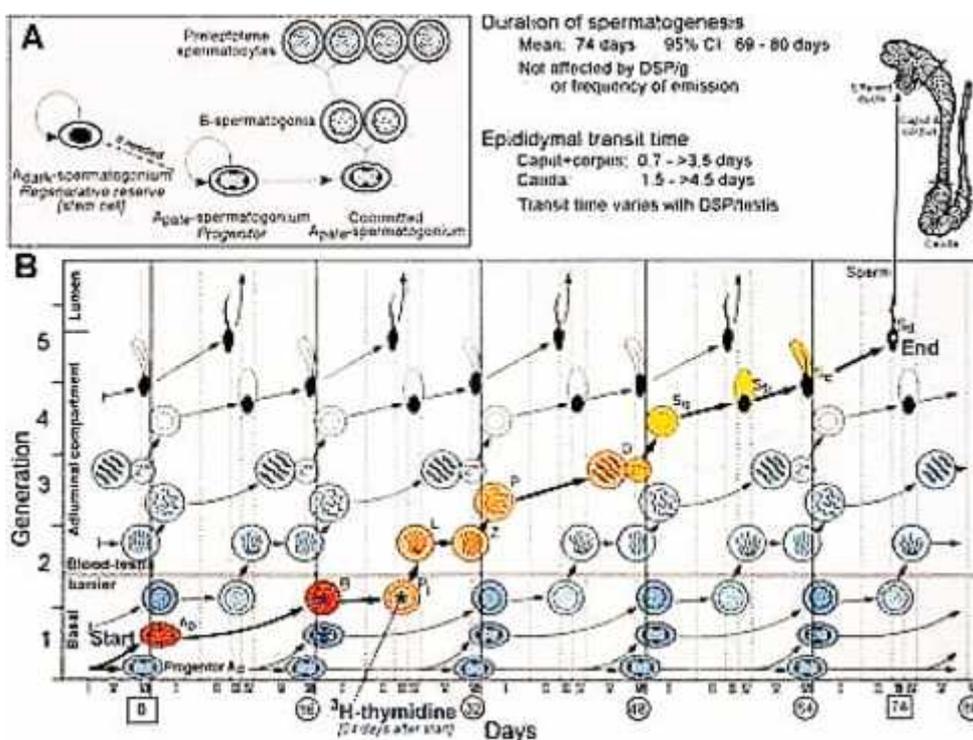


Fig. 20.- Espermatogénesis

La testosterona es el regulador local más importante de la espermatogénesis y aunque en un primer momento es la FSH la iniciadora de la espermatogénesis, será la testosterona la que mantenga modulado este proceso (Weinbauer et al., 1997).

Además de esta regulación endocrina existe una regulación local o paracrina independiente de la regulación hormonal., habiéndose descrito actividad

paracrina en células de Sertoli, Leydig, peritubulares, macrófagos y células germinales.

Han sido descritas distintas sustancias importantes en la regulación local de la espermatogénesis como son: los factores de crecimiento, entre los que se encuentran: el factor de crecimiento transformante - α y β - (TGF- α y TGF- β), la inhibina, la activina, el factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor de crecimiento de la insulina-I (IGF-I), el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de las células madre (SCF) y las interleukinas (IL). Estas sustancias tienen importantes efectos moduladores (inhibición – estimulación) sobre la espermatogénesis, que en un futuro pueden ser completadas por otras aun no conocidas y/o relacionadas (Weinbauer et al., 1997).

Recientes estudios han demostrado que las células germinales masculinas en ratón presentan activos los receptores opiodes, mu-opiodes (MOR), delta-opiodes (DOR) y kappa-opiodes, implicados en la regulación de la espermatogénesis y en la regulación de la meiosis modificando la expresión génica de las proteínas del complejo sinaptonémico. (Estomba et al., 2016).

6. ESTRUCTURA DE LOS ESPERMATOZOIDES

La función de los espermatozoides es llegar al ovocito y fertilizarlo. Para conseguir ese objetivo, el espermatozoide cuenta con una morfología muy bien diferenciada. El espermatozoide de los mamíferos se suele dividir en dos partes principales: la cabeza y la cola.

a. Cabeza

Las estructuras más reseñables dentro de la cabeza son el acrosoma, el núcleo y el citoplasma (muy reducido) (Browder et al., 1991).

Acrosoma

Es una vesícula grande situada en la parte apical de la cabeza. Dentro de esta estructura se encuentran enzimas hidrolíticas capaces de digerir la matriz extracelular del ovocito (zona pelucida). Esos enzimas se liberan mediante la exocitosis del acrosoma (reacción acrosómica) (zona pelucida).

Núcleo

Se sitúa en la parte de la cabeza que queda detrás del acrosoma, en la zona post-acrosómica. En el núcleo espermático el DNA aparece muy condensado debido a que durante la espermatogénesis, las histonas son reemplazadas por protaminas. En el núcleo también aparece RNA que tiene funciones aún desconocidas.

El núcleo espermático es la parte que debe penetrar en el ovocito.

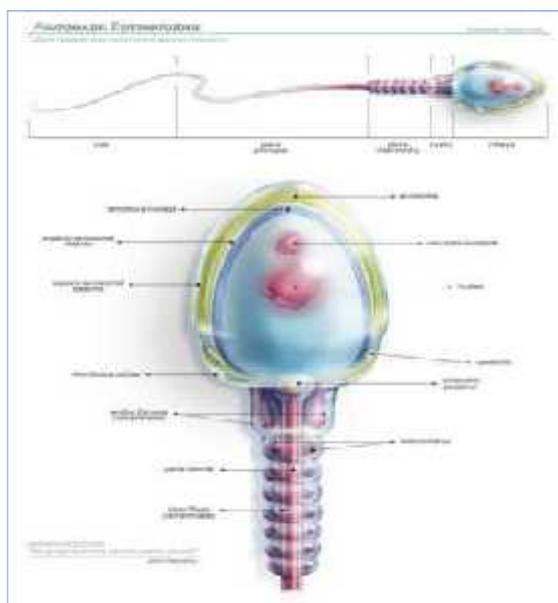


Fig. 21.- Cabeza espermatozoide

Citoplasma

Los espermatozoides maduros tienen un citoplasma muy reducido. La mayor pérdida del citoplasma se produce cuando los espermatozoides se van a liberar del epitelio de los túbulos seminíferos. Al fragmento de citoplasma que liberan se denomina cuerpo residual; esos cuerpos residuales contienen RNA empaquetado, aparato de Golgi, retículo endoplásmico, lisosomas y peroxisomas y son fagocitados por las células de Sertoli.

Debido a la alta condensación de la cromatina nuclear, no se creará RNA de novo y debido a la pérdida de citoplasma y de orgánulos, el mRNA no se traduce a proteínas ni se da el transporte de vesículas. Por tanto, los espermatozoides maduros pierden la capacidad de expresar proteínas y de transportar vesículas (Miller et al., 2006). Eso significa que los espermatozoides

no sintetizarán nuevos compuestos y que por tanto, deberán llegar al ovocito con lo creado durante la espermatogénesis. Aun así, a lo largo del trayecto por el epidídimo, durante el tiempo en el que están en contacto con el líquido seminal (mediante epididimosomas) y/o a través del tracto femenino, ocurre un intercambio de proteínas y lípidos de la membrana plasmática espermática (Schuel et al., 2005). De ese modo, puede ocurrir que los espermatozoides varíen su actividad en relación al medio en el que se encuentren. Por otra parte, la posibilidad de que algunos mRNA puedan ser traducidos mediante ribosomas mitocondriales deja en evidencia que este tema esté todavía en debate (Miller et al., 2006).

b. Cola

La cola de los espermatozoides tiene una estructura compleja y especializada con el fin de proporcionare movimiento a la célula. Morfológicamente se divide en cuatro partes: cuello, pieza media, pieza principal y pieza final (Mortimer, 1997).

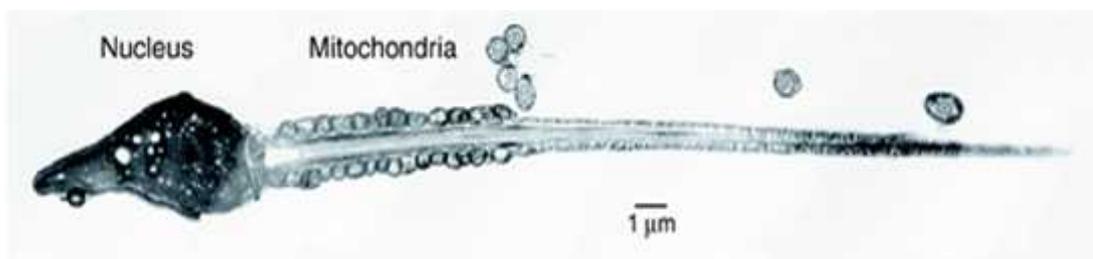


Fig. 22.- Micrografía electrónica de un espermatozoide humano. La célula tiene un núcleo compacto, las mitocondrias visibles, sin retículo endoplasmático; el citoplasma es mínimo y la cola es de gran tamaño (alrededor de 45 μ m de longitud) (Barratt et al., 2009).

Cuello

Es la articulación entre la cabeza y la cola

Pieza media

Esta formada por el axonema y alrededor hay 9 fibras densas externas. Alrededor de estas fibras hay una capa de mitocondrias y finalmente, rodeándolo todo, está la membrana plasmática. En esta pieza se crea el ATP necesario para el movimiento flagelar

Pieza principal

Aquí también encontramos las fibras densas externas rodeando el axonema pero las fibras en posición 3ª y 8ª están sustituidas por dos columnas de fibras membranosas. Estas dos columnas se encuentran unidas. Finalmente, está la membrana plasmática rodeando todo. En esta pieza también se crea ATP.

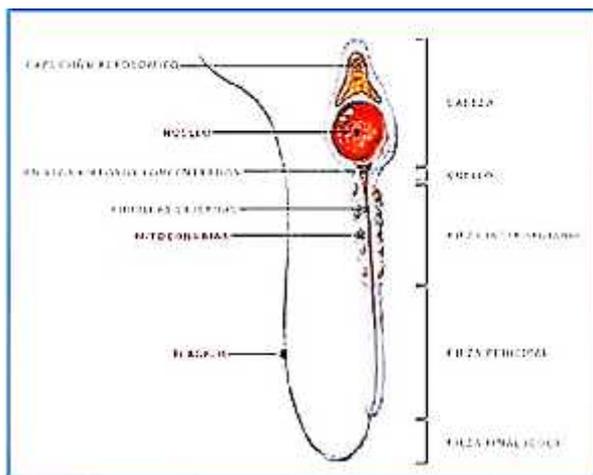


Fig. 23.- Partes espermatozoide

Pieza final o flagelo

Esta parte está formada por el axonema y la membrana plasmática. Los espermatozoides utilizan el flagelo para moverse. El movimiento es debido a la batida flagelar que crea el axonema en un proceso que requiere energía. El axonema está formado por microtúbulos y proteínas unidas a estos y en el caso del espermatozoide, su estructura se mantiene a lo largo de toda la cola. Más detalladamente, el axonema se compone por 9 pares de microtúbulos compuestos de tubulina creando un anillo y en el centro de este anillo se sitúan otros dos microtúbulos. Los brazos de dineína son las estructuras proteicas más importantes unidas a los microtúbulos. De hecho, como esa última proteína tiene actividad ATP-asa convierte la energía química en energía mecánica y de esa forma puede sufrir cambio conformacional. Así pues, el movimiento del flagelo ocurre por deslizamiento entre microtúbulos gracias al funcionamiento del motor tubulina/dineína (Marigomez y Cajaraville, 1999).

Los espermatozoides obtienen ATP principalmente por fosforilización oxidativa que se da en las mitocondrias presentes en la pieza media del flagelo. Pero en las partes del flagelo carentes de mitocondrias, es muy importante el ATP conseguido mediante la glicólisis que se da en las fibras membranosas de la pieza principal (Turner, 2006) (Fig.24)

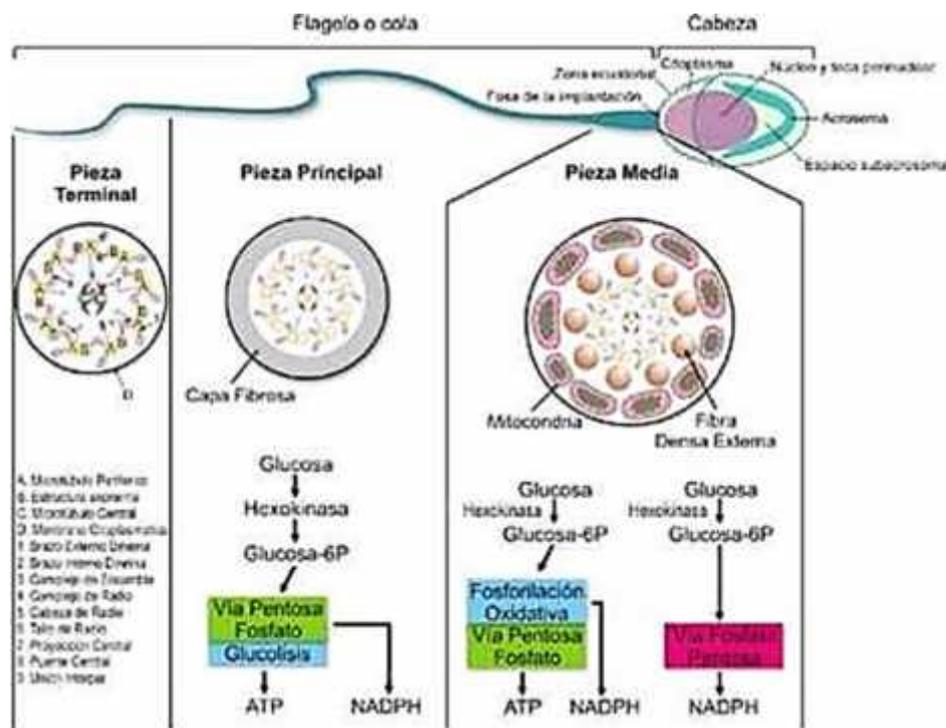


Fig. 24.- Obtención de energía

7. Fragmentación del ADN espermático

El ADN del espermatozoide aporta la mitad del material genético a la descendencia, y se requiere que sea sano para la fertilización, el desarrollo del embrión, el correcto desarrollo fetal y posnatal. En este ADN se puede en cualquier etapa del proceso de la espermatogénesis producir un daño, siendo éste un fenómeno multifactorial y no del todo delimitado.

El estudio de la infertilidad masculina se ha basado tradicionalmente en el análisis de semen clasificado de acuerdo con las normas del Manual de la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2010). Este análisis se basa en el número de espermatozoides, la motilidad y la morfología espermática, aunque sus

criterios de normalidad ofrecen un valor pronóstico limitado en la predicción de embarazo (Irvine et al., 1994).

Aunque existe variación en la estimación, aproximadamente 15% de los pacientes con infertilidad por factor masculino muestran espermogramas normales (Agarwal et al., 2005), como resultado surgieron las pruebas de morfología con criterios estrictos (Kruger et al., 1988) para proporcionar información adicional acerca de la calidad seminal.

La fragmentación del ADN se ha convertido en la última década en un importante marcador de la calidad del espermatozoide en función de su posible relación con diversos parámetros críticos tanto in vivo como en reproducción asistida, incluido el desarrollo del cigoto-embrión y la calidad, la implantación, el aborto y la salud del recién nacido (Aitken, 2004; Tesarik et al., 2004; Tomlinson et al., 2001; Schulte et al., 2010; Shamsi et al., 2010, 2011; Bungum et al., 2012) y proporcionar información adicional.

Por lo tanto, parece razonable sugerir que con las técnicas de reproducción asistida se puede compensar el deterioro de la integridad de la cromatina de esperma, en particular, si es el ICSI como el método de fertilización elegido y sólo el espermatozoide morfológicamente normal se selecciona para la microinyección. Además, la selección de espermatozoides morfológicamente normales para ICSI y la elección de embriones de buena calidad para la transferencia en la FIV / ICSI puede reducir los efectos potencialmente adversos del daño en el ADN del espermatozoide en el resultado de las técnicas de reproducción asistida.

En un trabajo realizado por Ming-Huei Lin (2008) curiosamente, observaron mayores tasas de aborto cuando el valor de la estabilidad del ADN superó el 15% en el grupo de FIV, pero no así en grupo ICSI. Las tasas de aborto mediante ICSI no parecían estar relacionados con la alta estabilidad del ADN (*high DNA stainability*) (HDS). Por lo tanto, la ICSI aparentemente compensa las anomalías funcionales espermáticas asociadas con HDS y eliminaba cualquier influencia significativa que una alta proporción de espermatozoides inmaduros pudiese tener en las tasas de aborto. Es posible que sólo el esperma morfológicamente maduro fuese seleccionado para inyectar en ICSI. También observaron que un índice de

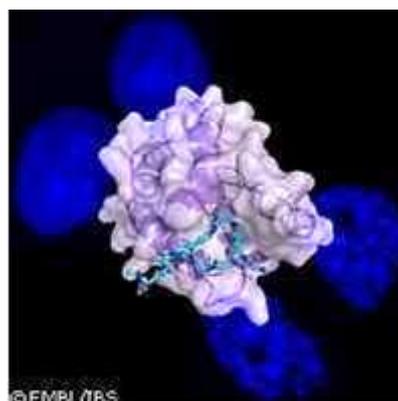
fragmentación alta (> 27%) (DNA fragmentation index) (DFI) se asoció con un mayor índice de aborto espontáneo, aunque no se encontró significación estadística.

Además, a la hora de preparar un muestra seminal para técnicas de reproducción asistida hay que tener en cuenta el método utilizado, en un estudio realizado por Tamayo Hussein y colaboradores (2017) evidenciaron que la técnica de selección espermática swim-up permite recuperar espermatozoides de mejor calidad, con mayor potencial de membrana y menor fragmentación de ADN.

En contraste con las células somáticas, el ADN del espermatozoide está altamente condensado debido a la sustitución de las histonas por protaminas y al aumento de la formación de enlaces disulfuro (Oliva et al., 1991). A finales de la espermatogénesis, alrededor del 85% de las histonas en el núcleo del espermatozoide es sustituido por protaminas. Este proceso da lugar a la compactación de la cromatina espermática y al silenciamiento de la transcripción. En el ser humano, hay dos tipos de protaminas: protamina-1 (P1) y protamina-2 (P2). Las variaciones en la expresión de las protaminas del espermatozoide se asocian con la infertilidad masculina. El aumento de la fragmentación del ADN espermático se asocia con protaminación anormal y da como resultado tasas de fertilización más bajas, menor calidad embrionaria y tasas de embarazo reducidas (Simon et al., 2011).

El ADN del espermatozoide normal es altamente resistente tanto a la desnaturalización física como química y cuenta con una configuración en anillo de forma que puede prevenir daños en el ADN durante el transporte de los espermatozoides (Philpott et al., 1992). Las roturas de la cadena de ADN de los espermatozoides humanos son indicadores de deterioro de la función. (Morinière et al., 2009).

Fig.25.- Morinière et al., (2009). Cooperative binding of two acetylation marks on a histone tail by a single bromodomain.



7.1. Mecanismos por los que se produce la fragmentación del ADN

¿Cómo tiene lugar el daño del ADN en el espermatozoide? El daño del ADN en los espermatozoides puede afectar tanto al ADN mitocondrial como al ADN nuclear y puede ser inducido mediante seis mecanismos principalmente. El ADN mitocondrial es el más vulnerable al ataque de ROS (Especies reactivas de oxígeno), y un marcador muy sensible al estrés oxidativo en la línea germinal. Sin embargo, como las mitocondrias paternas son eliminadas lentamente tras la fecundación, la integridad de su ADN no tendrá muchas consecuencias para el embrión resultante (Aitken et al., 2011).

Estos mecanismos pueden tener lugar durante la producción espermática o bien durante el transporte de los espermatozoides (Fig. 25). De estos seis mecanismos, uno de ellos puede jugar un mayor papel en la causa de la fragmentación del ADN espermático, este es el daño post testicular que se produce durante el transporte de los espermatozoides a través del epidídimo. Esto está apoyado por algunas publicaciones que demuestran que la fragmentación del ADN del espermatozoide es mayor en el epidídimo caudal y eyaculado en comparación con espermatozoides testiculares (Greco et al., 2005; Ollero et al., 2001). Esta hipótesis ha sido confirmada en recientes publicaciones (Suganuma et al., 2005). La pregunta, sin embargo, todavía sigue siendo si los fallos que se producen durante la espermatogénesis son los responsables de que los espermatozoides sean más susceptibles al daño post- testicular.

7.1.1. Inducción de la apoptosis durante el proceso de la espermatogénesis.

Durante el proceso de la espermatogénesis el mecanismo de selección de células germinales está gobernado por las células de Sertoli responsables de la inducción de la apoptosis en el 50% -60% de todas las células germinales que entran en meiosis I. Estas células tienen marcadores apoptóticos del tipo Fas y deben ser fagocitadas y eliminadas por las células de Sertoli a las que estas células germinales están asociadas (Billig et al., 1996; Pentikainen et al., 1999; Sakkas et al., 1999). Sin embargo, este mecanismo no siempre puede operar de manera eficiente y un porcentaje variable de estas células germinales defectuosas entran en el proceso de remodelación de los espermatozoides durante la

espermiogénesis, apareciendo más tarde en el eyaculado. En relación con el fracaso de este mecanismo de selección, los resultados de un estudio reciente por Burrello y colaboradores (2004), sugiere que hay disociación entre la calidad genómica en la célula germinal y la remodelación del espermatozoide que tiene lugar durante el proceso de la espermatogénesis. Es decir, una célula germinal puede tener su núcleo "alterado" por apoptosis o ser aneuploide y, aun así, el espermatozoide resultante tendrá una morfología normal. Por lo tanto, cuando se microinyecta en una ICSI un espermatozoide con morfología normal, no necesariamente significa que la calidad genómica también sea normal. Curiosamente, se ha propuesto recientemente que el mecanismo de la apoptosis en la espermiogénesis puede estar menos relacionada con la de la muerte celular, pero ser más responsable en las etapas finales de la maduración espermática (El-Domyati et al., 2009).

Se ha demostrado que en los hombres con oligozoospermia, la probabilidad de que un espermatozoide con morfología normal pueda ser aneuploide es mucho mayor que cuando el hombre es normozoospermico (Burrello et al., 2004). Esto está probablemente relacionado con la detención de la maduración parcial asociada con alteraciones meióticas. El hecho de que un porcentaje variable de espermatozoides en el eyaculado expresan marcadores de apoptosis, por ejemplo, Fas, fosfatidilserina, Bcl-XL, p53 (Sakkas et al., 2002; Cayli et al., 2004; Mahfouz et al., 2008; Oehninger et al., 2003), indica que este fenómeno podría ser usado para seleccionar espermatozoides no apoptóticos a partir de muestras de semen (Said et al., 2005). Un método recientemente introducido para este propósito es el uso de microperlas de Anexina-V-conjugado (kit Microbead del ANMB; Miltenyl Biotec, Alemania). El principio en que se basan estas columnas es que dado que los espermatozoides apoptóticos expresan fosfatidilserina en el exterior de la membrana, dichos espermatozoides tienen afinidad por la anexina-V por lo que se unen a ella. Cuando se aplica un campo magnético a las columnas, los espermatozoides unidos a la anexina-V conjugada con las microperlas magnéticas son retenidos en la columna, mientras que los espermatozoides no apoptóticos pasarán a través de la columna (Grunewald et al., 2001).

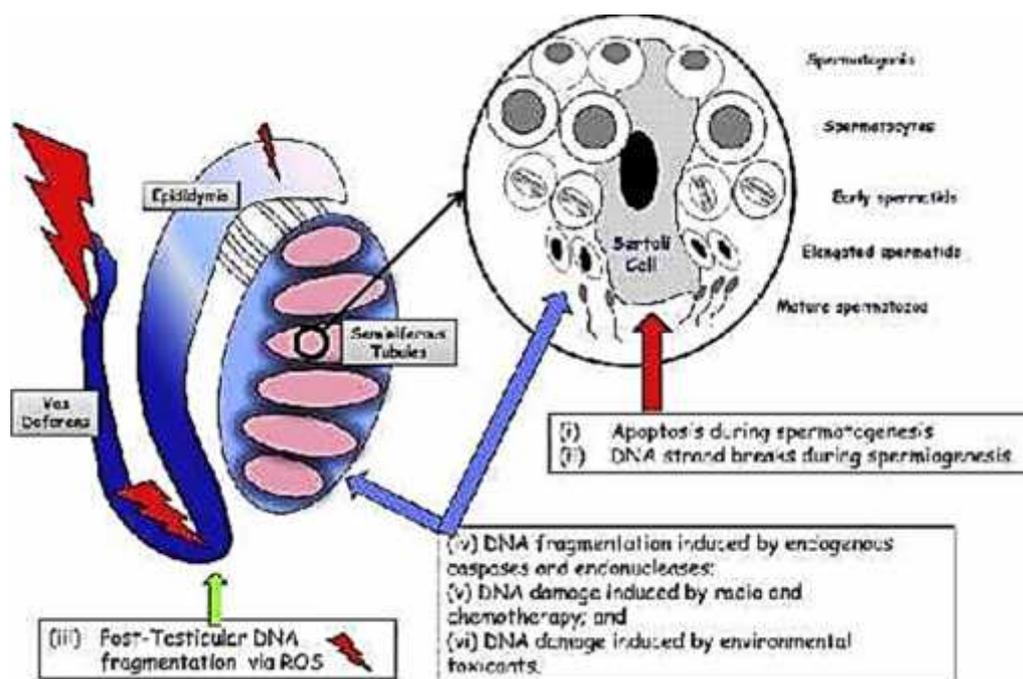


Fig. 26.- [1] apoptosis durante el proceso de la espermatogénesis; [2] roturas de la cadena de ADN producidos durante la remodelación de la cromatina del espermatozoide en el proceso de la espermiogénesis; [3] fragmentación del ADN post-testicular inducida principalmente por los radicales de oxígeno, como el óxido nítrico y radicales hidroxilo, durante el transporte del espermatozoide a través de los túbulos seminíferos y del epidídimo; [4] la fragmentación del ADN inducida por caspasas endógenas y endonucleasas; [5] daño del ADN inducido por la radioterapia y quimioterapia; y [6] el daño del ADN inducido por sustancias tóxicas ambientales.

7.1.2. Rotura del ADN durante el proceso de espermiogénesis.

Las alteraciones en la remodelación de la cromatina durante el proceso de espermiogénesis podrían influenciar en la fragmentación del ADN. McPherson y Longo (1992, 1993), postularon que la presencia de fracturas en el del ADN en los espermatozoides del eyaculado puede ser indicativo de una maduración incompleta durante la espermiogénesis (McPherson et al., 1993, 1993,1992). Se postula que el embalaje de la cromatina en ratón puede requerir actividad de la nucleasa endógena para crear y ligar los cortes que facilitan la protaminación. Estos cortes se cree que proporcionan un alivio en la tensión de torsión para ayudar a la disposición de la cromatina durante el remplazo de las histonas por las protaminas y el mismo procedimiento se cree que ocurre en los seres humanos (Marcon et al., 2004) (Fig.27).

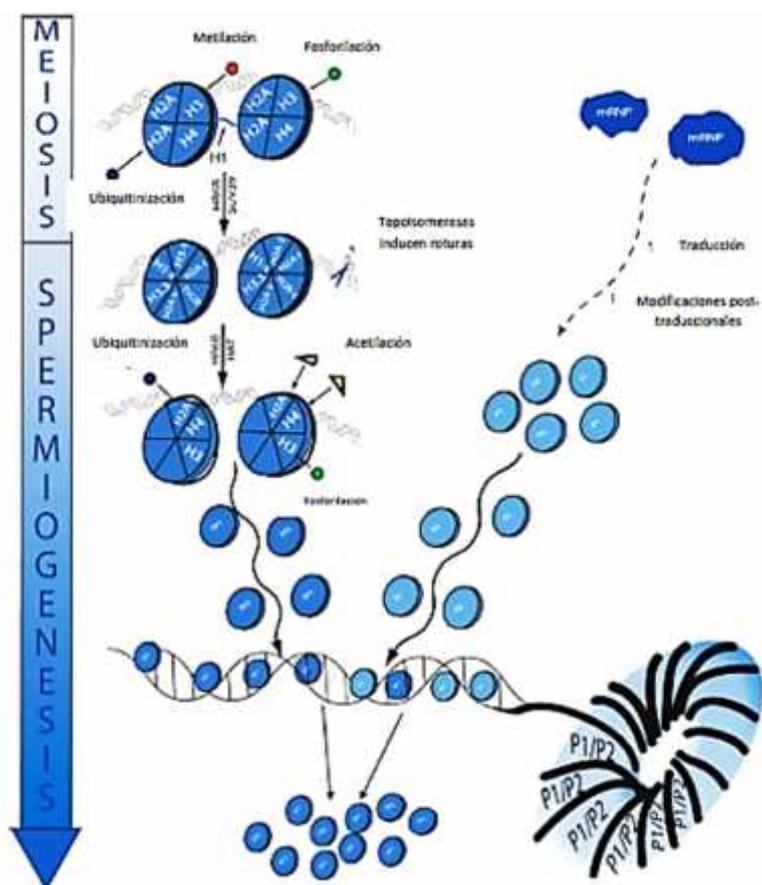


Fig. 27.- Remodelamiento de la cromatina durante el intercambio desde histonas a protaminas. Modificado de Carrell et al., (2007).

Las alteraciones en el control de este proceso pueden dar lugar a la presencia de anomalías en embalaje de la cromatina o fracturas del ADN no reparadas. Estas rupturas de ADN se producen antes de la espermiación y es probable que sean más susceptibles al ataque post-testicular.

7.1.3. Fragmentación del ADN espermático post-testicular

El estrés oxidativo generado por ROS conlleva a infertilidad por dos mecanismos: daño a la membrana espermática, lo que disminuye la movilidad del espermatozoide y su capacidad para fusionarse con el ovocito, y el daño al ADN espermático, alterando la contribución genómica paterna hacia el embrión. Por lo tanto, espermatozoides íntegros funcionalmente, son esenciales para la fertilización tanto "in vivo" como "in vitro". Las alteraciones en las mitocondrias están asociada a un incremento en la producción de ROS (Schatten et al., 2014). En ratas se ha demostrado alteraciones en la integridad y el empaquetamiento

normal del ADN espermático en machos viejos, haciéndolo más susceptible al daño oxidativo (Zubkova et al., 2005; Zubkova & Robaire, 2006).

La arquitectura física del espermatozoide previene cualquier actividad nucleasa como resultado del proceso apoptótico cuando alguna enzima con capacidad ADNasa accede al ADN nuclear e induce fragmentación, es por esta razón que la mayor parte de la fragmentación del ADN espermático es producto del daño oxidativo antes que de algún evento apoptótico, de aquí se deriva la importancia de su análisis.

Estudios recientes muestran que los espermatozoides inmaduros, producen altos niveles de ROS, pudiendo inducir daño en el ADN de los espermatozoides maduros. Este daño se produciría después de la espermiación durante la migración de espermatozoides maduros e inmaduros de los túbulos seminíferos al epidídimo caudal (Ollero et al., 2001). Aunque la vida media de las ROS es del orden de nanosegundos a microsegundos, dado que hay una alta concentración de espermatozoides en el epidídimo, facilitaría el daño del ADN inducido por las ROS.

Las ROS pueden dañar el ADN del espermatozoide directa o indirectamente a través de la activación de las caspasas y endonucleasas espermáticas. En el preparado de la muestra seminal para las técnicas de reproducción, dado que hay una centrifugación de espermatozoides maduros con inmaduros (que producen altos niveles de ROS) daría como resultado una inducción de la fragmentación del ADN en los espermatozoides maduros, ya que, bajo estas condiciones, los espermatozoides maduros e inmaduros están en contacto cercano (Twigg et al., 1998). Así, el hecho de que los espermatozoides maduros estén expuestos a sustancias ROS tiene como consecuencia un daño en el ADN espermático significativo. (Aitken et al., 1998; Lopes et al., 1998).

Por otro lado, las células epiteliales del epidídimo también podrían jugar un papel activo en el daño del ADN inducido por ROS.

[1] A través de ROS tales como el óxido nítrico o radical hidroxilo (Britan et al., 2006). Cabe señalar que la fragmentación del ADN de esperma inducida por los radicales hidroxilo y la radiación ionizante se traduce en la formación de 8-OH-guanina y 8-OH-2 'desoxiguanosina (8-OHdG) en una primera etapa y a partir

de entonces la fragmentación del ADN monocatenario (Cui et al., 2000). Además, la formación de radicales hidroxilo puede inducir daño en la doble cadena del ADN espermático a través de la activación de las caspasas y endonucleasas espermáticas. Aunque el daño del ADN del primer tipo puede ser reparado por el ovocito o el embrión, la fertilización de un ovocito por un espermatozoide con una extensa fragmentación del ADN de doble cadena es prácticamente irreparable e incompatible con un embrión normal y el desarrollo fetal.

[2] A través de la activación de las caspasas y endonucleasas espermáticas por factores fisicoquímicos tales como alta temperatura (Banks et al., 2005) y factores ambientales (Rubes et al., 2007).

En el primer caso, este daño teóricamente podría prevenirse con el uso de antioxidantes, mientras que en el segundo caso este tratamiento no sería eficaz, apoyado por el estudio de Greco y colaboradores (2005), en el que el uso de antioxidantes resultó en una reducción significativa en los niveles de fragmentación del ADN espermático. Sin embargo, se debe tener cuidado al utilizar la terapia antioxidante. Se ha visto que algunos antioxidantes, como la vitamina C, pueden aumentar la compactación de la cromatina mediante la reducción de enlaces disulfuro en las protaminas del espermatozoide (Menezo et al., 2007).

Lo más probable es que los espermatozoides que tienen mayores niveles de daño en el ADN serían aquellos que adquieren los niveles más bajos de enlaces disulfuro en su cromatina espermática durante el proceso de maduración de los espermatozoides en el epidídimo.

Una característica interesante que está surgiendo en estudios recientes es que, en general, el grado de fragmentación de ADN de espermatozoides eyaculados es mayor que en espermatozoides testiculares (Greco et al., 2005; Steele et al., 1999), y en el espermatozoide desde el cuerpo y la cabeza del epidídimo, que es precisamente donde el proceso de los cruces de los enlaces disulfuro tiene lugar, y que la inducción de la fragmentación de ADN de espermatozoides en el epidídimo podría estar relacionada con su calidad genómica. Es decir, además del mecanismo de selección ejercida por las células de Sertoli durante el proceso de la espermatogénesis, habría otro mecanismo de selección

en el nivel del epidídimo dirigida para eliminar los espermatozoides genómicamente defectuoso (Suganuma et al., 2005).

El daño potencial que el esperma puede experimentar durante el paso por el epidídimo puede verse limitada por la eliminación de ellos antes de ese paso. Esto tiene mayor relevancia clínica en los casos de altos niveles de fragmentación del ADN en el semen y el fracaso de FIV repetida donde uno puede recurrir al uso de espermatozoides testiculares obtenido por extracción de espermatozoides testiculares (TESA o TESE) (preferiblemente TESA, ya que es menos invasiva y gozaría de una mayor aceptación por el ginecólogo y el paciente). Esto se apoya en los resultados reportados por Greco y colaboradores (2005), donde la microinyección se realiza con espermatozoides testiculares en pacientes que previamente han tenido fallos con sus espermatozoides de eyaculado, con niveles de fragmentación del ADN en semen > 15%, por el método TdT-dUTP nick (TUNEL), resultando un porcentaje de embarazo clínico del 44,4%, y una tasa de implantación del 20,7% en comparación con un 0% con espermatozoides del eyaculado (un aborto).

La presencia de leucocitos en el eyaculado, también pueden contribuir a la producción de ROS (Ollero et al., 2001). Los leucocitos pueden generar hasta 100 veces más ROS que los espermatozoides. Los leucocitos utilizan los ROS como mecanismo de defensa contra agentes infecciosos, sin embargo, su presencia en el semen también puede ser resultado de factores ambientales, de largos periodos de abstinencia y de la presencia de varicocele (Agarwal et al., 2009). Los espermatozoides tienen poca capacidad antioxidante, debido a que han perdido gran parte del citoplasma y tienen pocas enzimas antioxidantes. Además, el escaso citoplasma que tienen se localiza mayoritariamente en la pieza media y no puede proteger la membrana plasmática de la cabeza y cola espermática. Así pues, la única protección real de los espermatozoides frente a los ROS proviene de los antioxidantes extracelulares que se encuentran en las secreciones del tracto genital masculino.



Fig. 28.- Fuentes comunes de ROS



Fig 29.- Efectos deletéreos de los ROS

Mecanismos de acción de las ROS

Los radicales libre actúan sobre los espermatozoides provocando daño en la integridad del ADN mitocondrial y nuclear, así como la peroxidación de las membranas mitocondriales y plasmática.

El ADN mitocondrial es el más vulnerable al ataque de ROS y un marcador muy sensible al estrés oxidativo en la línea germinal. Como las mitocondrias paternas son eliminadas lentamente tras la fecundación, la integridad de su ADN no tendrá muchas consecuencias para el futuro embrión (Aitken et al., 2011).

La importancia del estrés oxidativo en el espermatozoide recae en el efecto que pueden tener los radicales libres a nivel nuclear, ya que pueden generar roturas a nivel de cadena simple o doble en el ADN así como la modificación (oxidación o alquilación) y la delección de bases. De hecho, algunos autores postulan que la fragmentación en el ADN que observaríamos sería un efecto directo del estrés oxidativo. En cuanto se produjera la oxidación de alguna base, la enzima OGG1 8 (Oxoguanina Glycosylasa 1) escindiría dicha base. La siguiente proteína APE 1 (Apurinic/Apyrimidic Endonucleasa 1) de la cascada de BER (Base Escision Repair) debería dejar el final extremo 3'-OH que ha sido creado por OGG 1 listo para la inserción de la nueva base, sin embargo, la APE 1 no existe en el espermatozoide. En consecuencia, la completa reparación de la base escindida sólo podrá suceder por parte del ovocito en caso de que se produzca la fecundación (Aitken et al., 2014).

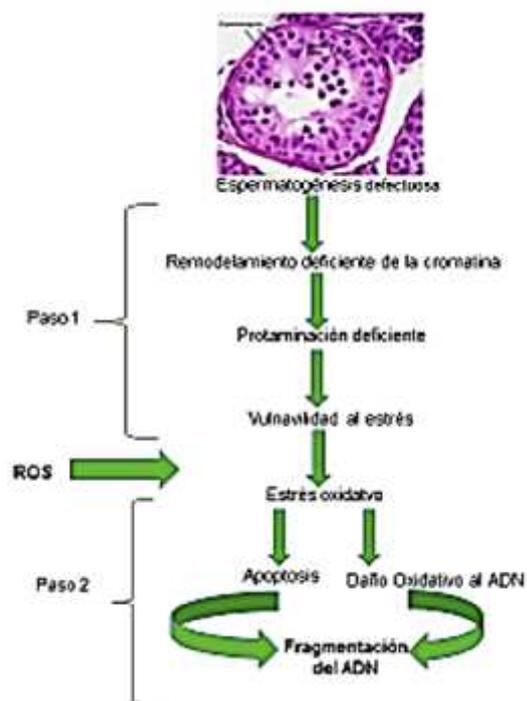
La peroxidación de la membrana plasmática, altera tanto la estructura como la función de sus lípidos y proteínas. Se sabe que los ROS hidroxilo e hidroperoxilo pueden reaccionar con los PUFA (PolyUnsaturated Fatty Acids) de los fosfolípidos y de otros componentes lipídicos de las membranas (Alvarez and Storey, 1995; Lamirande et al., 1995). Estos cambios dan lugar a una pérdida de la motilidad y afectan a eventos como la reacción acrosómica y la fusión del espermatozoide con el ovocito. En el caso de la peroxidación de la membrana mitocondrial se generarían aldehídos lipídicos como el 4HNE (4- Hydroxynonenal), que al unirse a proteínas de las cadenas de transporte de electrones de las mitocondrias estimularían la generación de ROS (Aitken et al., 2014).

7.1.4. Activación de Caspasas y Endonucleasas.

La activación de las caspasas y endonucleasas espermáticas por los radicales de oxígeno y otros factores fisicoquímicos también pueden inducir la fragmentación del ADN de los espermatozoides. Estudios previos indican que la exposición de los espermatozoides de ratón a 40 °C dan como resultado un aumento significativo en la fragmentación de ADN del esperma (Sailer et al., 1997) Recientemente, Banks y colaboradores (2005), han demostrado la inducción de la fragmentación de ADN exponiendo a 42°C testículo de ratón. Debido a que el aumento de la fragmentación del ADN espermático observado en estos ratones

se produjo dentro de 1 hora después de la exposición al calor los investigadores concluyeron que los daños observados deben haber ocurrido en el epidídimo y podría haber sido causada ya sea por ROS o la activación de las caspasas y endonucleasas espermáticas. Teniendo en cuenta que los núcleos de espermatozoides de ratón están empaquetados más homogéneamente la probabilidad de que el esperma humano sería susceptible al calor es mucho mayor, debido a los niveles más bajos de protaminas en los núcleos y más heterogeneidad en el empaquetamiento nuclear (Bianchial et., 1993).

Fig.30.- Hipótesis de daño sobre el ADN de la línea germinal masculina. Modificado de Aitken et al., (2009).



Las enzimas antioxidantes son una forma importante de defensa celular contra el daño causado por especies reactivas de oxígeno, se ha encontrado una relación inversa entre la actividad de la enzima superóxido dismutasa en el plasma seminal y la fragmentación del ADN del espermatozoide, una alta actividad de la enzima superóxido dismutasa relacionada con un bajo porcentaje de ADN fragmentado (Bojar et al., 2013).

7.1.5. Daño del ADN inducido por la radioterapia y quimioterapia.

La exposición a la quimioterapia y la radioterapia también pueden inducir la fragmentación del ADN de los espermatozoides. En general se cree que los tratamientos del cáncer afectan negativamente a la fertilidad masculina y que la reducción de la producción de espermatozoides surge de los efectos citotóxicos de la quimioterapia o la radioterapia sobre el epitelio espermatogénico (Morris, 2002).

Aunque el examen específico de ADN del espermatozoides ha sido limitado en pacientes con cáncer, un estudio reciente de O'Flaherty y colaboradores (2008), han encontrado que la integridad y la compactación del ADN de espermatozoides se ve afectada en pacientes con cáncer testicular y linfoma de Hodgkin antes de la quimioterapia.

7.1.6. Daño del ADN inducido por sustancias tóxicas ambientales.

Diversas publicaciones demuestran que la influencia de determinados factores ambientales podrían dar lugar al inicio del estrés oxidativo.

Un incremento del estrés oxidativo se ha relacionado con actividades laborales en incineradoras (Oh Mahfouz et al., 2005); el contacto con insecticidas (Bian et al., 2004), exposición a estireno (Migliore et al., 2002), exposición a altas temperaturas (Banks et al., 2005), tratamientos con agentes quimioterápicos para curar pacientes cancerosos (Hales et al., 2005), exposición a radiaciones electromagnéticas (Aitken et al., 2005) y abuso del tabaco (Fraga et al., 1996; Zenzes et al., 2000).

Así pues, el estrés oxidativo se puede iniciar por gran variedad de factores con graves consecuencias en el ADN si no se repara correctamente.

II OBJETIVOS

OBJETIVOS

En el año 2002, Fernández y colaboradores publicaron el primer trabajo experimental en el que se describían los niveles de actividad aminopeptidásica en diversas fracciones de semen humano normozoospermico. Los altos valores de actividad observados en las diferentes fracciones espermáticas estudiadas, sugirieron que tanto las peptidasas como sus sustratos naturales podrían estar implicados en la fisiología seminal, a través de la regulación de péptidos fisiológicamente activos tanto en testículos como en el propio espermatozoide.

Posteriormente, se fueron publicando varios trabajos en los que se describieron por un lado la regulación de la motilidad espermática mediada por diversas peptidasas implicadas en la regulación del metabolismo opioide (APN y NEP) mediante un mecanismo que implicaba a dicho sistema (Irazusta et al., 2004), y por otro el propio papel de dicho sistema (opioides-peptidasas) y de sus receptores a través de un posible efecto directo sobre los espermatozoides (Agirregoitia et al., 2006), si bien el papel de los receptores opioides mu, delta y kappa en la regulación de la espermatogénesis del ratón ha sido demostrado más recientemente (Estomba et al., 2016), pareciendo estos receptores estar implicados en la regulación de la meiosis masculina modificando la expresión génica de las proteínas del complejo sinaptonémico. También se ha descrito que las peptidasas degradadoras de encefalinas, presentes en el líquido seminal, tienen un papel clave en la movilidad espermática (Subirán et al., 2011). En el año 2016 (Marta Gianzo) describió por vez primera receptores del sistema renina angiotensina a nivel espermático, correlacionándolos también con la fertilidad masculina.

También recientemente, Ramón en el 2011 (Tesis Doctoral) describió los niveles de actividad aminopeptidásica en muestras seminales de pacientes astenozoospermicos, demostrando que su capacidad fertilizante en relación con el metabolismo peptídico se mantenía al menos durante las tres primeras horas postcapacitación.

En base a estos resultados previos, los objetivos de la presente Tesis Doctoral se pueden desglosar en los siguientes apartados (en todos los casos, serían resultados presentados por vez primera en este tipo de muestra seminal):

1) Describir y comparar distintos niveles de actividad proteolítica general en espermatozoide humano normal y con problemas de fragmentación espermática.

2) Describir y comparar el metabolismo opioidérgico general en espermatozoide humano normal y fragmentado. Se describirían los niveles comparativos de peptidasas y receptores.

3) Describir y comparar el metabolismo del sistema renina angiotensina en espermatozoide humano normal y fragmentado. Se describirían los niveles comparativos de peptidasas y receptores.

4) Demostrar si algunos de los resultados encontrados podrían servir como marcador de niveles de fragmentación en espermatozoide humano.

III MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Consentimientos y autorizaciones

Dadas las implicaciones éticas y relativas a los derechos de los pacientes de la presente investigación clínica, este proyecto ha sido presentado para su valoración al “Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC)” del Servicio Vasco de Salud / Osakidetza.

Las muestras utilizadas en esta investigación provinieron del Biobanco, que correspondían a pacientes que fueron seleccionados y diagnosticados (criterios OMS 2010) en los Laboratorio de Reproducción Asistida del Hospital de Cruces (Bizkaia). En este Centro también se realizó el seguimiento de la capacidad fertilizadora de las muestras.

Así mismo, todas las muestras se obtuvieron de pacientes voluntarios, a los que se presentó un formulario de consentimiento informado así como una hoja informativa sobre el estudio que iba a llevarse a cabo. Estos modelos los presentamos a continuación.

1. Comité ética Universidad
2. Comité ética Cruces
3. Carta Dra. Ramón
4. Consentimiento Dr. Matorras
5. Biobanco
6. Hoja informativa
7. Autorización



NAZIOARTETKO
E KANTASUN
CAMPUSA
CAMPUS DE
EXCELENCIA
INTERNACIONAL

IKERKETA SAILEKO ERREKTOREORDEZTA
VICERECTORADO DE INVESTIGACION

**GIZAKIEKIN ETA HAUEN LAGIN ETA DATUEKIN EGINDAKO IKERKETETARAKO UPV/EHUKO ETIKA
BATZORDEAREN TXOSTENA**

M^a Jesús Marcos Muñoz andreak, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitateko (UPV/EHU) GIEBeko idazkari gisa,

HAU ZIURTATZEN DU:

Gizakiekin egindako Ikerketarako Etika Batzorde honek (GIEB) 2008ko ekainaren 3ko EHAAn ezarritako baldintzak betetzen ditu, eta ikertzaile honen proposamena aztertu du: **Luis Casis Sáenz, GIEB/272/2014/CASIS SÁENZ**, ikerketa proiektu hau egiteko: *"Fragmentación del ADN espermático y su relación con el metabolismo peptídico"*.

Kontuan hartu dira honako alderdi hauek:

Ikerketa behar bezala justifikatuta dago helburu eta xedeei dagokienez; osasunari eta jakintzari onura ekarriko diete, eta, beraz, subjektuentzat aurreikus daitezkeen arrisku eta eragozpenak justifikatuta daude espero diren emaitzak lortzeko.

Ikerketak hipotesi argi bat proposatzen du, onartutako printzipio eta metodo zientifikoetan oinarritua, datu fidagarri eta baliagarriak ekarriko dituzten teknika estatistiko egokiak barne hartuta.

Ikertzaile taldearen gaitasuna eta erabilgarri dituzten baliabideak aproposak dira proiektua gauzatzeko.

Ikerketak beharrezko baldintzak betetzen ditu Osasun Berrikuntzarako eta Ikerketarako Euskal Fundazioaren (OEHUN Ikerketarako Euskal Biobankuko arduradun gisa) eta Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatearen artean hitzarmen espezifiko bat egiteko.

GIEBak, osakerari zoin Lan Prozedura Arautuari dagokienez, UPV/EHUren 2014ko otsailaren 17ko Ebazpena eta Jardunbide Egokien Arauak betetzen ditu.

GIEBak, 2014ko uztailaren 8an, **ALDEKO TXOSTENA** egin zuen (55/2014 aktan jasoa), Euskadiko Ikerketa Klinikoko Batzorde Etikoak (CEIC-E) egin behar duen "Laginak lagatzearen aldeko txostenarekin" baldintzatuta.

- Luis Casis Sáenz
- Olga Ramón Martínez
- Jon Irazusta Astiazarán
- M^a Begoña Sanz Echevarria
- Itxaro Pérez Urzelai
-

Hau sinatzen dut, Leioan, 2014ko uztailaren 15ean

Sin.: M^a Jesús Marcos Muñoz
UPV/EHUKO GIEBeko idazkaria



* Fichero de UPV/EHUren ikerketarako etika batzordearen proiektu bakoaren inguruko azterketa eta erregistroa

INFORME DEL COMITÉ DE ÉTICA PARA LAS INVESTIGACIONES CON SERES HUMANOS, SUS MUESTRAS Y SUS DATOS (CEISH) DE LA UPV/EHU

M^a Jesús Marcos Muñoz como Secretaria del CEISH de la Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU)

CERTIFICA

Que este Comité de Ética para la Investigación con Seres Humanos (CEISH), que reúne los requisitos establecidos en el BOPV de 17 de febrero de 2014^{*}, ha evaluado la propuesta del Investigador: **D. Luis Casis Sáenz**, CEISH/272/2014/CASIS SÁENZ, para la realización del proyecto de investigación: *"Fragmentación del ADN espermático y su relación con el metabolismo peptídico"*.

Considerando que,

La investigación presenta una justificación adecuada en cuanto a sus objetivos y fines, que proporcionarán un beneficio para la salud y el conocimiento; y por tanto, los riesgos y molestias previsibles para los sujetos están justificados para conseguir los resultados esperados.

La investigación propone una hipótesis clara, basada en principios y métodos científicos aceptados, incluyendo técnicas estadísticas adecuadas, que producirán datos fiables y válidos.

La capacidad del equipo investigador y los recursos disponibles en la UPV/EHU son los adecuados para realizar el proyecto.

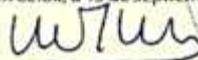
La investigación cumple los requisitos necesarios para el establecimiento de un Convenio Específico entre la Fundación Vasca de Innovación e Investigación Sanitarias (como responsable del Biobanco Vasco para la Investigación (OEHUN)) y la Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea.

El CEISH, tanto en su composición, como en su Procedimiento Normalizado de Trabajo, cumple con la Resolución de la UPV/EHU de 17 de febrero de 2014 y con las Normas de Buenas Prácticas.

Ha emitido **INFORME FAVORABLE** en la sesión del CEISH celebrada el 8 de julio de 2014 (recogido en su acta 55/2014), condicionado al *Informe Favorable a la Cesión de Muestras* que ha de emitir el Comité Ético de Investigación Clínica de Euskadi (CEIC-E).

- Luis Casis Sáenz
- Olga Ramón Martínez
- Jon Irazusta Astiazarán
- M^a Begoña Sanz Echevarria
- Itxaro Pérez Urzelai

Lo que firmo en Leioa, a 15 de septiembre de 2014



Fdo: M^a Jesús Marcos Muñoz
Secretaria del CEISH de la UPV/EHU



* Aprobado el con la sesión el Reglamento por el que se regulan las Ogracias a Ética en la Investigación y los protocolos de donación de la UPV/EHU

COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

ASISTENTES

PRESIDENTE (en funciones)

D. Luis Villoldo Ortega

VOCALES

D. Adolfo González Calles
D. Francisco Javier Santamaría Sandi
D^a. Marta Álvarez Rincón
D. Manuel Zaballa Itiguez
D. Mikel Latorre Guisasola

SECRETARIA

D^a. Amaya Martínez Galarza

ACTA 11/14

En Cruces-Barakaldo, el día 25 de Noviembre de 2014, a las 15 horas 30 minutos, se reúnen los miembros del Comité señalados al margen. Excusan su asistencia D. Francisco Javier González Mielgo, D. Alberto Alonso Ruiz, D. José Ignacio Pijoán Zubizarreta, D^a. Rita Sainz de Rozas Aparicio y D^a María Extremiana Eguía. Se trataron los siguientes temas:

II-LECTURA DE DOCUMENTACIÓN RECIBIDA

- a) Carta del Dr. Luis Casis Sáenz/UPV/EHU investigador principal del estudio "Fragmentación del ADN espermático y su relación con el metabolismo peptídico" (Dra. Ramón Martínez) (S^a URH/Ginecología) (código CEIC EI4/42) en la que da respuesta a las consideraciones del Comité según Acta 8/14 y adjunta Protocolo versión 2 de fecha 21 de Noviembre de 2014, Hoja de Información al paciente y Consentimiento Informado versión de fecha 25 de Noviembre de 2014. Una vez revisada la documentación, este CEIC decide dar su **APROBACIÓN ÉTICA** al estudio aunque queda a la espera de recibir respuesta a la siguiente consideración:

- Falta de recibirse, por parte de la investigadora clínica del estudio, la justificación sobre la pertinencia del uso de las muestras biológicas de manera codificada

Asimismo, se recuerda a los investigadores que deben informar al CEIC del desarrollo e incidencias del estudio durante su realización, así como de la finalización del mismo, con la presentación del Informe Final. Se informa a los investigadores.

Sin más temas por tratar, se da por finalizada la reunión a las 16 horas 45 minutos del día señalado al principio.


LA SECRETARIA

 **Osakidetza**

GURUTZETAKO UNIBERTSITATE OSPITALEA
HOSPITAL UNIVERSITARIO CRUCES
IKERKUNTZA KLINIKORAKO BATZORDE ETIKOA
COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

bio

eusko fundazioa

Fundación Vasca de Innovación
e Investigación Sanitarias

Dra. Olga Ramón del Hospital Universitario Cruces

Hace constar:

Que conoce y acepta la participación en el proyecto de investigación "Fragmentación del ADN espermático y su relación con el metabolismo peptídico" cuyo investigador principal es el Dr. Luis Casis de la UPV/EHU.

Que se compromete a que cada sujeto sea tratado y controlado siguiendo lo establecido en el protocolo autorizado por el Comité ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario Cruces.

Que respetará las normas éticas aplicable a este tipo de estudio

En Cruces, a 03 de septiembre de 2014

Firmado:



Dra. Olga Ramón



GURUTZETAKO UNIBERTSITATE OSPITALEA
HOSPITAL UNIVERSITARIO CRUCES

Cruces 15 de octubre de 2014

Tengo conocimiento de la realización del estudio "Fragmentación del ADN espermático y su relación con el metabolismo peptídico" en la URH (Unidad de Reproducción Humana) del Hospital Universitario de Cruces- Barakaldo en colaboración con el Dpto. de Fisiología de la EHU (Universidad del País Vasco) sobre las muestras seminales sobrantes en los procesamientos de muestras de IAC. Dicho trabajo no interfiere con ninguno de los estudios que se están realizando actualmente.

Dr. D. Roberto Matorras Weining

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'R. Matorras Weining'.



Plaza de Cruces, s/n - 48903 BARAKALDO (Bizkaia)
Tel. 94 600 6000



Scanned by CamScanner

CONSENTIMIENTO PARA LA DONACIÓN DE MUESTRAS AL
BIOBANCO VASCO PARA LA INVESTIGACIÓN DE BIOEF

Responsable clínico: Dr.

Yo _____ Afirmo haber obtenido información adecuada sobre la posibilidad de transferir y almacenar la muestra biológica junto con la información clínica relacionada al Biobanco Vasco para la Investigación de la Fundación BIOEF. Además, he obtenido información adecuada sobre la finalidad del proceso y conservación, así como sobre la seguridad y garantía de cumplimiento de la legalidad vigente y de la posibilidad de ceder a terceros las muestras para futuros proyectos de investigación que cumplan con las exigencias éticas y legales aplicables.

Se me ha informado de que el centro sanitario Hospital de Cruces/ Baracaldo puede transferir mis muestras y los datos de salud relevantes (excepto los que me identifiquen) de las enfermedades de Fertilidad al Biobanco Vasco para la Investigación.

Yo SÍ quiero donar la muestra

Yo NO quiero donar la muestra

Se me ha informado que puedo donar mi muestra y los datos clínicos sobre mi salud asociados de forma:

Que mi muestra SÍ pueda ser relacionada con mis datos identificativos

Que mi muestra NO pueda ser relacionada con mis datos identificativos

Se me ha advertido sobre la posibilidad de recibir información derivada de futuros análisis genéticos que pudieran realizarse sobre mi muestra biológica (solo si la muestra SÍ puede ser relacionada con mis datos de identificación personal).

Yo SÍ solicito información

Yo NO solicito información

Fecha Firma del paciente

Fecha..... Firma representante legal/familiar.....

Nombre representante legal

Grado de parentesco

Nombre del clínico responsable Fecha

Firma

HOJA INFORMATIVA

Se le invita a participar en un estudio de investigación titulado *"Fragmentación del ADN espermático y su relación con proteínas de membrana"*, bajo la dirección de M^a Victoria Aparicio, bióloga de la Unidad de Reproducción Asistida del Hospital Universitario de Cruces, la Dra. Olga Ramón, médico adjunto a la Unidad de Reproducción asistida del Hospital Universitario de Cruces y el Dr. Luis Casis, Catedrático de Fisiología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad del País Vasco/EHU.

El propósito de la presente hoja informativa es explicarle en que consiste este estudio para que Vd. decida o no participar en él. El médico le explicará cualquier cosa que no haya quedado clara y responderá a las preguntas que Vd. desee formularle. Si quiere tener más información o quiere matizar o profundizar en algún punto, pregunte sin ningún reparo.

Información general:

La estructura de la membrana de los espermatozoides juega un papel crucial en la fertilización exitosa, ya que tanto la reacción acrosómica como la fusión espermatozoide-ovocito son eventos asociados a la membrana. En este estudio determinaremos la posible pérdida de capacidad fertilizante de los espermatozoides, relacionando las proteínas de membrana con el índice de fragmentación del ADN espermático, determinando cómo afectan estos parámetros en la tasa de éxito en reproducción.

La fragmentación del DNA espermático, tal y como indica su nombre, se refiere a roturas o lesiones en el material genético del espermatozoide. Aproximadamente la mitad de los casos de infertilidad en los que se ven afectadas las parejas son de origen masculino. El análisis del semen en el que se miden volumen, concentración, movilidad y normalidad morfológica de los espermatozoides, y que continúa siendo la prueba clínica más importante para predecir infertilidad, no revela defectos en el espermatozoide que afecten la integridad del genoma masculino. Los pacientes pueden tener espermigramas normales y seguir siendo infértiles, pues el origen de la infertilidad puede ser por la presencia de un ADN del espermatozoide anómalo, factor que no se mide de forma sistemática. La integridad del ADN en el espermatozoide se puede considerar como un parámetro independiente e indicativo de su calidad.

En este sentido, se ha observado que espermatozoides con el DNA fragmentado pueden fecundar un ovocito, pero el desarrollo del futuro embrión puede verse comprometido.

Este daño del ADN de los espermatozoides puede ser la explicación de un elevado porcentaje de los casos de infertilidad idiopáticos. Estudios realizados indican que los espermatozoides con ADN defectuoso pueden tener una morfología, motilidad y capacidad de fecundación normales, pero no dar embarazos viables. La valoración de la integridad del ADN se trataría de un nuevo parámetro de fertilidad, independiente de los demás, a añadir a las pruebas que constituyen el espermograma habitual (O.M.S.,2010).



En algunos casos el ovocito puede reparar el daño del DNA del espermatozoide que lo ha fecundado. Esto va a depender de varios factores:

- El tipo de lesión del DNA.
- El porcentaje de DNA del espermatozoide afectado.

-La calidad del ovocito, ya que de ello va a depender si se puede reparar o no el daño de DNA en el espermatozoide. Esto va a depender sobre todo de la calidad citoplasmática y genómica del ovocito y del grado de daño en las cadenas de ADN del espermatozoide que haya fecundado al ovocito, este parámetro está generalmente ligado

a la edad de la paciente, y dado que la capacidad del ovocito de reparar este tipo de daño disminuye con la edad y que, al mismo tiempo, el nivel de fragmentación de ADN en los espermatozoides aumenta, ello podría explicar, al menos en parte, la disminución significativa en la tasa de embarazo que se observa en parejas de edad avanzada. Podría explicar el paro en el desarrollo embrionario que se produce tras la implantación de embriones con un cariotipo normal. Los niveles de fragmentación del DNA pueden diferir de una muestra a otra obtenida una o varias semanas después.

Procedimientos:

Si Vd. presta su consentimiento, los espermatozoides **sobrantes** de la muestra de semen serán objeto de una serie de análisis suplementarios (estudio de los niveles enzimáticos, tanto en plasma seminal como en espermatozoide, y porcentaje de fragmentación del ADN espermático).

Los espermatozoides que serán objeto del análisis específico, de no ser utilizados por este proyecto de investigación, serán automáticamente desechados. **Su empleo por lo tanto, en ningún caso supone una disminución en las posibilidades de éxito de la fertilización**, y podrían tener en el futuro importantes aplicaciones clínicas.

Las mencionadas muestras seminales en ningún caso serán objeto de otros análisis/destinos diferentes del mencionado.

Confidencialidad:

Se garantiza la absoluta confidencialidad tanto de su historial clínico como de cualquier otro documento médico. El anonimato más absoluto será mantenido cuando se publiquen los resultados del estudio. El manejo y análisis de los datos se realizará teniendo en cuenta en todo momento la Ley orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal, evitando incluso tener que emplear sus iniciales y/o número de identificación en el estudio.

Participación voluntaria:

La participación en este estudio es totalmente voluntaria. Vd. puede negarse a participar en el estudio o retirarse del mismo en cualquier momento sin que ello suponga perjuicio alguno y sin afectar al tratamiento médico que Vd. reciba en el futuro.



FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

"ESTUDIO DE LA FRAGMENTACION DEL ADN ESPERMATICO Y SU RELACION CON PROTEINAS DE MEMBRANA"

Nombre ♀:.....

Nombre ♂:

(nombre y apellidos del participante)

- *He leído la hoja informativa que se me ha entregado
- *He recibido suficiente información sobre el estudio
- *He podido hacer preguntas sobre el estudio

He sido informado por la bióloga M. Victoria Aparicio.

Comprendo que mi participación es voluntaria y presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

Fecha.....

Fecha.....

Firma del paciente

Firma del biólogo

CONFIDENCIAL

2. Aspectos clínicos

2.1. Inclusión

Las muestras utilizadas en esta investigación provinieron del Biobanco, que correspondían a pacientes que fueron seleccionados y diagnosticados (criterios OMS 2010) en los Laboratorio de Reproducción Asistida del Hospital de Cruces (Bizkaia). En este Centro también se realizó el seguimiento de la capacidad fertilizadora de las muestras.

Así mismo, todas las muestras se obtuvieron de pacientes voluntarios que acudían a la Unidad de Reproducción Asistida del Hospital de Cruces para realizar la primera inseminación intrauterina, a los que se presentó un formulario de consentimiento informado, así como una hoja informativa sobre el estudio que iba a llevarse a cabo. Estos modelos están presentados en el apartado anterior.

2.2. Estimulación ovárica

Todas las pacientes fueron estimuladas según nuestro protocolo habitual. Iniciamos la estimulación de ovulación con 100-150 UI/día de FSH recombinante (Gonal F[®], Laboratorios Merck-Serono, España), desde el 2^o día del ciclo menstrual, ajustando la dosis según la respuesta folicular evaluada mediante foliculometría transvaginal y estradiol plasmático. Administrando 0.25 mg./día de cetorelix (Cetrotide[®] Laboratorios Merck-Serono, España) con diámetros foliculares de 16 mm., manteniéndolo hasta el día de la administración de la rec-HCG, suplementando la estimulación FSH con LH recombinante (Luveris[®], Laboratorios Merck-Serono, España) 75 UI/día desde el inicio del cetorelix (acetato), hasta el día de la rec-HCG.

Administramos 250 µg. de rec-HCG (Ovitrelle, Laboratorios Merck-Serono, España) cuando observamos al menos 3 folículos de 18 mm., con un nivel de estradiol > de 600 pg./ml. Suspendemos el ciclo en presencia de < 3 o > 5 folículos. Realizamos una única inseminación por ciclo a las 37-39 horas post HCG efectuando 6 ciclos de inseminación por paciente, si no se consigue previamente el embarazo.

2.3. Recogida de las muestras

Las muestras de semen fueron recogidas, excepto en casos especiales, por masturbación, tras un período de abstinencia sexual no inferior a 2 días, ni superior a 7, en un frasco estéril, teniendo un especial cuidado en que no se derrame parte de la misma.

Las muestras fueron obtenidas en el domicilio o en la Unidad de Reproducción cuando la distancia geográfica sea excesiva y condicione un intervalo de tiempo superior a una hora desde la obtención hasta la entrega. Antes del procesamiento la muestra se mantiene entre 20°C y 37°C hasta su total licuefacción y no debe pasar más de media hora desde su obtención hasta su procesamiento.

2.4. Preparación de las muestras seminales para uso clínico

Las muestras seminales son, en su caso, procesadas mediante la capacitación espermática. Esta técnica consiste en seleccionar los espermatozoides con mejor motilidad, a la vez que eliminamos el plasma seminal y los detritus. El número total de muestras fue de 17 para la determinación de actividades enzimáticas, y de nueve para citometría de flujo e inmunocitoquímica.

2.4.1. Evaluación de la muestra

La evaluación de la muestra se realiza, colocando una gota de 10 µl. de la misma bien homogeneizada y licuada en una cámara Makler calentada a 37°C. Valoraremos la concentración, los diferentes grados de motilidad y la morfología en un microscopio de contraste de fases con placa calefactada.

Fig. 31.- Cámara Makler



2.4.2. Preparación de la muestra

Como técnica de capacitación espermática se ha empleado los gradientes de densidad, siendo esta la técnica que empleamos habitualmente en nuestro programa de Inseminaciones Intrauterinas. Nos permite una mejor recuperación de espermatozoides móviles, sobre todo en las muestras con baja concentración espermática o de movilidad.

El medio que empleamos para la preparación de los gradientes es Supra Sperm 100% (MediCult), y los gradientes de densidad fueron 90% y 45%.

Una vez licuada la muestra seminal depositamos 1cc de medio de gradiente al 90% en un tubo estéril, de fondo cónico y tapón de rosca. A continuación, y resbalando por las paredes del tubo, añadimos 1 cc de medio de gradiente al 45%, teniendo especial cuidado en que no se mezclen los diferentes gradientes, y se rompa la interfase entre ellos. Y, por último, depositamos el semen, haciéndolo deslizar suavemente por la pared del tubo. Centrifugamos a 300 g durante 20 minutos y a continuación recogemos el sedimento (que se encuentra en el gradiente de mayor densidad) y lo pasamos a otro tubo con 5 ml. de medio de cultivo (IVF MediCult Dinamarca) y centrifugamos a 300 g durante 10 minutos. Eliminamos el sobrenadante, y resuspendemos el pellet en un volumen de 0,4 ml. de medio de cultivo, siendo este el empleado para la inseminación de la paciente.

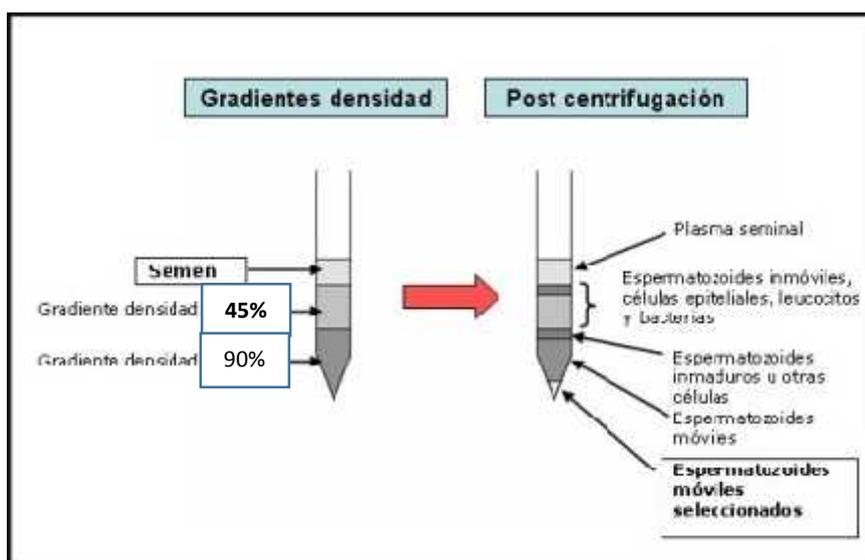


Fig.32.-Gradientes de densidad

Los volúmenes que utilizamos, tanto de los gradientes, como del semen, dependerán de la concentración y motilidad de la muestra de semen. Pueden variar desde 0,5 hasta 1,5ml. Evaluamos la muestra recuperada, y la mantenemos a 37°C en el incubador de CO₂, hasta el momento de la inseminación.

Todas las muestras procesadas fueron observadas visualmente mediante un microscopio de contraste de fase para verificar la ausencia de otros tipos celulares.

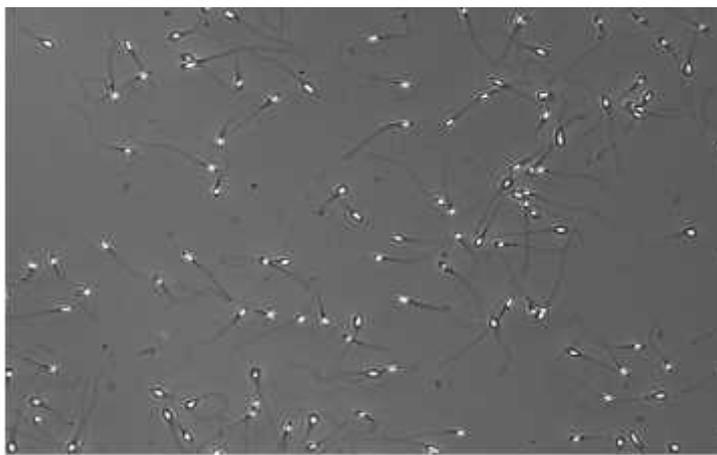


Fig. 33.-Imagen de contraste de fase de la pureza de la población espermática tras centrifugación en gradiente de densidad.

2.4.3. Análisis de la movilidad espermática

La medición de la movilidad espermática se realizó mediante un análisis computerizado de la movilidad seminal utilizando el software del SCA[®] (Sperm Class Analyzer, V5.1), configurado con los parámetros de la tabla 4 y asociado a un microscopio de contraste de fase. La concentración y la movilidad espermática se determinaron añadiendo alícuotas de 5 µl de las diferentes muestras en una cámara de recuento tipo Makler, precalentada a 37 °C, específica de espermatozoides. Se contaron un mínimo de 200 espermatozoides por cada gota analizada.

Tabla 4.- Configuración de los valores de análisis usados en el sistema CASA

Área de partícula analizada		2-60 μm
LVV	Velocidad mínima y máxima para que un espermatozoide sea considerado lento. Espermatozoides con valores inferiores al LVV mínimo serán considerados inmóviles	10>15 $\mu\text{m/s}$
MVV	Velocidad mínima y máxima para que un espermatozoide sea considerado medio. Espermatozoides con velocidades superiores al MVV máximo serán considerados rápidos	15>35 $\mu\text{m/s}$
Mínimo SRT	Valor de STR a partir del cual un espermatozoide es considerado progresivo	80%

Análisis computarizado de la movilidad seminal.

Imagen del microscopio de contraste de fase de la movilidad espermática medido a través del software Sperm Class Analyzer 2005[®]. Espermatozoides movilidad PR: trayectoria roja y trayectoria verde, espermatozoide movilidad NP: trayectoria azul, y espermatozoides IM: amarillos (Fig.34) (Tabla 5).

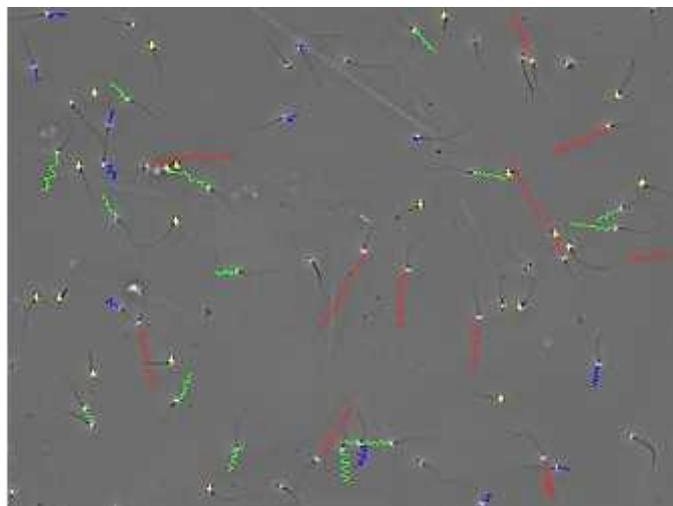
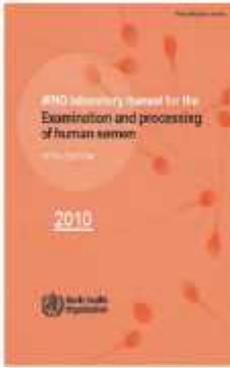


Fig. 34.- Análisis computarizado de la movilidad espermática.

Tabla 5.- Clasificación de los espermatozoides según los parámetros de la OMS 2010.

<p>En el manual de la OMS del 2010 se recomienda un sistema simple de clasificación de la motilidad que distingue a los espermatozoides con motilidad progresiva o no progresiva, según la siguiente clasificación:</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Motilidad progresiva (PR). Espermatozoides con movimiento activo ya sea linealmente o gran círculo, independientemente de la velocidad. ➤ Motilidad no progresiva (NP). Todos los otros patrones de motilidad espermática con ausencia de progresión (ligero movimiento de la cabeza o latido flagelar), o por ejemplo nadar en círculos pequeños. ➤ Inmóviles (IM): Ausencia de motilidad 	
---	---

La valoración de la movilidad de los espermatozoides se realizó según las recomendaciones de la OMS (OMS 2010), clasificando los espermatozoides en base a su velocidad (Tabla 4, 5). Además, en función de la velocidad, el sistema CASA (computer-assisted semen análisis) analizó los siguientes parámetros cinéticos de movilidad (Tabla 6).

Tabla 6.- Parámetros cinéticos de la movilidad espermática determinados por el sistema CASA.

Parámetros cinéticos de movilidad espermáticos		Unidad
VCL	Velocidad curvilínea. Distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de su trayectoria real en función del tiempo.	µm/s
VSL	Velocidad rectilínea. Distancia recorrida por el espermatozoide desde el primer punto y el último de su trayectoria en función del tiempo.	µm/s
VAP	Velocidad promedio. Distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de su trayectoria media en función del tiempo.	µm/s
LIN	Índice de linealidad. Linealidad de la trayectoria curvilínea. $VSL/VCL \times 100$.	%
STR	Índice de rectitud. Rectitud de la trayectoria. $VSL/VAP \times 100$.	%
WOB	Índice de oscilación. Oscilación de la trayectoria real con respecto a la trayectoria promedio. $VAP/VCL \times 100$.	%
ALH	Amplitud promedio del desplazamiento lateral de la cabeza. Es la magnitud del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide con respecto a su trayectoria promedio.	µm
BCF	Frecuencia de la batida de la cabeza. Frecuencia con la cual la trayectoria curvilínea atraviesa la lineal en función del tiempo.	Hz.

2.5. Inseminación Intrauterina

A las 38-40 h. de desencadenar la ovulación, depositamos la muestra espermática en el interior de la cavidad uterina, de forma cuidadosa para evitar traumatismos endometriales, mediante catéteres diseñados específicamente.

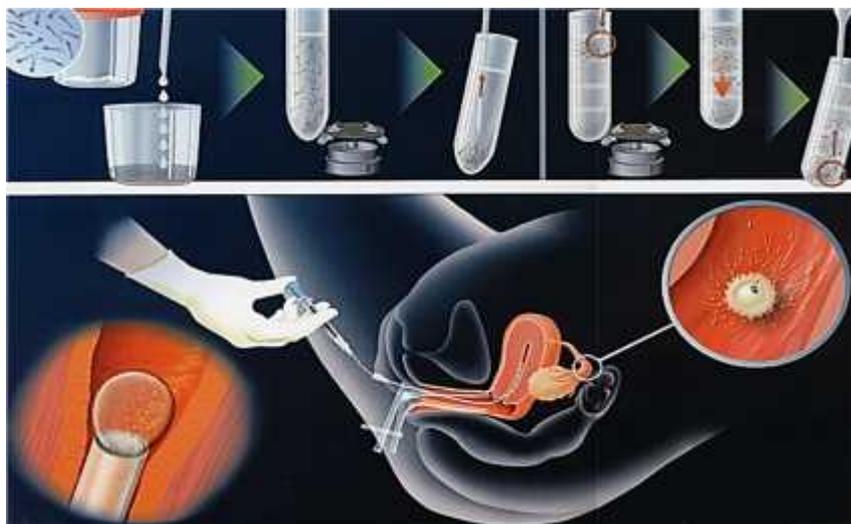


Fig. 35.- Preparación de la muestra e inseminación.

2.6. Fase lútea

La fase lútea es suplementada con Progesterona micronizada vaginal (Utrogestan®, Laboratorios Besins-Iscovesco, París, Francia) a dosis de 200 mg cada 12 Horas. (9-11), durante 15 días.

2.7. Definición de embarazo

El embarazo se definirá como la existencia de un saco gestacional visible por ecografía transvaginal a las 5-6 semanas.

2.8. Procesamiento de las muestras para el estudio

El estudio de fragmentación del ADN espermático se realizó en muestras en fresco. Mientras que para el estudio de las aminopeptidasas, así como para los receptores opioides como para el sistema SRA las muestras fueron congeladas y descongeladas según el siguiente protocolo.

2.8.1. Protocolo congelación

Se añade a volúmenes iguales 1/1 de muestra seminal y crioprotector (Sperm Freezing Medium, Origio, Spain) dejándolo deslizar suavemente y se homogeniza con mucho cuidado. Se mantiene durante 10 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se introduce en nevera a 4°C en baño de agua durante 60 minutos. Transcurrido este tiempo se vuelve a homogenizar y se coloca en una rueda en vapores de nitrógeno líquido durante 15 minutos para la congelación. El almacenamiento se realiza en nitrógeno líquido.

2.8.2. Protocolo descongelación

Se sacan los viales del nitrógeno líquido y se dejan 10 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se colocan a 37°C durante 10 minutos.

3. Fragmentación del ADN espermático

Test SCD.

Para la determinación de la fragmentación del ADN espermático se empleó el test SCD (Sperm Chromatin Dispersion) (Halosperm®; Halotech, Madrid, Spain), es un método indirecto de cuantificar el porcentaje de fragmentación del ADN. Este método se basa en la respuesta diferencial que ofrecen los núcleos de los espermatozoides cuando se someten a una desnaturalización ácida suave y a una posterior lisis de proteínas. Cuantificando los núcleos de cromatina dispersa y los núcleos condensados se puede estimar la fragmentación nuclear (Fernández et al., 2003 y 2005; Enciso et al., 2006). Es un método sencillo, rápido y eficaz.

El método se basa, en esencia, en generar desnaturalización controlada del ADN y, posteriormente, una desproteínización. El proceso global requiere tres pasos críticos: a) integración de la muestra en un material inerte de agarosa, microgel, sobre un portaobjetos; b) desnaturalización ácida del ADN en los núcleos de espermatozoides con ADN fragmentado, y c) tratamiento con una solución de lisis para eliminar proteínas nucleares. Con ello, y tras la tinción de rigor para microscopia de campo claro o para fluorescencia, se generan unos halos de dispersión de la cromatina que se correlacionan con el grado de fragmentación.

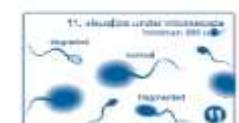
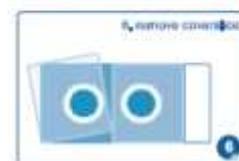
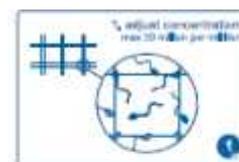
El test SCD produce una descondensación diferencial de la cromatina entre aquellos espermatozoides que presentan su ADN fragmentado con respecto a aquellos que lo mantienen intacto. Para ello se actúa directamente con un tratamiento de desproteización y de esta forma se facilita la relajación de la cromatina. En el caso de las muestras de esperma humano, los diferentes protocolos ensayados muestran que, tras un tratamiento ácido previo a una posterior desproteización, los espermatozoides que presentan el ADN fragmentado no liberan bucles de ADN y no generan un halo de dispersión de la cromatina o si lo hacen este es de muy pequeño tamaño. Por el contrario, los espermatozoides sin fragmentación de su ADN generan halos amplios de dispersión de los bucles de cromatina, que se diferencian morfológicamente de los anteriores (Fernández et al., 2003). En caso de que la técnica se aplique de igual forma en otras especies animales, los resultados obtenidos son similares, pero la discriminación entre las células que presentan ADN fragmentado de las que no lo presentan, no resulta tan sencilla como en el caso de humanos.

MATERIAL

- Baño 95-100°C
- Baño 37°C
- Nevera 4°C
- Micropipetas
- Placa de Petri
- Cubre objetos 40X40
- Agua destilada
- Etanol 70%
- Etanol 100%
- Microscópio de contraste de fases

PASOS DEL PROCESO

1. Diluir la muestra a una concentración de 20×10^6 millones de espermatozoides/ ml.
2. Incubar un tubo eppendorf (EPT), en un baño de agua entre $95-100^\circ\text{C}$ durante 5 minutos hasta que se haya licuado la agarosa, y mantener a 37°C durante 5 minutos hasta que la temperatura esté equilibrada.
3. Alicuotar $50\mu\text{l}$ de la dilución de la muestra de semen en $100\mu\text{l}$ de agarosa y homogeneizar. Poner $8\mu\text{l}$ de la suspensión celular en el centro en cada uno de las dianas del portaobjetos y colocar un cubreobjetos presionando para que se distribuya homogéneamente, todo el proceso debe realizarse con el portaobjetos en posición horizontal.
4. Colocar el portaobjetos sobre una placa de vidrio fría e incubar durante 5 minutos a 4°C .
5. Deslizar los cubreobjetos suavemente para retirarlos y continuar el resto del proceso a 22°C .
6. Dispensar el agente desnaturalizante (solución 1) sobre el portaobjetos e incubar a 22°C durante 7 minutos siempre en posición horizontal en posición elevada.
7. Dispensar la solución de lisis (solución 2) e incubar durante 20 minutos.
8. Lavar con abundante agua destilada durante 5 minutos. Retirar el agua con sumo cuidado y seguir trabajando en posición horizontal sobre superficie elevada. Proceder a la deshidratación con etanol al 70% e incubar durante 2 minutos, eliminar y añadir etano al 100% durante 2 minutos, después de eliminarlo dejar secar la muestra.
9. Aplicar las soluciones 3 y 4 durante 7 minutos cada una para la tinción y lavar con agua destilada.



10. Proceder a la lectura en un microscopio de contraste de fases a 40X. un mínimo de 200 espermatozoides.

11. Aplicar la fórmula.

$$\text{SDF (\%)} = \frac{\text{Fragmented + degraded}}{\text{Total cells}} \times 100$$

Se realizó una lectura de al menos 200 espermatozoides, y según el porcentaje de fragmentación las muestras se han clasificado como:

- No fragmentas cuando el porcentaje era < 20%
- Fragmentadas cuando el porcentaje era 20 %

4. Columnas de Anexina

Material

- Vial de MACS ART Annexin V Reagent
- Vial de MACS ART Binding Buffer
- Una MACS ART MS Column
- Una MACS ART Separation Unit
- MACS Multi Stand
- Pipeta y puntas esteriles
- Tubos de ensayo esterilizados y gradilla
- Centrífuga para tubos de ensayo.

Separación magnética de células apoptóticas

Fundamento

Aquellos espermatozoides en proceso de apoptosis presentan en su membrana plasmática un fosfolípido llamado fosfatidilserina.



Fig. 36.- En la representación esquemática la fosfatidilserina se presenta como triángulos amarillos.

La fosfatidilserina tiene afinidad por la anexina V. La Anexinas V está adherida a microesferas de metal (~50 nm en diámetro) recubiertas de un polímero biodegradable y si se las incuba con la muestra afectada, se formará el siguiente complejo. (Said et al., 2005, 2006a y b 2008).

Si a esta muestra se la hace interaccionar por segundos con un magneto de alto poder, los espermatozoides afectados quedarán adheridos a las paredes de la columna y los no afectados fluirán para luego ser recuperados y utilizados durante una técnica de reproducción. Este procedimiento de separación o filtrado molecular se denomina “Magnetic-Activated Cell Sorting- MACS”.

Método

El MACS ART Annexin V Reagent se une a la fosfatidilserina en la capa exterior de la membrana plasmática de las células apoptóticas. Antes de su separación, las células se marcan magnéticamente con el MACS ART Annexin V Reagent y después se hacen pasar a través de la MACS ART MS Column. Las células positivas a fosfatidilserina marcadas magnéticamente quedan retenidas en la columna, mientras que las no marcadas (por definición, las no apoptóticas) se recogen en el líquido de lavado. Mediante el MACS ART Annexin V System se separan eficientemente en la muestra de semen las células apoptóticas que se encuentran incluso en fases iniciales y tienen la membrana plasmática intacta.

5. Actividad enzimática

5.1. Actividad enzimática por espectrofluorometría

Equipamiento

- Espectrofotómetro. UV-2401 PC. Shimadzu
- Espectrofluorofotómetro. RF-540. Shimadzu
- Ultracentrifugadora. Centrikon T2190. Kontron
- Rotor de ángulo fijo. TFT 45.6. Kontron
- Centrifugadora. Labofuge 200. Heraeus
- Balanza de precisión. R180D. Sartorius.
- Homogenizador. PZR 50 Heidolph.
- Juego de puntas de teflón. Selecta.
- Agitador Magnético por mosca termostatizado. Agimatic-s. Selecta.
- pH- metro GLP 21. Crison
- Pipetas automáticas de precisión. Nychiryo.
- Dispensador universal. MuLtipette plus. Eppendorf
- Ultracongelador -70°C

Reactivos

- Acetato sódico tri-hidratado. Merck
- Ácido clorhídrico 35% Panreac
- Ácido acético glacial. Probus S.A
- Ácido ortofosfórico 85%. Merck
- Albúmina bovina. Sigma-Aldrich
- Captopril. Sigma-Aldrich
- Cloruro de manganeso. Merck

- Cloruro sódico. Merck
- Dimethyl-sulfóxido (DMSO). Sigma-Aldrich
- DL-Dithiothreitol (DTT). Sigma-Aldrich
- EDTA. Merck
- Etanol absoluto. Probus S.A
- Fosfato sódico monobásico. Merck
- Fosfato sódico dibásico. Merck
- Puromicina. Sigma-Aldrich
- Tris (hidroximetil) aminometazol (Trizma base). Sigma-Aldrich
- Azul brillante de Coomasie G-250. Sigma-Aldrich
- Z-Gly-Pro- -naftilamina. Fluka
- L- Arg- -naftilamida. Sigma-Aldrich
- L-Ala- -naftilamida. Sigma-Aldrich
- L-Asp-AP- -naftilamida. Sigma-Aldrich, H- Bachem
- N-Dansyl-D-Ala-Gly-pNO₂-Phe-Gly. Sigma-Aldrich
- H- Gly-Pro- -naftilamida. Bachem
- L- ácido piroglutámico- -naftilamida. Sigma-Aldrich

Soluciones:

- **Soluciones Tampón**

Tris-HCl 0,2 M

Trizma base 24,22 gr. + 1000 ml de agua destilada (pH 7,4 utilizando HCl

1N)

Tampón Fosfato 0,1 M.

Solución A 19 ml + Solución B 81ml + Agua destilada hasta 200 ml (pH 7.4)

- Solución A: Fosfato sódico monobásico 0,2M 27,6 gr.+ Agua destilada hasta 1000 ml

- Solución B: Fosfato sódico dibásico 0,2 M 28,4 gr.+ Agua destilada hasta 1000 ml

Tampón Acetato 0,1 M,

Solución A 36,8 ml+ Solución B 13,2 ml+ Agua destilada hasta 200 ml (pH 4.2)

Solución A: Ácido acético glacial 0,2 M 11,55 ml+ Agua destilada hasta 1000 ml

Solución B: Acetato sódico tri-hidratado+ Acetato sódico tri-hidratado 27,22 gr.

- + Agua destilada hasta 1000 ml

Tampón Tris- HCl 1M,

- Trizma base X gr.+ Agua destilada hasta 1000 ml (pH 7,4 utilizando HCl 1N)

Soluciones para la capacitación de las muestras

Universal IVF Médium (Origio Medicult Media)

Solución de albúmina humana (HAS) + Insulina humana recombinante + Penicilina (50.000 UI/l + Estrptomycin (50 mg/l)

SupraSperm® 100 (Origio Medicult Media)

Cloruro calcico + Glucosa + HEPES +Solucion de albumina humana + Agua Milli RX + Sulfato de Magnesio + Cloruro Potásico + Fosfato potásico monobásico + Bicarbonato Sódico + Cloruro Sódico + Lactato Sódico + Piruvato sódico

Sustratos enzimaticos

Sustrato prolil endopeptidasa

Z-Gly-Pro- -naftilamina 0,125 M + DTT 2 mM + BSA 10 mg/100 ml + Tampón fosfato 50 mM

Sustrato glutamil aminopeptidasa

Glu- -naftilamida 0,125 mM + DTT 2 mM + EDTA 2 mM + BSA 10 mg/100 ml + Tampón fosfato 50 mM

Sustrato aminopeptidasa básica

Arg- -naftilamida 0,125 mM + NaCl X mM + BSA 10 mg/100 ml + Tampón fosfato 50 mM

Sustrato aminopeptidasa neutra

Ala- -naftilamida 0,125 mM + DTT 2 mM + BSA 10 mg/100 ml + Tampón fosfato 50 mM

Sustrato aspartil-aminopeptidasa

Asp- -naftilamida 0,125 mM + MnCl₂ X mM + BSA 10 mg/100 ml + Tampón Tris-HCl 50 mM

Sustrato cys-aminopeptidasa

Cys- -naftilamida 0,125 mM + MnCl₂ X mM + BSA 10 mg/100 ml + Tampón Tris-HCl 50 mM

Sustrato aminopeptidasa sensible a puromicina

Ala- -naftilamida 0,125 mM + DTT 2 mM + BSA 10 mg/100 ml + Tampón fosfato 50 mM + 40 μM de Puromicina

Sustrato endopeptidasa neutra

N-Dansyl-D-Ala-Gly-pNO₂-Phe-Gly 0,125 mM + BSA 10 mg/100 ml + Tampón Tris-HCl 50 mM + 4,6 nM Captopril

Sustrato dipeptidil peptidasa IV

H- Gly-Pro- -naftilamida 0,125 mM + BSA 10 mg/100 ml + Tampón Tris-HCl 50 mM

Soluciones para la determinación de la concentración de proteínas

Reactivo de Bradford

Azul brillante Coomassie 0,117 mM, etanol al 5% (v/v), Acido ortofosfórico al 15 %.

Filtrar dos veces.

Soluciones para la RT-PCR

Tampón Tris/acetato/EDTA (TAE) T.A.E 50x, pH 7,4

Trizma-base 121 gr., Ácido acético 28,55 ml, EDTA (Na₂) 18.6 gr. H₂O hasta 500 ml

Gel de Agarosa

500 mg de Agarosa, 49 ml H₂O destilada, 1ml T.A.E

Otros

Albúmina

Etanol al 70%: Etanol 35 ml, H₂O libre de ARNasas 15 ml

Sample buffer

MgCl₂ 1M

Peróxido de hidrógeno

5.1.1. Análisis de la actividad por ensayos enzimáticos

Preparación de la muestra

Para la determinación de las actividades enzimáticas, el semen (completo fresco) se centrifugó a 100.000 g durante 35 minutos con el fin de separar la fracción seminal de los gametos espermáticos. Dicho plasma seminal (sobrenadante) fue utilizado para la medición de las diferentes actividades en esta fracción.

El sedimento resultante, que correspondería a la fracción espermática, fue resolubilizado y homogeneizado en tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7,4). Este material fue utilizado para la determinación de las actividades enzimáticas en los gametos.

Posteriormente se realizó la cuantificación de proteína con el método Bradford (Bradford et al., 1976).

Tras su adecuado procesamiento, las muestras se sometieron a los ensayos enzimáticos, todos basados en técnicas espectrofluorométricas, para la determinación de las actividades peptidásicas seleccionadas:

1.- Para ensayar las actividades APN, DPPIV, APA, APB, Asp, Glu-AP y PEP se usaron sustratos del tipo peptidil- o aminoacil-beta-naftilamida. Concretamente, los sustratos utilizados fueron Ala- -naftilamida; H-Gly-Pro- -naftilamida; H-Glu- -naftilamida o Asp-AP- -naftilamida; Arg- -naftilamida; Asp-AP- -naftilamida, Z-Gly-Pro- -naftilamina y ácido glutámico- -naftilamida. respectivamente.

2.- Para la determinación de la NEP se empleó un ensayo fluorométrico también, pero en este caso el sustrato fue el N-Dansyl-D-Ala-Gly-pNO₂-Phe-Gly(DAGNPG).

5.1.2. Determinación de la actividad de las aminopeptidasas

La concentración de un enzima en un tejido o líquido, puede determinarse midiendo la velocidad de una reacción catalizada por el enzima en cuestión. Para ello, puede medirse la disminución en la concentración de sustrato en el tiempo o el incremento que con el tiempo se produce en algunos de los productos de reacción.

Los sustratos artificiales más usados para la determinación de aminopeptidasas han sido, sin lugar a dudas, los derivados amídicos de la 2-naftilamina: las aminoacil-2-naftilamidas. Estos sustratos fueron introducidos por primera vez por Gomori (1954) y, desde entonces, se han obtenido derivados de todos los aminoácidos, de muchos dipéptidos e, incluso, de compuestos que han permitido la detección de diversas endopeptidasas.

En principio, la 2-naftilamina liberada por acción enzimática, se acoplaba a una diazosal para producir color rojo o azul (dependiendo de la sal de acoplamiento considerada) y se media espectrofotométricamente a 520 nm. Este método se ha aplicado también a la determinación histoquímica de aminopeptidasas (Gomori, 1954). Pero la 2-naftilamina liberada puede medirse

fluorimétricamente, sin necesidad del posterior acoplamiento, siendo este método desarrollado por Greenberg en 1962, posteriormente modificado por Alba y colaboradores en 1989 y, en algunos casos, por nuestro propio equipo de investigación (Fernández et al., 2002).

5.1.3. Fundamento general

Se incubaba el sustrato artificial junto con la muestra seminal correspondiente. La presencia de aminopeptidasas en la muestra hará que la aminoacil-2-naftilamida se rompa liberando aminoácidos libres y moléculas de 2-naftilamina (Figura 37). Esta molécula tiene la particularidad (que no tienen sus derivados amídicos) de ser fluorescente, y cuando es excitada con luz de 345 nm emite parte de esa energía a una longitud de onda de 412 nm. Esta propiedad permite que la cantidad de 2-naftilamina liberada pueda ser medida muy fácilmente mediante un espectrofluorímetro. La cantidad de 2-naftilamina liberada es controlada por la concentración del enzima en la muestra, de manera que la medida de 2-naftilamina puede ser extrapolada a concentración aminopeptidásica de la muestra (Figura 37).

En concreto, los valores obtenidos en el fluorímetro son transformados en picomoles de beta-naftilamina liberada, mediante una ecuación obtenida tras la determinación de concentraciones decrecientes de 2-naftilamina, en un medio de solución igual al del sustrato utilizado.

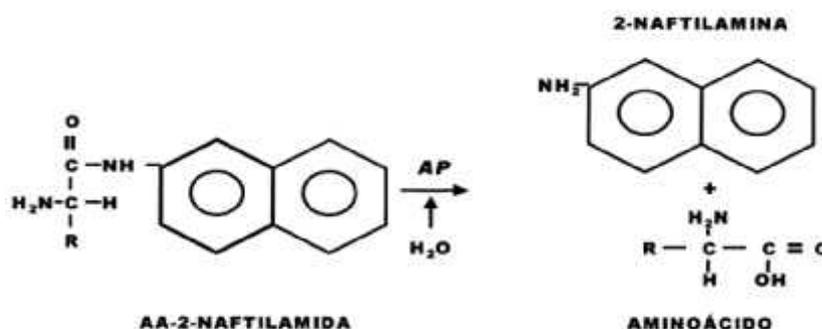


Fig. 37.- Esquema de la hidrólisis del sustrato de peptidasa en el ensayo enzimático. Uno de los productos obtenidos, -naftilamina, emite fluorescencia a 412nm cuando es excitado a 345nm.

5.1.4. Fundamento particular para cada enzima.

En particular, se determinaron las actividades enzimáticas del pool de peptidasas en las fracciones celulares de las muestras espermáticas. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado, empleándose como resultado final la media de las mismas.

Las muestras seminales (10 µl) se incubaron a la temperatura fisiológica (37°C) junto con 1 ml del sustrato artificial fluorogénico (Ala- -naftilamida; H-Gly-Pro- -naftilamida; H-Glu- -naftilamida o Asp-AP- -naftilamida; Arg- -naftilamida; Asp- -naftilamida, Z-Gly-Pro- -naftilamina y ácido glutámico- -naftilamida). La presencia de aminopeptidasas en la muestra hizo, como hemos comentado, que la aminoacil-beta-naftilamida se rompiera liberando aminoácidos libres y moléculas de beta-naftilamina.

Esta última molécula tiene la particularidad, que no tienen sus derivados amídicos, de ser fluorescente. Así cuando es excitada con una luz de 435 nm emite parte de esta energía en una longitud de onda de 412 nm. Dicha propiedad permite que la cantidad de beta-naftilamina liberada pueda ser medida muy fácilmente mediante un espectrofluorímetro. La cantidad de producto fluorescente liberado está en función de la concentración del enzima en la muestra, de manera que la cantidad de beta-naftilamina medida puede ser extrapolada a concentración aminopeptidásica en el tejido estudiado.

La NEP es una peptidasa unida a membrana que degrada encefalinas por ruptura del enlace Gly³-Phe⁴. Un método para determinar su actividad es el método fluorimétrico, basado en la utilización del sustrato artificial fluorogénico DAGNPG: N-Dansyl-D-Ala-Gly-(p-Nitro)-Phe-Gly.

En este caso, 10 µl de tejido fueron incubados con 1 ml de sustrato. La presencia de NEP en la muestra provoca la ruptura del enlace nitro-fenil, Gly-(pNO₂) Phe, en la secuencia peptídica (Figura 38).

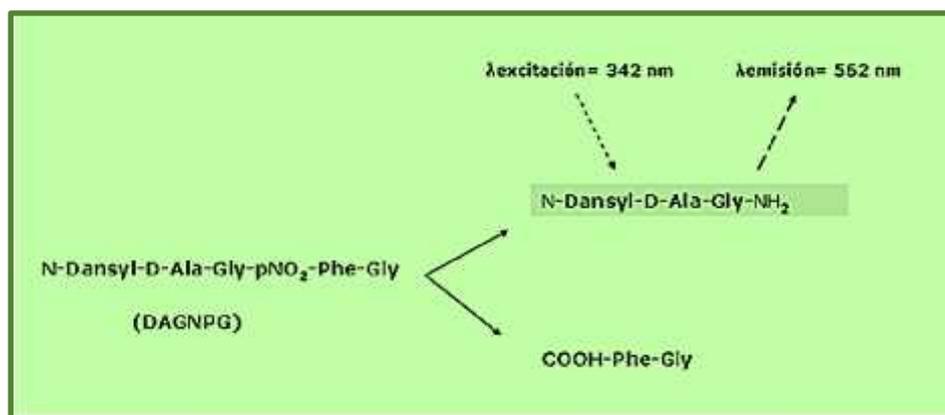


Fig.38.- Esquema de la hidrólisis del sustrato de NEP en el ensayo enzimático. Uno de los productos obtenidos, Dansyl-D-Ala-Gly, emite fluorescencia a 562nm cuando es excitado a 342 nm.

En el DAGNPG, la fluorescencia nativa del grupo Dansil está apantallada por la proximidad espacial del grupo (pNO₂) Phe. De esta manera, cuando el péptido N-Dansyl-D-Ala-Gly (DAG) es liberado por la acción enzimática se produce un aumento de la fluorescencia que puede ser detectada y cuantificada a longitudes de onda de excitación y de emisión de 342 y 562 nm, respectivamente. Dicha propiedad permite que el dansil liberado pueda ser medido muy fácilmente mediante un espectrofluorímetro. La cantidad de producto fluorescente liberado está controlada por la concentración del enzima en la muestra, de manera que el DAG detectado fluorimétricamente puede ser extrapolado a concentración endopeptidasa neutra en el tejido estudiado y como resultado final la media de las mismas.

En conjunto: la reacción se inicia al añadir 1 ml del sustrato artificial del que se trate (mencionados anteriormente y específico para cada ensayo) sobre la muestra, y se permite que transcurra la reacción durante 30 minutos a 30 °C. Dicha reacción se detiene por la adición de 1 ml de tampón acetato a pH 4,2. Como se ha descrito, cada actividad enzimática de las peptidasas se determinó, por triplicado, mediante espectrofluorimetría, mediante el uso de un fluorímetro RF-540 de Shimadzu.

5.1.5. Análisis de datos de las actividades peptidásicas

Los valores obtenidos espectrofluorimétricamente o fotométricamente fueron transformados en picomoles de metabolito liberado mediante extrapolación, por ajuste no lineal, de los datos a una ecuación de regresión calculada a partir de una curva patrón. Posteriormente, estos datos fueron convertidos en unidades de actividad peptidasa (UP), definiéndose dicha unidad como la cantidad de enzima que hidroliza un picomol de sustrato por minuto. Los resultados finales se expresaron como actividad específica (unidades de actividad peptidásica/miligramo de proteína en la muestra).

Los datos resultantes fueron analizados mediante la U de Mann-Whitney para la comparación de muestras. Se llevó a cabo con el programa IBM SPSS Statistics 22.

5.1.6. Técnica para la cuantificación de proteínas

El método está basado en la afinidad de los polipéptidos por un colorante, el Azul de Coomassie G-250 (Bradford y cols., 1976). La unión del colorante a las proteínas produce un cambio en la longitud de onda de máxima absorción del citado compuesto que pasa de 465nm a 595nm. El incremento de absorción, siempre y cuando exista un exceso de colorante, es directamente proporcional a la cantidad de proteína, por lo que este es el parámetro que se mide, en un espectrofotómetro y a 595nm.

Se añadieron 2 ml del reactivo de Bradford a 10 μ l de muestra, a continuación, se leyó la absorbancia a 595 nm en el espectrofotómetro.

Dicho valor se determinó frente a un blanco de reactivo (2 ml de reactivo de Bradford sin muestra).

El resultado de la medición se transformó en miligramos de proteína por mililitro, utilizando para ello una curva de calibración ($y = ax + b$) obtenida tras medir por el mismo procedimiento, concentraciones crecientes de y conocidas de una solución estándar de albúmina bovina.

La extrapolación se llevó a cabo en una hoja Excel de Office.

5.2. Actividad enzimática por citometría de flujo

5.2.1. Fundamento

La citometría de flujo es una técnica que permite el análisis de una población estudio de determinadas características físicas y químicas de las células en suspensión que producen una señal al interferir con una fuente de luz. Esto permite analizar múltiples parámetros celulares, con el tamaño, forma y complejidad (por dispersión de la luz visible) de cualquier componente celular o función que pueda ser marcada con un fluorocromo (dispersión de haz de luz de una longitud de onda determinada).

Mediante citometría de flujo, se pudieron establecer diversas relaciones entre los receptores y las enzimas del SRA estudiados en espermatozoides con la fragmentación del ADN en el espermatozoide.

Esta técnica se basa en que las células, al pasar de forma ordenada, de una en una, por delante de un haz luminoso producen su dispersión, lo que es detectado por un sensor. La información producida puede diferenciarse en dos, una la generada por la dispersión de la luz y otra en la relacionada con la emisión de luz por los fluorocromos presentes en la célula al ser excitados por el haz luminoso. Las señales luminosas detectadas se transforman en impulsos eléctricos que se amplifican y se convierten en señales digitales que son procesadas por un software informático.

Una vez que las células de interés han sido distinguidas de los otros tipos celulares, en función de la dispersión de la luz, se puede usar la inmunofluorescencia para determinar la presencia/ausencia y la proporción o número de células que poseen un determinado marcador.

Una característica importante que representa una ventaja de esta técnica, es la posibilidad de medir de forma simultánea, tantos parámetros como anticuerpos se dispongan para ello. Dichos anticuerpos han de estar conjugados con fluorocromos de diferentes longitudes de onda. Los fluorocromos son moléculas que al ser excitadas con la energía de una determinada longitud de onda, son capaces de emitir energía de una longitud de onda mayor. Estas características son las que permiten el análisis multiparamétrico.

Esta técnica se basa en que las células, al pasar de forma ordenada de una en una por delante de un haz luminoso producen su dispersión, lo que es detectado por un sensor. La información producida puede diferenciarse en dos, una la generada por la dispersión de la luz y otra en la relacionada con la emisión de luz por los fluorocromos presentes en la célula al ser excitados por el haz luminoso. Las señales luminosas detectadas se transforman en impulsos eléctricos que se amplian y se convierten en señales digitales que son procesadas por un software informático (Figura 39).

Una vez que las células de interés han sido distinguidas de los otros tipos celulares, en función de la dispersión de la luz, se puede usar la inmunofluorescencia para determinar la presencia/ausencia y la proporción o número de células que poseen un determinado marcador.

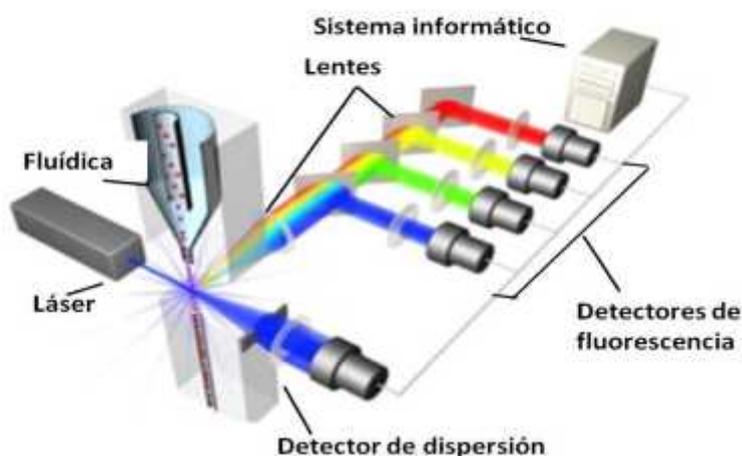


Fig.39.- Esquema que muestra los componentes de un citómetro de flujo y su disposición.

5.2.2. Preparación de las muestras (Citometría semi-cuantitativa)

Una vez descongelados los viales, como se ha descrito con anterioridad, las muestras a estudio fueron sometidas a separación de espermatozoides con ADN fragmentado de los que no tienen ADN fragmentado, se fijaron con paraformaldehído (PAF) al 4% y se mantuvieron a 4°C hasta su posterior análisis.

La semi-cuantificación de los niveles proteicos del AT1R, AT2R, AT4R/IRAP, PRR y MASR, se realizó midiendo la intensidad de fluorescencia

mediante citometría de flujo, empleando anticuerpos específicos para cada receptor, así como también para las enzimas CD/13APN, CD143/ACE y CD/10NEP.

La muestra se dividió en fracciones, alícuotas que se centrifugaron a 3.500g durante 6 minutos, para eliminar el medio de fijación en el que permanecían los espermatozoides y se lavaron con tampón fosfato salino (PBS) 1x. Seguido, las muestras se permeabilizaron con PBS-Tritón® X-100 0,5% durante 10 minutos en continua agitación y una vez pasado este tiempo se volvieron a lavar con PBS 1x.

Una vez eliminada la solución de permeabilización, se procedió al bloqueo, con el fin de evitar posteriores uniones inespecíficas de los anticuerpos. Éste se llevó a cabo durante 30 minutos con suero bovino fetal (SBF) al 10% en PBS 1x.

Transcurrido este tiempo se eliminó el SBF y se añadieron las diluciones de anticuerpos diseñados para reconocer los distintos receptores y enzimas del SRA estudiados (Tabla 7) (en el casos de los receptores opioides se muestran en la tabla 9). Las muestras se incubaron toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se eliminó la dilución de anticuerpo primario mediante centrifugación a 3.500g durante 6 minutos, se lavaron las muestras con PBS 1x y se incubaron, durante una hora a temperatura ambiente y en oscuridad, con un anticuerpo secundario marcado con una molécula fluorescente (Tabla 7). Una vez pasado este tiempo, se tiñeron los núcleos con Hoechst 33258 (Invitrogen) a una concentración de 5 µg/mL durante dos minutos, pasados los cuales, las fracciones de la muestra se resuspendieron en PBS 1x.

Con anterioridad a los análisis se determinó la especificidad tanto de los anticuerpos primarios como de los secundarios. La especificidad de los anticuerpos primarios se determinó mediante la adición de Inmunoglobulinas inespecíficas (Negative Rabbit Immunoglobulin Fraction (Normal)) en concentraciones idénticas a las empleadas con los anticuerpos primarios. Mientras que la especificidad del anticuerpo secundario se realizó omitiendo el anticuerpo primario antes de la adición del anticuerpo secundario.

Los datos de fluorescencia se extrajeron del análisis de al menos 10.000 eventos obtenidos en el citómetro de flujo (Gallios, Becton Dickinson). La fluorescencia azul emitida por el Hoechst 33258 y la fluorescencia verde emitida por el anticuerpo secundario unido a Alexa Fluor® 488 se recogieron por los sensores FL9 y FL1 respectivamente. Se realizó una primera selección de los eventos de tamaño y complejidad correspondientes a la población de espermatozoides. (Figura 40). Se eliminaban de esta forma, en los siguientes gráficos las células no espermáticas. Con el fin de eliminar la autofluorescencia emitida por los espermatozoides, se eliminó el ruido de fondo (señal de fluorescencia) de los eventos positivos al Hoechst 33258 usando como referencia los controles de cada muestra. Los gráficos de fluorescencia se analizaron mediante el software Summit v4.3. Los resultados obtenidos eran el porcentaje de espermatozoides que presentaban el marcador objeto de estudio.

Tabla 7.- Tabla de diluciones de los diferentes receptores y enzimas del sistema SRA utilizados para la citometría de flujo.

Anticuerpo	Hospedador	Dilución	Casa comercial	Referencia
Anti receptor de angiotensina II tipo 1	Conejo	1:200	Almone	AAR-011
Anti receptor de angiotensina II tipo 2	Conejo	1:200	Abcam	ab19134
Anti receptor de angiotensina II tipo 4	Conejo	1:200	Santa CruzBiotech	sc-135229
Anti receptor de renina	Conejo	1:200	Santa CruzBiotech	sc-67390
Anti receptor de angiotensina (1-7) MAS	Conejo		Almone	AAR-013
Anti-ACE humano conjugado con PE	Ratón	1:200	BioLegend	344204
Anti-CD13 humano conjugado con PE	Ratón	1:200	BD Pharmingen™	555394
Anti-CD10 humano conjugado con PE	Ratón	1:200	BD Pharmingen™	
IgG1, k Isotipo Control conjugado con PE	Ratón	-	BioLegend	400112
Anti- IgG (H+L) de conejo conjugado con Alexa Fluor® 488	Cabra	1:2000	Invitrogen	A11008

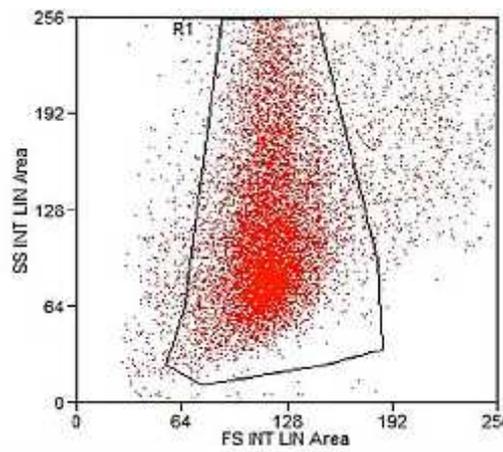


Fig.40.- Imagen de citometría de flujo de las poblaciones espermáticas en base a su tamaño y complejidad que muestra una forma característica de llama.

6. Receptores

Inmunocitoquímica

La inmunocitoquímica es una técnica que permite determinar de forma directa la localización en las células de las proteínas. Para ello se usan anticuerpos conjugados con fluorocromos. Los fluorocromos son moléculas que, al ser excitadas con una energía de una determinada longitud de onda, son capaces de emitir energía de otra longitud de onda mayor. La localización se realiza a través de un microscopio de fluorescencia o confocal, capaz de recoger específicamente la luz emitida por el anticuerpo conjugado con el fluorocromo. La detección de las proteínas se llevó a cabo mediante inmunofluorescencia indirecta. Este método requirió del uso de dos anticuerpos de forma consecutiva, un anticuerpo primario que se une a la proteína objeto y un anticuerpo secundario unido a un fluorocromo, que detectó de forma específica el anticuerpo primario.

Los espermatozoides previamente fijados en paraformaldehído al 2% (vol/vol), se lavaron con PBS 1x y se resuspendieron en PBS 1x. Se extendieron en unos cubreobjetos previamente tratados con poli-L-lisina y se dejaron secar. Se permeabilizaron con Tritón® x-100 al 1% en PBS 1x durante 10 minutos en agitación. Se retiró el Tritón® y se realizaron tres lavados de 5 minutos cada uno con PBS 1x. Posteriormente, se bloquearon las muestras con SBF 10% (vol/vol) en PBS 1x durante 30 minutos. A continuación, se incubaron durante toda la noche

a 4°C con el anticuerpo primario correspondiente en PBS-SBF 5%. Se eliminó el anticuerpo primario de las muestras, se hicieron 3 lavados de 5 minutos con PBS 1x y éstas se incubaron con el anticuerpo secundario anti-IgG Alexa Fluor® 488 en oscuridad durante 1 hora a temperatura ambiente. Una vez transcurrido este tiempo se hicieron otros tres lavados con PBS 1x durante 5 minutos, se añadió Hoechst 33258 (Invitrogen) a una concentración de 5µg/ml y se dejó incubando durante dos minutos para que se intercalase en los núcleos, marcándolos.

El fluorocromo Alexa Fluor 488 posee una longitud de onda máxima de excitación y absorción de 495nm y 519nm respectivamente. Por lo que las muestras se excitaron con un láser de argón a 488nm y se recogió luz entre 505-520nm. El Hoechst 33258 es un marcador de DNA, permeable a la membrana celular, que fluoresce en azul cuando se une al surco menor de la doble cadena de DNA. Posee una longitud de onda máxima de excitación y absorción de 352nm y 461 nm respectivamente, siendo idónea una combinación con Alexa Fluor 488, ya que no se produce solapamiento entre sus espectros de emisión.

El montaje de las muestras se realizó con Fluoromont G (Southern Biotech). Las preparaciones se observaron en un microscopio cofocal (Microscopio confocal de láser, Olympus Fluoview FV 500) que permite solapar imágenes de planos consecutivos de los espermatozoides, permitiendo visualizar de una forma óptima las zonas que emitían fluorescencia, que son las zonas donde había presencia de estos marcadores de interés. Las imágenes se procesaron con el software informático Fluoview v5.0. y el programa de análisis de imágenes Image J.

Simultáneamente se realizaron controles negativos de los anticuerpos secundarios siguiendo el mismo procedimiento experimental, pero omitiendo la adición de los anticuerpos primarios. Por otra parte, la determinación de la especificidad de los anticuerpos primarios, no se creyó necesaria puesto que análisis previos de citometría de flujo, con diluciones más concentradas de los mismos anticuerpos, demostraron que las uniones inespecíficas que se producían eran mínimas.

6.1. Receptores sistema renina angiotensina. Inmunocitoquímica

Para la localización de los receptores del sistema renina angiotensina se utilizó la misma técnica de inmunocitoquímica descrita en el apartado 6.1. mediante inmunofluorescencia indirecta. Los anticuerpos correspondientes se presentan en la tabla 8.

Tabla 8.- Anticuerpos empleados en inmunocitoquímica para los receptores SRA.

Anticuerpo	Hospedador	Dilución	Casa comercial	Referencia
Anti receptor de angiotensina II tipo 1	Conejo	1:200	Almone	AAR-011
Anti receptor de angiotensina II tipo 2	Conejo	1:500	Abcam	ab19134
Anti receptor de angiotensina II tipo 4	Conejo	1:200	Santa CruzBiotech	sc-135229
Anti receptor de angiotensina (1-7) MAS	Conejo		Almone	AAR-013
IgG1, k Isotipo Control conjugado con PE	Ratón	1:1000	BioLegend	400112
Anti- IgG (H+L) de conejo conjugado con Alexa Fluor® 488	Cabra	1:2000	Invitrogen	A11008

6.2. Receptores opioides. Inmunocitoquímica

Para la localización de los receptores opioides hMOR (μ), hDOR () y hKOR () se utilizó la misma técnica de inmunocitoquímica mediante inmunofluorescencia indirecta. Los anticuerpos correspondientes se presentan en la tabla 9.

Antígeno	Hospedador	Dilución	Casa comercial
hMOR	Conejo	1:800	Chemicon
hDOR	Conejo	1:800	Chemicon.
hKOR	Conejo	1:50	Santa Cruz
Anti-Rabbit IgG: Alexa Fluor 488	Cabra	1:500	Molecular Probes

Tabla 9.- Anticuerpos empleados en inmunocitoquímica y citometría de flujo. hMOR: Recepto opioide μ humano; hDOR: Receptor opioide humano; hKOR: Receptor opioide humano.

IV RESULTADOS

Resultados

1. Aspectos clínicos

Realizamos el estudio enzimático en muestras seminales provenientes de 17 primeros ciclos de inseminación intrauterina, dichos pacientes tenían que cumplir unos requerimientos mínimos, como era tener un seminograma previo normozoospermico según los valores de la OMS 2010, un volumen de eyaculado suficiente para realizar la recuperación de espermatozoides suficientes para realizar la inseminación así como para las alícuotas necesarias para las determinaciones que ocupan este estudio.

El protocolo de estimulación fue el mismo en todas las pacientes: Gonadotropinas recombinantes, con supresión hipofisaria mediante antagonistas GnRH y el desencadenamiento de la ovulación se realizó mediante la administración de HCG recombinante, cuando ecográficamente al menos ecográficamente se observaron tres folículos mayores de 16 mm.

La edad media de las mujeres fue de $35,88 \pm 1,99$ años siendo el mínimo de 32 y el máximo de 40 años y la de los varones de $37,35 \pm 4,40$ años con un mínimo de 29 y un máximo de 46 años (Tabla 10).

Datos epidemiológicos					
	N	Mínimo	Máximo	Media	Desviación estándar
EDAD MUJERES	17	32	40	35,88	1,996
N válido (por lista)	17				
EDAD VARONES	17	29	46	37,35	4,401
N válido (por lista)	17				

Tabla 10.- Datos epidemiológicos.

La respuesta ovárica a la estimulación folicular fue similar en el grupo estudio.

El tiempo entre la recogida de la muestra por los pacientes y el comienzo de la preparación de la muestra, no superó en ningún caso los 60 minutos, la media fue de $37,53 \pm 17,77$, siendo el mínimo de 15 minutos y el máximo de 60 (Tabla 11).

Estadísticos descriptivos					
	N	Mínimo	Máximo	Media	Desviación estándar
TIEMPO PROCESAMIENTO	17	15,00	60,00	37,5294	14,76955
N válido (por lista)	17				

Tabla 11.- Tiempo desde la recogida de la muestra hasta el comienzo del procesado.

No se encuentran diferencias entre los parametros seminales y los embarazos. La media de la concentración espermática por mililitro de las muestras precapacitadas fue de $68,29 \pm 26,27$ millones de espermatozoides por mililitro, con un mínimo de 29 y un máximo de 128. La media de la motilidad progresiva fue de $28,11 \pm 6,34\%$, con un mínimo del 15% y máximo del 40%. Respecto a la morfología la media fue $5,35 \pm 2,42\%$. La media de la concentración por mililitro de espermatozoides recuperados para inseminación fue de $25,68 \pm 12,79$ millones por mililitro (Tabla 12).

Estadísticos descriptivos					
	N	Mínimo	Máximo	Media	Desviación estándar
Volumen	17	2,50	5,00	3,5882	,79521
ph	17	7,00	8,00	7,7941	,30917
Concentración precapacitación	17	29,00	128,00	68,2941	26,27205
Motilidad progresiva	17	15,00	40,00	28,1176	6,34313
Motilidad no progresiva	17	20,0	30,0	24,706	4,4967
Inmóviles	17	30,00	65,00	46,8824	9,72678
Espermatozoides inseminados	17	3,24	46,80	25,6847	12,78724
Morfología	17	1,00	11,00	5,3529	2,42232
N válido (por lista)	17				

Tabla 12.- Parámetros seminales.

Tras el estudio estadístico con el programa SPSS, pruebas no paramétricas para muestras independientes, según la prueba U de Mann-Whitney no hay significado estadístico en ninguno de los parámetros concentración, motilidades, morfología y el número de espermatozoides recuperados con el embarazo (Figura 41).

Resumen de contrastes de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de concentración es la misma entre las categorías de EMBARAZO.	Prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes	,462 ¹	Conserve la hipótesis nula.
2	La distribución de motilidad progresiva es la misma entre las categorías de EMBARAZO.	Prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes	,062 ¹	Conserve la hipótesis nula.
3	La distribución de morfología es la misma entre las categorías de EMBARAZO.	Prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes	,525 ¹	Conserve la hipótesis nula.
4	La distribución de espermatozoides inmovilizados es la misma entre las categorías de EMBARAZO.	Prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes	,884 ¹	Conserve la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significancia es ,05.

¹ Se muestra la significación exacta para esta prueba.

Fig 41.- Contraste de hipótesis de parámetros seminales y embarazo.

Tras el estudio estadístico con el programa SPSS, pruebas no paramétricas para muestras independientes, según la prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes no hay significado estadístico en ninguno de los parámetros concentración, motilidades y morfología con la fragmentación del ADN espermático.

La determinación del porcentaje de fragmentación en las muestras seminales, se realizó pre-recuperación espermática por la técnica SCD(Figura 42).

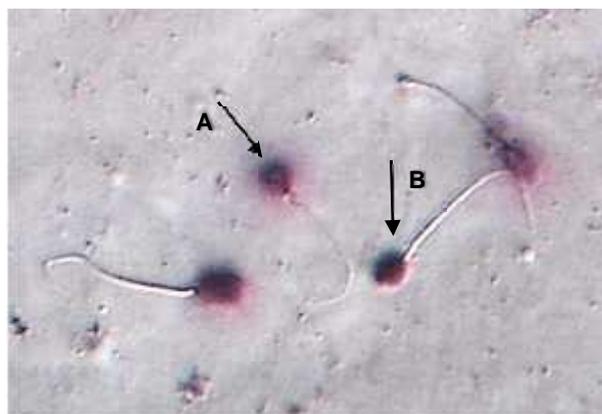


Fig 42.- Test SCD. A) No fragmentación, B) Fragmentación

El porcentaje de pacientes que presentaban fragmentación de ADN en el espermatozoide tras la realización de la prueba SCD en la muestra seminal en fresco, pre-recuperación espermática, (considerando muestras con ADN fragmentado aquellas cuyo porcentaje de fragmentación fue 20%) fue del 59% de los pacientes frente al 41% de las muestras que no presentaban fragmentación (Figura 43).

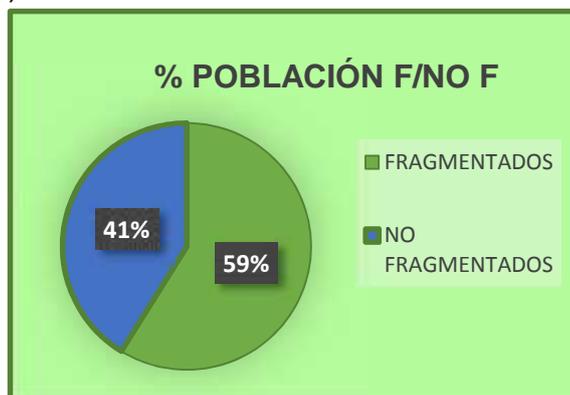
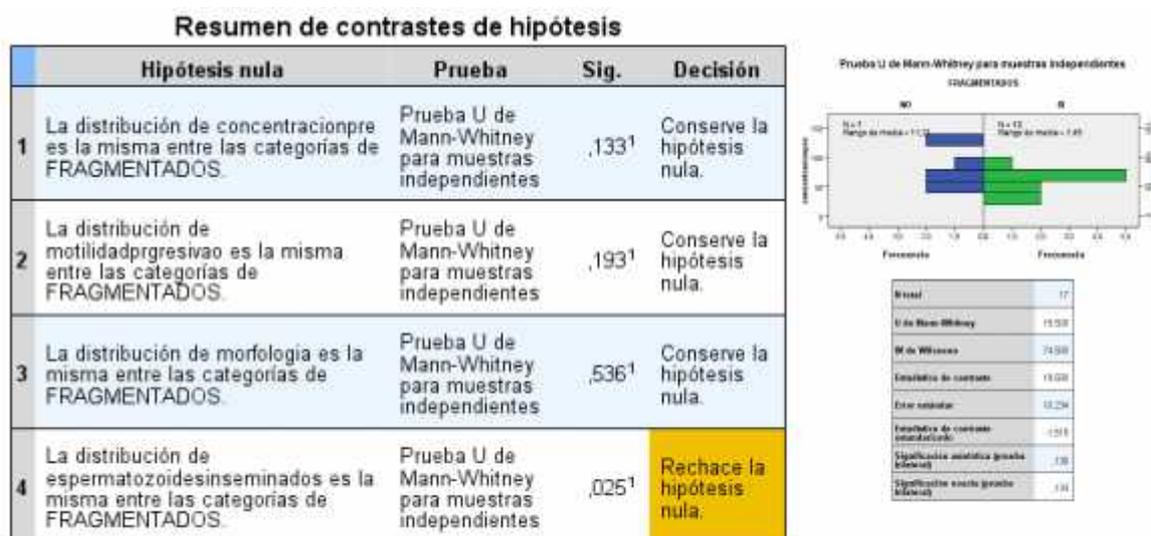


Fig. 43.- Porcentaje muestras con ADN fragmentado vs. no fragmentados.

Al analizar, concentración, motilidades, morfología y el número de espermatozoides recuperados mediante la U de Mann-Whitney, no encontramos diferencias, salvo en el número de espermatozoides recuperados.



Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significancia es ,05.

¹Se muestra la significación exacta para esta prueba.

Fig. 44.- Contraste de hipótesis parámetros seminales/ fragmentación.

La tasa de embarazo evolutivo en primer ciclo fue del 35%.

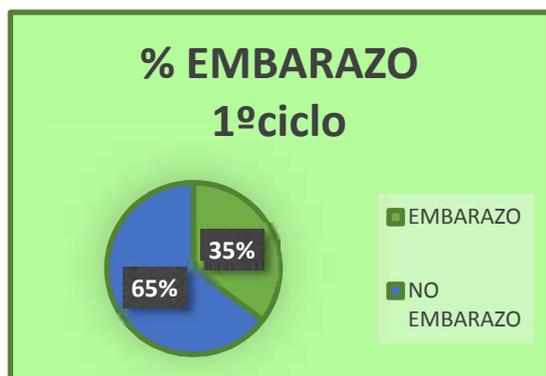


Fig.45.- Porcentaje embarazos primeros ciclos.

Pero cuando observamos el seguimiento de ciclos posteriores de la población en estudio observamos que el porcentaje de embarazo fue del 65%, de este porcentaje el 41% fue evolutivo (un embarazo en segundo ciclo), el 18% terminó en aborto y un 6% de ectópico (3 abortos y un ectópico).

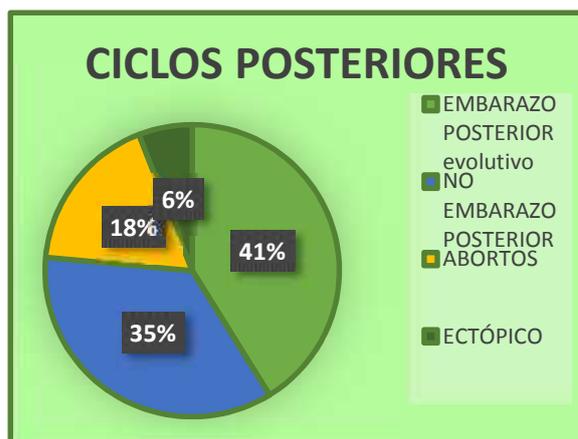


Fig.46.- Porcentajes del seguimiento de los casos a estudio.

2. Resultados de la actividad enzimática

2.1. Actividad enzimática por espectrofluorimetría

El primer paso fue la realización de un análisis estadístico descriptivo de los datos (media, error estándar, mediana, valor mínimo y valor máximo) para ver el comportamiento general de los mismos. Además, estos análisis iniciales, proporcionaban información como una primera aproximación para iniciar el análisis de los datos. El segundo paso fue la determinación del tipo de distribución que seguían los mismos. Esto se realizó mediante el test de normalidad de Shapiro-Wilk dado que el tamaño muestral era inferior a 50.

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante el programa Microsoft Excel y el paquete estadístico SPSS Statistics v.22. El estadístico utilizado fue la U de Mann-Whitney para comprobar si había alguna relación entre cada una de las enzimas estudiadas y la fragmentación del ADN espermático.

Los mayores niveles de actividad peptidásica en espermatozoides corresponden a la Dipeptidil Peptidasa con una media de 173093,51±27202,09 seguida de la Aminopeptidasa neutra con una media de 53255,61±11269,60, la siguen la Aminopeptidasa B y la Aminopeptidasa sensible a la puromicina con valores muy similares, por último, tenemos la Cistil aminopeptidasa, Aspartil aminopeptidasa y la que presenta menor valor con una media de 457,23±83,10 es la Endopeptidasa neutra (Tabla 13, Figuras 47, 48).

Tabla 13.- Valores de la actividad enzimática por espectrofluorimetría en espermatozoides.

Estadísticos descriptivos					
	N	Mínimo	Máximo	Media	Desviación estándar
PSA	15	15813,83	33813,00	23141,9320	5936,75819
APN	16	31996,12	74704,22	53255,6131	11269,59776
APB	16	12295,93	39297,35	21965,4300	6972,24712
CYS	16	2230,82	4832,00	3066,6850	775,09821
DPPIV	16	109328,94	216291,30	173093,5150	27202,09011
ASP	16	653,10	1380,27	923,3175	202,60513
NEP	16	305,15	579,48	457,2263	83,10383
N válido (por lista)	15				

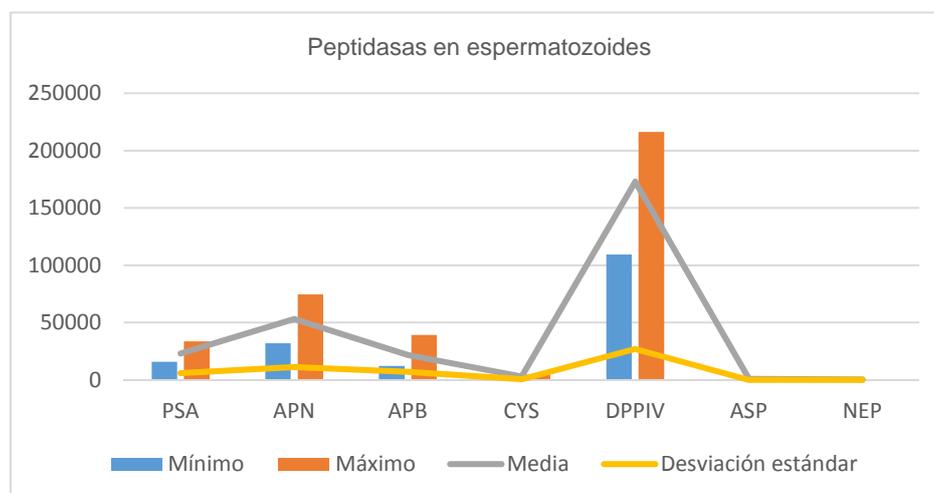


Fig. 47.- Gráfica peptidasas espermatozoides.

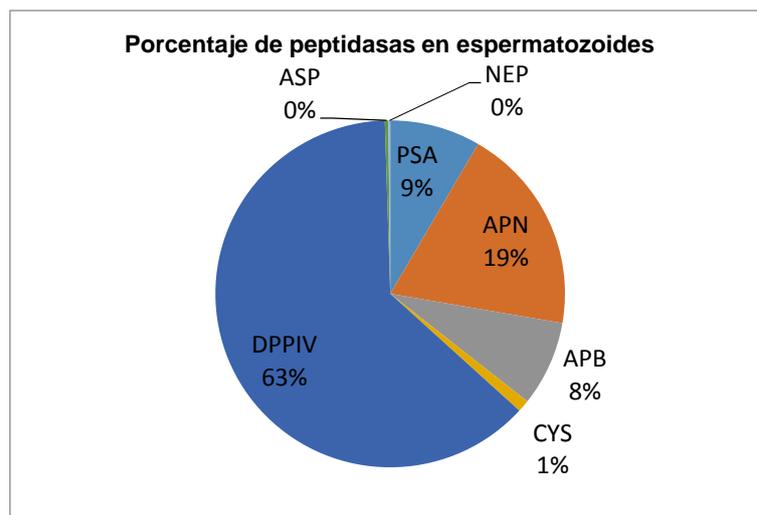


Fig. 48.- Gráfica porcentaje de peptidasas en espermatozoides.

Los mayores niveles de actividad peptidásica en plasma seminal corresponden a la Dipeptidil Peptidasa con una media de $42629,54 \pm 5304,55$, seguida de la Aminopeptidasa B con una media de $32844,39 \pm 7173,45$, la sigue muy de cerca la Aminopeptidasa Neutra con valores muy similares, luego la sigue Aminopeptidasa Sensible a la Puromicina y la Cistil aminopeptidasa, por último, tenemos la Aspartil aminopeptidasa, Prolil endopeptidasa, y la Glutamil aminopeptidasa que presenta menor valor con una media de $26,92 \pm 9,11$ (Tabla 14, Figuras 49 y 50).

Estadísticos descriptivos					
	N	Mínimo	Máximo	Media	Desviación estándar
PSAPS	14	11130,47	23260,18	16444,5186	3588,62676
APNPS	16	21746,70	43811,82	30582,7863	6901,71077
APBPS	16	23007,38	50658,00	32844,3894	7173,44866
GLUPS	16	17,13	49,72	26,9200	9,11104
PEPPS	16	36,96	85,65	64,4456	14,13923
CYSPS	16	1545,63	2512,29	1880,1650	312,39763
DPPiVPS	16	33371,00	49582,00	42629,5456	5304,54702
ASPPS	16	59,17	104,74	81,9531	15,77396
N válido (por lista)	14				

Tabla 14.- Valores de la actividad enzimática por espectrofluorimetría en plasma seminal.

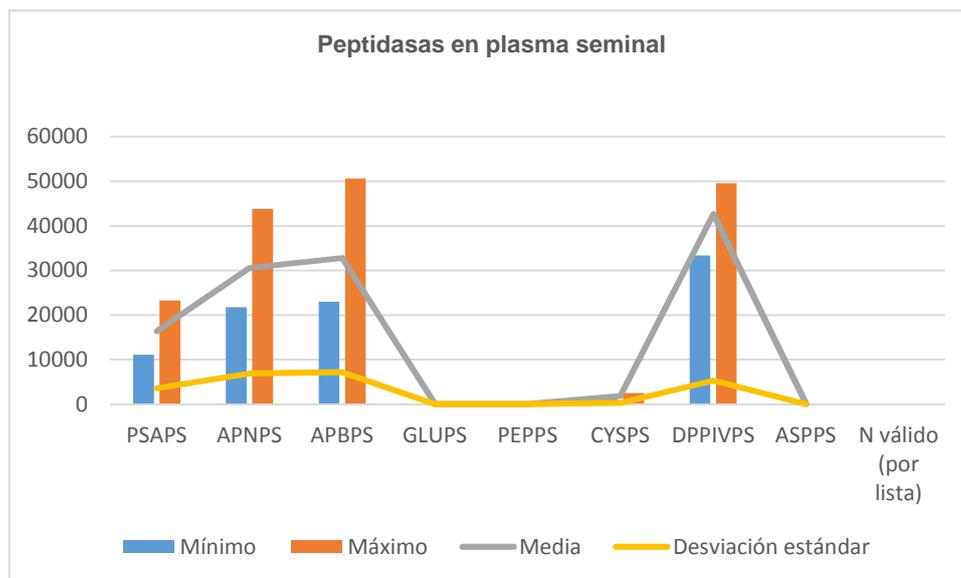


Fig. 49.- Gráfica peptidasas en plasma seminal

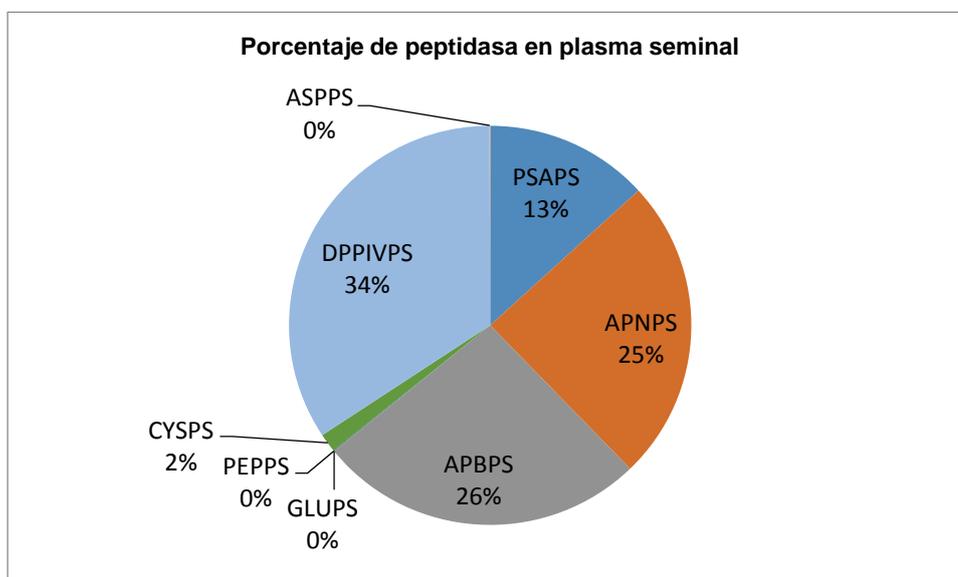


Fig. 50.- Gráfica porcentaje de peptidasas en plasma seminal.

Analizando cada uno de los enzimas en espermatozoides en función del valor de fragmentación inferior o igual al 20% considerándolos como no fragmentados o poco fragmentados, y superior a 20 como fragmentados considerándolos como fragmentados. Utilizamos el paquete estadístico SPSS Statistics v.22. El estadístico utilizado fue la U de Mann-Whitney para comprobar si había alguna relación entre cada una de las enzimas estudiadas y la fragmentación del ADN espermático. Los máximos, mínimos, así como las medias y de desviaciones cuando hay fragmentación del ADN en los espermatozoides o

no, siendo le valor “0” no fragmentación y el valor “1” fragmentación se presentan en la tabla 15 y figuras 51 y 52.

Estadísticos descriptivos					
	N	Mínimo	Máximo	Media	Desviación estándar
PSA1	8	16663,39	54896,66	33748,4900	13233,00745
PSA0	7	15813,83	25883,24	19591,5800	3390,72632
APN1	9	31996,12	61607,21	48049,0400	8274,05895
APN0	7	18779,37	74704,22	52920,0314	18637,74421
APB1	9	12295,93	31080,41	22278,3900	6049,99644
APB0	7	13066,76	39297,35	21563,0529	8508,31893
CYS1	9	2350,16	4832,00	3337,0400	877,17088
CYS0	7	2230,82	3519,00	2719,0857	474,80263
DPPIV1	9	143980,87	208793,00	176854,2300	23549,32341
DPPIV0	7	109328,94	216291,30	168258,3100	32587,82821
ASP1	9	653,10	1380,27	986,2278	248,34700
ASP0	7	707,70	972,61	842,4329	82,57032
NEP1	9	305,15	579,48	457,5811	88,98023
NEP0	7	319,00	553,00	456,7700	81,90571
N válido (por lista)	0				

Tabla 15.- Valores de la actividad enzimática por espectrofluorimetría en espermatozoides. (PSA0, APN0, APB0, CYS0, DPPIV0, ASP0, NEP0, actividad enzimática en espermatozoides que no presentan o es bajo el porcentaje de fragmentación del ADN espermático. PSA1, APN1, APB1, CYS1, DPPIV1, ASP1, NEP1, actividad enzimática en espermatozoides que presentan fragmentación del ADN espermático).

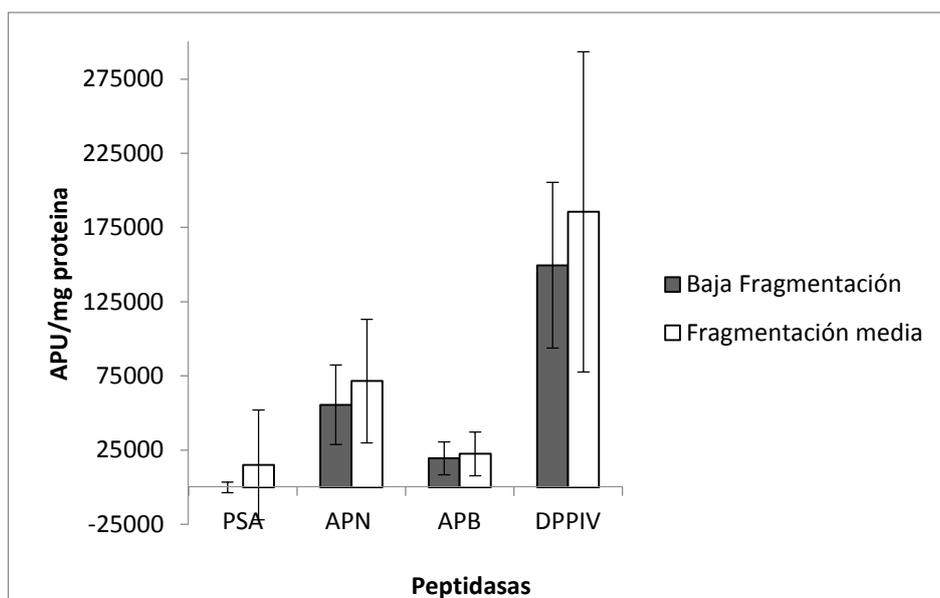


Fig. 51.- Gráfica de peptidasas de espermatozoides con mayor actividad enzimática en espermatozoides con baja fragmentación y fragmentados.

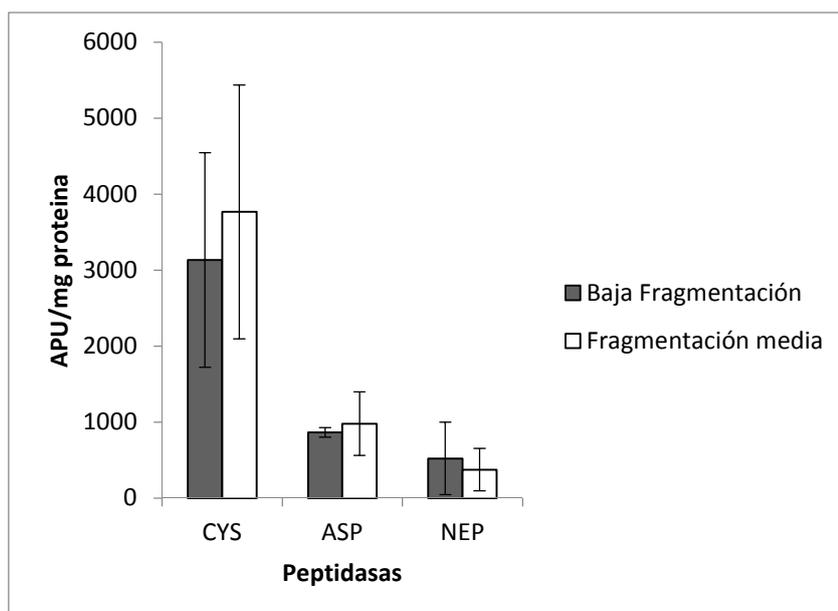


Fig. 52.- Gráfica peptidasas es espermatozoides con menor actividad enzimática en espermatozoides con baja fragmentación y fragmentados.

En la figura 53 se muestran los porcentajes de las peptidasas estudiadas en los espermatozoides que no presentaban fragmentación en el ADN (A), o presentaban fragmentación (B).

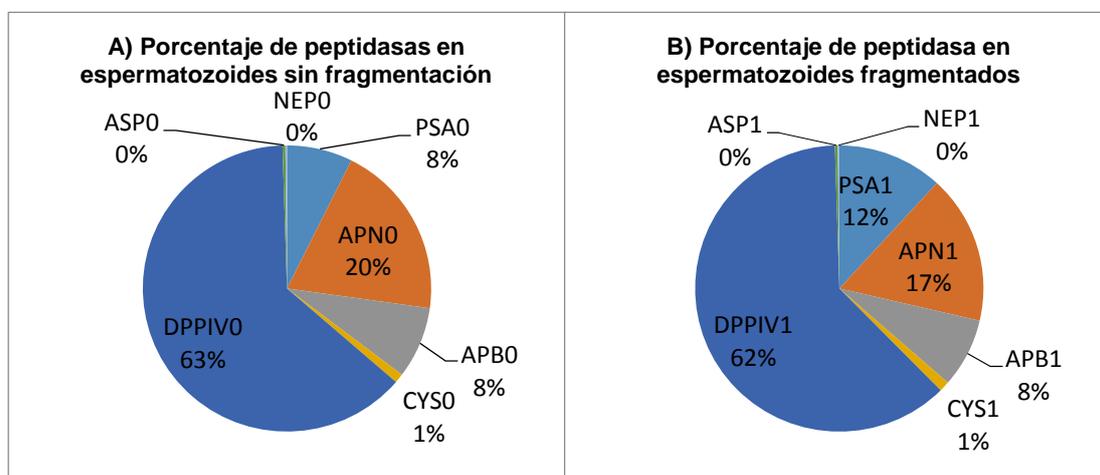


Fig. 53.- Gráficas de porcentajes de peptidasas en espermatozoides sin fragmentación (A) o con fragmentación (B).

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante el programa Microsoft Excel y el paquete estadístico SPSS Statistics v.22. El estadístico utilizado fue la U de Mann-Whitney, no encontrándose relación de la actividad enzimática de las

enzimas estudiadas en espermatozoides con la fragmentación del ADN espermático o sin ella.

Los máximos, mínimos, así como las medias y de desviaciones en plasma seminal cuando hay fragmentación del ADN en los espermatozoides o no, siendo le valor “0” no fragmentación y el valor “1” fragmentación se presentan en la tabla 16, figuras 54 y 55.

Estadísticos descriptivos					
	N	Mínimo	Máximo	Media	Desviación estándar
PSAPS1	7	12306,78	23260,18	16438,3157	3745,22398
PSAPS0	7	11130,47	21891,67	16450,7214	3725,05911
APNPS1	9	21746,70	37137,38	28324,8356	5190,67941
APNPS0	7	22618,00	43811,82	33485,8657	8104,30736
APBPS1	9	23007,38	41773,00	31758,7711	5890,28035
APBPS0	7	25014,00	50658,00	34240,1843	8851,24716
GLUPS1	9	17,77	43,47	26,8911	8,06786
GLUPS0	7	17,13	49,72	26,9571	10,98807
PEPPS1	9	36,96	85,65	62,8967	16,08168
PEPPS0	7	54,95	83,47	66,4371	12,11366
CYSPS1	8	1545,63	2512,29	1836,1938	319,54375
CYSPS0	7	1568,05	2439,14	1945,1257	339,98039
DPPIVPS1	9	33371,00	49582,00	43283,2489	5801,23287
DPPIVPS0	7	34231,82	48119,50	41789,0700	4899,79791
ASPPS1	9	59,17	103,88	83,3122	17,22006
ASPPS0	7	63,15	104,74	80,2057	14,84378
N válido (por lista)	0				

Tabla 16.- Valores de la actividad enzimática por espectrofluorimetría en plasma seminal. (PSAPS0, APNPS0, APBPS0, CYSPS0, DPPIVPS0, ASPPS0, NEPS0, actividad enzimática en plasma aeminal de espermatozoides que no presentan o es bajo el porcentaje de fragmentación del ADN espermático. PSAPS1, APNPS1, APBPS1, CYSPS1, DPPIVPS1, ASPPS1, NEPPS1, actividad enzimática en plasma seminal de espermatozoides que presentan fragmentación del ADN espermático).

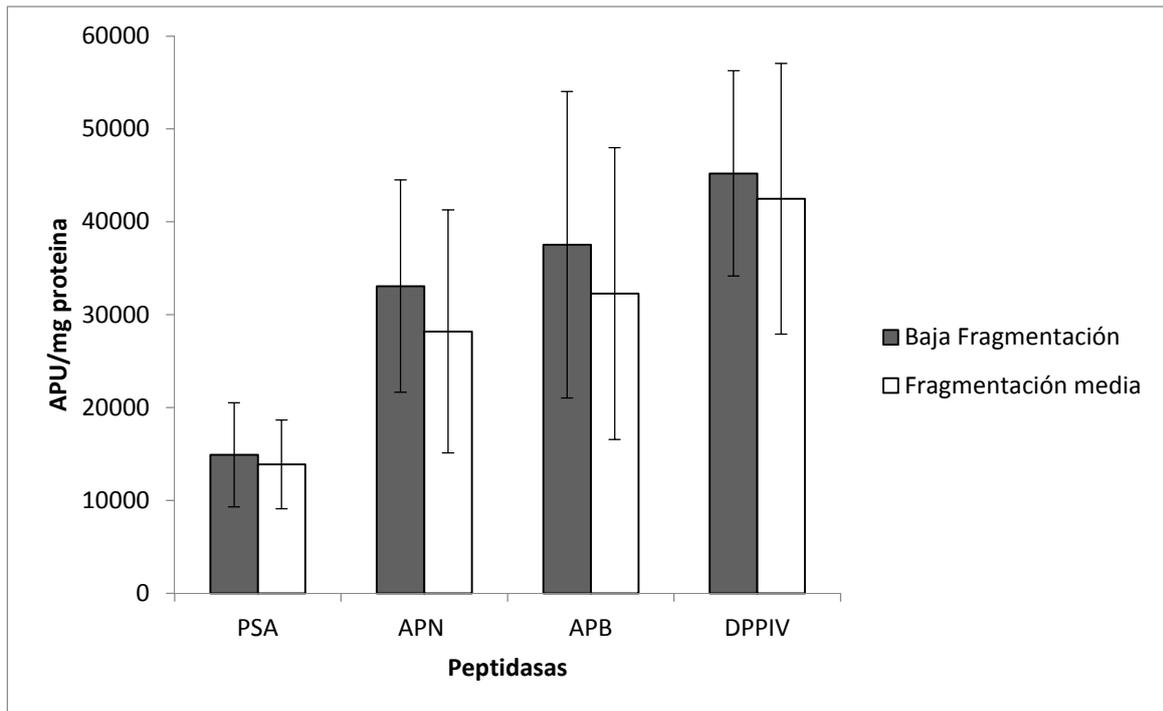


Fig. 54.- Gráfica de peptidasas en plasma seminal con mayor actividad enzimática de espermatozoides con baja fragmentación y fragmentados

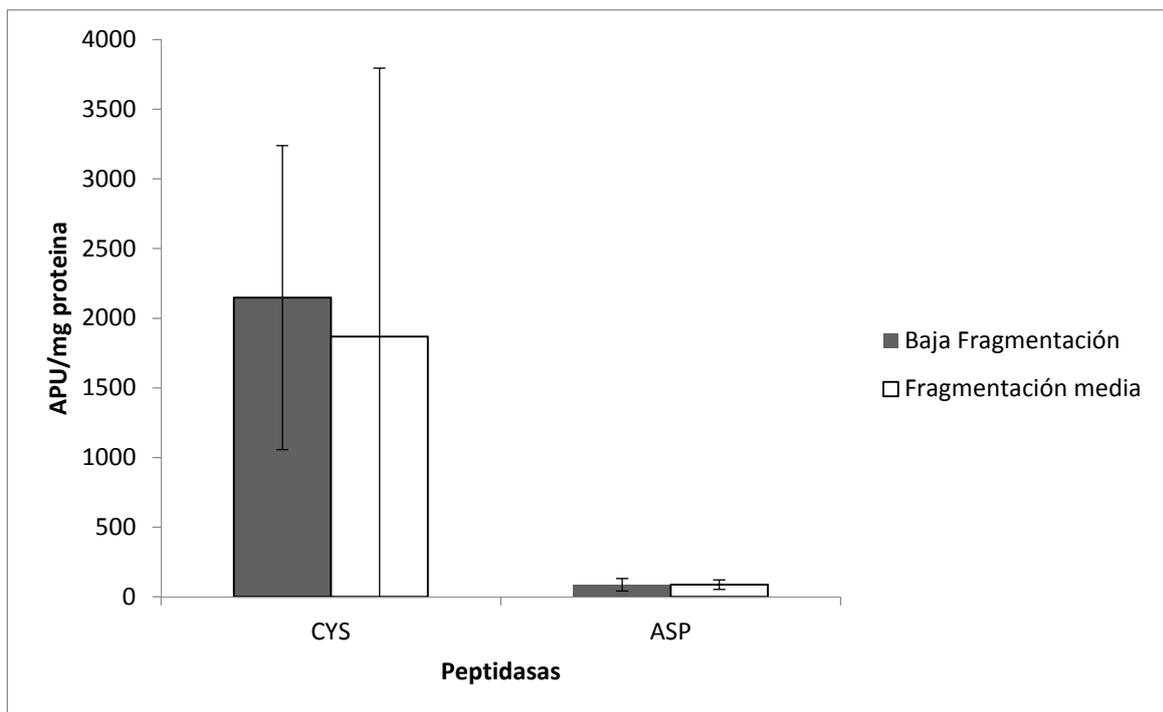


Fig. 55.- Gráfica de peptidasas en plasma seminal con menor actividad enzimática de espermatozoides con baja fragmentación y fragmentados

En la figura 56 se muestran los porcentajes de las peptidasas estudiadas en plasma seminal de los espermatozoides que no presentaban fragmentación en el ADN (A), o presentaban fragmentación (B).

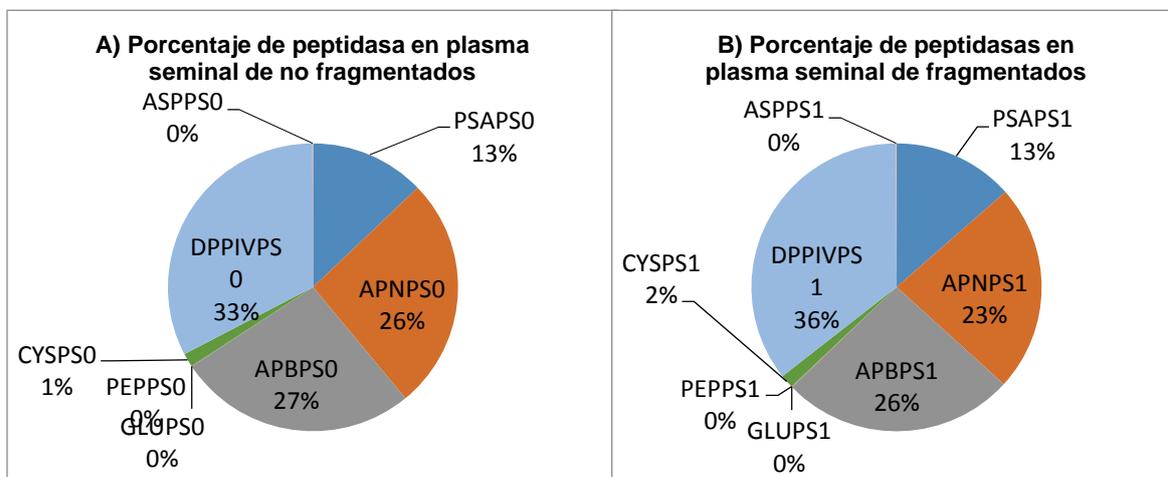


Fig. 56.- Gráficas de porcentajes de peptidasas en plasma seminal de espermatozoides sin fragmentación (A) o con fragmentación (B).

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante el programa Microsoft Excel y el paquete estadístico SPSS Statistics v.22. El estadístico utilizado fue la U de Mann-Whitney, no encontrándose relación de la actividad enzimática de las enzimas estudiadas en plasma seminal de espermatozoides con la fragmentación del ADN espermático o sin ella.

2.2. Actividad enzimática por citometría de flujo

Posteriormente, la presencia de CD13/APN, CD143/ACE y CD10/NEP en espermatozoides humanos se confirmó mediante citometría de flujo.

Se determinó la presencia de CD13/APN en espermatozoides no fragmentados con una media del $69,87 \pm 8,12\%$ frente a $30,50 \pm 8,36\%$ en fragmentados, siendo un p valor 0,05 y la media de intensidad fue de $53,9 \pm 1,24$ para los no fragmentados frente a $7,03 \pm 1,99$ en fragmentados.

En el caso de la CD143 el porcentaje de la media de espermatozoides marcados fue del $50,42 \pm 16,56\%$ en el caso de no fragmentados frente a $88,99 \pm 1,11\%$ en fragmentados, la media de intensidad fue de $2,08 \pm 0,41$ en no fragmentados frente a $7,43 \pm 1,39$ en fragmentados, siendo la p valor 0,05.

El marcaje para la CD10 fue del $3,66 \pm 0,66\%$ en el caso de los no fragmentados y de $35,68 \pm 6,22\%$ en fragmentados siendo la p valor 0,05, y la intensidad de $10,21 \pm 1,78$ para los no fragmentados y de $2,41 \pm 0,33$ para los fragmentados (Figura 57, Tabla 16).

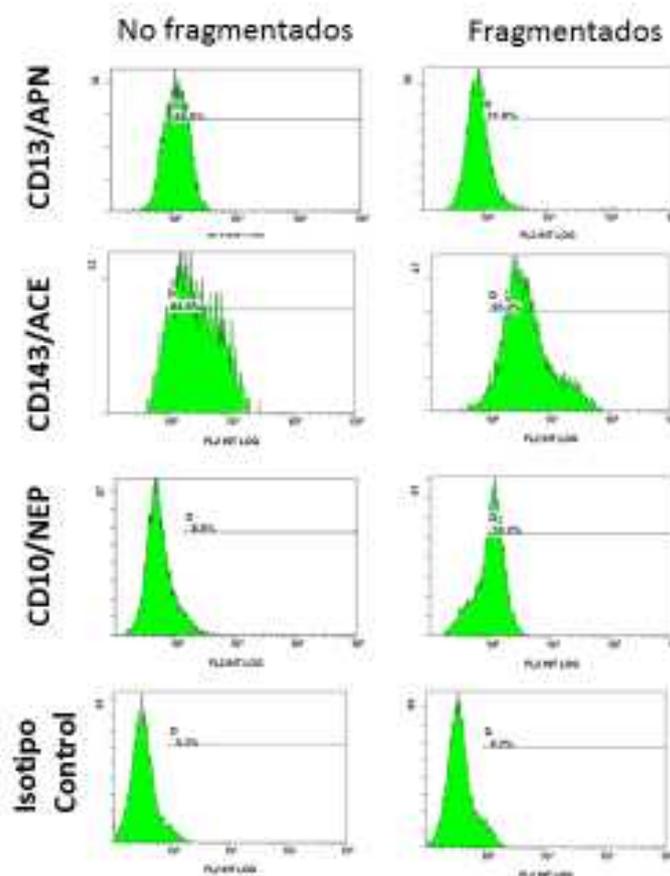


Fig. 57.- Enzimas CD13, CD143 y CD10 por citometría de flujo.

		% Espermatozoides positivos		Intensidad	
		No fragmentados	Fragmentados	No fragmentados	Fragmentados
Enzimas	APN/CD13	69,87±8,12	30,50±8,36	53,875±1,24	7,025±1,99
	ACE/CD146	50,422±16,56	88,994±1,11	2,088±0,41	7,436±1,39
	NEP/CD10	3,66±0,66	35,68±6,22	10,21±1,78	2,405±0,33

Tabla 16.- Actividad enzimática APN/CD13, ACE/CD146 y NEP/CD10 por citometría de flujo.

3. Receptores

3.1. Receptores opioides. Inmunocitoquímica

En la localización de los distintos receptores opioides μ (μ), delta (δ) y kapa (κ) mediante inmunomarcaje no se ha visto diferencias entre espermatozoides con ADN fragmentado y los que no lo tenían fragmentado.

En el caso del receptor opioide μ se observa inmunomarcaje con mayor intensidad en la región ecuatorial / postacrosomal de la cabeza, en la pieza intermedia y en la cola.

El receptor opioide δ se encuentra en la membrana plasmática de la cabeza del espermatozoide (sobre la región acrosomal), así como en la región media (cuello), se detecta también una inmunotinción intensa y uniformemente distribuida a lo largo de la cola del espermatozoide.

El receptor opioide κ se encuentra en la membrana plasmática de la cabeza del espermatozoide, en la región media, y en la cola.

Por último, el caso de omitir el anticuerpo primario anti-DOR, -KOR o -MOR antes de la adición del anticuerpo secundario, la tinción fluorescente patrón no es evidente (Figura 58 y 59).

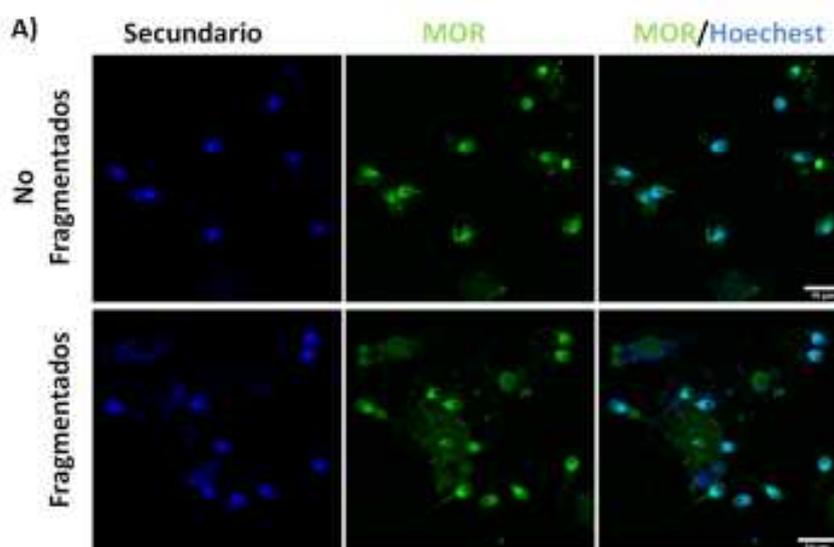


Fig. 58.- MOR (A). Inmunocitoquímica

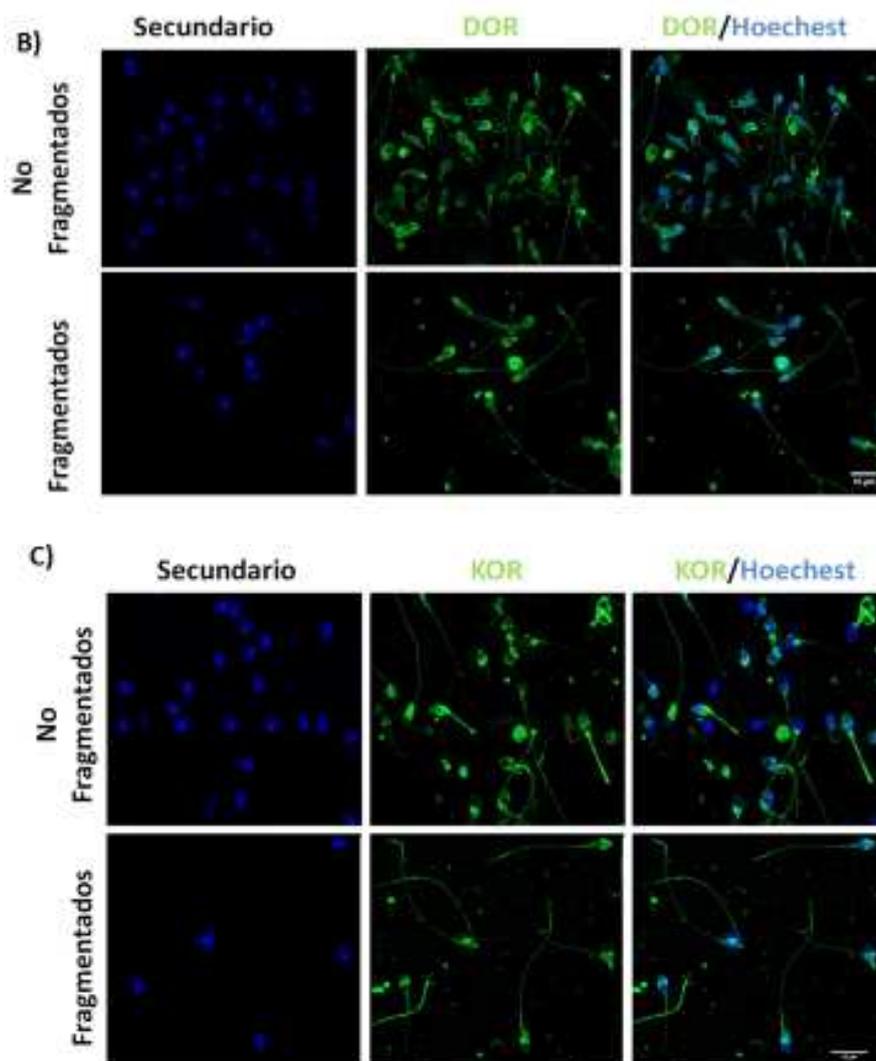


Fig. 59.- DOR (B) y KOR.(C) Inmunocitoquímica

3.2. Receptores Sistema renina angiotensina. Inmunocitoquímica

La localización de los distintos receptores del sistema renina angiotensina AT1R, AT2R, AT4R, PRR y MARS se detectó mediante inmunocitoquímica.

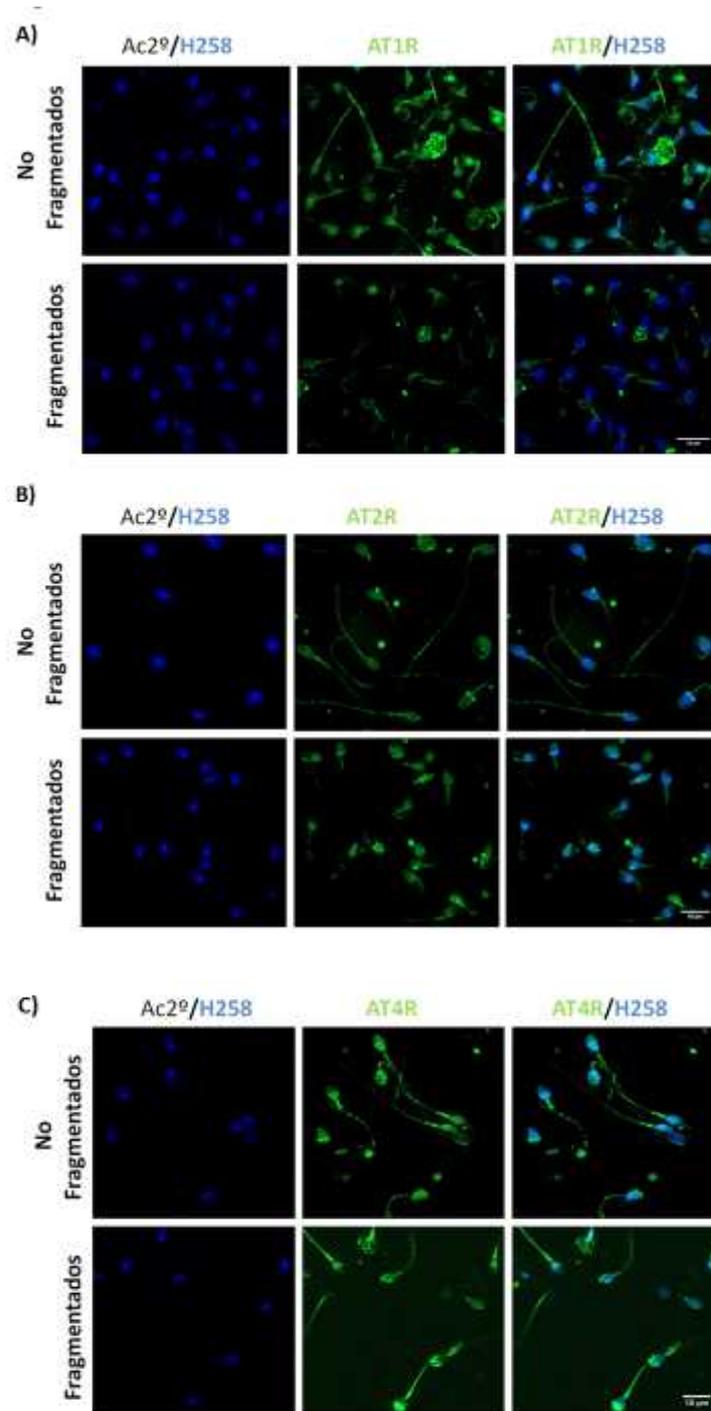
El receptor AT1R, se ha detectado en la cola de los espermatozoides, el AT2R se localiza en la región ecuatorial/postacrosomal de la cabeza de los espermatozoides, además se observó un marcaje más leve a lo largo de la cola de los espermatozoides.

La localización del PRR en los espermatozoides humanos se concentra en la parte frontal de la cabeza espermática, sobre la región acrosómica y en la parte posterior de la cabeza, además se observa un marcaje más leve a lo largo de la

cola de los espermatozoides, en el caso de los fragmentados la intensidad es menor.

En los controles negativos, al omitir el anticuerpo primario específico, no se observaron en las muestras uniones inespecíficas.

Las imágenes de dichos receptores se muestran en la figura 60.



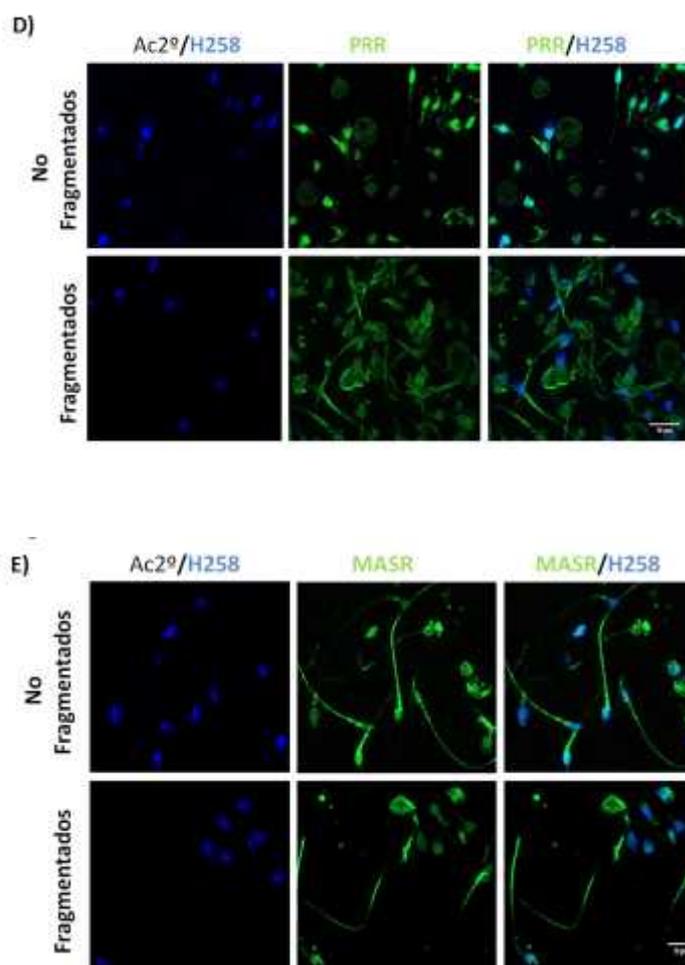


Fig. 60.- Inmunocitoquímica de los receptores renina angiotensina en espermatozoides sin fragmentación y con fragmentación. AT1R (A), AT2R (B), AT4R (C), PRR (D), MARS (E).,

3.3 Receptores opioides. Citometría de flujo

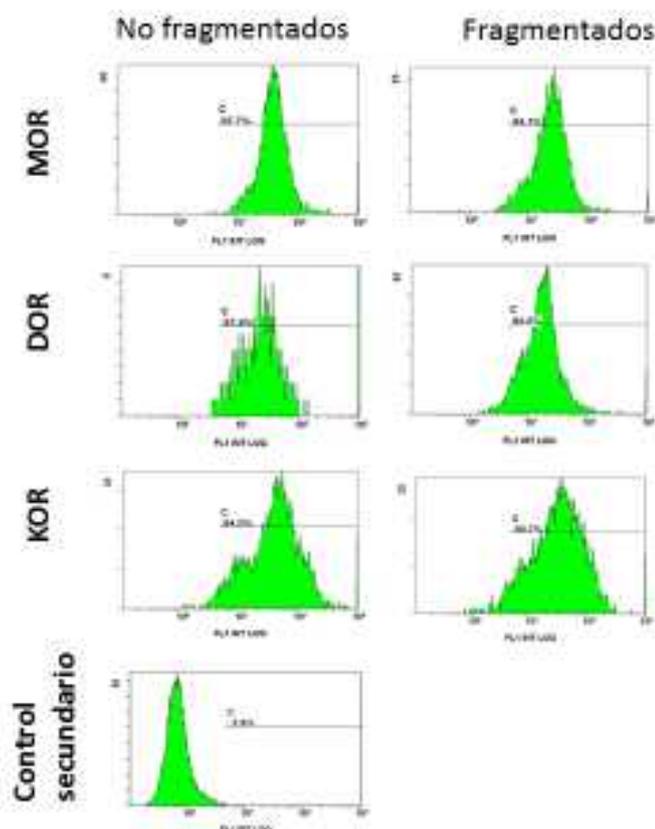
Se determinó tanto la presencia como el porcentaje del receptor opioide MOR (μ), DOR () y KOR () en espermatozoides tanto fragmentados como no fragmentados que expresan estos receptores. Esta determinación se realizó mediante citometría de flujo.

Se estableció la presencia de un porcentaje de 97,7% para MOR en el caso de espermatozoides no fragmentados frente a 94,3% en fragmentados, la intensidad de este receptor fue de 61,6 para no fragmentados y 37,8 para fragmentados.

Para el receptor opioide DOR en espermatozoides no fragmentados el porcentaje fue de 87,8% y 92,0% en fragmentados, la intensidad de este receptor

fue de 90,1 frente a 35,6 en espermatozoides no fragmentados y fragmentados respectivamente.

Por último, para el receptor opioide KOR el porcentaje de espermatozoides no fragmentados marcados fue del 94% y un 90,7% en fragmentados, mostrando una intensidad de 75,3 en no fragmentados y 61,5 en fragmentados.



	% Espermatozoides positivos			Intensidad	
	No fragmentados	Fragmentados		No fragmentados	Fragmentados
MOR	97,7	94,3		61,6	37,8
DOR	87,8	92,0		90,1	35,6
KOR	94	90,7		75,3	61,5

Fig. 61.- Porcentajes e intensidades de los receptores opiodes MOR (μ), DOR () y KOR () en espermatozoides tanto fragmentados como no fragmentados que expresan estos receptores por citometría de flujo.

La especificidad de los anticuerpos se determinó mediante el análisis de: 1) una muestra a la que no se le había añadido los anticuerpos primario y secundario (blanco); 2) la adición de inmunoglobulinas inespecíficas en concentraciones idénticas a las empleadas con los anticuerpos primarios (control de anticuerpo primario); y 3) omitiendo el anticuerpo primario antes de la adición del anticuerpo secundario (control del anticuerpo secundario) (Figura 61). Estos tres controles mostraron patrones de intensidad de fluorescencia similares, demostrando que la fluorescencia medida en las muestras se debía exclusivamente a la emitida por el anticuerpo específico de unión a los receptores MOR, DOR y KOR (Figura 61).

3.4. Receptores sistema renina angiotensina. Citometría de flujo

Se determinó tanto la presencia como el porcentaje del AT1R, AT2R, AT4/IRAP, PRR y MASR de espermatozoides tanto fragmentados como no fragmentados que expresan estos receptores. Esta determinación se realizó mediante citometría de flujo.

Se estableció la presencia de un porcentaje de 94,7% de AT1R en el caso de espermatozoides no fragmentados frente a 84,8% en fragmentados, y una intensidad de 14,7 en no fragmentados y 8,03 en fragmentados.

Para la AT2R se estableció una presencia de 87,5% con una intensidad de 14,5 en no fragmentados y 63,1% en fragmentados con intensidad 6,53.

Con respecto a la presencia de AT4/IRAP fue superior al 90% en ambos casos (96,2%-95,1%), sin embargo la intensidad en el caso de los no fragmentados fue de 42,4 y en el de fragmentados de 21,3.

El PRR y el MARS mostraron un porcentaje de 96,3 y 97,4% respectivamente para espermatozoides no fragmentados y del 48,2 y 88,7% respectivamente para el PRR y el MARS en el caso de fragmentados, las intensidades fueron de 89,5 en no fragmentados y 14,7 en fragmentados para la PRR, y el receptor MAS mostro una intensidad de 31,1 y 8,13 en no fragmentados y fragmentados respectivamente (Figura 62, Tabla 17).

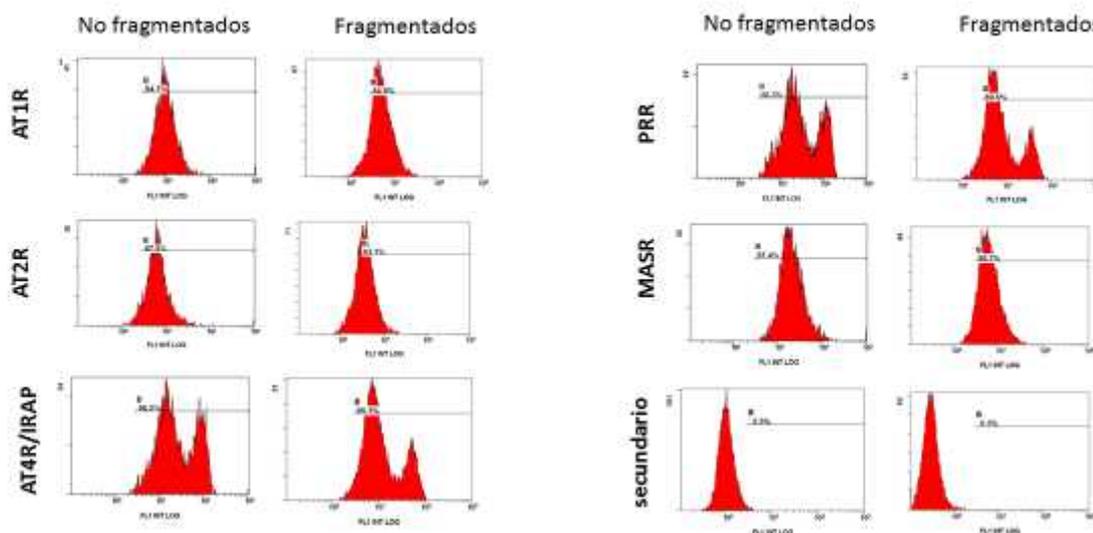


Fig. 62.- Receptores SRA por citometría de flujo

		% Espermatozoides positivos		Intensidad	
		No fragmentados	Fragmentados	No fragmentados	Fragmentados
Receptores	AT1R	94,73	84,84	14,7	8,03
	AT2R	87,45	63,1	14,5	6,53
	AT4R	96,2	95,1	42,4	21,3
	PRR	96,3	48,2	89,5	14,7
	MAS	97,37	88,7	31,1	8,13

Tabla 17.- Resultados receptores SRA por citometría de flujo.

La especificidad de los anticuerpos se determinó mediante el análisis de: 1) una muestra a la que no se le había añadido los anticuerpos primario y secundario (blanco); 2) la adición de inmunoglobulinas inespecíficas en concentraciones idénticas a las empleadas con los anticuerpos primarios (control de anticuerpo primario); y 3) omitiendo el anticuerpo primario antes de la adición del anticuerpo secundario (control del anticuerpo secundario) (Figura 62). Estos tres controles mostraron patrones de intensidad de fluorescencia similares, demostrando que la fluorescencia medida en las muestras se debía exclusivamente a la emitida por el anticuerpo específico de unión a los receptores AT1R, AT2R, AT4R/IRAP, PRR y MARS.

IV DISCUSIÓN

Discusión

1. Sobre los resultados clínicos obtenidos

Se calcula que en la actualidad un 15% de parejas necesitan ayuda médica para conseguir su deseo de paternidad. Algunas de estas parejas realizaron tratamiento de Inseminación Intrauterina. Este método de Reproducción Asistida está indicado en casos de esterilidad de origen cervical, patología seminal leve-moderada, anovulación, endometriosis y esterilidad de causa desconocida. Es necesario que la mujer tenga una buena reserva ovárica, y al menos una trompa permeable. La muestra seminal debe permitir la recuperación para la inseminación de al menos 5 millones de espermatozoides con motilidad progresiva.

En la literatura se han referido diversos factores pronósticos del resultado de las Inseminaciones: edad de la mujer, duración de la infertilidad, etiología de la infertilidad, contaje espermático, número de folículos maduros, concentración de E2 el día de la administración de la HCG y tipo de catéter usado. Sin embargo, los diferentes investigadores no están de acuerdo sobre la naturaleza y clasificación de estos criterios.

La edad de la mujer era el predictor más específico de éxito en todas las indicaciones. Así Merviel (2010) refiere una tasa de embarazo en curso en el 38,5% de las mujeres menores de 30 años versus 12,5 % para las mayores de 40 años. Nuojua-Huttunen y cols. (1999) encontraron una tasa de embarazo por ciclo 13,7% entre los 811 ciclos de inseminación intrauterina en mujeres menores de 40 años, el 4,1% para los mayores de 40 años, y ningún embarazo después de 42 años de edad. Sorprendentemente, en el estudio de Brzechffa (1998), la edad de las mujeres menores de 40 años no tenía influencia en la tasa de embarazo después de la estimulación con clomifeno citrato y HMG. Por el contrario, Bronte (1999) examinó 9963 ciclos y refirió una diferencia relacionada con la edad en la tasa de embarazo: un 18,9% hasta los 26 años, el 13,9% entre 26 y 30, 12,4% entre 31 y 35, 11,1% entre 36 y 40, el 4,7% entre 41 y 45, y 0,5 % mayores de 45 ($P < .001$). Por último, Goverde (2000) declaró que la edad de la mujer es el factor más importante que influye en la probabilidad de embarazo, sea cual sea el tratamiento elegido (IAC o FIV). En consonancia con lo presentado, en el grupo estudiado en la presente investigación, en que la edad de las mujeres era igual o

menor de 40 años, con una edad media de 35,88 años (rango 32-40 años), no hubo diferencias significativas entre el grupo con embarazo y el no gestante.

Otro factor de éxito para el embarazo después de la inseminación intrauterina es la duración de la esterilidad (Erdem et al., 2008). De hecho, se ha observado a menudo que cuanto menor sea la duración de la esterilidad, mayor será la probabilidad de embarazo. Nuojua - Huttunen y colaboradores (1999) informaron de diferentes tasas de embarazo si la esterilidad no superaba los 6 años (14,2 % vs. 6,1%). Sin embargo, otros autores no encuentran esta diferencia pronóstica. En nuestro grupo de estudio no encontramos como factor pronóstico la duración de la esterilidad, pero todas las parejas presentaban una esterilidad inferior a los 5 años, y era el primer ciclo de inseminación. No hubo diferencias significativas en la duración de la esterilidad entre las parejas embarazadas y las que no obtuvieron gestación.

El número de folículos > 16 mm es un importante factor pronóstico. Bronte y colaboradores (1999) analizando 9963 ciclos encuentran una tasa de embarazo del 7.6% para un folículo, 10.1% para dos folículos, 8.6% para tres folículos, y 14% para cuatro folículos ($P < .001$). Belaisch-Allart y colaboradores (1988) (con 880 ciclos) confirman estos resultados, con una tasa de embarazo clínico/ciclo de 13.8% con uno o dos folículos y 19.6% con al menos tres folículos. En nuestro estudio, el reclutamiento folicular fue entre 2 o 3 folículos > 16 mm.

Los estudios epidemiológicos indican que una edad materna superior a 40 años, es un factor de riesgo que incrementa la infertilidad y la tasa de abortos, sobre todo, si la mujer tiene más de 35 años (de la Rochebrochard et al., 2005). En reproducción asistida, es un factor controvertido. Así, Belloc (2008) en una revisión retrospectiva de 17000 ciclos, observó que la edad paterna avanzada (entendido como de ambos progenitores) influía negativamente en la consecución de embarazo y positivamente en la producción de abortos. Sin embargo, Bellver (2008), no encontró cambios en la calidad embrionaria, tasa de implantación ni en la tasa de abortos en 2700 ciclos de FIV. En un estudio reciente realizado por Dodge y presentado en el congreso de la SRHRE en el 2017, en el cual sobre 19000 ciclos (7.753 parejas) se realizó el estudio con franjas de edades en mujeres y hombres. El éxito disminuía cuando en la franja de edad de las mujeres era entre 40-42 años independientemente de la edad del varón. Pero comparando,

cuando la mujer era menor de 30 años y el hombre se situaba entre los 30 y 35 años la probabilidad de embarazo era 73%, mientras que si el varón estaba en la franja de 40-42 años la probabilidad de éxito disminuía al 46%, observándose alteraciones en los parámetros seminales, aumento del daño del ADN en los espermatozoides y alteraciones epigenéticas en el espermatozoides que afectan a la fertilización, la implantación o el desarrollo del embrión. Sin embargo, se sigue dando más importancia a la edad de la mujer, ya que los efectos de la edad masculina son más sutiles.

La edad media de nuestros pacientes fue de 37,35 años (rango 29-46 años). Durán y colaboradores (2002) concluyeron que el número de folículos, la edad de la mujer / el hombre y la calidad del ADN de los espermatozoides pueden predecir el resultado de IUI.

Se ha sugerido que el número de espermatozoides móviles inseminados es un factor predictivo potencial. Según Sakhel y colaboradores (2005), la tasa de embarazo por ciclo es del 8% con menos de 500.000 espermatozoides inseminados frente al 30,6 % para un recuento superior a 5 millones de espermatozoides móviles. En los 9963 ciclos estudiados por Bronte y colaboradores (1999), la tasa de embarazo fue de alrededor del 11 % por ciclo, cuando se inseminaron entre 4 y 6 millones de espermatozoides móviles. Un aumento adicional en el número no mejoró la tasa, pero el valor cae significativamente si el recuento desciende por debajo de 2 millones (5%). En nuestra Unidad, una recuperación inferior a 5 millones de espermatozoides móviles, es indicación de Fertilización *in Vitro*. En nuestra serie el REM siempre fue superior a 5 millones, salvo en un caso que resultó en embarazo.

La influencia de la morfología espermática en el resultado del tratamiento es controvertida. Burr y colaboradores (1996) observaron una caída en la tasa de embarazo del 18,2 % al 4,3 % por ciclo, cuando la teratozoospermia alcanza el 90% y según Belaisch-Allart y colaboradores (1988), una tasa de teratozoospermia mayor del 80% se opone a la IAC. Por otra parte, Wainer y colaboradores (2004) analizaron 2564 IACs e informó de que las tasas de embarazo no se vieron afectadas significativamente por teratozoospermia. En nuestra serie de estudio, los espermatozoides presentaban una morfología normal según el Manual de la

OMS del 2010, salvo en dos casos que la muestra el día de la inseminación fue ligeramente inferior.

Los intervalos de tiempo entre la recogida de semen, procesamiento e inseminación, pueden afectar a los resultados de la Inseminación Intrauterina. Yavas y Selub (2004) realizaron un estudio retrospectivo, encontrando mejores resultados cuando la muestra era obtenida en la clínica y no en casa. En nuestra serie de estudio, en ningún caso transcurrieron más de 60 minutos desde la recogida al comienzo del procesamiento, la media fue de $37,53 \pm 17,77$ minutos, siendo el mínimo de 15 minutos y el máximo de 60. El estudio de los tiempos en las diferentes fases del procesamiento seminal, demostró una diferencia significativa entre los grupos de embarazadas y no embarazadas en el intervalo medio de tiempo entre la obtención y la capacitación (61 vs. 76 minutos), coincidente con Ramón (2011).

La capacidad fertilizante del espermatozoide, no se limita solo a su movilidad, pudiendo intervenir otros factores lesivos en función del tiempo de exposición al plasma seminal como la exposición a los factores decapacitantes (Blegey y Quinn, 1982) que provocarían una prevención irreversible de la capacitación espermática y su incapacidad fertilizadora, así como la exposición prolongada a los radicales libres (ROS: reactive oxygen species) asociados a una menor capacidad fertilizante de los espermatozoides (Zorn et al., 2003) ya que inducen peroxidación lipídica, daño en el ADN y la apoptosis de los espermatozoides (Kothari et al., 2010).

El método de preparación de la muestra seminal, también tiene importancia. Aunque hay estudios controvertidos sobre cual, es la mejor técnica. Los gradientes de densidad, según un trabajo realizado por Rouen y colaboradores (2013), observaron que preparando la muestra seminal por gradientes de densidad se reducía la proporción de espermatozoides desequilibrados en los eyaculados de pacientes con reordenamientos cromosómicos pero esta eliminación es solo parcial y quedan algunos espermatozoides anormales. Sin embargo, para el caso de la fragmentación hay controversias. En el caso que se preparen las muestras por swim-up, el número de espermatozoides recuperados es menor respecto al gradiente, pero un incremento de la motilidad con respecto a la muestra inicial. Con la técnica *swim-up* se disminuye el número de espermatozoides móviles no

progresivos, aunque la técnica de gradiente permite mejor recuperación de espermatozoides móviles seleccionados totales. Tamayo (2017) evidenció un incremento en el porcentaje de células con potencial de membrana mitocondrial alto y un menor índice de fragmentación del ADN con la técnica de swim-up. En la Unidad de Reproducción Asistida del Hospital de Cruces, para la técnica de inseminación se utiliza la técnica de recuperación espermática de gradientes de densidad, dado que el número de espermatozoides recuperados es mayor por esta técnica.

2. Sobre la distribución de actividad enzimática observada

Los primeros trabajos relacionados con el estudio de la actividad peptidásica, su ubicación, características bioquímicas y sustratos, se remontan a principios de la década de los años 60 del siglo pasado, aunque posiblemente el verdadero interés por el estudio de la misma surgió a finales de la década de los 70 con el descubrimiento de que la inhibición de la ACE tenía efectos antihipertensivos (Ondetti y Cushman, 1977). A partir de este momento se multiplicaron las publicaciones relacionadas con el análisis de los enzimas proteolíticos y la regulación de sus péptidos bioactivos, en situaciones tanto fisiológicas como patológicas, tratando además de encontrar aplicaciones clínicas. Destacar que la mayoría de los estudios estuvieron encaminados a la descripción de las actividades enzimáticas en el sistema nervioso central, no en vano, la década de los años 90 fue declarada oficialmente como “la década del cerebro”. Actualmente existe un nutrido número de estudios sobre actividad peptidásica en tejidos tan diversos como: músculo esquelético, pulmón, corazón, hígado, riñón, intestino, próstata, etc. (Sentandreu y Toldra, 2007; Singh et al., 2008; Blanco et al., 2010; Pérez, 2011; Larrinaga et al., 2012; Thorek et al., 2013).

En el año 2002, Fernández y colaboradores describieron los niveles de actividad aminopeptidásica en diversas fracciones de semen humano normozoospermico. Los altos valores observados en las distintas fracciones (líquido seminal, prostasomas, fracción espermática citosólica y fracción de membrana), sugirieron que tanto las peptidasas como sus sustratos naturales podrían estar implicados en la fisiología seminal a través de la regulación de péptidos fisiológicamente activos, tanto en testículo como en fluido espermático

como en el propio espermatozoide. Posteriormente, limitaron su estudio a los enzimas reguladores de los niveles encefalinérgicos, es decir, PSA, APN y NEP. Según sus resultados, la actividad de la NEP quedó restringida a la membrana de los prostasomas y no se detectó actividad para PSA en ninguna de las fracciones seminales mientras que APN fue la única enzima presente en todas las fracciones del eyaculado (Subirán et al., 2008), mostrando una actividad muy superior a la encontrada en cerebro, riñón, corazón, músculo o pulmón (Fernández et al., 2002; Subirán et al., 2011). Con respecto al resto de peptidasas, las enzimas degradadoras de TRH (PGI y PEP) han sido localizadas en todas las fracciones seminales de varones normozoospermicos (Valdivia et al., 2004) y se ha detectado actividad DPPIV en plasma seminal y en la fracción espermática (capacitada) de pacientes astenozoospermicos (Ramón, 2011).

Cualitativamente hablando, estudios realizados en nuestro laboratorio (Valdivia, 2004) demostraron que, en muestras normozoospermicas, los mayores niveles de actividad peptidásica correspondían a la APN, seguida de la dipeptidil peptidasa IV y, a cierta distancia, el resto de enzimas ensayados. También resultados llevados a cabo por nuestro equipo de investigación en muestras astenozoospermicas encontraron que, a nivel espermático, y contrariamente a lo que ocurre en semen normozoospermico, los mayores niveles de actividad corresponden a la dipeptidil peptidasa IV, seguida de la Aminopeptidasa neutra. La Prolil aminopeptidasa y la aminopeptidasa básica muestran niveles similares entre sí, y parecidos a la pGlu-AP, pero en todos los casos unas 10 veces inferiores a los primeros descritos. La aminopeptidasa ácida presenta valores ligeramente inferiores a las cuatro anteriores, mostrando la endopeptidasa neutra valores mínimos de actividad (Ramón, 2011).

Con los resultados obtenidos en el presente trabajo, debemos de hacer diferentes consideraciones, dependiendo de la muestra ensayada (espermatozoide o liquido seminal) y las características de la misma (con fragmentación o sin ella).

Así, en lo referido a la fracción espermática en muestras normozoospermicas, observamos como los mayores niveles de actividad los obtenemos en la DPPIV, seguidos de la APN, APB y PSA. Los niveles más bajos

los obtuvimos con (por este orden) Cys-AP, Asp-AP y NEP. Estos resultados son más coincidentes con los obtenidos por Ramón (2011) y Fernández (2002), que con los de Valdivia en 2004, si viene la única nota discordante la representan los niveles de DPPIV y los de los enzimas reguladores de encefalinas. Curiosamente en nuestros resultados de muestras tanto normozoospermicas como con media y alta fragmentación, no hemos podido detectar actividad espermática de Glu-aminopeptidasa y Prolil Endopeptidasa, cuando los resultados de Ramón demostraban que, al menos en pacientes astenozoospermicos, los niveles de PEP resultaban ser similares a los de la APB.

Sí podemos remarcar que estos resultados son totalmente coherentes con los obtenidos al medir tanto el porcentaje de espermatozoides positivos como la intensidad del marcaje. Así, los niveles de actividad espectrofluorométrica de la endopeptidasa neutra son los más bajos de los observados de todas las peptidasas estudiadas, coincidente con que sólo el 2,5% de los espermatozoides normozoospermicos presenta inmunomarcaje positivo para este enzima. Sin embargo, la APN, segundo de los enzimas con mayor actividad fluorimétrica está presente en el 70% de los mismos.

A nivel de líquido seminal se mantiene un patrón similar, con los mayores niveles de actividad para la DPPIV (si bien del casi 1/3 de los observados a nivel espermático), seguidos de APN, APB y PSA. Niveles inferiores los observamos con Cys- y Asp-aminopeptidasas y los más bajos correspondieron a PEP y Glu-AP. Como podemos observar, a nivel de líquido seminal de pacientes normozoospermicos si se aprecian niveles (aunque bajos) de estos dos enzimas, a diferencia de lo observado en este ensayo a nivel espermático. Finalmente, y tal como era de esperar, no obtuvimos actividad seminal de Endopeptidasa Neutra.

Si estudiamos los niveles enzimáticos en muestras con fragmentación, tanto a nivel espermático como seminal, observamos una distribución similar a la obtenida con muestras normozoospermicas, y ello independientemente de las posibles diferencias significativas que pudieran existir entre ambos grupos. Es decir, los mayores niveles los seguimos observando en DPPIV, seguidos de APN, APB, PSA, Cys-aminopeptidasa, Asp-aminopeptidasa y NEP en espermatozoides con ADN no fragmentado y (de forma similar) DPPIV, APN, PSA, APB, Cys-

aminopeptidasa, Asp-aminopeptidasa y NEP en espermatozoides con ADN fragmentado; en plasma seminal los mayores niveles los presentan (en orden decreciente) la DPPIV, APB, APN, PSA, Cys-aminopeptidasa, Asp-aminopeptidasa, PEP Y Glu-aminopeptidasa.

Mención aparte merecen los resultados obtenidos con la única muestra que encontramos con una gran fragmentación, concretamente del 40%, lo que representaría no solo un porcentaje de fragmentación muy elevado sino también una apoptosis muy alta. Así, los mayores niveles de actividad DPPIV y APN en esta muestra con alto porcentaje de fragmentación se encuentran en espermatozoides y menores en plasma seminal, siendo los niveles de actividad en los gametos, y por orden decreciente, los siguientes: DPPIV, APB, PSA, APN, Cys-AP, Asp-AP y NEP. Resulta interesante observar la tremenda disminución de actividad observada en la PSA y APN en comparación con muestras sin fragmentación e, incluso, con las fragmentadas. A nivel de líquido seminal, nuevamente los mayores niveles los observamos con la DPPIV, seguidos (por este orden) de APB, APN, PSA, Cys-AP, Asp-AP, PEP y APA. En este caso se aprecia un descenso importante en los niveles de PSA.

Antes de continuar con la discusión de estos aspectos, resulta entonces interesante constatar cómo, independientemente de que se trate de muestras normozoospermicas como con fragmentación moderada, los niveles de actividad se mantienen, es decir, la importancia relativa de cada uno de los enzimas ensayados es independiente del proceso de fragmentación. Y ello tanto a nivel espermático como seminal. Algo similar, aunque con la precaución del número de muestras por un lado y de la radical diferencia de actividad obtenida por otro, podríamos comentar en relación con la muestra de gran fragmentación. En este caso parece mantenerse la importancia de la actividad de la DPPIV y disminuyen de manera notabilísima la importancia cuantitativa de los enzimas PSA, APN y Asp-AP.

Como hemos venido comentando en la introducción, la DPPIV está involucrada en la activación e inactivación de un gran número de citoquinas y quimosinas (Havre et al., 2008) y además de su acción sobre péptidos bioactivos y su papel en el sistema inmune, esta aminopeptidasa tendría especial relevancia

en el transporte específico de algunos dipéptidos y tripéptidos (Tiruppathi et al., 1990). A pesar de ser una glicoproteína de membrana, que presenta un extremo amino terminal de tan sólo 6 aminoácidos hacia el citoplasma, un dominio hidrofóbico que la ancla a la membrana y un gran dominio extracelular en el que se haya el centro activo. También se ha visto, que en ocasiones, la pérdida del extremo amino terminal insertado en la membrana, puede originar su presencia en forma soluble en suero humano, líquido cerebroespinal, líquido seminal y otros fluidos corporales (Iwaki-Egawa et al., 1998; Carl-McGrath et al., 2006; Ramón, 2011), por lo que es válido encontrar actividad de este enzima tanto a nivel espermático como a nivel seminal, si bien resulta llamativo el hecho de que esta sea la actividad enzimática más alta hallada en ambas fracciones. Así, y como planteamiento de lo anterior, podemos resaltar que se ha encontrado actividad DPP en testículos y epidídimos de algunos mamíferos (bovinos y ratas), siendo esta actividad es causada por DPP 4 en el epidídimo, mientras que en los testículos es atribuida a DPP8/9, pero no se encontró actividad DPP en los espermatozoides a excepción de los incrustados en el epitelio, justo antes de su liberación a la luz y en las espermátides que presentaban una tinción específica para DPP9. (Dubois et al., 2009).

Los niveles de péptidos opioides están controlados por degradación enzimática, siendo sus enzimas reguladores los más estudiados hasta el momento. Específicamente, son dos las enzimas degradadoras de encefalinas: la APN (recordemos que este enzima también participa en la regulación del SRA) y la PSA. Ambas enzimas presentan una actividad particularmente elevada en semen, siendo significativamente superior con respecto a actividades presentes en otros tejidos corporales (Fernández et al., 2002). Sin embargo, actualmente no se conoce con exactitud la función principal de ambas enzimas en la fertilidad masculina.

También han sido implicadas en el control de los niveles de opioides endógenos las enzimas APB y APA, si bien estas actividades parecen participar también en la regulación de los niveles de otros péptidos. Así, entre los sustratos naturales de la APB se encuentran las bradiquininas, encefalinas, somatostatina, Angiotensina III y kalidinas (McLellan et al., 1988; Foulon et al., 2004). La APA es uno de los principales enzimas que regulan la concentración de Angiotensina II en

el ovario humano; es más, se ha detectado en líquido folicular una inmunoreactividad *AngII-like* 10 veces mayor que en plasma (Culler et al., 1986).

Como hemos presentado anteriormente, al menos en lo en lo referido a la fracción espermática en muestras normozoospermicas, pero que podríamos extender a muestras con fragmentación (incluso elevada), observamos cómo tras los mayores niveles de actividad obtenidos con la DPPIV, se siguen de la APN, APB y PSA, como ya hemos mencionado principales enzimas implicados en la regulación de los niveles opioidérgicos. Estos péptidos opioides parecen estar implicados en la movilidad espermática, aunque los resultados encontrados hasta la actualidad son contradictorios. Por un lado, la movilidad espermática desciende en presencia de altas concentraciones de encefalinas y en presencia de la μ -endorfina (Fraïoli et al., 1982, Sastry et al., 1991). Además, se ha visto que, análogos sintéticos de la met-encefalina (DAMME) produjeron también un descenso de la movilidad espermática debido a una reducción en el consumo de O_2 , sin afectar en la viabilidad del espermatozoide (Foresta et al., 1985). Sin embargo, otros autores han observado que las encefalinas a bajas concentraciones son necesarias para mantener la movilidad espermática (Fujisawa et al., 1992). Finalmente, algunos estudios, incluso, no detectan efecto alguno de la met-encefalina sobre la movilidad espermática (Fraïoli et al., 1985). Agirregoitia y colaboradores (2006) propusieron que el efecto bivalente de los opioides podría ser debido a la activación de distintos receptores ya que la incubación de espermatozoides humanos con morfina (agonista del receptor μ -opioides) o con naltrindol (antagonista del receptor μ -opioides) inhibe la movilidad espermática. Además, la naloxona, antagonista con afinidad diferencial por los receptores opioides, modula la movilidad dependiendo de la dosis del antagonista utilizado (Albrizio et al., 2005; Mari et al., 2005). Aunque el efecto de los péptidos opioides es contradictorio, algunos autores sugieren que un nivel adecuado de encefalinas sería necesario para el mantenimiento de la movilidad espermática ya que pacientes con déficit en la movilidad espermática (astenozoospermia) presentan unos niveles de met-encefalina significativamente menores en su plasma seminal (Fujisawa et al., 1996). En recientes estudios, se ha visto un incremento en el reconocimiento del papel que juegan los péptidos presentes en el plasma seminal sobre la motilidad espermática; así las peptidasas, tales como la

endopeptidasa neutra (NEP) y la aminopeptidasa N (APN), poseen efectos adversos significativos sobre la motilidad espermática. Curiosamente, varios estudios recientes demuestran que existe un péptido endógeno inhibidor de NEP / APN llamado opiorphin presente en el plasma seminal humano, que sugiere que promueve la motilidad del espermatozoide y pudiendo influir positivamente en la motilidad del espermatozoide (Jayme et al., 2014).

Además del sistema opioide, otro importante modelo de regulación fisiológica es el sistema Renina-Angiotensina (SRA), del que existen evidencias de que la funcionalidad del aparato reproductor masculino depende de la presencia de un sistema renina-angiotensina local. Se ha observado infertilidad en animales carentes de los genes que codifican componentes SRA, como el enzima de conversión de la angiotensina (ECA) o angiotensinógeno (Hagaman et al., 1998). Además, la distribución de los componentes de SRA, los receptores y las actividades de la angiotensina asociados demuestran funciones que están exclusivamente relacionadas con el proceso reproductivo (Leung y Sernia, 2003; Saridogan et al., 1996). El sistema reproductor masculino presenta varios lugares de actividad SRA intrínseca. De hecho, todos los componentes de SRA se han localizado morfológica y topográficamente. Se ha demostrado que son sensibles a los andrógenos y a la hipoxia, y que la angiotensina tiene influencia tubular y, por consiguiente, de secreción de fluidos.

Componentes del SRA se han encontrado en los testículos, epidídimo, los conductos deferentes, la próstata y el semen. Receptores de la angiotensina II tipo 1 y, en menor medida, de tipo 2 están muy extendidos, y receptores de la angiotensina IV, han sido localizados en la próstata. La angiotensina II se encuentra también en el plasma seminal, además en concentraciones más elevadas que en la sangre, aunque no existen variaciones en cuanto al número de espermatozoides y su movilidad (O'Mahony et al., 2000). Las funciones del SRA en los procesos locales de los sitios antecitados son todavía inciertos y aún no se han dilucidado totalmente, aunque hay pruebas de la participación en la contractilidad tubular, la espermatogénesis, la maduración de espermatozoides, la capacitación, la exocitosis acrosomal y la fertilización. (Vinson et al., 1995; O'Mahony et al., 2000; Fraser et al., 2001).

En el presente estudio hemos incluido un amplio espectro de enzimas que participan en la regulación de este sistema renina angiotensina, como la Asp-AP, APA (Glu-AP), APB, APN, PEP, NEP y Cys-aminopeptidasas, siendo la importancia cuantitativa de cada una de ellas distinta tanto si lo consideramos desde un punto de vista de actividad como de fragmentación y muestra. Así, a nivel de los gametos, los mayores niveles de actividad los observamos en la APN, seguida de APB, Cys-AP, Asp-AP y NEP. Curiosamente en nuestros ensayos no hemos sido capaces de detectar actividad de APA y PEP. A nivel de líquido seminal, los mayores niveles de estas enzimas los observamos con la APB, seguida de APN, Cys-AP, Asp-AP, PEP y APA. Dos cuestiones: a este nivel si hemos encontrado actividad APA y PEP (aunque con niveles bajos), y en segundo lugar y como era de esperar no hemos observado actividad NEP.

Observamos cómo, en todas las enzimas estudiadas, salen valores inferiores de actividad en plasma seminal con respecto a las observadas en espermatozoide, salvo en el caso de la APB que presenta una media de actividad superior en plasma seminal. Por otro lado la APN y APB presentan mayor concentración en plasma seminal en aquellas muestras que no presentaban fragmentación en el ADN de los espermatozoides, sin embargo cuando se realiza la medida en espermatozoides solo se aprecian valores inferiores de APN en los gametos fragmentados con respecto a los no fragmentados, sin presentar diferencias estadísticamente significativas. Este aspecto lo ampliamos un poco más en el siguiente apartado, al incluir la determinación de la APN por citometría de flujo.

Finalmente, también han sido incluidas en este proyecto de investigación enzimas que participan en la regulación de los niveles oxitocinérgicos (PEP y Cys-AP), si bien la funcionalidad principal propuesta para este péptido ha sido el útero grávido: La oxitocina es uno de los agentes uterotónicos más potentes y es clínicamente utilizado para inducir el parto. De hecho, la Cys-AP ha sido considerada en humanos la peptidasa placentaria más importante a nivel de membrana, durante el embarazo se ha detectado en plasma una forma circulante, resultante del corte proteolítico llevado a cabo en el dominio extracelular de la peptidasa (Nomura et al., 2005). Esta actividad en plasma aumenta significativamente durante el tercer trimestre de gestación, para experimentar un

efecto *plateau* justo antes del parto (Mizutani et al., 1982; Mustafa et al., 2004; Pham et al., 2009). Debido a que dos de sus principales sustratos, oxitocina y vasopresina, generan contracción y vasoconstricción uterina, se ha establecido que la Cys-AP contribuye al desarrollo normal del embarazo y suprime el dolor mediante la regulación del nivel de estas hormonas en suero (Rogi et al., 1996; Horio et al., 1999).

A pesar de ello, se ha encontrado un sistema completo de oxitocina en testículo, epidídimo y próstata (Frayne y Nicholson, 1998). En el testículo, la oxitocina regula la contractilidad de los túbulos seminíferos, facilitando el transporte de los espermatozoides inmóviles al epidídimo y modula, de manera autocrina/paracrina, la esteroidogénesis al incrementar la actividad alfa-reductasa testicular (Nicholson y Jenkin, 1995). La oxitocina está presente en la próstata en concentraciones mayores que en el plasma sanguíneo, estando implicada en la contracción prostática y la expulsión de sus productos de secreción. Además, puede estimular el crecimiento de la próstata en ratones, por incremento de la actividad mitótica en el epitelio glandular (Plecas et al., 1992). Se ha sugerido que la oxitocina actúa como un factor paracrino regulando el crecimiento celular a través de su actividad sobre la 5α reductasa (Nicholson, 1996).

La actividad Cys-AP se ha descubierto como proteína transmembrana de tipo II, no solo en placenta, sino también en otros tejidos tales como cerebro, corazón, riñón, colon, próstata, ovario y músculo esquelético (Keller et al., 1995; Rogi et al., 1996; Laustsen et al., 1997; Czech y Corvera, 1999; Moeller et al., 1999; Demaegdt et al., 2004). Se ha observado elevada actividad PEP en el córtex renal, células epiteliales, fibroblastos, testículos, linfocitos, trombocitos, placenta y ovario porcino (Mizutani et al., 1984; Pereira et al., 2009) mientras que esta actividad en fluidos corporales ha sido baja (Goossens et al., 1996a). Por ello no puede resultar extraño que no obtengamos actividad PEP en fracción espermática en ninguno de los casos ensayados (normozoospermicos y fragmentados), y que los niveles de Cys-AP (única aminopeptidasa de membrana descrita como degradadora de oxitocina) sean bajos tanto a nivel seminal como espermático, si bien tenemos que considerar que este último enzima:

-No es el que presenta los niveles más bajos y

-Ha sido descrita en tejidos tan dispares como cerebro, corazón, riñón, músculo liso, células adiposas, colon, próstata y ovario (Czech y Corvera, 1999; Moeller et al., 1999; Demaegdt et al., 2004).

3. Sobre las modificaciones espermáticas y seminales según el grado de fragmentación

El estudio de la infertilidad masculina se ha basado tradicionalmente en el análisis de semen clasificado de acuerdo con las normas del Manual de la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2010). Este análisis se basa en el número de espermatozoides, la motilidad, y la morfología espermática, aunque sus criterios de normalidad ofrecen un valor pronóstico limitado en la predicción de embarazo (Irvine et al., 1994). Aunque existe variación en la estimación, aproximadamente 15% de los pacientes con infertilidad por factor masculino muestran espermogramas normales (Agarwal et al., 2005), como resultado surgieron las pruebas de morfología con criterios estrictos (Kruger et al., 1988) para proporcionar información adicional acerca de la calidad seminal. Sin embargo, la fragmentación del ADN se ha convertido en la última década en un importante marcador de la calidad del espermatozoide en función de su posible relación con diversos parámetros críticos tanto *in vivo* como en reproducción asistida, incluido el desarrollo del cigoto-embrión y la calidad, la implantación, el aborto y la salud del recién nacido (Aitken, 2004; Tesarik et al., 2004; Tomlinson et al. 2001; Schulte et al., 2010; Shamsi et al., 2010, 2011; Bungum, 2012) y proporcionar información adicional.

Por lo tanto, parece razonable sugerir que con las técnicas de reproducción asistida se puede compensar el deterioro de la integridad de la cromatina de esperma, en particular, si es el ICSI como el método de fertilización elegido y sólo el espermatozoide morfológicamente normal se selecciona para la microinyección. Además, la selección de espermatozoides morfológicamente normales para ICSI y la elección de embriones de buena calidad para la transferencia en la FIV / ICSI puede reducir los efectos potencialmente adversos del daño en el ADN del espermatozoide en el resultado de las técnicas de reproducción asistida. En un trabajo realizado por Ming-Huei Lin (2008) curiosamente, observaron mayores tasas de aborto cuando el valor de la estabilidad del ADN superó el 15% en el

grupo de FIV pero no así en grupo ICSI. Las tasas de aborto mediante ICSI no parecían estar relacionados con la alta estabilidad del ADN (high DNA stainability (HDS). Por lo tanto, la ICSI aparentemente compensa las anomalías funcionales espermáticas asociadas con HDS y eliminaba cualquier influencia significativa que una alta proporción de espermatozoides inmaduros pudiese tener en las tasas de aborto. Es posible que sólo el esperma morfológicamente maduro fuese seleccionado para inyectar en ICSI. También observaron que un índice de fragmentación alta (> 27%) (DNA fragmentation index (DFI) se asoció con un mayor índice de aborto espontáneo, aunque no se encontró significación estadística.

Un aspecto interesante para proporcionar información adicional acerca de la calidad seminal sería comparar precisamente si la fragmentación del ADN espermático estaría relacionada con posibles alteraciones en el metabolismo peptídico, tanto en el propio espermatozoide como a nivel del líquido seminal que lo cobija.

Precisamente, los resultados obtenidos en el presente trabajo describen por vez primera en la literatura científica una comparativa del metabolismo peptídico entre muestras normozoospermicas y apoptóticas con diferentes niveles de fragmentación del DNA, y todo ello tanto a nivel espermático como seminal. Como hemos comentado en el apartado de Objetivos, uno de ellos era tratar de observar si alguno/s de las actividades enzimáticas ensayadas pudieran servir como marcador en dichos niveles de fragmentación y, con ello, previo al tratamiento de fertilidad, conocer a priori la calidad seminal y con ello las posibilidades de éxito reproductivo.

Lamentablemente, con los resultados obtenidos no podemos apreciar esta conclusión, ya que aunque observamos diferencias en determinados enzimas y muestras, la desviación típica parece demasiado alta, con lo que, al menos, se deberían incluir un número mucho mayor de muestras, con lo que dejaría de ser un estudio metabólico/enzimático para transformarse en un ensayo epidemiológico.

En primer lugar, y en relación con las actividades seminales observadas, no se aprecian diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los

ensayos analizados. Esta situación no debería ser sorprendente, ya que el líquido seminal que cobija a los gametos no tendría por qué verse afectado por la presencia de espermatozoides con fragmentación. En primer lugar, el grado de fragmentación del DNA espermático observado variaba entre el 20 y el 40% y, en segundo lugar, recordemos que los gametos con fragmentación son también capaces de fertilizar el ovocito.

En segundo lugar, en relación con el metabolismo de encefalinas a nivel espermático, tanto la PSA como la APN presentan modificaciones de actividad al comparar muestras fragmentadas e integrales, si bien en el caso de la peptidasa neutra los descensos no resultan ser significativos. Sin embargo, al estudiar la actividad de la APN/CD13 por citometría de flujo, técnica más exacta y que discrimina claramente la fracción de membrana y, por tanto, sin “contaminación” de la fracción soluble, observamos un patrón mucho más marcado, ya que el porcentaje de espermatozoides normozoospermicos que presenta esta actividad de membrana es de casi el 70%, mientras que en los espermatozoides con fragmentación representa solo el 30%. Este aspecto se ve además reflejado en el grado de intensidad de marcaje, que alcanza un valor de 53,8 en normos y de solo un 7 en fragmentados. Si comparamos el otro enzima implicado en la regulación opioidérgica como es la NEP, observamos que el porcentaje de espermatozoides normozoospermicos que muestran marcaje de membrana para este enzima es del 2,55%, frente al 35,68 de espermatozoides con fragmentación. Curiosamente la intensidad se invierte: 10 para normos frente al 2,4 para fragmentados. Es decir que tanto el porcentaje presencial como la inmunorreactividad son significativamente inferiores en gametos que presentan fragmentación del DNA.

Todo esto quiere decir que, al menos parcialmente, el metabolismo opioide está alterado al comparar ambos tipos de espermatozoides. La intensidad de marcaje de ambas enzimas es claramente inferior en muestras que presentan fragmentación del DNA espermático. Esto resulta coherente, como mostraremos más adelante, con los resultados de intensidad de marcaje de los tres receptores de opioides, significativamente inferiores en muestras fragmentadas.

Sí resultan muy llamativos, aunque resulta necesario incluir un mayor número de muestras que lo corroboren (en su caso), los niveles de actividad de

los tres enzimas reguladores de encefalinas (PSA, APN y APB) en la muestra muy fragmentada. Este dato además se aprecia tanto a nivel espermático como seminal y resulta interesante, ya que se produce fundamentalmente en estos enzimas y no en el resto de los ensayados.

Como hemos mencionado anteriormente, además del sistema opioidérgico, otro importante modelo de regulación fisiológica es el sistema Renina-Angiotensina, del que existen evidencias de que la funcionalidad del aparato reproductor masculino depende de la presencia de un sistema renina angiotensina local. Se ha observado infertilidad en animales carentes de los genes que codifican componentes SRA, como el enzima de conversión de la angiotensina (ECA) o angiotensinógeno (Hagaman et al., 1998). Además, la distribución de los componentes de SRA, los receptores y las actividades de la angiotensina asociados demuestran funciones que están exclusivamente relacionadas con el proceso reproductivo (Leung y Sernia, 2003; Saridogan et al., 1996). Así, la Angiotensina II (A II) ha sido detectada en el plasma seminal, en concentraciones de tres a cinco veces superiores a las halladas en el plasma sanguíneo (O'Mahony et al., 2000). Sin embargo, la infertilidad masculina no parece estar relacionada con los bajos niveles de A II esperados en los ratones carentes del gen que codifica para la ACE, enzima encargada de la formación de la A II (Paul et al., 2006). Se ha descrito que la A II es un modulador de la actividad espermática, ya que está implicada en procesos como la movilidad y la reacción acrosómica (Foresta et al., 1991; Vinson et al., 1997; Gur et al., 1998; Kohn et al., 1998a; Wennemuth et al., 1999; Sabeur et al., 2000). En cuanto a su implicación en la movilidad, la A II aumenta tanto el porcentaje de espermatozoides móviles, como su velocidad lineal (Vinson et al., 1996). Aunque la Angiotensina (1-7) no ha sido localizada en espermatozoides maduros, la existencia de su receptor sugiere que éstos podrían ser influidos por modificaciones en la producción local de este péptido (Reis et al., 2010).

Sin embargo, los enzimas reguladores de los niveles de distintos componentes del sistema renina angiotensina (entiéndase: aminopeptidasas reguladoras) ensayados en este estudio no muestran alteraciones significativas cuando comparamos los niveles de actividad en muestras normo y fragmentadas, y todo ello tanto a nivel seminal como espermático, y a diferencia de lo que ocurría

con los niveles de actividad opioidérgica en la muestra muy fragmentada, la actividad ensayada en este caso tampoco muestra alteraciones significativas. Al estudiar por citometría de flujo al enzima convertidor de angiotensina (ACE), se aprecia un mayor número de espermatozoides fragmentados marcados frente a los controles (89% frente al 51%) y, en este caso, el grado de intensidad de marcaje es también muy superior en esperma fragmentado que en normozoospermico (7,5 frente a 2). De ello parece deducirse que la actividad del ACE está claramente incrementada en los espermatozoides con fragmentación, lo que parecería indicar un incremento en la formación de angiotensina II sin afectar a la degradación posterior de la misma. Por ello podríamos quizá sugerir que sólo una parte del metabolismo del SRA local parecería tener influencia (o estar influido) a nivel de integridad del ADN del espermatozoide. Resulta necesario comentar y discutir (más adelante) las alteraciones que también hemos observado en los receptores del sistema, por lo que ampliaremos este aspecto en la parte final de la Discusión (Integración de Resultados).

En relación con el metabolismo de la oxitocina, se producen dos situaciones:

-No encontramos niveles de actividad PEP en espermatozoide, a diferencia del líquido seminal (aunque con niveles muy bajos), y

-No se aprecian diferencias significativas de actividad al comparar ambos niveles enzimáticos (Cys-AP y PEP) en muestras íntegras, fragmentadas y muy fragmentadas, y ello ni a nivel espermático ni a nivel seminal. En el testículo, la oxitocina regula la contractilidad de los túbulos seminíferos, facilitando el transporte de los espermatozoides inmóviles al epidídimo y modula, de manera autocrina/paracrina, la esteroidogénesis al incrementar la actividad alfa-reductasa testicular (Nicholson y Jenkin, 1995). Con nuestros resultados parece ser que la oxitocina participaría regulando el movimiento espermático pero no directamente como los opioides, sino indirectamente a través de los propios túbulos seminíferos.

Tenemos que considerar que este trabajo es uno de los primeros que intenta relacionar el metabolismo peptídico con el grado de fragmentación espermática, por lo que no resulta fácil discutir estos resultados. Por ejemplo, se ha descrito que existe un componente proteínico como el péptido -amiloide (A)

en su forma insoluble, que circula en concentraciones bajas en el líquido cefalorraquídeo y sangre. En concentraciones fisiológicas actúa como factor neurotrófico y neuroprotector, sin embargo, con el envejecimiento y sobre todo en la enfermedad de Alzheimer se acumula, causando neurotoxicidad. La toxicidad del A β se ha asociado a la generación de radicales libres que causan peroxidación de lípidos y oxidación de proteínas entre otros daños. (Manzano-León et al., 2006). El estrés oxidativo se ha asociado con alteraciones en la movilidad espermática, principalmente como resultado de la peroxidación lipídica y el agotamiento de los niveles de ATP. Además, los altos niveles de actividad redox por los espermatozoides se han correlacionado con la inhibición de la reacción acrosómica y de la fusión espermato-ocito (Aitken et al., 2004).

Los espermatozoides pueden generar niveles bajos ROS, las cuales participan en el proceso de capacitación y culminan en la fertilización. En condiciones de leucocitospermia e infecciones bacterianas pueden generar una concentración elevada de ROS en el semen. Los hallazgos de Potts y colaboradores (2000) indican que los niveles de ROS seminal en individuos con infección genital con ureaplasma, aún sin evidencia de leucocitospermia, fueron casi dos veces mayores que en los individuos sin infección. Los micoplasmas adheridos a las células huésped pueden liberar ROS, principalmente peróxido de hidrógeno y radicales superóxido que dañan directamente la membrana celular (Rottem, 2003; Avron et al., 1995; Potts et al., 2000). Los micoplasmas adheridos a los espermatozoides podrían inducir la hiperproducción de ROS y como consecuencia la reducción de la fluidez membranal y alteración de la capacidad fertilizante (Rottem, 1998, 2003; Miller et al., 1997; Aitken et al., 2004).

4. Sobre los receptores de opioides

La presencia de los receptores opioides delta-DOR (δ), mu-MOR (μ) y kappa-KOR (κ) en la membrana espermática humana fue descrita por vez primera por nuestro equipo de investigación en el año 2006 (Agirregoitia et al.). Inicialmente ello parecía indicar que los péptidos opioides podrían regular la función reproductora ejerciendo un efecto directo sobre los espermatozoides.

En un reciente estudio se ha demostrado por primera vez que las células germinales masculinas expresaron MOR activo, DOR y KOR en ratón, y las

principales conclusiones han sido que los receptores activos mu-opioides, delta-opioides y kappa-opioides estaban presentes en las células germinales masculinas en los testículos de ratón. Por otro lado, que los receptores opioides mu-opioides, delta-opioides y kappa-opioides están implicados en la regulación de la espermatogénesis del ratón, y que los tres receptores opioides parecían estar implicados en la regulación de la meiosis masculina en ratón modificando la expresión génica de las proteínas del complejo sinaptonémico. Estos estudios contribuyen a resolver varias cuestiones relativas al papel de los receptores opioides en la espermatogénesis para el diagnóstico y tratamiento de la infertilidad masculina (Estomba et al. 2016), como que la administración crónica de morfina puede reducir la fertilidad en ratas (Cicero et al., 2002) o que la administración de metadona durante 3 días puede producir espermatozoides con aberraciones cromosómicas en el ratón (Badr et al., 1979).

Como también hemos indicado, los propios péptidos opioides parecen también estar implicados en la movilidad espermática, aunque los resultados encontrados hasta la actualidad son contradictorios. Por un lado, la movilidad espermática desciende en presencia de altas concentraciones de encefalinas y en presencia de la μ -endorfina (Fraioli et al., 1982, Sastry et al., 1991). Además, se ha visto que análogos sintéticos de la met-enkefalina (DAMME) produjeron también un descenso de la movilidad espermática debido a una reducción en el consumo de O_2 , sin afectar en la viabilidad del espermatozoide (Foresta et al., 1985). Sin embargo, otros autores han observado que las encefalinas a bajas concentraciones son necesarias para mantener la movilidad espermática (Fujisawa et al., 1992). Finalmente algunos estudios, incluso, no detectan efecto alguno de la met-enkefalina sobre la movilidad espermática (Fraioli et al., 1985). Por ello nuestro grupo de investigación (Agirregoitia et al., 2006) propuso entonces que el efecto bivalente de los opioides podría ser debido a la activación de distintos receptores ya que la incubación de espermatozoides humanos con morfina (agonista del receptor μ -opioides) o con naltrindol (antagonista del receptor μ -opioides) inhibe la movilidad espermática. Además, la naloxona, antagonista con afinidad diferencial por los receptores opioides, modula la movilidad dependiendo de la dosis del antagonista utilizada (Albrizio et al., 2005; Mari et al., 2005).

Parece entonces claro que dado que tanto los propios opioides, como sus sistemas de regulación y los tres tipos de receptores han sido descritos en espermatozoides humanos (Fernández et al, 2002; Agirregoitia et al., 2006; Albrizio et al., 2006), existiría una acción directa de los EOP sobre las células espermáticas, y por lo tanto, sobre la capacidad reproductora del hombre.

Con los resultados que hemos obtenido en el presente trabajo, en primer lugar al estudiar las micrografías de los receptores espermáticos, no podemos apreciar diferencias en el patrón de inmunomarcaje entre células normozoospermicas y fragmentadas, es decir, la localización en la membrana celular parece mantenerse independientemente de que el espermatozoide esté fragmentado o no. Estos resultados de distribución de los tres receptores son bastante coincidentes con los previamente descritos por Agirregoitia y colaboradores (2006). Así, mediante inmunomarcaje, observamos que los receptores delta opioides se encuentran en la membrana plasmática de la cabeza del espermatozoide (sobre la región acrosomal), así como en la región media (cuello). Se detecta también una inmunotinción intensa y uniformemente distribuida a lo largo de la cola del espermatozoide. Por otro lado, se observa inmunotinción del receptor opioide κ en la membrana plasmática de la cabeza del espermatozoide, en la región media, y en la cola. En el caso del receptor opioide μ se observa inmunomarcaje con mayor intensidad en la región ecuatorial / postacrosomal de la cabeza, en la pieza intermedia y en la cola. En el caso de omitir el anticuerpo primario anti-DOR, -KOR o -MOR antes de la adición del anticuerpo secundario, la tinción fluorescente patrón no es evidente.

Por tanto, el inmunomarcaje de receptores de opioides no parece ser un sistema válido como marcador de fragmentación del DNA/apoptosis en el espermatozoide humano. Sin embargo, al estudiarlos por un lado los porcentajes de espermatozoides que expresan los receptores de opioides y por otro la intensidad del marcaje en cada caso, sí podemos apreciar algunas diferencias entre ambos tipos de muestras ensayadas.

Desde un punto de vista del porcentaje de gametos que expresan los receptores, vemos que prácticamente no hay diferencias entre ambos tipos de muestras: 97,7% frente al 94,3% en receptores μ , 87,8% frente al 92% en delta

receptor y 94% frente al 90,7% en receptores kappa. Por tanto, el grado de expresión de estos tres diferentes tipos de proteínas de membrana no parecen alterados por el hecho de que el DNA del gameto se encuentre ó no fragmentado. En cambio sí se ve afectada la intensidad del marcaje, siendo en los tres casos significativamente inferior en los espermatozoides que presentan fragmentación. Esto es coherente con los resultados de porcentaje/intensidad observados en los enzimas reguladores de opioides: los niveles de APN/CD13 son significativamente inferiores en gametos con fragmentación y con ello se vería disminuida la degradación opioidérgica (niveles por tanto más altos), coherente con el hecho de que los espermatozoides fragmentados presentan menor inmunorreactividad (menor capacidad de respuesta) en los tres receptores ensayados.

Por tanto, independientemente del posible valor como marcador de la técnica de citometría de flujo para predecir la integridad del ADN del espermatozoide, parece claro que la fragmentación en el mismo produce cambios en la intensidad del marcaje, y pensamos que ello conllevaría una menor capacidad de respuesta a los péptidos opioides implicados en la regulación de la movilidad/reacción acrosómica.

5. Sobre los receptores del SRA

Como ya hemos indicado, el sistema renina-angiotensina (SRA) es un sistema peptídico con características endocrinas, principalmente conocido por su importancia en el mantenimiento de la presión arterial y la homeostasis de electrolitos y fluidos, a través de mecanismos renales y no renales (Paul et al., 2006). Sin embargo, además de esta función sistémica, también se ha demostrado su existencia en distintos órganos y tejidos. Esto ya se sospechaba desde hace tiempo (de Gandarias et al., 1984), aunque es más reciente la demostración de sus diversas funciones específicas, así como su presencia en el interior de distintas células (Herr et al., 2013). Todo esto supone que el SRA no sólo actúa a nivel sistémico sino también a nivel local e intracelular, mediante mecanismos paracrinós y autocrinós (Atlas, 2007; Fyhrquist y Saijonmaa, 2008). Estos SRA locales se caracterizan por: 1) la presencia de distintos componentes, como angiotensina y las enzimas de conversión; 2) la síntesis local de A II y otras angiotensinas; y 3) la unión a sus receptores específicos, que como resultado

desencadena una respuesta fisiológica local (Fyhrquist y Saijonmaa, 2008). Otra de las características de estos SRA locales, es que pueden actuar como entidades aisladas, o interactuando con el SRA sistémico y/o con otros sistemas moleculares (Paul et al., 2006; Fyhrquist y Saijonmaa, 2008).

Los espermatozoides para llevar a cabo correctamente su función, deben pasar por una serie de procesos como son la adquisición de la movilidad, la capacitación, la reacción acrosómica, y el reconocimiento, unión y fecundación del oocito (Yoshida et al., 2008; Sakkas et al., 2015). Estos procesos están regulados por la actuación conjunta de diversos mecanismos moleculares, entre los cuales se encuentra el SRA (Yoshida et al., 2008; Vinson et al., 1997; Speth et al., 1999). Así, tanto la presencia y la distribución de los componentes del SRA en los espermatozoides, como la actividad de las angiotensinas asociadas, sugieren que este sistema estaría regulando la función reproductora, actuando directamente sobre la capacidad fértil de los espermatozoides (Leung y Sernia, 2003).

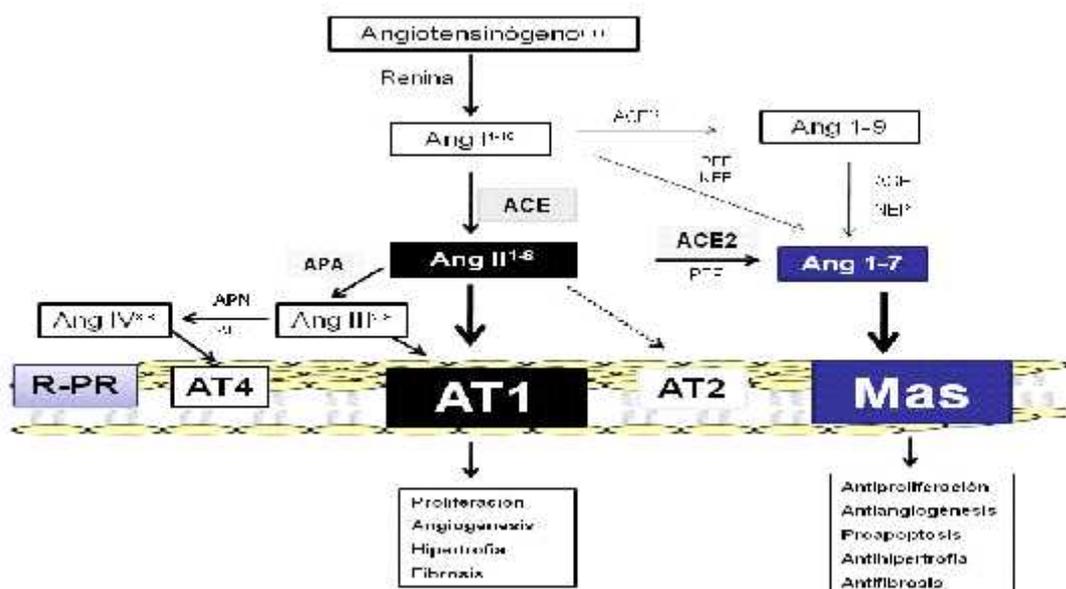
Hemos presentado anteriormente en la propia Discusión cómo los enzimas reguladores de los niveles de distintos componentes del sistema renina angiotensina ensayados en este estudio no muestran alteraciones significativas cuando comparamos los niveles de actividad en muestras normo y fragmentadas, y todo ello tanto a nivel seminal como espermático (y en muestra muy fragmentada). De ello parecía entonces deducirse que el metabolismo del SRA local no tendría influencia/estaría influido a nivel de integridad del ADN del espermatozoide.

Nuevamente, y al igual que ocurría con los receptores opioides, al estudiar las micrografías de los receptores espermáticos del SRA, no podemos apreciar diferencias en el patrón de inmunomarcaje entre células normozoospermicas y fragmentadas, es decir, la localización en la membrana celular parece mantenerse independientemente de que el espermatozoide esté fragmentado o no. Así, en cuanto a los receptores específicos de la Angiotensina II, el AT1R (presente en el 94,7% de gametos analizados) lo hemos detectado en la cola de los espermatozoides, lo que coincide con Vinson y colaboradores (Vinson et al., 1995a; Vinson et al., 1995b), así como con Gianzo (2016). El AT2R se localiza en la región ecuatorial/postacrosomal de la cabeza de los espermatozoides. Este

marcaje lo hemos observado en el 87% de los espermatozoides no fragmentados analizados. Por otro lado, la localización del PRR (presente en el 96% de espermatozoides analizados) en los gametos masculinos humanos se concentra en la parte frontal de la cabeza espermática, sobre la región acrosómica y en la parte posterior de la cabeza, donde observamos un intenso inmunomarcaje; sin embargo, observamos un marcaje más leve a lo largo de la cola de los mismos. En cualquier caso, y dado que la localización de la mayoría de los receptores del SRA (salvo quizá el PRR) se sitúa en la cola espermática, se podría deducir que, tal y como sugieren Vinson y colaboradores (1996), estos receptores estarían relacionados con la regulación de la movilidad del espermatozoide más que con la reacción acrosómica del mismo.

En este caso, y dada su localización, quizá en esta reacción pudiera estar implicado el PRR, lo que coincide con lo sugerido por varios autores en relación con esta posibilidad y el SRA (Foresta et al., 1991; Vinson et al., 1997; Gur et al., 1998; Kohn et al., 1998a; Wennemuth et al., 1999; Sabeur et al., 2000). Además, y tal y como se ha sugerido anteriormente, podría ser que tanto la prorrenina, proteína precursora de la renina, como la propia renina, actuaran sobre el PRR de forma independiente al eje clásico (Zhuo et al, 2013) y por ello quizá sería adecuado presentar los resultados aparte.

Recordando esquemáticamente la distribución de los receptores del sistema, así como los distintos componentes que se unen a ellos, tenemos:



En nuestros resultados observamos que el marcaje de AT1 (94% normos frente a 84%), AT4 (96% frente al 95%) y MAS (97% frente al 87%) podrían ser similares entre ambos grupos de espermatozoides analizados (con niveles mayores en normozoospermicos), de manera similar a los receptores opioides, en que la fragmentación (¿causa/efecto?) no provoca alteraciones en el número de gametos que expresan el receptor. Pero parece claro que el AT2 (87% normos frente a 63% fragmentados) y PRR (96% frente a 48%) presenta un mayor número de espermatozoides no fragmentados que expresan estos receptores. Hay que tener en cuenta sin embargo también el grado de intensidad en el marcaje, apareciendo en todos los casos que el nivel es inferior en espermatozoides fragmentados. Es decir resulta difícil deducir si la diferencia radica en el mayor o menor número de receptores presentes o que son más los espermatozoides que los expresan. Queremos decir que si son menos los espermatozoides que presentan inmunomarcaje cuando el grado de fragmentación es alto y que la intensidad del marcaje es menor podría ser debido a dos circunstancias:

1) Los espermatozoides con fragmentación del DNA presentan una menor capacidad de respuesta a los péptidos activos del SRA, al presentar una menor intensidad de marcaje, ó

2) Ésta menor intensidad de inmunomarcaje es debida al menor número de espermatozoides que expresan los receptores.

Aunque curiosamente la segunda posibilidad podría parecer la más lógica, nosotros (vistos todos los resultados) nos inclinamos a pensar en la primera posibilidad, es decir, los receptores presentan una menor capacidad de respuesta por tener un marcaje inferior. Esta conclusión podemos deducirla de manera clara al comparar el porcentaje de gametos con y sin fragmentación que son positivos al marcaje de receptor AT4R: 96% no fragmentados y 95% fragmentados, es decir prácticamente sin diferencia. Sin embargo, la intensidad es de 42 en no fragmentados frente a 21 en fragmentados, exactamente la mitad.

En cualquier caso, y nuevamente, parece que de alguna manera el SRA está implicado en la respuesta celular a la fragmentación del DNA espermático.

6. Integración de resultados

Trataremos en este apartado final de la Discusión de analizar de forma integrada los distintos aspectos del metabolismo peptídico que hemos ensayado en este estudio. Presentaremos primero un análisis del sistema opioide y a continuación el del sistema renina angiotensina.

Tenemos que considerar que, salvo los péptidos específicos que constituyen ambos complejos sistemas, hemos estudiado prácticamente todos sus componentes, tanto desde un punto de vista de síntesis como de degradación, así como la actividad que presentan sus receptores específicos, y todo ello comparando semen completo (espermatozoides y líquido seminal que los cobija) en pacientes normozoospermicos y con fragmentación del DNA. Ello ha provocado que tengamos una gran cantidad de resultados que no son sencillos de integrar y que, contrariamente a lo que podíamos esperar al plantear los objetivos originales de la Tesis, han dado lugar a resultados en muchos casos contradictorios, y todo ello a pesar de que, como ya hemos mencionado, existe una gran controversia sobre cómo cada uno de estos componentes pueden influir tanto en la motilidad espermática como en la reacción acrosómica. Tendríamos quizá que plantearnos si las modificaciones observadas en los componentes de los sistemas podrían por un lado ser adaptaciones del espermatozoide fragmentado (no olvidemos que son gametos capaces de fertilizar aunque no lleven habitualmente embarazo a término) para mantener su movilidad y posible reacción acrosómica, o por otro que el propio proceso de fragmentación provoque alteraciones en la capacidad de respuesta del gameto, alterando tanto su movilidad como la capacidad de reacción acrosómica. De todas formas, (por supuesto añadiendo un mayor número de muestras al estudio), estas alteraciones podrían servir como marcadores de fragmentación del DNA espermático, ello de cara a orientar las posibilidades de éxito de la técnica de reproducción.

6.1. Integración de resultados: sistema opioide

De acuerdo entonces con lo que hemos venido presentando, parece demostrado que los péptidos opioides están implicados en la movilidad espermática, aunque es importante remarcar que los resultados encontrados hasta la actualidad son tremendamente contradictorios y, lamentablemente, los

resultados obtenidos en el presente proyecto de Tesis Doctoral no terminan de ayudar a solucionar la controversia.

Por un lado, la movilidad espermática desciende en presencia de altas concentraciones de encefalinas y en presencia de la β -endorfina (Fraioli et al., 1982, Sastry et al., 1991). Además, se ha visto que, análogos sintéticos de la met-enkefalina (DAMME) produjeron también un descenso de la movilidad espermática debido a una reducción en el consumo de O₂, sin afectar en la viabilidad del espermatozoide (Foresta et al., 1985). Sin embargo, otros autores han observado que las encefalinas a bajas concentraciones son necesarias para mantener la movilidad espermática (Fujisawa et al., 1992). Finalmente, algunos estudios, incluso, no detectan efecto alguno de la met-enkefalina sobre la movilidad espermática (Fraioli et al., 1985). Nuestro grupo de investigación propuso en 2006 (Agirregoitia et al.) que el efecto bivalente de los opioides podría ser debido a la activación de distintos receptores, ya que observamos que la incubación de espermatozoides humanos con morfina (agonista del receptor μ -opioides) o con naltrindol (antagonista del receptor δ -opioides) inhibe la movilidad espermática. Además, la naloxona, antagonista con afinidad diferencial por los receptores opioides, modula la movilidad dependiendo de la dosis del antagonista utilizada (Albrizio et al., 2005; Mari et al., 2005).

Sin embargo, y aunque como matizamos el efecto de los péptidos opioides es contradictorio, algunos autores sugieren que un nivel adecuado de encefalinas sería necesario para el mantenimiento de la movilidad espermática ya que pacientes con déficit en la movilidad espermática presentan unos niveles de met-enkefalina significativamente menores en su plasma seminal (Fujisawa et al., 1996). En recientes estudios, se ha visto un incremento en el reconocimiento del papel que juegan los péptidos presentes en el plasma seminal sobre la motilidad espermática; así las peptidasas, tales como la endopeptidasa neutra (NEP) y la aminopeptidasa N (APN), poseen efectos adversos significativos sobre la motilidad espermática. Curiosamente, varios estudios recientes demuestran que existe un péptido endógeno inhibidor de NEP/ APN llamado opiorphin presente en el plasma seminal humano, que sugiere que promueve la motilidad del espermatozoide pudiendo influir positivamente en la motilidad del espermatozoide (Jayme et al., 2014).

Todos estos resultados podrían entonces quizá explicar los resultados también contradictorios que encontramos en el presente trabajo. Así, observamos alteraciones contradictorias de actividad en alguno de los enzimas reguladores ensayados, si bien estas modificaciones se ven mejor definidas al ensayar tanto los niveles por citometría como por inmunocitoquímica. En ambos casos se aprecia un patrón muy marcado, ya que el porcentaje de espermatozoides normozoospermicos que presenta esta actividad CD13 de membrana es de casi el 70%, mientras que en los espermatozoides con fragmentación representa solo el 30%. Este aspecto se ve además reflejado en el grado de intensidad de marcaje, que alcanza un valor de 53,8 en normos y de solo un 7 en fragmentados. La intensidad del marcaje en los tres receptores de opioides es también significativamente inferior en los gametos que muestran fragmentación del DNA espermático, lo que podría indicar una menor capacidad de respuesta en este tipo de espermatozoides. Esto, como decimos, es coherente con los resultados de porcentaje/intensidad observados en los enzimas reguladores de opioides: los niveles de APN/CD13 son significativamente inferiores en gametos con fragmentación y con ello se vería disminuida la degradación opioidérgica (niveles por tanto más altos), coincidente con el hecho de que los espermatozoides fragmentados presentan menor inmunorreactividad (menor capacidad de respuesta) en los tres receptores ensayados.

6.2. Integración de resultados: sistema renina-angiotensina

Los espermatozoides, para llevar a cabo correctamente su función, deben pasar por una serie de procesos como son la adquisición de la movilidad, la capacitación, la reacción acrosómica, y el reconocimiento, unión y fecundación del oocito (Yoshida et al., 2008; Sakkas et al., 2015). Estos procesos están regulados por la actuación conjunta de diversos mecanismos moleculares, entre los cuales se encuentra el SRA (Yoshida et al., 2008; Vinson et al., 1997; Speth et al., 1999). Así, tanto la presencia y distribución de los componentes del SRA en los espermatozoides, como la actividad de las angiotensinas asociadas, sugieren que este sistema estaría regulando la función reproductora, actuando directamente sobre la capacidad fértil de los espermatozoides (Leung y Sernia, 2003).

La Angiotensina II ha sido detectada en el plasma seminal, en concentraciones de tres a cinco veces superiores a las halladas en el plasma sanguíneo (O'Mahony et al., 2000). Sin embargo, la infertilidad masculina no parece estar relacionada con los bajos niveles de Angiotensina II esperados en los ratones carentes del gen que codifica para la ACE, enzima encargada de la formación de la Ang II (Paul et al., 2006). Se ha descrito que la Angiotensina II es un modulador de la actividad espermática, ya que está implicada en procesos como la movilidad y la reacción acrosómica (Foresta et al., 1991; Vinson et al., 1997; Gur et al., 1998; Kohn et al., 1998a; Wennemuth et al., 1999; Sabeur et al., 2000). En cuanto a su implicación en la movilidad, la Angiotensina II aumenta tanto el porcentaje de espermatozoides móviles, como su velocidad lineal (Vinson et al., 1996).

Aunque la Angiotensina (1-7) no ha sido localizada en espermatozoides maduros, la existencia de su receptor sugiere que éstos podrían ser influidos por modificaciones en la producción local de este péptido (Reis et al., 2010).

Los niveles de angiotensina II están regulados por el enzima que la sintetiza, la ACE, en nuestro caso mejor denominada tACE, ya que sería el enzima convertidor analizado a nivel de la membrana del espermatozoide. Esta tACE está presente en la membrana plasmática de las espermátidas y espermatozoides de distintas especies (Vanha-Pertulla et al., 1985; Brentjens et al., 1986; Dobrinski et al., 1997), y principalmente en la membrana plasmática de la región acrosomal, en el segmento ecuatorial, en la región postacrosomal y en la pieza intermedia (Ganong, 1995; Kohn et al., 1998b). Su actividad es baja en animales inmaduros pero va aumentando progresivamente conforme va alcanzando la madurez sexual, lo que sugiere que su presencia es dependiente de la maduración sexual (Jaiswal et al., 1983). El mecanismo a través del cual la tACE participa en la función espermática todavía no se conoce en detalle, aunque, distintos estudios han demostrado su implicación en la movilidad, la capacitación, la reacción acrosómica y en la capacidad fecundante (Singh et al., 1985; Foresta et al., 1987; Foresta et al., 1991; Kohn et al., 1995; Shibahara et al., 2001; Li et al., 2014). Lo que sí hemos apreciado en nuestros resultados es el hecho de que los niveles de tACE son muy superiores en células fragmentadas, tanto desde un punto de vista de espermatozoides que la expresan como desde un punto de vista de intensidad

de marcaje. Esto solo puede significar que la producción de angiotensina II está claramente incrementada en procesos de fragmentación del DNA espermático. Pero, como ya hemos presentado, los niveles de los receptores de AII están disminuidos (tanto en número de espermatozoides que los expresan como desde un punto de vista de intensidad) en espermatozoides fragmentados. Podríamos quizá deducir de ello que este incremento en los niveles de AII se produzca para compensar el descenso en el número e intensidad de los receptores en gametos fragmentados. Insistimos en el hecho de que los gametos con fragmentación consiguen fertilización.

Se cree que el AT1R está implicado en la movilidad espermática, ya que el uso de antagonistas de este receptor, como el losartán, inhibe la movilidad, mientras que tras la adición de A II se produce un aumento tanto del porcentaje de espermatozoides móviles, como de su velocidad lineal (Vinson et al., 1996). De igual manera, también se ha evidenciado su implicación en la reacción acrosómica, ya que tras la adición de captopril, inhibidor específico de la ACE, ésta queda inhibida (Foresta et al., 1991; Gur et al., 1998). Por su parte, el AT2R ha sido localizado en la región acrosomal de la cabeza de espermatozoides de ratón, aunque, por ahora, no se le ha atribuido ninguna función (Wennemuth et al., 1999). Pero como hemos presentado, en ambos casos hay tanto diferencia porcentual de espermatozoides marcados como de intensidad del marcaje.

Finalmente, la presencia del MasR en espermatozoides humanos indica que estas células tienen la capacidad de responder a la Ang (1-7), y por lo tanto, podrían ser influidas por modificaciones en la producción local de este péptido (Reis et al., 2010). Pero recordemos que este péptido, la Angiotensina (1-7), no ha sido localizada en espermatozoides maduros, y que la actividad responsable del control (espermático-membrana y seminal) de los niveles de este péptido no difieren entre muestras normo y fragmentadas. Lo mismo podríamos decir del receptor AT4 y por tanto la capacidad de responder a la angiotensina IV, así como la presencia de receptor PRR y la capacidad para responder directamente a la renina. Lo único que podemos presentar en relación con ellos es que el marcaje y los niveles de intensidad son mayores en espermatozoides no fragmentados, pero no hemos observado modificaciones significativas en los enzimas que regulan la formación de los agonistas correspondientes (salvo el caso del ECA).

Podríamos entonces, como hemos planteado anteriormente, concluir que todo este conjunto de variaciones son:

- una alteración del espermatozoide con DNA fragmentado para modificar sus posibilidades de fecundación

- que el proceso de fragmentación provoque alteraciones en la capacidad de respuesta del gameto, alterando tanto su movilidad como la capacidad de reacción acrosómica.

VI CONCLUSIONES

1) Parece no influir para la consecución de embarazo y niño sano en casa los niveles de fragmentación en la muestra seminal en fresco (precapitada) siempre que se recupere el número suficiente de espermatozoides para la realización de la inseminación intrauterina.

2) La técnica de capacitación por gradientes de densidad, en muestras normozoospermicas con respecto a los valores de normalidad de la OMS 2010, a pesar que muestren fragmentación moderada en el ADN nos permite recuperar un número suficiente de espermatozoides para la inseminación intrauterina.

3) En gametos control, los mayores niveles de actividad los obtenemos en DPPIV, seguidos de APN, APB y PSA. Los niveles más bajos los obtenemos con Cys-AP, Asp-AP y NEP. A nivel de líquido seminal se mantiene un patrón similar. Los niveles enzimáticos en muestras con fragmentación, tanto a nivel espermático como seminal, presentan una distribución paralela a la obtenida con muestras normozoospermicas. Por tanto, independientemente de que se trate de muestras normozoospermicas como con fragmentación moderada, los niveles de actividad se mantienen, es decir, la importancia relativa de cada uno de los enzimas ensayados es independiente del proceso de fragmentación.

4) En relación con los niveles de actividad enzimática obtenidos en plasma seminal, no se aprecian diferencias estadísticamente significativas al comparar entre sí ninguna de las actividades analizadas, es decir, desde un punto de vista del metabolismo estudiado, el líquido seminal que cubija a los gametos no se ve afectado por la presencia de espermatozoides con fragmentación.

5) En relación con el metabolismo de encefalinas a nivel espermático, solo la APN muestra unos niveles ligeramente inferiores de actividad (no significativos) en pacientes con elevada fragmentación. Al estudiar la actividad de la APN/CD13 por citometría de flujo, se observa un patrón mucho más marcado (porcentaje de espermatozoides control con esta actividad de membrana 70%, con fragmentación 30%). Además está el grado de intensidad de marcaje: 53,8 en normos y 7 en fragmentados. Es decir, tanto el porcentaje presencial como la inmunorreactividad son significativamente inferiores en gametos que presentan fragmentación del DNA.

6) Los enzimas reguladores del sistema renina angiotensina ensayados en este estudio no muestran alteraciones significativas cuando comparamos los niveles de actividad en muestras normo y fragmentadas, y todo ello tanto a nivel seminal como espermático. Al estudiar por citometría de flujo el enzima convertidor de angiotensina (ACE), se aprecia un mayor número de espermatozoides fragmentados marcados frente a los controles (89% frente al 51%) y el grado de intensidad de marcaje es también superior en esperma fragmentado que en normozoospermico (7,5 frente a 2). De ello se deduce que la actividad del ACE está incrementada en los espermatozoides con fragmentación.

7) En relación con el metabolismo de oxitocina no encontramos niveles de actividad PEP en espermatozoide, a diferencia del líquido seminal (aunque con niveles muy bajos), y no se aprecian diferencias significativas de actividad al comparar ambos niveles enzimáticos (Cys-AP y PEP) en muestras íntegras, fragmentadas y muy fragmentadas, y ello ni a nivel espermático ni a nivel seminal.

8) No se aprecian diferencias en el patrón de inmunomarcaje de receptores opioides y del sistema renina angiotensina entre células normozoospermicas y fragmentadas, es decir, la localización en la membrana celular parece mantenerse independientemente de que el espermatozoide esté fragmentado o no. Sí se ve afectada la intensidad del marcaje, siendo en todos casos significativamente inferior en los espermatozoides que presentan fragmentación.

9) En base a estos resultados, se puede concluir que de alguna manera tanto el metabolismo opioide como el del Sistema Renina Angiotensina están implicados en la respuesta celular a la fragmentación del DNA espermático.

VII BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía**A**

Abbott CA, Baker E, Sutherland GR, McCaughan GW (1994). Genomic organization, exact localization, and tissue expression of the human CD26 (dipeptidyl peptidase-IV) gene. *Immunogenetics* 40(5):331-8.

Agarwal A, Allamaneni SS (2005). Sperm DNA damage assessment: a test whose time has come. *Fertil Steril*; 84:850-3.

Agarwal A, Sharma RK, Desai NR, Prabakaran S, Tavares A, Sabanegh E (2009). Role of oxidative stress in pathogenesis of varicocele and infertility. *Urology* 73(3):461-9.

Agirregoitia E (2008). Opiode-hartzaileak (d, k, m) eta kannabinoide-hartzaileak (CB1, CB2) giza espermatozoideetan espresatzen dira eta haien mugikortasunean eragiten dute. Departamento de Fisiología. Universidad del País Vasco. Tesis Doctoral

Agirregoitia E, Peralta L, Mendoza R, Expósito A, Diaz Ereno E, Matorras R, Agirregoitia N (2012a). Expression and localization of opioid receptors during the maturation of human oocytes. *Reproductive Biomedicine Online* 24(5):550-7.

Agirregoitia E, Valdivia A, Carracedo A, Casis L, Gil J, Subiran N, Ochoa C, Irazusta J (2006). Expression and localization of delta-, kappa-, and mu-opioid receptors in human spermatozoa and implications for sperm motility. *J Clin Endocrinol Metab* Dec; 91(12):4969-75.

Agirregoitia N, Irazusta A, Ruiz F, Irazusta J, Gil J (2003b). Ontogeny of soluble and particulate prollyl endopeptidase activity in several areas of the rat brain and in the pituitary gland. *Developmental Neuroscience* 25(5):316-23.

Aitken R, De Luliis G & McLachlan R (2009). Biological and clinical significance of DNA damage in the male germ line. *Int. J. Androl.* 32(1):46-56.

Aitken RJ, Baker MA (2004). Oxidative stress and reproductive biology. *Reprod Fertil Develop* 16; 581-88.

Aitken RJ, Bennetts LE, Sawyer D, Wiklendt AM, King BV (2005). Impact of radio frequency electromagnetic radiation on DNA integrity in the male germline. *International journal of andrology*, 28:171-179.

Aitken RJ, Curry BJ (2011). Redox regulation of human sperm function: from the physiological control of sperm capacitation to the etiology of infertility and DNA damage in the germ line. *Antioxid Redox Signal*; 1:367-381.

Aitken RJ, Gordon E, Harkiss D, Twigg JP, Milne P, Jennings Z, Irvine DS (1998). Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol Reprod*, 59, pp. 1037-1046.

Aitken RJ, Smith TB, Jobling MS, Baker MA, De Luliis GN (2014). Oxidative stress and male reproductive health. *Asian J Androl* 16: 31-38.

Aitken RJ. (2004). Founders' Lecture. Human spermatozoa: fruits of creation, seeds of doubt. *Reprod Fertil Dev* 16, 655-664.

Alba F, Arenas JC, Lopez MA (1995). Comparison of soluble and membrane-bound pyroglutamyl peptidase I activities in rat brain tissues in the presence of detergents. *Neuropeptides*. 1995 Aug; 29(2):103-7.

Albiston AL, McDowall SG, Matsacos D, Sim P, Clune E, Mustafa T, Lee J, Mendelsohn FA, Simpson RJ, Connolly LM (2001). Evidence that the angiotensin IV (AT(4)) receptor is the enzyme insulin-regulated aminopeptidase. *J Biol Chem* 276:48623-48626.

Albrizio M, Guaricci AC, Calamita G, Zarrilli A, Minoia P (2006). Expression and immunolocalization of the mu-opioid receptor in human sperm cells. *Fertility and Sterility* 86(6):1776-9.

Albrizio M, Guaricci AC, Maritato F, Sciorsci RL, Mari G, Calamita G, Lacalandra GM, Aiudi GG, Minoia R, Dell'Aquila ME, Minoia P (2005). Expression and subcellular localization of the muopioid receptor in equine spermatozoa: evidence for its functional role. *Reproduction*. Jan 129(1):39-49.

Alenina N, Baranova T, Smirnow E, Bader M, Lippoldt A, Patkin E and Walther T (2002). Cell type-specific expression of the Mas proto-oncogene in testis. *J Histochem Cytochem* 50:691-696.

Alvarez JG, Storey BT (1995). Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 42: 334-346.

Amann RP, Howard SS (1980). Daily spermatozoal production and epididymal spermatozoal reserves on the human male. *J Urol.* 124:211-215.

Ammer H and Schulz R (1997). Chronic morphine treatment increases stimulatory beta-2 adrenoceptor signaling in A431 cells stably expressing the mu opioid receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 280: 1: 512-520.

Ando H, Nagasaka T, Nomura M, Tsukahara SI, Kotani Y, Toda S, Murata Y, Itakura A, Mizutani S (2002). Premenstrual disappearance of aminopeptidase A in endometrial stromal cells around endometrial spiral arteries/arterioles during the decidual change. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 87(5):2303-9.

Angelisova P, Drbal K, Horejsi V, Cerny J (1999). Association of CD10 neutral endopeptidase 24.11 with membrane microdomains rich in glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins and Lyn kinase. *Blood* 93(4):1437-9.

Antczak C, De Meester I, Bauvois B (2001). Ecto-peptidases in pathophysiology. *Bioessays* 23(3):251-60.

Aoki V & Carrell D (2003). Human protamines and the developing spermatid: their structure, function, expression and relationship with male infertility. *Asian J. Androl.* 5:315–24.

Atlas SA (2007). The renin-angiotensin aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition. *J Manag Care Pharm* 13:9-20.

Audhya T, Hollander CS, Schlesinger DH, Hutchinson B (1989). Structural characterization and localization of corticotropin-releasing factor in testis. *Biochim Biophys Acta.* Mar16 995(1):10-6.

Aurich-Costa J, Cadel S, Gouzy C, Foulon T, Cherif D, Cohen P (1997). Assignment of the aminopeptidase B gene (RNPEP) to human chromosome 1 band q32 by in situ hybridization. *Cytogenetics and Cell Genetics* 79(1-2):143-4.

B

Babkova et al., 2017 Babkova, Korabecny, Soukup, Nepovimova, Jun & Kuca Katerina Babkova, Jan Korabecny, Ondrej Soukup, Eugenie Nepovimova & Kamil Kuca*, Daniel Jun (2017). Prolyl oligopeptidase and its role in the organism: attention to the most promising and clinically relevant inhibitors *Future Medicinal Chemistry SPECIAL FOCUS y Advances in neurodegenerative disease therapy – Part 2 Review*

Badr FM, Rabouh SA, Badr RS. (1979). On the mutagenicity of methadone hydrochloride. Induced dominant lethal mutation and spermatocyte chromosomal aberrations in treated males. *Mutat Res.* Nov 68 (3):235–49.

Balakumar P and Jagadeesh G (2011). Potential cross-talk between (pro)renin receptors and Wnt/frizzled receptors in cardiovascular and renal disorders. *Hypertens Res* 34:1161-1170.

Balogh A, Cadel S, Foulon T, Picart R, Garabedian AD, Rousselet A, Tougard C, Cohen P (1998). Aminopeptidase B: a processing enzyme secreted and associated with the plasma membrane of rat pheochromocytoma (PC12) cells. *Journal of Cell Science* 111:161-9.

Banks S, King SA, Irvine DS, Saunders PT (2005). Impact of a mild scrotal heat stress on DNA integrity in murine spermatozoa. *Reproduction*, 129 pp. 505–514.

Barratt CH, Kay V and K Oxenham SK (2009). Minireview The human spermatozoon—a stripped down but refined machine *Journal of Biology* 8:63.

Barret AJ, Rawling ND, Woessner JF (2004). *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Elsevier Academic Press.1.

Barrett AJ, McDonald JK (1986). Bomenclature: Protease, proteinase and peptidase. *Biochemical Journal* 237(3):935.

Belisle S, Petit A, Gallopayet N, Bellabarba D, Lehoux JG, Lemaire S (1988). Functional opioid receptor sites in human placentas. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 66(2):283-9.

Bhagwat SV, Lahdenranta J, Giordano R, Arap W, Pasqualini R, Shapiro LH (2001). CD13/APB is activated by angiogenic signals and is essential for capillary tube formation. *Blood* 97(3):652-9.

Bian Q, Xu LC, Wang SL, Xia YK, Tan LF, Chen JF, Song L, Chang HC, Wang XR (2004). Study on the relation between occupational fenvalerate exposure and spermatozoa DNA damage of pesticide factory workers. *Occup Environ Med* 61: 999-1005.

Bianchi L, Gagliardi A, Campanella G, Landi C, Capaldo A, Carleo A, Armini A, De Leo V, Piomboni P, Focarelli R, Bini L (2013). A methodological and functional proteomic approach of human follicular fluid en route for oocyte quality evaluation. *Journal of proteomics* 90:61-76.

Bianchi PG, Manicardi GC, Bizzaro D, Bianchi U, Sakkas D (1993). Effect of deoxyribonucleic acid protamination on fluorochrome staining and in situ nick translation of murine and human mature spermatozoa. *Biol Reprod.* Nov;49(5):1083-8.

Bickel M, Tan JSE, Taubert HD, Kuhl H (1972). Evidence of a sex-specific effect of testosterone and progesterone upon L-cystine-aminopeptidase activity in hypothalamus and paleopallium of rat. *Neuroendocrinology* 9(6):321-31.

Billig H, Chun SY, Eisenhauer K, Hsueh AJ (1996). Gonadal cell apoptosis: hormone-regulated cell demise. *Hum Reprod Update*, 2 pp. 103–117.

Binger KJ and Muller DN (2013). Autophagy and the (Pro)renin Receptor. *Front Endocrinol (Lausanne)* 4:155.

Blanco L (2010). Alteraciones en la actividad enzimática, expresión tisular y expresión génica de peptidasas en neoplasias renales. Departamento de Fisiología. Universidad del País Vasco. Tesis doctoral.

Blanco L, Larrinaga G, Pérez I, Lopez JI, Gil J, Agirregoitia E, Varona A (2008). Acid, basic, and neutral peptidases present different profiles in chromophobe renal cell carcinoma and in oncocytoma. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 294(4): F850-F8.

Blanco L, Pérez I, Sanz B, Gil J, Lopez JI, Ugalde A, Varona A, Larrinaga G (2010). Changes in Cell-Surface Peptidase Activity in Papillary Renal Cell Carcinoma. *Anticancer Research* 30(4):1137-41.

Blank MS, Roberts DL (1982). Antagonist of gonadotropin-releasing hormone blocks naloxone-induced elevations in serum luteinizing hormone. *Neuroendocrinology*. Nov 35(5):309-12.

Bodineau L, Frugièrè A, Marc Y, Inguibert N, Massot C, Balavoine F, Roques B, Llorens-Cortes C (2008). Orally Active Aminopeptidase A Inhibitors Reduce Blood Pressure A New Strategy for Treating hipertensión. *Hypertension*. 51:1318-25.

Bodnar R, Paul D, Pastemark G (1991). Synergistic interactions bet ween the periaqueductal gray and the locus coeruleus. *Brain Res* 558: 224-230.

Bogenrieder T, Finstad CL, Freeman RH, Papandreou CN, Scher HI, Albino AP, Reuter VE, Nanus DM (1997). Expression and localization of aminopeptidase A, aminopeptidase N, and dipeptidyl peptidase IV in benign and malignant human prostate tissue. *Prostate* 33(4):225-32.

Bojar I, Witczak M, Wdowiak A (2013). Biological and environmental conditionings for sperm DNA fragmentation, *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, Vol 20, No 4, 865–868.

Bonvouloir N, Lemieux N, Crine P, Boileau G and DesGroseillers L (2001). Molecular cloning, tissue distribution, and chromosomal localization of MMEL2, a gene coding for a novel human member of the neutral endopeptidase-24.11 family. *DNA Cell Biol* 20:493-498.

Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. May 7; 72:248-54.

Brentjens AB, Araujo FC, Pereira VM, Dos Reis AM, Santos RA and Reis FM (2010). Angiotensin (1-7) and its receptor Mas are expressed in the human testis: implications for male infertility. *J Mol Histol* 41:75-80.

Brentjens JR, Matsuo S, Andres GA, Caldwell PR and Zamboni L (1986). Gametes contain angiotensin converting enzyme (kininase II). *Experientia* 42:399-402.

Britan A, Maffre V, Tone S, Drevet JR (2006). Quantitative and spatial differences in the expression of tryptophan-metabolizing enzymes in mouse epididymis *Cell Tissue Res*, 324, pp. 301–310.

Browder LW, Ericsson CA, Jeffery WR (1991). *Developmental Biology*, cap 3, edit Saunders Collage Publishing, New Cork.

Bungum M. (2012). Sperm DNA integrity assessment: a new tool in diagnosis and treatment of fertility. *Obstet Gynecol Int* 2012, 531042.

Burrello N, Arcidiacono G, Vicari E, Asero P, Di Benedetto D, De Palma A, Romeo R, D Agata, Calogero AE (2004). Morphologically normal spermatozoa of patients with secretory oligo-astheno-teratozoospermia have an increased aneuploidy rate *Hum Reprod*, 19, pp. 2298–2302.

Bustos-Obregon E, Courot M, Flechon JE, Hochereau-de-Reviere MT, Holstein AF (1975). Morphological appraisal of gametogenesis. Spermatogenesis process in mammals with particular referente to man. *Andrologia* 7(2):141-63.

C

Cadel S, Foulon T, Viron A, Balogh A, MidolMonnet S, Noel N, Cohen P (1997). Aminopeptidase B from the rat testis is a bifunctional enzyme structurally related to leukotriene-A(4) hydrolase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(7):2963-8.

Cadel S, Pierotti AR, Foulon T, Creminon C, Barre N, Segretain D, Cohen P (1995). Aminopeptidase B in the rat testes: isolation, functional properties and cellular localization in the seminiferous tubules. *Molecular and Cellular Endocrinology* 110(1- 2):149-60.

Cadel S, Piesse C, Gouzy-Darmon C, Cohen P, Foulon T (2004). Arginyl aminopeptidase. *Aminopeptidases in biology and disease*. N. Hooper and U. Lendeckel, Kluwer Academic/Plenum Press. 2:113-26.

Carl-McGrath S, Lendeckel U, Ebert M, Roecken C (2006). Ectopeptidases in tumour biology: A review. *Histology and Histopathology* 21(12):1339-53.

Carracedo A (2006). Acción antitumoral de los cannabinoides: implicación de p8 y la vía de estrés de retículo endoplasmático. Tesis Doctoral, 2006a.

Carrell D, Emery B & Hammoud S (2007). Altered protamina expression and diminished spermatogenesis: what is the link? *Hum. Reprod. Update* 13:313–27.

Carrera MP, Ramirez-Expósito MJ, Garcia MJ, Mayas MD, Martinez-Martos JM (2009). Ovarian Renin-Angiotensin System-regulating Aminopeptidases Are Involved in Progesterone Overproduction in Rats with Mammary Tumours Induced by N-Methyl Nitrosourea. *Anticancer Research* 29(11):4633-7.

Carrera MP, Ramirez-Expósito MJ, Valenzuela MT, Garcia MJ, Mayas MD, Martinez-Martos JM (2004). Glutamyl- but not aspartyl-aminopeptidase activity is modified in serum of N-methyl nitrosourea-induced rat mammary tumours. *Anticancer Research* 24(2B):801-5.

Cayli S, Sakkas D, Vigue L, Demir R, Huszar G (2004). Cellular maturity and apoptosis in human sperm: creatine kinase, caspase-3 and Bcl-XL levels in mature and diminished maturity sperm *Mol Hum Reprod*, 10 pp. 365–372.

Chai SY, Fernando R, Peck G, Ye SY, Mendelsohn FA, Jenkins TA and Albiston AL (2004). The angiotensin IV/AT4 receptor. *Cell Mol Life Sci* 61:2728-2737.

Chen CL, Madigan MB (1987). Regulation of testicular proopiomelanocortin gene expression. *Endocrinology*. Aug; 121(2):590-6.

Chen CLC, Chang CC, Krieger DT, Bardin CW (1986). Expression and regulation of proopiomelanocortin-like gene in the ovary and placenta: comparison with the testis. *Endocrinology*. Jun; 118(6):2382-9.

Chen L., Y-L. Ling, G. Peng y F. Li. (2012). Structural basis for multifunctional roles of mammalian aminopeptidase N. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 44: 17966–17971.

Chen Y, Mestek A, Liu J and Yu L (1993). Molecular cloning of a rat kappa opioid receptor reveals sequence similarities to the mu and delta opioid receptors. *Biochem J* 295 (Pt 3): Pt 3: 625-628.

Cho C, Willis W, Goulding E et al. (2001). Haploinsufficiency of protamine-1 or -2 causes infertility in mice. *Nat. Genet*. 28:82–6.

Cicero TJ, Davis LA, LaRegina MC, Meyer ER, Schlegel MS. (2002) Chronic opiate exposure in the male rat adversely affects fertility. *Pharmacol Biochem Behav*. May; 72(1–2):157–63. PMID: 11900783.

Cicero TJ, Schainker BA, Meyer ER (1979). Endogenous opioids participate in the regulation of the hypothalamus-pituitary-luteinizing hormone axis and testosterone's negative feedback control of luteinizing hormone. *Endocrinology*. May; 104(5):1286-91.

Claude PA, Wotta DR, Zhang XH, Prather PL, McGinn TM, Erickson LJ, Loh HH and Law PY (1996). Mutation of a conserved serine in TM4 of opioid receptors confers full agonistic properties to classical antagonists. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 12: 5715- 5719.

Clermont Y (1963). The cycle of the seminiferous epithelium in man. *Am J Anat* 112: 35-51.

Colasanti B (1990). Narcotic analgesics. In Craig C, Stitzel R, editors: *Modern Pharmacology* ed 3. boston, Little, Brown.

Collard MW, Day R, Akil H, Uhler MD, Douglass JO (1990). Sertoli cells are the primary site of prodynorphin gene expression in rat testis: regulation of mRNA and secreted peptide levels by cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate analogs in cultured cells. *Mol Endocrinol*. Oct; 4(10):1488-96.

Comb M, Seeburg PH, Adelman J, Eiden L and Herbert E (1982). Primary structure of the human Met- and Leu-enkephalin precursor and its mRNA. *Nature* 295: 5851: 663- 666.

Constam DB, Tobler AR, Rensingehl A, Kemler I, Hersh LB, Fontana A (1995). Puromycin-sensitive aminopeptidase: Sequence, analysis, expression, and functional characterization. *Journal of Biological Chemistry* 270(45):26931-9.

Cox BM, Opheim KE, Teschermaker H et al., (1975). A peptidelike substance from pituitary that acts like morphine. Purification and properties. *Life Sci*, 16: 1777.

Crain SM and Shen KF (1990). Opioids can evoke direct receptor-mediated excitatory as well as inhibitory effects on sensory neuron action potentials. *NIDA Res Monogr* 105: 34-39.

Craven DJ, Warren AY and Symonds EM (1981). Active and inactive renin in human seminal plasma. *Arch Androl* 7:63-67.

Cui J, Holmes EH, Greene TG, Liu PK (2000). Oxidative DNA damage precedes DNA fragmentation after experimental stroke in rat brain *FASEB J*, 14, pp. 955–967.

Culler MD, Tarlatzis BC, Lightman A, Fernández LA, Decherney AH, Negrovilar A, Naftolin F (1986). Angiotensin ii-like immunoreactivity in human ovarian follicular fluid. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 62(3):613-5.

Czech MP, Corvera S (1999). Signaling mechanisms that regulate glucose transport. *Journal of Biological Chemistry* 274(4):1865-8.

Czlonkowski A et al., (1983). Opiate receptor binding sites in human spinal cord. *Brain Res* 267, 392-394.

D

Dando PM, Young NE, Barrett AJ (1997). Aminopeptidase PS: a widely distributed cytosolic peptidase. *Proteolysis in Cell Functions* 13:88-95.

Danilczyk U, Eriksson U, Oudit GY, Penninger JM (2004). Physiological roles of angiotensin-converting enzyme 2. *Cell Mol Life Sci.* 61:2714-9.

de Gandarias JM, Astiazaran JI, Varona A, Fernández D, Gil J, Casis L (1999b). Effect of lithium treatments on the tyrosine-aminopeptidase activities in the rat brain and the pituitary gland. *Arzneimittel-Forschung-Drug Research* 49(10):816-9.

de Gandarias JM, Casis L, Casis E, Iribar C (1984). Angiotensina y sistema nervioso central, *Gac Med Bilbao*, 81: 373-384.

de Gandarias JM, Echevarria E, Irazusta J, Gil J, Casis L (1993). Brain aminopeptidase activity after subacute xylene exposure. *Neurotoxicology and Teratology* 15(1):51-3.

de Gandarias JM, Irazusta J, Echevarria E, Casis L (1993). Aspartate-aminopeptidase activity during the estrous cycle and the pregnancy in rat brain and pituitary gland. *Exp Clin Endocrinol.* 101(3):156-60.

de Gandarias JM, Irazusta J, Echevarria E, Casis L (1994b). Regulación de la liberación gonadotrópica hipofisaria: Papel de los enzimas proteolíticos. *Gaceta Médica de Bilbao* 91(3):70-4.

de Gandarias JM, Irazusta J, Fernández D, Gallego M, Silio M, Casis L (1996). Membrane-bound tyrosine aminopeptidase activities in the rat brain throughout the estrous cycle. *Life Sciences* 59(13):1097-101.

de Gandarias JM, Irazusta J, Fernández D, Varona A, Casis L (1994a). Developmental changes of pyroglutamate-peptidase I activity in several regions of the female and the male rat brain. *The International journal of neuroscience* 77(1- 2):53-60.

de Gandarias JM, Irazusta J, Varona A, Gil J, Fernández D, Casis L (1999a). Effect of imipramine on enkephalin-degrading peptidases. *European Neuropsychopharmacology* 9(6):493-9.

de Gandarias JM, Ramirez M, Echevarria E, Irazusta J, Casis L (1990). Serum and brain aminopeptidase activities in cyclic rats. *General Physiology and Biophysics* 9(4):385-9.

de Gandarias JM, Ramirez M, Zulaica J, Casis L (1989). Aminopeptidase (Arylamidase) activity in discrete areas of the rat-brain: Sex differences. *Hormone and Metabolic Research* 21(5):285-6.

de Gasparo M and Siragy HM (1999). The AT2 receptor: fact, fancy and fantasy. *Regul Pept* 81:11-24.

de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW and Unger T (2000). International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev* 52:415-472.

de Lorenzo Fernández P (2003). *Drogodependencias*. Madrid: Editorial Médica

de Mota N, Iturrioz X, Claperon C, Bodineau L, Fassot C, Roques BP, Palkovits M, Llorens-Cortes C (2008). Human brain aminopeptidase A: biochemical properties and distribution in brain nuclei. *Journal of Neurochemistry* 106(1):416- 28.

de Souza ANC, Bruno JA, Carvalho KM (1991). An enkephalin degrading aminopeptidase of human brain preserved during the vertebrate phylogeny. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Pharmacology Toxicology & Endocrinology* 99(3):363-7.

Delitala G, Grossman A, Besser GM (1981). Changes in pituitary hormone levels induced by met-enkephalin in man--the role of dopamine. *Life Sci.* Oct 12; 29(15):1537-44.

Dell'Aquila ME, Albrizio M, Guaricci AC, De Santis T, Maritato F, Tremoleda JL, Colenbrander B, Guerra L, Casavola V, Minoia P (2008). Expression and localization of the mu-

opioid receptor (MOR) in the equine cumulus-oocyte complex and its involvement in the seasonal regulation of oocyte meiotic competence. *Molecular Reproduction and Development* 75(8):1229-46

Dell'Aquila ME, Casavola V, Reshkin SJ, Albrizio M, Guerra L, Maritato F, Minoia P (2002). Effects of beta-endorphin and Naloxone on in vitro maturation of bovine oocytes. *Molecular Reproduction and Development* 63(2):210-22.

Dell'Aquila ME, Cho YS, Albrizio M, Guaricci AC, Maritato F, Minoia P (2003). Immunofluorescence detection of the mu-opioid receptor in human oocytes. *Human Reproduction* 18:180.

Demaegdt H, Vanderheyden P, De Backer JP, Mosselmans S, Laeremans H, Le MT, Kersemans V, Yvette MB, Vauquelin G (2004). Endogenous cystinyl aminopeptidase in Chinese hamster ovary cells: characterization by I-125 Ang IV binding and catalytic activity. *Biochemical Pharmacology* 68(5):885-92.

Dierich A, Sairam MR, Monaco L, Fimia GM, Gansmuller A, LeMeur M, Sassone-Corsi P (1998). Impairing follicle-stimulating hormone (FSH) signaling in vivo: targeted disruption of the FSH receptor leads to aberrant gametogenesis and hormonal imbalance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Nov 10; 95(23):13612-7.

Dobrinski I, Ignatz GG, Fagnan MS, Yudin SI and Ball BA (1997). Isolation and characterization of a protein with homology to angiotensin converting enzyme from the periacrosomal plasma membrane of equine spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 48:251-260.

Dobson H, Smith RF (2000). What is stress, and how does it affect reproduction? *Animal Reproduction Science* 60:743-52.

Dodge L (2017). The impact of male partner age on cumulative incidence of live birth following in vitro fertilization. *Abstrat Congreso ESHRE*.

Douglass J, Cox B, Quinn B, Civelli O, Herbert E (1987). Expression of the prody-norphin gene in male and female mammalian reproductive tissues. *Endocrinology* Feb; 120(2):707-13.

Drucker DJ, Nauck MA (2006). The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *Lancet* 368(9548):1696-705.

Dubois V, Van Ginneken C, De Cock H, Lambeir AM, Van der Veken P, Augustyns K, Chen X, Scharpé S, De Meester I (2009). Enzyme activity and immunohistochemical localization of dipeptidyl peptidase 8 and 9 in male reproductive tissues. *J Histochem Cytochem*. Jun; 57(6):531-41.

Duran EH, Morshedi M, Taylor S, Oehninger S (2002). Sperm DNA quality predicts intrauterine insemination outcome: a prospective cohort study. *Hum Reprod*. Dec;17(12):3122-8.

Dyer SH, Slaughter CA, Orth K, Moomaw CR, Hersh LB (1990). Comparison of the soluble and membrane bound forms of the puromycin sensitive enkephalin degrading aminopeptidases from rat. *Journal of Neurochemistry* 54(2):547-54.

E

Eblen A, Bao S, Lei ZM, Nakajima ST, Rao CV (2001). The presence of functional luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptors in human sperm. *J Clin Endocrinol Metab*. Jun; 86(6):2643-8.

Elde R, Arvidsson U, Riedl M, Vulchanova L, Lee JH, Dado R, Nakano A, Chakrabarti S, Zhang X and Loh HH (1995). Distribution of neuropeptide receptors. New views of peptidergic neurotransmission made possible by antibodies to opioid receptors. *Ann N Y Acad Sci* 757: 390-404.

El-Domyati M, Al-Din A, Barakat M, El-Fakahany H, Xu J, Sakkas D (2009). DNA repair and apoptosis in testicular germ cells of ageing fertile males: the role of the poly(ADP-ribosyl)ation pathway. *Fertil Steril*. May; 91(5 Suppl):2221-9.

El-Dorry HA, MacGregor JS and Soffer RL (1983). Dipeptidyl carboxypeptidase from seminal fluid resembles the pulmonary rather than the testicular isoenzyme. *Biochem Biophys Res Commun* 115:1096-1100

Enciso M, Muriel L, Fernandez JL, Goyanes V, Segrelles E, Marcos M, Montejo JM, Ardoy M, Pacheco A and Gosálvez (2006). Infertile Men With Varicocele Show a High Relative Proportion of Sperm Cells With Intense Nuclear Damage Level, Evidenced by the Sperm Chromatin Dispersion. *Journal of Andrology*, Vol. 27, No. 1, January/February 2006 Copyright q American Society of Andrology

Engel M, Hoffmann T, Wagner L, Wermann M, Heiser U, Kiefersauer R, Huber R, Bode W, Demuth HU, Brandstetter H (2003). The crystal structure of dipeptidyl peptidase IV (CD26) reveals its functional regulation and enzymatic mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Apr 29; 100(9):5063-8.

Eppig JJ (2001). Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction* 122(6):829-38.

Erbeznik H, Hersh LB (1997). A novel mammalian high-molecular-weight aminopeptidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 344(1):228-34.

Eskeland NL, Lugo DI, Pintar JE, Schachter BS (1989). Stimulation of beta- endorphin secretion by corticotropin-releasing factor in primary rat Leydig cell cultures. *Endocrinology*. Jun; 124(6):2914-9.

Esther CR, Howard TE, Marino EM, Goddard JM, Capecchi MR and Bernstein KE (1996). Mice lacking angiotensin-converting enzyme have low blood pressure, renal pathology, and reduced male fertility. *Lab Invest* 74:953-965.

Estomba H, Muñoz-Hoyos I, Gianzo M, Urizar-Arenaza I, Casis L, Irazusta J, Subirán N (2016). Expression and Localization of Opioid Receptors in Male Germ Cells and the Implication for Mouse Spermatogenesis. Department of Physiology, Faculty of Medicine and Dentistry, University of the Basque Country, Leioa, Bizkaia, Spain. *PLOS ONE* | DOI:10.1371/journal.pone.0152162 March 31, 1.

F

Fabbri A, Fraioli F, Isidori A (1986). Opioid peptides in the testis and the male genital tract: presence and possible function. *J Endocrinol Invest*. Dec; 9(6):521-8.

Fabbri A, Jannini EA, Gnessi L, Ulisse S, Moretti C, Isidori A (1989). Neuro-endocrine control of male reproductive function: The opioid system as a model of control at multiple sites. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 32(1B):145-50.

Fabbri A, Knox G, Buczko E, Dufau ML (1988). Beta-endorphin production by the fetal Leydig cell: regulation and implications for paracrine control of Sertoli cell function. *Endocrinology*. Feb; 122(2):749-55.

Fabbri A, Tsai-Morris CH, Luna S, Fraioli F, Dufau ML (1985). Opiate receptors are present in the rat testis. Identification and localization in Sertoli cells. *Endocrinology*. Dec; 117(6):2544-6.

Facchinetti F, Ruspa M, Turci A, Petraglia F, Segre A, Forabosco A, Genazzani AR (1986). Met-enkephalin enhances follicle-stimulating hormone-dependent progesterone production from cultured granulosa cells. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 63(5):1222-4.

Feldman RS, Meyer JS, Quenzer L (1997). The opiates. *Neuropsychopharmacology*. Sunderland MA: Sinauer Associates. 495-598.

Fernández D (1996). Papel de las aminopeptidasas cerebrales en la liberación de gonadotropinas. Departamento de Fisiología. Universidad del País Vasco. Tesis doctoral

Fernández D, Valdivia A, Irazusta J, Ochoa C, Casis L (2002). Peptidase activities in human semen. *Peptides* Mar; 23(3):461-8.

Fernández JL, Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosálvez J, Enciso M, LaFromboise M, and De Jonge Ch (2005). Halosperm® is an easy, available, and cost-effective alternative for determining sperm DNA fragmentation. *Fertility and Sterility* Vol. 84, No. 4, October

Fernandez JL, Muriel L, Rivero MT, Goyanes V, Vazquez R and Alvarez JG (2003). The Sperm Chromatin Dispersion Test: A Simple Method for the Determination of Sperm DNA Fragmentation. *Journal of Andrology*, Vol. 24, No. 1, January/February Copyright q American Society of Andrology

Ferro ES, Hyslop S, Camargo ACM (2004). Intracellular peptides as putative natural regulators of protein interactions. *Journal of Neurochemistry* 91(4):769-77.

Fields A and Sarne Y (1997). The stimulatory effect of opioids on cyclic AMP production in SK-N-SH cells is mediated by calcium ions. *Life Sci* 61: 6: 595-602.

Fink G (1988). Estrogen and progesterone interactions in the control of gonadotropin and prolactin secretion. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 30(1-6):169- 78.

Flórez J, Armijo JA and Mediavilla A (1998). *Farmacología humana*. Barcelona etc.: Masson, p. 1355.

Foresta C, Mioni R, Rossato M, Varotto A and Zorzi M (1991). Evidence for the involvement of sperm angiotensin converting enzyme in fertilization. *Int J Androl* 14:333-339.

Foresta C, Indino M, Manoni F and Scandellari C (1987). Angiotensin-converting enzyme content of human spermatozoa and its release during capacitation. *Fertil Steril* 47:1000-1003.

Foresta C, Tramarin A, Scandellari C, Arslan P (1985). Effects of a met-enkephalin analogue on motility, O₂ consumption, and ATP content of human spermatozoa. *Arch Androl*. 14(2-3):247-52.

Foulon T, Cadel S, Chesneau V, Draoui M, Prat A, Cohen P (1996). Two novel metallopeptidases with a specificity for basic residues: functional properties, structure, and cellular distribution. *Neuropeptides: Basic and Clinical Advances* 780:106-20.

Foulon T, Cadel S, Piesse C, Cohen P, Barret AJ, Rawling ND, Woessner JF (2004). Aminopeptidase B. *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Elsevier Academic Press.1.

Fournier D, Luft FC, Bader M, Ganten D and Andrade- MA (2012). Emergence and evolution of the renin-angiotensin-aldosterone system. *J Mol Med (Berl)* 90:495-508.

Fraga CG, Motchnik PA, Wyrobek AJ, Rempe DM, Ames BN (1996). Smoking and low antioxidant levels increase oxidative damage to sperm DNA. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis Volume 351, Issue 2, 13 April, Pages 199-203*.

Fraioli F, Fabbri A, Gnessi L, Moretti C, Bonifacio V, Isidori A, Dufau M (1985). Naloxone increases bioactive LH in man: evidence for selective release of early LH pool. *J Endocrinol Invest*. Dec; 8(6):513-7.

Fraioli F, Panerai AE, Santoro C, Fabbri A, Santoro F, Isidori A (1982). Control of gonadotropin secretion in man: role of opioid peptides. *Horm Metab Res*. Jun; 14(6):312-6.

Fraser LR and Adeoya-Osiguwa SA (2001). Fertilization promoting peptide – a possible regulator of sperm function. *Vit Horm*. 63:1–28.

Fraser LR, Pondel MC and Vinson GP (2001). Calcitonin, angiotensin II and FPP significantly modulate mouse sperm function. *Mol Hum Reprod* March; 7(3):245-53.

Frayne J, and Nicholson HD (1998). Localization of oxytocin receptors in the human and macaque monkey male reproductive tracts: evidence for a physiological role of oxytocin in the male. *Mol Hum Reprod* Jun; 4(6):527-32.

Fujimura H, Ino K, Nagasaka T, Nakashima N, Nakazato H, Kikkawa F, Mizutani S (2000). Aminopeptidase A expression in cervical neoplasia and its relationship to neoplastic transformation and progression. *Oncology* 58(4):342-52.

Fujisawa M, Bardin CW, Morris PL (1992). A germ cell factor(s) modulates preproenkephalin gene expression in rat Sertoli cells. *Mol Cell Endocrinol*. Mar; 84(1-2):79-88.

Fujisawa M, Kanzaki M, Okada H, Arakawa S, Kamidono S (1996). Metenkephalin in seminal plasma of infertile men. *International journal of urology: official journal of the Japanese Urological Association* 3(4):297-300.

Fujiwara H, Imai K, Inoue T, Maeda M, Fujii S (1999). Membrane-bound cell surface peptidases in reproductive organs. *Endocrine Journal* 46(1):11-25.

Fujiwara H, Maeda M, Imai K, Fukuoka M, Yasuda K, Horie K, Takakura K, Taii S, Mori T (1992a). Differential expression of aminopeptidase N on human ovarian granulosa and theca cells. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 74(1):91-5.

Fujiwara H, Maeda M, Imai K, Fukuoka M, Yasuda K, Takakura K, Mori T (1992b). Human luteal cells express dipeptidyl peptidase IV on the cell surface. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 75(5):1352-7.

Fukasawa K, Kanari M, Fujii S, Harada M (1996). Molecular cloning and expression of rat liver aminopeptidase B. *Journal of Biological Chemistry* 271(48):30731-5.

Fyhrquist F, Saijonmaa O (2008). Renin-angiotensin system revisited. *Journal of Internal Medicine* 264(3):224-36.

G

Gainer H, Russell JT, Loh YP (1984). An aminopeptidase activity in bovine pituitary secretory vesicles that cleaves the N-terminal arginine from β -lipotropin60-65. *Febs Letters* 175(1):135-9.

Ganong WF (1995). Reproduction and the renin-angiotensin system. *Neurosci Biobehav Rev* 19:241-250

Garcia-Horsman JA, Mannisto PT, Venalainen JI (2007). On the role of prolyl oligopeptidase in health and disease. *Neuropeptides* 41(1):1-24.

Garrett JE, Collard MW, Douglass JO (1989). Translational control of germ cell- expressed mRNA imposed by alternative splicing: opioid peptide gene expression in rat testis. *Mol Cell Biol*. Oct; 9(10):4381-9.

Gass J, Khosla C (2007). Prolyl endopeptidases. *Cellular and Molecular Life Sciences* 64(3):345-55.

Gaveriaux-Ruff C, and Kieffer BL. (1999) Opioid receptors: gene structure and function. *Opioids in Pain Control: Basic and Clinical Aspects*. Cambridge University Press.

Gerendai I, Shaha C, Gunsalus GL, Bardin CW (1986). The effects of opioid receptor antagonists suggest that testicular opiates regulate Sertoli and Leydig cell function in the neonatal rat. *Endocrinology* May; 118(5):2039-44.

Gianzo M (2016). "Estudio del Sistema Renina Angiotensina como posible biomarcador para la mejora de los tratamientos de fecundación in vitro". Departamento de Fisiología. Universidad del País Vasco. Tesis Doctoral.

Gilchrist RB, Ritter LJ, Armstrong DT (2004). Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. *Animal Reproduction Science* 82-3:431-46.

Glenner GG, McMillan PJ, Folk JE (1962). A mammalian peptidase specific for hydrolysis of N-terminal alpha-L-glutamyl and aspartyl residues. *Nature* 194(4831):867.

Goossens F, DeMeester I, Vanhoof G, Scharpe S (1996a). Distribution of prolyl oligopeptidase in human peripheral tissues and body fluids. *European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry* 34(1):17-22.

Goossens FJ, Wauters JG, Vanhoof GC, Bossuyt PJ, Schatteman KA, Loens K, Scharpe SL (1996b). Subregional mapping of the human lymphocyte prolyl oligopeptidase gene (PREP) to human chromosome 6q22. *Cytogenetics and Cell Genetics* 74(1-2):99-101.

Goto Y, Hattori A, Ishii Y, Mizutani S, Tsujimoto M (2006). Enzymatic properties of human aminopeptidase A: regulation of its enzymatic activity by calcium and angiotensin IV. *Journal of Biological Chemistry* 281(33):23503-13.

Gotoh H, Hagihara M, Nagatsu T, Iwata H, Miura T (1988). Activity of dipeptidyl peptidase IV and post-proline cleaving enzyme in sera from osteoporotic patients. *Clinical Chemistry* 34(12):2499-501.

Greco E, Scarselli F, Iacobelli M, Rienzi L, Ubaldi F, Ferrero S, Franco G, Anniballo N, Mendoza C, Tesarik J (2005). Efficient treatment of infertility due to sperm DNA damage by ICSI with testicular spermatozoa. *Hum Reprod*, 20 (2005), pp. 226–230.

Greenberg LJ (1962). Fluorometric measurement of alkaline phosphatase and aminopeptidase activities in the order of 10⁻¹⁴ mole. *Biochem Biophys Res Commun*. Nov 27; 9:430-5.

Gros C, Giros B, Schwartz JC (1985a). Purification of membrane-bound aminopeptidase from rat-brain: Identification of aminopeptidase-M. *Neuropeptides* 5(4-6):485-8.

Gros C, Giros B, Schwartz JC (1985b). Identification of aminopeptidase-M as an enkephalin- inactivating enzyme in rat cerebral membranes. *Biochemistry* 24(9):2179-85.

Grunewald S, Paasch U, Glander HJ (2001). Enrichment of non-apoptotic human spermatozoa after cryopreservation by immunomagnetic cell sorting. *Cell Tissue Bank*, 2 pp. 127–133.

Gur Y, Breitbart H, Lax Y, Rubinstein S and Zamir N (1998). Angiotensin II induces acrosomal exocytosis in bovine spermatozoa. *Am J Physiol* 275:E87-93.

Gwathmey TM, Westwood BM, Pirro NT, Tang L, Rose JC, Diz DI, Chappell MC (2010). Nuclear angiotensin-(1-7) receptor is functionally coupled to the formation of nitric oxide. *Am J Physiol Renal Physiol*. 299:983-90.

H

Haeggström J (2004). Aminopeptidase PS. *Handbook of Proteolytic Enzymes*. A. Barrett, N. Rawlings and J. Woessner, Elsevier Academic Press. 1:313-6.

Hagaman JR, Moyer JS, Bachman ES, Siboney M, Magyar PL, Welch JE, Smithies O, Krege JH, O'Brien DA (1988). Angiotensin-converting enzyme and male fertility. *Proc Natl Acad Sci USA*. Mar 3; 95(5):2552-7.

Hales BF, Barton TS, Robaire B (2005). Impact of paternal exposure to chemotherapy on offspring in the rat. *J Natl Cancer Inst Monogr* 34; 28-31.

Hallberg M, Le Grevés P, Nyberg F (2005). Neuropeptide processing. *Proteases in the Brain*. Lendeckel N.M., Hooper U. Edizioa. Springer Science 203-34.

Hannoun A, Ghaziri G, Abu Musa A, Zreik TG, Hajameh F, Awwad J (2010). Addition of sphingosine-1-phosphate to human oocyte culture medium decreases embryo fragmentation. *Reproductive Biomedicine Online* 20(3):328-34.

Hansson V, Reusch E, Trygstad O, Torgersen O, Ritzen EM, French FS (1973). FSH stimulation of testicular androgen binding protein. *Nat New Biol*. Nov 14; 246(150):56-8.

Harata T, Ando H, Iwase A, Nagasaka T, Mizutani S, Kikkawa F (2006). Localization of angiotensin II, the AT1 receptor, angiotensin-converting enzyme, aminopeptidase A, adipocyte-derived leucine aminopeptidase, and vascular endothelial growth factor in the human ovary throughout the menstrual cycle. *Fertility and Sterility* 86(2):433-9.

Hashida H, Takabayashi A, Kanai M, Adachi M, Kondo K, Kohno N, Yamaoka Y, Miyake M (2002). Aminopeptidase N is involved in cell motility and angiogenesis: Its clinical significance in human colon cancer. *Gastroenterology* 122(2):376-86.

Hassan E, Creatsas G, Mastorakos G, Michalas S (2000). Clinical implications of the ovarian/endometrial renin-angiotensin-aldosterone system. *Young Woman at the Rise of the 21st Century: Gynecological and Reproductive Issues in Health and Disease*. G. Creatsas, G. Mastorakos and G. P. Chrousos. 900:107-18.

Havre PA, Abe M, Urasaki Y, Ohnuma K, Morimoto C, Dang NH (2008). The role of CD26/dipeptidyl peptidase IV in cancer. *Frontiers in Bioscience-Landmark* 13:1634-45.

Havre PA, Abe M, Urasaki Y, Ohnuma K, Morimoto C, Dang NH (2008). The role of CD26/dipeptidyl peptidase IV in cancer. *Front Biosci*. Jan 1; 13:1634-45.

Heckert LL, Griswold MD (2002). The expression of the follicle-stimulating hormone receptor in spermatogenesis. *Recent Prog Horm Res.*; 57:129-48.

Hernández Ávalos I, Ruiz Cervantes JJ, Ruiz Rivera MA, Ruiz Cervantes JG, Miranda Cortés AE (2006). Péptidos opioides endógenos (POE): su control sobre la reproducción. *Revista AMMVEPE* 17 (6): 255-263.

Herr D, Bekes I and Wulff C (2013). Local Renin-Angiotensin system in the reproductive system. *Front Endocrinol (Lausanne)* 4:150.

Hersh LB, McKelvy JF (1981). An aminopeptidase from bovine brain which catalyzes the hydrolysis of enkephalin. *Journal of Neurochemistry* 36(1):171-8.

Hertting G and Meyer DK (1974). Effect of converting enzyme blockade on isoprenaline- and angiotensin I- induced drinking. *Br J Pharmacol* 52:381-386.

Hirai K, Song K, Kanehara H, Shiota N, Ueda H, Kim S, Miyazaki H, Katsuoka Y and Miyazaki M (1998). Pituitary-dependent expression of the testicular angiotensin II receptor and its subtypes in rats. *Int J Androl* 21:177-185.

Hohlbrugger G, Pschorr J and Dahlheim H (1984). Angiotensin I converting enzyme in the ejaculate of fertile and infertile men. *Fertil Steril* 41:324-325.

Hopsu VK, Makinen KK, Glenner GG (1966). Characterization of aminopeptidase B: substrate specificity and affector studies. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 114(3):567-75.

Horio J, Nomura S, Okada M, Katsumata Y, Nakanishi Y, Kumano Y, Takami S, Kinoshita M, Tsujimoto M, Nakazato H, Mizutani S (1999). Structural organization of the 5'-end and chromosomal assignment of human placental leucine aminopeptidase insulin-regulated membrane aminopeptidase gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 262(1):269-74.

Horio J, Nomura S, Okada M, Katsumata Y, Nakanishi Y, Kumano Y, Takami

Huang HF, Pogach LM, Nathan E, Giglio W, Seebode JJ (1991). Synergistic effects of folliclestimulating hormone and testosterone on the maintenance of spermiogenesis in hypophysectomized rats: relationship with the androgen- binding protein status. *Endocrinology*. Jun; 128(6):3152-61.

Hughes J and Kosterlitz HW (1983). Opioid Peptides: introduction. *Br Med Bull* 39: 1: 1-3.

Hugues J, Smith TW, Kosterlitz HW et al., (1975). Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature*, 258: 577.

Hui K-S (2007). Brain-specific aminopeptidase: From enkephalinase to protector against neurodegeneration. *Neurochemical Research* 32(12):2062-71.

Hwang S-R, O'Neill A, Bark S, Foulon T, Hook V (2007). Secretory vesicle aminopeptidase B related to neuropeptide processing: molecular identification and subcellular localization to enkephalin- and NPY-containing chromaffin granules. *Journal of Neurochemistry* 100(5):1340-50.

Imai K, Maeda M, Fujiwara H, Kariya M, Takakura K, Kanzaki H, Mori T (1992c). Dipeptidyl peptidase IV as a differentiation marker of the human endometrial glandular cells. *Human Reproduction* 7(9):1189-94.

Ino K, Uehara C, Kikkawa F, Kajiyama H, Shibata K, Suzuki T, Khin EE, Ito M, Takeuchi M, Itakura A, Mizutani S (2003). Enhancement of aminopeptidase A expression during angiotensin II-induced choriocarcinoma cell proliferation through AT(1) receptor involving protein kinase C- and mitogen-activated protein kinase-dependent signaling pathway. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 88(8):3973-82.

Iorga AI, Valentini L, De Santis T, Ambruosi B, Albrizio M, Guaricci AC, Caira M, Dell'Aquila ME (2009). Expression of the mu Opioid Receptor and Effects of the Opioid Antagonist Baloxone on In Vitro Maturation of Oocytes Recovered from Anoestrous Bitches. *Reproduction in Domestic Animals* 44:263-8.

Irazusta J, Valdivia A, Fernández D, Agirregoitia E, Ochoa C, Casis L (2004). Enkephalin-degrading enzymes in normal and subfertile human semen. *J Androl*. Sep-Oct; 25(5):733-9.

Irvine DS, Macleod IC, Templeton AA, Masterton A, Taylor A (1994). A prospective clinical study of the relationship between the computer-assisted assessment of human semen quality and the achievement of pregnancy in vivo. *Hum Reprod* 9:2324-34.

Ishii K, Usui S, Sugimura Y, Yoshida S, Hioki T, Tatematsu M, Yamamoto H, Hirano K (2001). Aminopeptidase N regulated by zinc in human prostate participates in tumor cell invasion. *International Journal of Cancer* 92(1):49-54.

Ito N, Nomura S, Iwase A, Ito T, Kikkawa F, Tsujimoto M, Ishiura S, Mizutani S (2004). ADAMs, a disintegrin and metalloproteinases, mediate shedding of oxytocinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 314(4):1008-13.

Ito T, Nomura S, Okada M, Katsumata Y, Iwase A, Kikkawa F, Tsujimoto M, Mizutani S (2001). Transcriptional regulation of human placental leucine aminopeptidase/oxytocinase gene. *Molecular human reproduction* 7(9):887-94.

Iversen LL (1987). Overview:peptides in the nervous system. In: *Neuropeptides and their peptidases*, edited by Turner AJ. Chichester: Ellis Horwood Ltd.

Iwai M and Horiuchi M (2009). Devil and angel in the renin-angiotensin system: ACE-angiotensin II-AT1 receptor axis vs. ACE2-angiotensin-(1-7)-Mas receptor axis. *Hypertens Res* 32:533-536.

Iwaki-Egawa S, Watanabe Y, Kikuya Y, Fujimoto Y (1998). Dipeptidyl peptidase IV from human serum: purification, characterization, and N-terminal amino acid sequence. *Journal of Biochemistry* 124(2):428-33.

J

Jaiswal AK, Panda JN, Kumar MV and Singh LN (1983). Age related development of angiotensin converting enzyme in testes and epididymis of rat. *Andrologia* 15:347-349.

Jayne S, Bosler, MD, Kelvin P. Davies, PhD, and Genevieve S. Neal-Perry, MD, PhD1,2,4 (2014). Peptides in Seminal Fluid and Their Role in Infertility: A Potential Role for Opiorphin Inhibition of Neutral Endopeptidase Activity as a Clinically Relevant Modulator of Sperm Motility: A Review” *Reproductive Sciences*, Vol. 21(11) 1334-1340.

Jordan B and Devi LA (1998). Molecular mechanisms of opioid receptor signal transduction. *Br J Anaesth* 81: 1: 12-19.

Jung K, Pergande M, Wischke UW (1984). Characterization of particulate and soluble variants of the brush-border enzymes alanine aminopeptidase, alkaline-phosphatase and gamma-glutamyltransferase in human-urine. *Biomedica Biochimica Acta* 43(12):1357-64.

K

Kakidani H, Furutani Y, Takahashi H, Noda M, Morimoto Y, Hirose T, Asai M, Inayama S, Nakanishi S and Numa S (1982). Cloning and sequence analysis of cDNA for porcine beta-neo-endorphin/dynorphin precursor. *Nature* 298: 5871: 245-249.

Kalra SP (1992). Hypothalamic opioid systems and reproduction - physiological considerations. *Hormones in Gynecological Endocrinology*.

Kaminski T, Siawrys G, Bogacka I, Okrasa S, Przala J (2003). The regulation of steroidogenesis by opioid peptides in porcine theca cells. *Animal Reproduction Science* 78(1-2):71-84.

Kandror KV, Yu LC, Pilch PF (1994). The major protein of Glut4-containing vesicles, gp160, has aminopeptidase activity. *Journal of Biological Chemistry* 269(49):30777-80.

Karlsson C, Lindell K, Svensson E, Bergh C, Lind P, Billig H, Carlsson LMS, Carlsson B (1997). Expression of functional leptin receptors in the human ovary. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 82(12):4144-8.

Keller SR, Scott HM, Mastick CC, Aebersold R, Lienhard GE (1995). Cloning and characterization of a novel insulin-regulated membrane aminopeptidase from Glut4 vesicles. *Journal of Biological Chemistry* 270(40):23612-8.

Kelly JA, Neidle EL, Neidle A (1983). An aminopeptidase from mouse brain cytosol that cleaves N-terminal acidic amino acid residues. *Journal of Neurochemistry* 40(6):1727-34.

Kenny J (1986). Cell - surface peptidases are neither peptide - specific nor organ - specific. *Trends in Biochemical Sciences* 11(1):40-2.).

Kerr JB (1992). Functional cytology of the human testis. *Bailliere Clin Endocrinol Metab* Apr 6(2):235-50.

Kerr MA, Kenny AJ (1974). The purification and specificity of a neutral endopeptidase from rabbit kidney brush border. *Biochem J. Mar*; 137(3):477-88).

Kew D, Jin DF, Kim F, Laddis T, Kilpatrick DL (1989). Translational status of proenkephalin mRNA in the rat reproductive system. *Mol Endocrinol. Aug*; 3(8):1191-6.

Kew D, Muffly KE, Kilpatrick DL (1990). Proenkephalin products are stored in the sperm acrosome and may function in fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A. Dec*; 87(23):9143-7.

Khanum A and Dufau ML (1988). Angiotensin II receptors and inhibitory actions in Leydig cells. *J Biol Chem* 263:5070-5074.

Kikkawa F, Kajiyama H, Shibata K, Ino K, Nomura S, Mizutani S (2005). Dipeptidyl peptidase IV in tumor progression. *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics* 1751(1):45-51.

Kilpatrick DL, Borland K, Jin DF (1987). Differential expression of opioid peptide genes by testicular germ cells and somatic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A. 1987 Aug*; 84(16):5695-9.

Kilpatrick DL, Howells RD, Noe M, Bailey LC, Udenfriend S (1985). Expression of preproenkephalin-like mRNA and its peptide products in mammalian testis and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A. Nov*; 82(21):7467-9.

Kilpatrick DL, Millette CF (1986). Expression of proenkephalin messenger RNA by mouse spermatogenic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A. Jul*; 83(14):5015-8.

Kilpatrick DL, Zinn SA, Fitzgerald M, Higuchi H, Sabol SL, Meyerhardt J (1990). Transcription of the rat and mouse proenkephalin genes is initiated at distinct sites in spermatogenic and somatic cells. *Mol Cell Biol. Jul*; 10(7):3717-26.

Kimura A, Matsui H, Takahashi T (2002). Expression and localization of prolyl oligopeptidase in mouse testis and its possible involvement in sperm motility. *Zoological Science* 19(1):93-102.

Kimura A, Ohnishi J, Okimura H, Hamabata T, Takahashi T (1998). Localization of prolyl endopeptidase mRNA in small growing follicles of porcine ovary. *Molecular Reproduction and Development* 50(2):121-7.

Kioussi C, Crine P, Matsas R (1992). Endopeptidase-24.11 is suppressed in myelin-forming but not in non-myelin-forming Schwann cells during development of the rat sciatic nerve. *Neuroscience. Sep*; 50(1):69-83.

Kobori H, Nangaku M, Navar LG, Nishiyama A (2007). The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hipertensi3n and kidney disease. *Pharmacol Rev.* 59:251-87.

Kobori H, Nangaku M, Navar LG, Nishiyama A (2007). The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hipertensi3n and kidney disease. *Pharmacol Rev.* 59:251-87.

Kohn FM, Dammshausser I, Neukamm C, Renneberg H, Siems WE, Schill WB and Aumuller G (1998b). Ultrastructural localization of angiotensin-converting enzyme in ejaculated human spermatozoa. *Hum Reprod* 13:604-610.

Kohn FM, Miska W and Schill WB (1995). Release of angiotensin-converting enzyme (ACE) from human spermatozoa during capacitation and acrosome reaction. *J Androl* 16:259-265.

Kohn FM, Muller C, Drescher D, Neukamm C, el Mulla KF, Henkel R, Hagele W, Hinsch E, Habenicht UF and Schill WB (1998a). Effect of angiotensin converting enzyme (ACE) and angiotensins on human sperm functions. *Andrologia* 30:207-215.

Kokkinaki M, Lee T, He Z et al. (2010). Age affects gene expression in mouse spermatogonial stem/progenitor cells. *Reproduction* 139(6):1011-20.

Krege JH, John SW, Langenbach LL, Hodgins JB, Hagaman JR, Bachman ES, Jennette JC, O'Brien DA and Smithies O (1995). Male-female differences in fertility and blood pressure in ACE-deficient mice. *Nature* 375:146-148.

Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, Swanson RJ, Matta JF, Oehninger S (1988). Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization. *Fertil Steril*; 49:112–7.

Kuhar MJ, Pert CB, Snyder SH (1973). Regional distribution of opiate receptor binding in monkey and human brain. *Nature*, 245: 447.

Kuhl H, Rosniatowski C, Taubert HD (1978). Activity of an LH-RH-degrading enzyme in anterior-pituitary during rat estrus cycle and its alteration by injections of sex-hormones. *Acta Endocrinologica* 87(3):476-84.

Kuhl H, Taubert HD (1975). Short-loop feedback mechanism of luteinizing-hormone: LH stimulates hypothalamic L-cystine arylamidase to inactivate LH-RH in rat hypothalamus. *Acta Endocrinologica* 78(4):649-63.

Kumar R, Singh VP and Baker KM (2007). The intracellular renin-angiotensin system: a new paradigm. *Trends Endocrinol Metab* 18:208-214.

Kyrieleis O.J.P., P. Goettiga, R. Kiefersauera, R. Hubera et al. (2005). Crystal Structures of the Tricorn Interacting Factor F3 from *Thermoplasma acidophilum*, a Zinc Aminopeptidase in Three Different Conformations. *J Mol Biol.* 4: 787–800.

L

Lambeir AM, Durinx C, Scharpé S, De Meester (2003). IDipeptidyl-peptidase IV from bench to bedside: an update on structural properties, functions, and clinical aspects of the enzyme DPP IV. *Crit Rev Clin Lab Sci.* Jun; 40(3):209-94.

Lambert DW, Hooper NM, Turner AJ (2008). Angiotensin-converting enzyme 2 and new insights into the renin-angiotensin system. *Biochem Pharmacol.* 75:781-6.

Lamirande E, Gagnon C (1995). Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. *Hum Reprod* 10:15-21.

Larrinaga G, Blanco L, Sanz B, Pérez I, Gil J, Unda M, Andres L, Casis L, Lopez JI (2012). The impact of peptidase activity on clear cell renal cell carcinoma survival. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 303(12):F1584-F91.

Larrinaga G, Pérez I, Blanco L, Lopez JI, Andres L, Etxezarraga C, Santaolalla F, Zabala A, Varona A, Irazusta J (2010). Increased prolyl endopeptidase activity in human neoplasia. *Regulatory Peptides* 163(1-3):102-6.

Larrinaga G, Pérez I, Sanz B, Irazusta A, Zarrazquin I, Elena Sanchez C, Sanchez del Rey A, Zabala A, Santaolalla F (2011b). Activity of soluble aminopeptidase A and dipeptidyl peptidase IV and membrane-bound aminopeptidase B and pyroglutamyl peptidase I in adenoid hyperplasia, tonsillar hyperplasia and chronic tonsillitis. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* 75(11):1399- 403.

Larrinaga G, Pérez I, Sanz B, Zarrazquin I, Casis L, Antonio Anta J, Martinez A, Santaolalla F (2011a). Altered dipeptidyl peptidase IV and prolyl endopeptidase activities in chronic tonsillitis, tonsillar hyperplasia and adenoid hyperplasia. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* 75(3):347-50.

Lauffart B, McDermott J, Jones P, Mantle D (1988). Amino acid inhibition of aminopeptidases purified from human cerebral cortex. *Biochemical Society Transactions* 16(5):849-50.

Laustsen PG, Rasmussen TE, Petersen K, PedrazaDiaz S, Moestrup SK, Gliemann J, SottrupJensen L, Kristensen T (1997). The complete amino acid sequence of human placental oxytocinase. *Biochimica Et Biophysica Acta- Gene Structure and Expression* 1352(1):1-7.

Leal MC, Pinheiro SV, Ferreira AJ, Santos RA, Bordoni LS, Alenina N, Bader M and Franca LR (2009). The role of angiotensin-(1-7) receptor Mas in spermatogenesis in mice and rats. *J Anat* 214:736-743.

Lei ZM, Rao CV (2001). Neural actions of luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin. *Semin Reprod Med.*; 19(1):103-9.

Lemaire S, Magnan J and Regoli D (1978). Rat vas deferens: a specific bioassay for endogenous opioid peptides. *Br J Pharmacol* 64: 3: 327-329.

Letarte M, Vera S, Tran R, Addis JB, Onizuka RJ, Quackenbush EJ, Jongeneel CV, McInnes RR (1988). Common acute lymphocytic leukemia antigen is identical to neutral endopeptidase. *J Exp Med.* Oct 1; 168(4):1247-53.

Leung PS (2007). The physiology of a local renin-angiotensin system in the pancreas. *Journal of Physiology-London* 580(1):31-7.

Leung PS and Sernia C (2003). The renin-angiotensin system and male reproduction: new functions for old hormones. *J Mol Endocrinol* 30:263-270.

Levy BI (2004). Can angiotensin II type 2 receptors have deleterious effects in cardiovascular disease? Implications for therapeutic blockade of the renin-angiotensin system. *Circulation* 2004:109:8-13.

Levy S, Serre V, Hermo L et al. (1999). The effects of aging on the seminiferous epithelium and the blood–testis barrier of the Brown Norway rat. *J. Androl.* 20:356–65.

Li JR, Wilk E, Wilk S (1996). Inhibition of prolyl oligopeptidase by Fmoc- aminoacylpyrrolidine-2-nitriles. *Journal of Neurochemistry* 66(5):2105-12.

Li LJ, Zhang FB, Liu SY, Tian YH, Le F, Wang LY, Lou HY, Xu XR, Huang HF and Jin F (2014). Human sperm devoid of germinal angiotensin-converting enzyme is responsible for total fertilization failure and lower fertilization rates by conventional in vitro fertilization. *Biol Reprod* 90:125.

Linardi A, Panunto PC, Ferro ES, Hyslop S (2004). Peptidase activities in rats treated chronically with N-omega-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME). *Biochemical Pharmacology* 68(2):205-14.

Liu L, Qian J, Singh H, Meiers I, Zhou X, Bostwick DG (2007). Immunohistochemical analysis of chromophobe renal cell carcinoma, renal oncocytoma, and clear cell carcinoma - An optimal and practical panel for differential diagnosis. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 131(8):1290-7.

Lojda Z, Gossrau R (1980). Study on aminopeptidase A. *Histochemistry* 67(3):267-90.

Look AT, Ashmun RA, Shapiro LH, Peiper SC (1989). Human myeloid plasma membrane glycoprotein CD13 (gp150) is identical to aminopeptidase-N. *Journal of Clinical Investigation* 83(4):1299-307.

Lopes S, Jurisicova A, Sun JG, Casper RF (1998). Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa *Hum Reprod*, 13 pp. 896–900.

Lord J et al., (1977): Endogenous opioid peptides: Multiple agonists and receptors. *Nature* 267: 495.

Lorenzo Fernández P (2003). *Drogodependencias*. Madrid: Editorial Médica panamericana, p 651.

Lorenzo P, Ladero J M. Leza JC, Lizasoain I (1999): *Drogodependencias*. Panamericana argitaletxea, Madrid.

Luan Y y Xu W (2007). The Structure and Main Functions of Ami-nopeptidase N. *Curr Med Chem.* 14: 639-647.

M

Mahfouz RZ, Sharma RK, Poenicke K, Jha R, Paasch U, Grunewald S, Agarwal A (2008). Evaluation of poly(ADP-ribose) polymerase cleavage (cPARP) in ejaculated human sperm fractions after induction of apoptosis. *Fertil Steril Volume* 91, Issue 5, Supplement, May, pp. 2210-2220.

Malfroy B, Kuang WJ, Seeburg PH, Mason AJ, Schofield PR (1988). Molecular cloning and amino acid sequence of human enkephalinase (neutral endopeptidase). *FEBS Lett.* Feb 29; 229(1):206-10.

Mansour A, Fox CA, Thompson RC, Akil H and Watson SJ (1994). mu-Opioid receptor mRNA expression in the rat CNS: comparison to mu-receptor binding. *Brain Res* 643: 1-2: 245-265.

Mantle D (1992). Comparison of soluble aminopeptidases in human cerebral cortex, skeletal muscle and kidney tissues. *Clinica Chimica Acta* 207(1-2):107-18.

Mantle D, Hardy MF, Lauffart B, McDermott JR, Smith AI, Pennington RJT (1983). Purification and characterization of the major aminopeptidase from human skeletal muscle. *Biochemical Journal* 211(3):567-73.

Manzano-León N y Mas -Oliva J (2006). Estrés oxidativo, péptido -amiloide y enfermedad de Alzheimer. *Gac Méd Méx* Vol. 142 No. 3, 229-238.

Marcel D, Pollard H, Verroust P, Schwartz JC, Beaudet A (1990). Electron microscopic localization of immunoreactive enkephalinase (EC 3.4.24.11) in the neostriatum of the rat. *J Neurosci*. Aug; 10(8):2804-17.

Marchio S, Lahdenranta J, Schlingemann RO, Valdembri D, Wesseling P, Arap MA, Hajitou A, Ozawa MG, Trepel M, Giordano RJ, Nanus DM, Dijkman H, Oosterwijk E, Sidman RL, Cooper MD, Bussolino F, Pasqualini R, Arap W (2004). Aminopeptidase A is a functional target in angiogenic blood vessels. *Cancer Cell* 5(2):151-62.

Marcon L, Boissonneault G (2004). Transient DNA strand breaks during mouse and human spermiogenesis new insights in stage specificity and link to chromatin remodeling *Biol Reprod*, 70, pp. 910–918.

Margioris AN, Liotta AS, Vaudry H, Bardin CW, Krieger DT (1983). Characterization of immunoreactive proopiomelanocortin-related peptides in rat testes. *Endocrinology*. Aug; 113(2):663-71.

Mari G, Rizzato G, Iacono E, Merlo B, Minoia R, Belluzzi S (2005). Effects of beta-endorphin and naloxone on motility of cooled equine spermatozoa. *Anim Reprod Sci*. Oct; 89(1-4):223-5.

Marigomez I, Cajaraville MP (1999). Célula Udako Euskal Unibertsitatea argitalaia, Bilbo.

Marina S (2003). Advances in the Knowledges of spermatogenesis. Clinical implications. *Revista Iberoamericana de Fertilidad* Julio-Agosto; 4(20):213-24.

Matsas R, Kenny AJ (1989). Immunocytochemical localization of endopeptidase-24.11 in cultured neurons from pig striatum. *Neuroscience*; 31(1):237-46.

Matsas R, Stephenson SL, Hryszko J, Kenny AJ, Turner AJ (1985). The metabolism of neuropeptides. Phase separation of synaptic membrane preparations with Triton X-114 reveals the presence of aminopeptidase-N. *Biochemical Journal* 231(2):445-9.

Matsumoto AM, Hadáis EY, Rock JA, Rosenwaks Z (1996). Spermatogenesis. In: *Reproductive Endocrinology, Surgery, and Technology*. Lippincott-Raven Publishers. Philadelphia 360-384.

Matsumoto H, Rogi T, Yamashiro K, Kodama S, Tsuruoka N, Hattori A, Takio K, Mizutani S, Tsujimoto M (2000). Characterization of a recombinant soluble form of human placental leucine aminopeptidase/oxytocinase expressed in Chinese hamster ovary cells. *European Journal of Biochemistry* 267(1):46-52.

McDonnell M, Fitzgerald R, Ni Fhaolain I, Jennings PV, O'Cuinn G (1997). The possible role of aminopeptidases from starter culture *Lactococcus lactis* subspecies *cremoris* AM2 in cheese making. *Biochem Soc Trans*. Feb; 25(1):119S.

McLellan S, Dyer SH, Rodriguez G, Hersh LB (1988). Studies on the tissue distribution of the puromycin-sensitive enkephalin-degrading aminopeptidases. *Journal of Neurochemistry* 51(5):1552-9.

McPherson RW, Feldman MA (1991). Narcotics in neuroanesthesia. In: Estafanous FG (ed). *Opioids in anesthesia II*. p. 116. Boston. Butterworth-Heinemann.

McPherson S, Longo FJ (1993). Chromatin structure–function alterations during mammalian spermatogenesis: DNA nicking and repair in elongating spermatids *Eur J Histochem*, 37 pp. 109–128.

McPherson SM, Longo FJ (1992). Localization of DNase I-hypersensitive regions during rat spermatogenesis: stage-dependent patterns and unique sensitivity of elongating spermatids *Mol Reprod Dev*, 31 pp. 268–279.

McPherson SM, Longo FJ (1993). Nicking of rat spermatid and spermatozoa DNA: possible involvement of DNA topoisomerase II *Dev Biol*, 158 pp. 122–130.

Mehta ND, Don J, Zinn SA, Millette C, Wolgemuth DJ, Kilpatrick DL (1994). Proenkephalin gene expression in testicular interstitial cells is down-regulated coincident with the appearance of pachytene spermatocytes. *Endocrinology*. Oct; 135(4):1543-50.

Melner MH, Young SL, Czerwiec FS, Lyn D, Puett D, Roberts JL, Koos RD (1986). The regulation of granulosa cell proopiomelanocortin messenger ribonucleic acid by androgens and gonadotropins. *Endocrinology* 119(5):2082-8.

Menezo YJ, Hazout A, Panteix G, Robert F, Rollet J, Cohen-Bacrie P, Chapuis F, Clément P, Benkhalifa M (2007). Antioxidants to reduce sperm DNA fragmentation: an unexpected adverse effect. *Reprod Biomed Online*, Apr 14(4), pp. 418–421.

Migliore L, Naccarati A, Zanella A, Scarpato R, Bramanti L, Mariani M (2002). Assessment of sperm DNA integrity in workers exposed to styrene. *Hum Reprod* 17: 2912-2918.

Miller D, Ostermeier GC (2006). Towards a better understanding of RNA carriage by ejaculate spermatozoa. *Hum Reprod Update*. Nov-Dec; 12(6):757-67. Epub Aug 1. Review.

Minami M and Satoh M (1995). Molecular biology of the opioid receptors: structures, functions and distributions. *Neurosci Res* 23: 2: 121-145.

Minami M, Nakagawa T, Seki T, Onogi T, Aoki Y, Katao Y, Katsumata S and Satoh M (1996). A single residue, Lys108, of the delta-opioid receptor prevents the mu-opioid- selective ligand [D-Ala²,N-MePhe⁴,Gly-ol⁵]enkephalin from binding to the delta- opioid receptor. *Mol Pharmacol* 50: 5: 1413-1422.

Mina-Osorio P (2008). The moonlighting enzyme CD13: old and new functions to target. *Trends in Molecular Medicine* 14(8):361-71.

Ming-Huei Lin, Kuo-Kuang Lee R, Sheng-Hsiang Li, Chung-Hao Lu, Fang-Ju Sun, Yuh-Ming Hwu (2008). Sperm chromatin structure assay parameters are not related to fertilization rates, embryo quality, and pregnancy rates in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection, but might be related to spontaneous abortion rates. *Fertility and Sterility* Vol. 90, No. 2, August pp. 352-359.

Minoia R, Neglia G, Gasparrini B, Ambruosi B, Dell'Aquila ME, Zicarelli L (2008). Immunofluorescence Detection of Mu-opioid Receptors on Buffalo (Bubalis Bubalis) Primary and In Vitro Matured Oocytes. *Reproduction in Domestic Animals* 43:81.

Mitsui T, Nomura S, Itakura A, Mizutani S (2004). Role of aminopeptidases in the blood pressure regulation. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 27(6):768-71.

Mizutani S, Hayakawa H, Akiyama H, Sakura H, Yoshino M, Oya M, Kawashima Y (1982). Simultaneous determinations of plasma oxytocin and serum placental leucine aminopeptidase (P-LAP) during late pregnancy. *Clinical Biochemistry* 15(3):141-5.

Mizutani S, Hayakawa H, Akiyama H, Sakura H, Yoshino M, Oya M, Kawashima Y (1982). Simultaneous determinations of plasma oxytocin and serum placental leucine aminopeptidase (P-LAP) during late pregnancy. *Clinical Biochemistry* 15(3):141-5.

Mizutani S, Sumi S, Suzuki O, Narita O, Tomoda Y (1984). Post-proline endopeptidase in human placenta. *Biochemical and Biophysical Acta* 1(2):113-7.

Moeller I, Albiston AL, Lew RA, Mendelsohn FAO, Chai SY (1999). A globin fragment, LVV-hemorphin-7, induces H-3 thymidine incorporation in a neuronal cell line via the AT(4) receptor. *Journal of Neurochemistry* 73(1):301-8.

MoHiroi Y, Endo Y, Natori Y (1992). Purification and properties of an aminopeptidase from rat liver cytosol. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 294(2):440-5.

Momeni N, Yoshimoto T, Ryberg B, Sandberg-Wollheim M, Grubb A (2003). Factors influencing analysis of prolyl endopeptidase in human blood and cerebrospinal fluid: increase in assay sensitivity. *Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation* 63(6):387-95.

Morain P, Boeijinga PH, Demazieres A, De Nanteuil G, Luthringer R (2007). Psychotropic profile of S 17092, a prolyl endopeptidase inhibitor, using quantitative EEG in young healthy volunteers. *Neuropsychobiology* 55(3-4):176-83.

Morain P, Robin JL, De Nanteuil G, Jochemsen R, Heidet V, Guez D (2000). Pharmacodynamic and pharmacokinetic profile of S 17092, a new orally active prolyl endopeptidase inhibitor, in elderly healthy volunteers. A phase I study. *British Journal of Clinical Pharmacology* 50(4):350-9.

Morales E, Horn R, Pastor LM, Santamaría L, Pallarés J, Zuasti A, Ferrer C, Canteras M (2004). Involution of seminiferous tubules in aged hamsters: an ultrastructural, immunohistochemical and quantitative morphological study. *Histol. Histopathol.* 19:445–55. 61.

Morinière, J, Morinière J1, Rousseaux S, Steuerwald U, Soler-López M, Curtet S, Vitte AL, Govin J, Gaucher J, Sadoul K, Hart DJ, Krijgsveld J, Khochbin S, Müller CW, Petosa C (2009). Cooperative binding of two acetylation marks on a histone tail by a single bromodomain. *Nature. Oct 1; 461(7264):664-8.*

Morris ID (2002). Sperm DNA damage and cancer treatment *Int J Androl*, 25, pp. 255–261.

Morse HC, Horike N, Rowley MJ, Heller CG (1973). Testosterone concentrations in testes of normal men: effects of testosterone propionate administration. *J Clin Endocrinol Metab.* Dec; 37(6):882-6.

Mortimer ST (1997). A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Hum Reprod Update.* Sep-Oct; 3(5):403-39.

Mucha A, Drag M, Dalton JP y Kafarski P (2010). Metallo-aminopeptidase inhibitors. *Bioch.* 92: 1509-1529.

Mukhopadhyay AK, Cobilanschi J, Schulze W, Brunswig-Spickenheier B and Leidenberger FA (1995) . Human seminal fluid contains significant quantities of prorenin: its correlation with the sperm density. *Mol Cell Endocrinol* 109:219-224.

Murakami H, Yokoyama A, Kondo K, Nakanishi S, Kohno N, Miyake M (2005). Circulating aminopeptidase N/CD13 is an independent prognostic factor in patients with non-small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research* 11(24):8674-9.

Mustafa T, Chai SY, May CN, Mendelsohn FAO, Albiston AL (2004). Oxytocinase/insulin-regulated aminopeptidase is distributed throughout the sheep, female reproductive tract and is regulated by oestrogen in the uterus. *Regulatory Peptides* 122(2):85-9.

Myohanen TT, Kaariainen TM, Jalkanen AJ, Piltonen M, Mannisto PT (2009). Localization of prolyl oligopeptidase in the thalamic and cortical projection neurons: A retrograde neurotracing study in the rat brain. *Neuroscience Letters* 450(2):201-5.

Myohanen TT, Tenorio-Laranga J, Jokinen B, Vazquez-Sanchez R, Moreno-Baylach MJ, Garcia-Horsman JA, Mannisto PT (2011). Prolyl oligopeptidase induces angiogenesis both in vitro and in vivo in a novel regulatory manner. *British Journal of Pharmacology* 163(8):1666-78.

N

Nakanishi S, Inoue A, Kita T, Nakamura M, Chang AC, Cohen SN and Numa S (1979). Nucleotide sequence of cloned cDNA for bovine corticotropin-beta-lipotropin precursor. *Nature* 278: 5703: 423-427

Nanus DM (2003). Of peptides and peptidases: The role of cell surface peptidases in cancer. *Clinical Cancer Research* 9(17):6307-9.

Nascimento-Silva MCL, Leal AT, Daffre S, Juliano L, Vaz ID, Paiva-Silva GD, Oliveira PL, Sorgine MHF (2008). BYC, an atypical aspartic endopeptidase from *Rhipicephalus (Boophilus)*

microplus eggs. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* 149(4):599-607.

Nemeth G, Pepperell JR, Yamada Y, Palumbo A, Naftolin F (1994). The basis and evidence of a role for the ovarian renin-angiotensin system in health and disease. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation* 1(2):118-27.

Neves LAA, Chappell MC, Ferrario CM, Gallagher PE, Ganten D, Brosnihan KB (2006). Effect of estrogen on neprilysin expression in uterus and kidney of Sprague-Dawley normotensive and heterozygous (mRen2)27-transgenic hypertensive rats. *Peptides* 27(11):2912-8.

Nguyen G (2011). Renin, (pro)renin and receptor: an update. *Clin Sci (Lond)* 120:169-178.

Nguyen G and Muller DN (2010). The biology of the (pro)renin receptor. *J Am Soc Nephrol* 21:18-23.

Nguyen G, Delarue F, Burckle C, Bouzahir L, Giller T and Sraer JD (2002). Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. *J Clin Invest* 109:1417- 1427.

Nicholson HD (1996). Oxytocin: a paracrine regulator of prostatic function. *Rev Reprod* May; 1(2):69-72.

Nicholson HD, and Jenkin L (1995). Oxytocin and prostatic function. *Exp Biol Med. Adv.* 395: 529-38.

Noble F, Roques BP (2007). Protection of endogenous enkephalin catabolism as natural approach to novel analgesic and antidepressant drugs. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 11(2):145-59.

Nomura S, Ito T, Yamamoto E, Sumigama S, Iwase A, Okada M, Shibata K, Ando H, Ino K, Kikkawa F, Mizutani S (2005). Gene regulation and physiological function of placental leucine aminopeptidase/oxytocinase during pregnancy. *Biochimica Et Biophysica Acta- Proteins and Proteomics* 1751(1):19-25.

Nomura S, Tsujimoto M, Mizutani S, Barret AJ, Rawlings ND, Woessner JF (2004). Cystinyl aminopeptidase, oxytocinase and insulin-regulated aminopeptidase. *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Elsevier Academic Press.1

O

O’Cuinn G (1998). Peptide metabolism in cytoplasm of brain cells. *Biochemical Society Transactions* 26(3):279-92.

O’Mahony OH, Djahanbakhch O, Mahmood T, Puddefoot JR and Vinson GP (2000). Angiotensin II in human seminal fluid. *Hum Reprod* Jun; 15(6):1345-9.

Ocain TD, Rich DH (1987). L-Lysinethiol: A subnanomolar inhibitor of aminopeptidase B. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 145(3):1038-42.

Oehninger S, Morshedi M, Weng SL, Taylor S, Duran H, Beebe S (2003). Presence and significance of somatic cell apoptosis markers in human ejaculated spermatozoa *Reprod Biomed Online*, 7 pp. 469–476.

O’Flaherty C, Vaisheva F, Hales BF, Chan P, Robaire B (2008). Characterization of sperm chromatin quality in testicular cancer and Hodgkin’s lymphoma patients prior to chemotherapy *Hum Reprod*, 23 (2008), pp. 1044–1052.

Oh E, Lee E, Im H, Kang HS, Jung WW, Won NH, Kim EM, Sul D (2005). Evaluation of immune and reproductive toxicities and association between immunotoxicological and genotoxicological parameters in waste incineration workers. *Toxicology*; 15: 65-80.

O’Hara BF, Donovan DM, Lindberg I, Brannock MT, Ricker DD, Moffatt CA, Klaunberg BA, Schindler C, Chang TS, Nelson RJ, et al (1994). Proenkephalin transgenic mice: a short promoter confers high testis expression and reduced fertility. *Mol Reprod Dev.* Jul; 38(3):275-84.

Okuyama A, Nonomura N, Koh E, Kondoh N, Takeyama M, Nakamura M, Namiki M, Fujioka H, Matsumoto K and Matsuda M (1988). Induction of renin-angiotensin system in human testis in vivo. *Arch Androl* 21:29-35.

Oleary RM, Gallagher SP, Oconnor B (1996). Purification and characterization of a novel membrane-bound form of prolyl endopeptidase from bovine brain. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 28(4):441-9.

Oliva R, Dixon GH (1991). Vertebrate protamine genes and the histone-to-protamine replacement reaction. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*; 40:25–94.

Ollero M, Gil-Guzman E, Lopez MC, Sharma RK, Agarwal A, Larson K, Evenson D, Anthony JT, Alvarez JG (2001). Characterization of subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implications in the diagnosis and treatment of male infertility *Hum Reprod*, 16, pp. 1912–1921.

Ondetti MA, Rubin B, Cushman DW (1977). Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme: new class of orally active antihypertensive agents. *Science*. Apr 22; 196(4288):441-4.

Orth JM (1986). FSH-induced Sertoli cell proliferation in the developing rat is modified by betaendorphin produced in the testis. *Endocrinology*. Oct; 119(4):1876-8.

Osada T, Watanabe G, Kondo S, Toyoda M, Sakaki Y and Takeuchi T (2001). Male reproductive defects caused by puromycin-sensitive aminopeptidase deficiency in mice. *Mol Endocrinol* 15:960-971.

Osada T, Watanabe G, Kondo S, Toyoda M, Sakaki Y, Takeuchi T (2001b). Male reproductive defects caused by puromycin-sensitive aminopeptidase deficiency in mice. *Molecular Endocrinology* 15(6):960-71.

Osada T, Watanabe G, Sakaki Y, Takeuchi T (2001a). Puromycin-sensitive aminopeptidase is essential for the maternal recognition of pregnancy in mice. *Molecular Endocrinology* 15(6):882-93.

P

Pandey KN and Inagami T (1986). Regulation of renin-angiotensins by gonadotropic hormones in cultured murine Leydig tumor cells. Release of angiotensin but not renin. *J Biol Chem* 261:3934-3938.

Pandey KN, Ascoli M and Inagami T (1985). Induction of renin activity by gonadotropic hormones in cultured Leydig tumor cells. *Endocrinology* 117:2120-2126.

Pardanaud L, Dieterlenlievre F (1993). Emergence of endothelial and hematopoietic cells in the avian embryo. *Anatomy and Embryology* 187(2):107-14.

Parmentier M, Inagami T, Pochet R and Desclin JC. (1983). Pituitary-dependent renin-like immunoreactivity in the rat testis. *Endocrinology* 112:1318-1323.

Parvizi N (2000). Neuroendocrine regulation of gonadotropins in the male and the female. *Anim Reprod Sci* 60-61:31-47.

Pascual I, García G, Sánchez L, Arzola LI, Labrada N, Arrebola Y, Miranda WE, Chávez MA, Valiente P y Charli JL (2015). La Aminopeptidasa N de mamíferos: características bioquímicas, funciones fisiológicas y su implicación en procesos fisiopatológicos en humanos. *Revista Cubana de Ciencias Biológicas*. 4(1):2-16.

Paul M, Poyan Mehr A and Kreutz R (2006). Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev* 86:747-803.

Peckys D and Landwehrmeyer GB (1999). Expression of mu, kappa, and delta opioid receptor messenger RNA in the human CNS: a 33P in situ hybridization study. *Neuroscience* 88: 4: 1093-1135.

Pentikainen V, Erkkila K, Dunkel L (1999). Fas regulates germ cell apoptosis in the human testis in vitro *Am J Physiol*, 276 pp. 310–316.

Peralta L (2012). Expresión y localización de los receptores opioides (δ , κ , μ) y los receptores cannabinoides (CB1, CB2) durante la reanudación de la meiosis en ovocitos humanos. Departamento de Fisiología. Universidad del País Vasco. Tesis doctoral.

Pereira VM, Reis FM, Santos RAS, Cassali GD, Santos SHS, Honorato-Sampaio K, dos Reis AM (2009). Gonadotropin Stimulation Increases the Expression of Angiotensin-(1-7) and Mas Receptor in the Rat Ovary. *Reproductive Sciences* 16(12):1165-74.

Pérez I (2011). Alteraciones en la actividad enzimática de peptidasas en neoplasias colorrectales. Departamento de Fisiología. Universidad del País Vasco. Tesis doctoral

Pérez I, Varona A, Blanco L, Gil J, Santaolalla F, Zabala A, Martínez Ibarguen A, Irazusta J, Larrinaga G (2009). Increased APN/CD13 and acid aminopeptidase activities in head and neck squamous cell carcinoma. *Head and Neck-Journal for the Sciences and Specialties of the Head and Neck* 31(10):1335-40.

Petraglia F, Comitini G, Dambrogio G, Volpe A, Facchinetti F, Alessandrini G, Genazzani AR (1985). Short-term effects of ovariectomy: The opioid control of LH secretion in fertile climacteric and postmenopausal women. *Journal of Endocrinological Investigation* 8(4):325-30.

Petraglia F, Dimeo G, Storchi R, Segre A, Facchinetti F, Szalay S, Volpe A, Genazzani AR (1987). Proopiomelanocortin related peptides and methionine enkephalin in human follicular fluid: Changes during the menstrual cycle. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 157(1):142-6.

Petraglia F, Facchinetti F, Mfuta K, Ruspa M, Bonavera JJ, Gandolfi F, Genazzani AR (1986). Endogenous opioid peptides in uterine fluid. *Fertility and Sterility* 46(2):247-51.

Pham V, Burns P, Albiston AL, Yeatman HR, Ng L, Diwakarla S, Chai SY (2009). Reproduction and maternal behavior in insulin-regulated aminopeptidase (IRAP) knockout mice. *Peptides* 30(10):1861-5.

Philpott A, Leno GH (1992). Nucleoplasmin remodels sperm chromatin in *Xenopus* egg extracts. *Cell*; 69:759–67.

Picatoste F, Sarri E and Claro E (1996). Proteínas G y sistema adenilil ciclasa. Barcelona: Ediciones en Neurociencias.

Pilapil C, Welner S, Magnan J, Gauthier S and Quirion R (1987). Autoradiographic distribution of multiple classes of opioid receptor binding sites in human forebrain. *Brain Res Bull* 19: 5: 611-615.

Pintar JE, Schachter BS, Herman AB, Durgerian S, Krieger T (1984). Characterization and localization of proopiomelanocortin messenger RNA in the adult rat testis. *Science*. Aug 10; 225(4662):632-4.

Plecas B, Popovic A, Jovovic D, and Hristic M (1992). Mitotic activity and cell deletion in ventral prostate epithelium of intact and castrated oxytocin-treated rats. *J Endocrinol Invest* 1992 Apr; 15(4):249-53.

Pol O, Alameda F and Puig MM (2001). Inflammation enhances mu-opioid receptor transcription and expression in mice intestine. *Mol Pharmacol* 60: 5: 894-899.

Polgár L (2002). The prolyl oligopeptidase family. *Cell Mol Life Sci* 59(2):349-62.

Porrello ER, Delbridge LM and Thomas WG (2009). The angiotensin II type 2 (AT2) receptor: an enigmatic seven transmembrane receptor. *Front Biosci (Landmark Ed)* 14:958-972.

Potts JM, Sharma R, Pasqualotto F, Nelson D, Hall G, Agarwal A (2000). Association of *Ureaplasma Urealyticum* with abnormal reactive oxygen species levels and absence of leukocytospermia. *The Journal of Urology*. Volume 163, Issue 6, June 2000, Pages 1775-1778.

Pro B, Dang NH (2004). CD26/dipeptidyl peptidase IV and its role in cancer. *Histology and Histopathology* 19(4):1345-51.

Proost P, Mortier A, Loos T, Vandercappellen J, Gouwy M, Ronsse I, Schutyser E, Put W, Parmentier M, Struyf S, Van Damme J (2007). Proteolytic processing of CXCL11 by CD13/aminopeptidase N impairs CXCR3 and CXCR7 binding and signaling and reduces lymphocyte and endothelial cell migration. *Blood* 110(1):37-44.

Ragni G, Delauretis L, Bestetti O, Sghedoni D, Gambaro V (1988). Gonadal function in male heroin and methadone addicts. *International Journal of Andrology* 11(2):93-100.

Ramirez-Expósito MJ, Martínez JM, Prieto I, Alba F, Ramirez M (2000). Comparative distribution of glutamyl and aspartyl aminopeptidase activities in mouse organs. *Hormone and Metabolic Research* 32(5):161-3.

Ramón M (2011). Estudio de la actividad aminopeptidásica en espermatozoides astenozoospermicos. Comparación clínica. Departamento de Fisiología. Universidad del País Vasco. Tesis doctoral.

Rannikki AS, Zhang FP, Huhtaniemi IT (1995). Ontogeny of follicle-stimulating hormone receptor gene expression in the rat testis and ovary. *Mol Cell Endocrinol*. Feb; 107(2):199-208.

Rawlings ND, Barrett AJ (1995). Evolutionary families of metallopeptidases. *Proteolytic Enzymes: Aspartic and Metallo Peptidases* 248:183-228.

Rawlings ND, Barrett AJ, Bateman A (2010). MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Research* 38: D227-D33.

Rawlings ND, Polgar L, Barrett AJ (1991). A new family of serine-type peptidases related to prolyl oligopeptidase. *Biochemical Journal* 279:907-8.

Re RN (2002). The origins of intracrine hormone action. *American Journal of the Medical Sciences* 323(1):43-8.

Re RN (2003). Intracellular renin and the nature of intracrine enzymes. *Hypertension* 42(2):117-22.

Re RN, Cook JL (2006). An intracrine view of angiogenesis. *Bioessays* 28(9):943-53.

Reis AB, Araujo FC, Pereira VM, Dos Reis AM, Santos RA and Reis FM (2010). Angiotensin (1-7) and its receptor Mas are expressed in the human testis: implications for male infertility. *J Mol Histol* 41:75-80.

Reisine T, Pasternak G (1996). Analgésicos opioides y sus antagonistas. En Goodman and Gilman. et al (eds). *Las bases farmacológicas de la terapéutica* 9th ed. McGraw-Hill Co. 557-593.

Relton JM, Gee NS, Matsas R, Turner AJ and Kenny AJ (1983). Purification of endopeptidase-24.11 ('enkephalinase') from pig brain by immunoadsorbent chromatography. *Biochem J* 215: 3: 519-523.

Riemann D, Kehlen A, Langner J (1999). CD13 - not just a marker in leukemia typing. *Immunology Today* 20(2):83-8.

Ritzén EM, Hagenäs L, Hansson V, Weddington SC, French FS, Nayfeh SN (1975). Androgen binding and transport in testis and epididymis. *Vitam Horm*. 33:283-95.

Riviere PJ (2004). Peripheral kappa-opioid agonists for visceral pain. *Br J Pharmacol* 141: 8: 1331-1334.

Rogi T, Tsujimoto M, Nakazato H, Mizutani S, Tomoda Y (1996). Human placental leucine aminopeptidase oxytocinase: a new member of type II membrane-spanning zinc metallopeptidase family. *Journal of Biological Chemistry* 271(1):56-61.

Roméu Pérez C (2014). Alteraciones en la actividad enzimática de peptidasas en líquido folicular humano. Departamento de Fisiología. Universidad del País Vasco. Tesis doctoral.

Roques BP, Beaumont A (1990). Neutral endopeptidase-24.11 inhibitors: from analgesics to antihypertensives? *Trends Pharmacol Sci*. Jun; 11(6):245-9.

Roques BP, Noble F and Fournie-Zaluski MC (1999). Endogenous opioid peptides and analgesia. In: *Opioids in pain control. Basic and clinical aspects*, edited by Stein C Cambridge University press.

Roques BP, Noble F, Daugé V, Fournié-Zaluski MC, Beaumont A (1993). Neutral endopeptidase 24.11: structure, inhibition, and experimental and clinical pharmacology. *Pharmacol Rev. Mar*; 45(1):87-146.

Rosivall J (2009). Intrarenal rennin-angiotensin system. *Mol Cell Endocrinol.* 302:185-92.

Rouen A, Balet R, Dorna M, Hyon C, Pollet-Villard X, Chantot-Bastaraud S, Joye N, Portnoi MF, Guy Cassuto N and Jean-Pierre Siffroi J-P (2013). Discontinuous gradient centrifugation (DGC) decreases the proportion of chromosomally unbalanced spermatozoa in chromosomal rearrangement carriers. *Human Reproduction*, Vol.28, No.7 pp. 2003–2009,

Rubes J, Selevan SG, Sram RJ, Evenson DP, Perreault SD (2007). GSTM1 genotype influences the susceptibility of men to sperm DNA damage associated with exposure to air pollution. *Mutat Res*, 625, pp. 20–28.

Ruiz-Ortega M, Esteban V, Egido J (2007). The regulation of the inflammatory response through nuclear factor-kappa B pathway by angiotensin IV extends the role of the renin angiotensin system in cardiovascular diseases. *Trends in Cardiovascular Medicine* 17(1):19-25.

Russell LD, Ettlín RA, Sinha Hikim AP, Clegg ED (1990). Mammalian spermatogenesis. in: *Histological and histopathological evaluation of the testis*. Clearwater: Cache River Press. 1-40.

S

S, Kinoshita M, Tsujimoto M, Nakazato H, Mizutani S (1999). Structural organization of the 5'-end and chromosomal assignment of human placental leucine aminopeptidase insulin-regulated membrane aminopeptidase gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 262(1):269-74. *Chemistry* 271(1):56-61.

Sabeur K, Vo AT and Ball BA (2000). Effects of angiotensin II on the acrosome reaction in equine spermatozoa. *J Reprod Fertil* 120:135-142.

Said T, Agarwal A, Grunewald S, Rasch M, Baumann T, Kriegel C, Liang Li, Hans-Juergen Glander, Anthony J. Thomas Jr., Uwe Paasch (2005). Selection of non-apoptotic spermatozoa as a new tool for enhancing assisted reproduction outcomes: an in vitro model. *Biol Reprod* 74, pp.530–537.

Said TM, Agarwal A, Zborowski M, Grunewald S, Glander HJ and Paasch U (2008). Utility of Magnetic Cell Separation Andrology Lab Corner* as a Molecular Sperm Preparation Technique. *Journal of Andrology*, Vol. 29, No. 2, March/April.

Said TM, Grunewald S, Paasch U, Rasch M, Agarwal A and Glander HJ (2005). Effects of magnetic-activated cell sorting on sperm motility and cryosurvival rates. *Fertility and Sterility*_ Vol. 83, No. 5, May.

Sailer BL, L.J. Sarkar LJ, J.A. Bjordahl JA, L.K. Jost LK, D.P. Evenson DP (1997). Effects of heat stress on mouse testicular cells and sperm chromatin structure *J Androl*, 18, pp. 294–301.

Sakkas D, Mariethoz E, Manicardi G, Bizzaro D, Bianchi PG, Bianchi U (1999). Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa *Rev Reprod*, 4, pp.31–37.

Sakkas D, Moffatt O, Manicardi GC, Mariethoz E, Tarozzi N, Bizzaro D (2002). Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis *Biol Reprod*, 66, pp. 1061–1067.

Sakkas D, Ramalingam M, Garrido N and Barratt CL (2015). Sperm selection in natural conception: what can we learn from Mother Nature to improve assisted reproduction outcomes?. *Hum Reprod Update* 21:711-726.

Sanderink GJ, Artur Y, Schiele F, Gueguen R, Siest G (1988). Alanine aminopeptidase in serum: biological variations and reference limits. *Clin Chem. Jul*; 34(7):1422-6.

Sanderink GJ, Artur Y, Siest G (1988). Human aminopeptidases: a review of the literature. *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry* 26(12):795-807.

Sanders SL, Melner MH, Curry TE (1990). Cellular localization of ovarian proopiomelanocortin messenger RNA during follicular and luteal development in the rat. *Molecular Endocrinology* 4(9):1311-9.

Santos RA, Simoes e Silva AC, Maric C, Silva DM, Machado RP, de Buhr I, Heringer-Walther S, Pinheiro SV, Lopes MT, Bader M (2003). Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:8258-8263.

Santos RAS, Ferreira AJ, Simoes e Silva AC (2008). Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2- angiotensin (1-7) –Mas axis. *Exp. Physiol.* 93:519-27.

Saridogan E, Djahanbakhch O, Puddefoot JR, Demetroulis C, Collingwood K, Mehta JG, Vinson GP (1996). Angiotensin II receptors and angiotensin II stimulation of ciliary activity in human fallopian tube. *J Clin Endocrinol Metab* Jul; 81(7):2719-25.

Sarkar DK, Yen SSC (1985). Changes in β -endorphin-like immunoreactivity in pituitary portal blood during the estrous-cycle and after ovariectomy in rats. *Endocrinology* 116(5):2075- 9.

Sastry BV, Janson VE, Owens LK (1991). Significance of substance P- and enkephalin-peptide systems in the male genital tract. *Ann NY Acad Sci* 632:339-53.

Sastry BV, Janson VE, Owens LK, Tayeb OS (1982). Enkephalin- and substance P-like immunoreactivities of mammalian sperm and accessory sex glands. *Biochem Pharmacol.* Nov 1; 31(21):3519-22.

Sawyer CH (1955). Rhinencephalic involvement in pituitary activation by intraventricular histamine in the rabbit under Bembutal anesthesia. *American Journal of Physiology* 180(1):37-46.

Schatten H, Sun QY, Prather R (2014). The impact of mitochondrial function/dysfunction on IVF and new treatment possibilities for infertility. *Reprod Biol Endocrinol* 12:111.

Scher W, Scher BM, Waxman S. (1982). Proteases stimulate mouse erythroleukemia cell differentiation and multiplication. *Biochem Biophys Res Commun.* Nov 30; 109(2):348-54.

Schuel H, Burkman LJ (2005). A tale of two cells: endocannabinoid-signaling regulates functions of neurons and sperm. *Biol Reprod.* Dec 73(6):1078-86.

Schulte RT, Ohl DA, Sigman M, Smith GD. (2010) Sperm DNA damage in male infertility: etiologies, assays, and outcomes. *J Assist Reprod Genet* 27, 3–12.

Schwartz JC (1983). Metabolism of enkephalins and the inactivating neuropeptidase concept. *Trends in Neurosciences* 6(2):45-8.

Scornik O.A y V. Botbol. (2001). Bestatin as an Experimental Tool in Mammals. *Curr Drug Metab.* 2: 67-85.

Sentandreu MA, Toldra F (2007). Oligopeptides hydrolysed by muscle dipeptidyl peptidases can generate angiotensin-I converting enzyme inhibitory dipeptides. *European Food Research and Technology* 224(6):785-90.

Shaman J & Ward W (2006). *Sperm chromatin Stability and Susceptibility to Damage in Relation to Its Structure.* Cambridge, UK: Cambridge University Press.

Shamsi MB, Imam SN, Dada R. (2011). Sperm DNA integrity assays: diagnostic and prognostic challenges and implications in management of infertility. *J Assist Reprod Genet* 28, 1073–1085.

Shamsi MB, Venkatesh S, Tanwar M, Singh G, Mukherjee S, Malhotra N, Kumar R, N.P. Gupta NP, Mittal S, Dada R (2010). Comet assay: a prognostic tool for DNA integrity assessment in infertile men opting for assisted reproduction. *Indian J Med Res* 131, 675–681.

Sharp B, Pekary AE (1981). β -Endorphin 61-91 and other β -endorphin-immunoreactive peptides in human semen. *J Clin Endocrinol & Metab.* Mar; 52(3):586-8.

Sharp BM, Roy S and Bidlack JM (1998). Evidence for opioid receptors on cells involved in host defense and the immune system. *J Neuroimmunol* 83: 1-2: 45-56.

Sharpé R (1994). Regulation of spermatogenesis. In *The Physiology of Reproduction.* ed. Knobil E & Neill J. 1:1363–434.

Shibahara H, Kamata M, Hu J, Nakagawa H, Obara H, Kondoh N, Shima H and Sato I (2001). Activity of testis angiotensin converting enzyme (ACE) in ejaculated human spermatozoa. *Int J Androl* 24:295-299.

Shimada K, Takahashi M, Turner AJ, Tanzawa K (1996). Rat endothelin-converting enzyme-1 forms a dimer through Cys412 with a similar catalytic mechanism and a distinct substrate binding mechanism compared with neutral endopeptidase-24.11. *Biochem J.* May 1; 315 (Pt 3):863-7.

Shrimpton CN, Smith AI, Lew RA (2002). Soluble metalloendopeptidases and neuroendocrine signaling. *Endocrine Reviews* 23(5):647-64.

Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW and Molinoff PB (1993). *Basic neurochemistry*. New York: Raven press.

Simon L, Castillo J, Oliva R, Lewis SE (2011). Relationships between human sperm protamines, DNA damage and assisted reproduction outcomes. *Reprod. Biomed. Online*, 23 pp. 724–734.

Simonin F, Befort K, Gaveriaux-Ruff C, Matthes H, Nappey V, Lannes B, Micheletti G and Kieffer B (1994). The human delta-opioid receptor: genomic organization, cDNA cloning, functional expression, and distribution in human brain. *Mol Pharmacol* 46: 6: 1015-1021.

Singh J, Naran A, Misso NL, Rigby PJ, Thompson PJ, Bhoola KD (2008). Expression of kallikrein-related peptidases (KRP/hK5, 7, 6, 8) in subtypes of Human lung carcinoma. *International Immunopharmacology* 8(2):300-6.

Singh US, Kumar MV and Panda JN (1985). Angiotensin converting enzyme in semen and its possible role in capacitation. *Andrologia* 17:472-475.

Sirinathsinghji DJ, Whittington PE, Audsley A, Fraser HM (1983). beta-Endorphin regulates lordosis in female rats by modulating LH-RH release. *Nature*. Jan 6;301(5895):62-4.

Sjoholm I, Yman L (1967). Degradation of oxytocin, lysine-vasopressin, angiotensin II and agniotensin-II-amide by oxytocinase (cystine aminopeptidase). *Acta Pharmaceutica Suecica* 4(2):65-&.

Sjostrom H, Noren O, Olsen J (2000). Structure and function of aminopeptidase N. *Cellular Peptidases in Immune Functions and Diseases* 2 477:25-34.

Slomczynska M, Pierzchala-Koziec K, Gregoraszczyk E, Maderspach K, Wierzchos E (1997). The kappa-opioid receptor is present in porcine ovaries: localization in granulosa cells. *Cytobios* 92(370-71):195-202.

Snyder KR, Murray TF, DeLander GE and Aldrich JV (1993). Synthesis and opioid activity of dynorphin A-(1-13)NH₂ analogues containing cis- and trans-4- aminocyclohexanecarboxylic acid. *J Med Chem* 36: 13: 1921-1922.

Snyder SH (1977). Opiate receptors and internal opiates. *Sci Am*, 236: 44.9.

Speth RC, Daubert DL and Grove KL (1999). Angiotensin II: a reproductive hormone too?. *Regul Pept* 79:25-40.

Staszkiwicz J, Skowronski MT, Kaminski T, Siawrys G, Krazinski BE, Kusmider M, Przala J, Okrasa S (2007). Expression of proopiomelanocortin, proenkephalin and prodynorphin genes in porcine theca and granulosa cells. *Animal Reproduction Science* 101(1-2):97- 112.

Steele EK, McClure N, Maxwell RJ, Lewis SE (1999). A comparison of DNA damage in testicular and proximal epididymal spermatozoa in obstructive azoospermia. *Mol Hum Reprod*, 5, pp. 831–835.

Stoltze L, Schirle M, Schwarz G, Schroter C, Thompson MW, Hersh LB, Kalbacher H, Stevanovic S, Rammensee HG, Schild H (2000). Two new proteases in the MHC class I processing pathway. *Nature Immunology* 1(5):413-8.

Subirán N, Agirregoitia E, Valdivia A, Ochoa C, Casis L, Irazusta J (2008). Expression of enkephalin-degrading enzymes in human semen and implications for sperm motility.. *Fertil Steril.* May; 89(5 Suppl):1571-7. Epub 2007 Oct 22.

Subirán N, Casis L, Irazusta J (2011). Regulation of Male Fertility by the Opioid System. *Molecular Medicine* 17(7-8):846-53.

Suda H, Aoyagi T, Takeuchi T, Umezawa H (1976). Inhibition of aminopeptidase B and leucine aminopeptidase by bestatin and its stereoisomer. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 177(1):196-200.

Suganuma R, Yanagimachi R, Meistrich ML (2005). Decline in fertility of mouse sperm with abnormal chromatin during epididymal passage as revealed by ICSI *Hum Reprod*, 20, pp. 3101–3108.

Sumitani S, Ramlal T, Somwar R, Keller SR, Klip A (1997). Insulin regulation and selective segregation with glucose transporter-4 of the membrane aminopeptidase vp165 in rat skeletal muscle cells. *Endocrinology* 138(3):1029-34.

Sumitomo M, Shen RQ, Nanus DM (2005). Involvement of neutral endopeptidase in neoplastic progression. *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics* Aug 1; 1751(1):52-9.

Surprenant A, Shen KZ, North RA and Tatsumi H (1990). Inhibition of calcium currents by noradrenaline, somatostatin and opioids in guinea-pig submucosal neurones. *J Physiol* 431: 585-608.

Suzuki Y, Shibata K, Kikkawa F, Kajiyama H, Ino K, Nomura S, Tsujimoto M, Mizutani S (2003). Possible role of placental leucine aminopeptidase in the antiproliferative effect of oxytocin in human endometrial adenocarcinoma. *Clinical Cancer Research* 9(4):1528-34.

Szeltner Z, Polgar L (2008). Structure, function and biological relevance of prolyl oligopeptidase. *Current Protein & Peptide Science* 9(1):96-107.

T

Tachibana T, Fujiwara H, Suginami H, Nakamura K, Honda T, Yamada S, Maeda M, Mori T (1996). An aminopeptidase inhibitor, bestatin, enhances progesterone and oestradiol secretion by porcine granulosa cells stimulated with follicle stimulating hormone in vitro. *Human Reproduction* 11(3):497-502.

Tam LT, Engelbrecht S, Talent JM, Gracy RW, Erdös EG (1985). The importance of disulfide bridges in human endopeptidase (enkephalinase) after proteolytic cleavage. *Biochem Biophys Res Commun.* Dec 31; 133(3):1187-92.

Tamayo Hussein S, Lalinde Acevedo PC, Gómez Morales NA, Cardona Maya WD (2017). Comparación de 2 métodos de selección espermática sobre la fragmentación del ADN y el potencial de membrana mitocondrial de los espermatozoides humanos: en busca del gameto de oro. *Clínica e Investigación en Ginecología y Obstetricia* Available online 2 June

Tanioka T, Hattori A, Masuda S, Nomura Y, Nakayama H, Mizutani S, Tsujimoto M (2003). Human leukocyte derived arginine aminopeptidase: the third member of the oxytocinase subfamily of aminopeptidases. *Journal of Biological Chemistry* 278(34):32275-83.

Tapanainen JS, Aittomäki K, Min J, Vaskivuo T, Huhtaniemi IT (1997). Men homozygous for an inactivating mutation of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor gene present variable suppression of spermatogenesis and fertility. *Nat Genet.* Feb; 15(2):205-6.

Taupenot L, Harper KL, O'Connor DT (2003). Mechanisms of disease: the chromogranin-secretogranin family. *New England Journal of Medicine* 348(12):1134-49.

Taylor A (1993). Aminopeptidases - towards a mechanism of action. *Trends in Biochemical Sciences* 18(5):167-72.

Tesarik J, Greco E, Mendoza C. (2004). Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation. *Hum Reprod* 19, 611–615.

Thompson MW, Tobler A, Fontana A, Hersh LB (1999). Cloning and analysis of the gene for the human puromycin-sensitive aminopeptidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 258(2):234-40.

Thorek DLJ, Evans MJ, Carlsson SV, Ulmert D, Lilja H (2013). Prostate-specific kallikrein-related peptidases and their relation to prostate cancer biology and detection. Established relevance and emerging roles. *Thrombosis and haemostasis* 110(3):484-92.

Thorn NA, Russell JT, Torp-Pedersen C and Treiman M (1978). Calcium and neurosecretion. *Ann N Y Acad Sci* 307: 618-639.

Thunnissen M., P. Nordlund y J.Z. Haeggstrom. (2001). Crystal structure of human leukotriene A4 hydrolase, a bifunctional enzyme in inflammation. *Nat. Struct. Biol.* 8:131.

Tiruppathi C, Ganapathy V, Leibach FH (1990). Evidence for tripeptide-proton symport in renal brush border membrane vesicles. Studies in a novel rat strain with a genetic absence of dipeptidyl peptidase IV. *Journal of Biological Chemistry* 265(4):2048-53.

Tobler AR, Constam DB, SchmittGraff A, Malipiero U, Schlapbach R, Fontana A (1997). Cloning of the human puromycin-sensitive aminopeptidase and evidence for expression in neurons. *Journal of Neurochemistry* 68(3):889-97.

Tomlinson MJ1, Moffatt O, Manicardi GC, Bizzaro D, Afnan M, Sakkas D. (2001). Interrelationships between seminal parameters and sperm nuclear DNA damage before and after density gradient centrifugation: implications for assisted conception. *Hum Reprod.* Oct;16(10):2160-5.

Tsong SD, Phillips D, Halmi N, Liotta AS, Margioris A, Bardin CW, Krieger DT (1982). ACTH and beta-endorphin-related peptides are present in multiple sites in the reproductive tract of the male rat. *Endocrinology.* Jun; 110(6):2204-6.

Tsuji E, Misumi Y, Fujiwara T, Takami N, Ogata S, Ikehara Y (1992). An active-site mutation (Gly(633) Arg) of dipeptidyl peptidase-IV causes its retention and rapid degradation in the endoplasmic reticulum. *Biochemistry* 31(47):11921-7.

Turner AJ (1986). Processing and metabolism of neuropeptides. *Essays in Biochemistry* 22:69- 119.

Turner AJ (1987). Endopeptidase-24.11 and neuropeptide metabolism. In: *Neuropeptides and their peptidases*, edited by Turner AJ. Chichester: Ellis Horwood Ltd.

Turner AJ (1987). Metabolism of enkephalins. *Isi Atlas of Science-Pharmacology* 1(1):74-7.

Turner AJ, Barret AJ, Rawling ND, Woessner JF (2004). Membrane alanine aminopeptidase. *Handbook of Proteolytic Enzymes.* Elsevier Academic Press.1

Turner RM (2006). Moving to the beat: a review of mammalian sperm motility regulation. *Reprod Fertil Dev.* 18(1-2):25-38).

Twigg JP, Irvine DS, Aitken RJ (1998). Oxidative damage to DNA in human spermatozoa does not preclude pronucleus formation at intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction* vol.13 no.7 pp.1864–1871.

U

Ulisse S, Fabbri A, Dufau ML (1989). Corticotropin-releasing factor receptors and actions in rat Leydig cells. *J Biol Chem.* Feb 5; 264(4):2156-63.

Ulisse S, Fabbri A, Tinajero JC, Dufau ML (1990). A novel mechanism of action of corticotrophin releasing factor in rat Leydig cells. *J Biol Chem.* Feb 5; 265(4):1964-71.

V

Valdivia A, Irazusta J, Fernández D, Mugica J, Ochoa C, Casis L (2004). Pyroglutamyl peptidase I and prolyl endopeptidase in human semen: increased activity in necrozoospermia. *Regulatory Peptides* 122(2):79-84.

Vanhaper T (1969). Aminoacyl and dipeptidyl arylamidases (aminopeptidases) of pituitary gland as related to function. *Endocrinology* 85(6):1062-&.

Vanha-Perttula T, Mather JP, Bardin CW, Moss SB and Bellve AR (1985). Localization of the antigotensin- converting enzyme activity in testis and epididymis. *Biol Reprod* 33:870-877.

Vanha-Perttula T, Mather JP, Bardin CW, Moss SB and Bellve AR (1985). Localization of the antigotensin converting enzyme activity in testis and epididymis. *Biol Reprod* 33:870-877.

Varela 2015

Varela González P (2015). Actividad y expresión de enzimas convertidoras de angiotensinas en neoplasias renales. Departamento de Fisiología. Universidad del País Vasco. Tesis doctoral.

Varona A, Blanco L, Lopez JI, Gil J, Agirregoitia E, Irazusta J, Larrinaga G (2007). Altered levels of acid, basic, and neutral peptidase activity and expression in human clear cell renal cell carcinoma. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 292(2):F780-F8.

Vazeux G, Wang JY, Corvol P, LlorensCortes C (1996). Identification of glutamate residues essential for catalytic activity and zinc coordination in aminopeptidase A. *Journal of Biological Chemistry* 271(15):9069-74.

Villarejo DM (1998). Farmacología de los analgésicos opioides y sus antagonistas. En: Villarejo DM. editor. Farmacología aplicada a la anestesia (Intersiste mas), PAC Anestesia 1, tomo A-3: 5-18.

Villarejo-Díaz M, Murillo-Zaragoza JR, Alvarado-Hernández H (2000). Farmacología de los agonistas y antagonistas de los receptores opioides. *Educación e Investigación Clínica* • V ol. 1, Núm. 2 • Mayo-Agosto, 106-137.

Vinson GP, Ho MM and Puddefoot JR (1995b). The distribution of angiotensin II type 1 receptors, and the tissue renin-angiotensin systems. *Mol Med Today* 1:35-39.

Vinson GP, Mehta J, Evans S, Matthews S, Puddefoot JR, Saridogan E, Holt WV and Djahanbakhch O (1996). Angiotensin II stimulates sperm motility. *Regul Pept* 67:131-135.

Vinson GP, Puddefoot JR, Ho MM, Barker S, Mehta J, Saridogan E and Djahanbakhch O (1995a). Type 1 angiotensin II receptors in rat and human sperm. *J Endocrinol* 144:369-378.

Vinson GP, Puddefoot JR, Ho MM, Barker S, Mehta J, Saridogan E and Djahanbakhch O (1995). Type 1 angiotensin II receptors in rat and human sperm. *J Endocrinol*. Feb; 144(2):369-78.

Vinson GP, Saridogan E, Puddefoot JR and Djahanbakhch O (1997). Tissue renin-angiotensin systems and reproduction. *Hum Reprod* 12(4):651-662.

W

Waites GM (1993). Male fertility regulation: the challenges for the year 2000. *Br Med Bull* 49:210-221.

Wakahara S, Konoshita T, Mizuno S, Motomura M, Aoyama C, Makino Y, Kato N, Koni I, Miyamori I (2007). Sinergistic expression of angiotensin-converting enzyme (ACE) and ACE2 in human renal tissue and confounding effects of hypertension on the ACE to ACE2 ratio. *Endocrinology*. 148:2453-7.

Waksman G, Bouboutou R, Devin J, Bourgoin S, Cesselin F, Hamon M, Fournie- Zaluski MC and Roques B (1985). In vitro and in vivo effects of kelatorphan on enkephalin metabolism in rodent brain. *Eur J Pharmacol* 117: 2: 233-243.

Waksman G, Hamel E, Delay-Goyet P, Roques BP (1986). Neuronal localization of the neutral endopeptidase 'enkephalinase' in rat brain revealed by lesions and autoradiography. *EMBO J*. Dec 1; 5(12):3163-6.

Waldhoer M, Bartlett SE and Whistler JL (2004). Opioid receptors. *Annu Rev Biochem* 73: 953-990.

Walter R, Shlank H, Glass JD, Schwartz IL, Kerenyi TD (1971). Leucylglycinamide released from oxytocin by human uterine enzyme. *Science (New York, N.Y.)* 173(3999):827-9.

Wang J, Cooper MD, Barret AJ, Rawlings ND, Woessner JF (2004). Aminopeptidase A. *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Elsevier Academic Press.1.

Wang JY, Walker H, Lin Q, Jenkins N, Copeland NG, Watanabe T, Burrows PD, Cooper MD (1996). The mouse BP-1 gene: Structure, chromosomal localization, and regulation of expression by type I interferons and interleukin-7. *Genomics* 33(2):167-76.

Weinbauer GF, Gromoll J, Simini M, Nieschlag R (1997). Physiology of testicular function. Nieschlag E, Behre HM, eds, Springer, Berlin Heidelberg New York 26-57.

Welches WR, Santos RAS, Chappell MC, Brosnihan KB, Greene LJ, Ferrario CM (1991). Evidence that prolyl endopeptidase participates in the processing of brain angiotensin. *Journal of Hypertension* 9(7):631-8.

Wennemuth G, Babcock DF and Hille B (1999). Distribution and function of angiotensin II receptors in mouse spermatozoa. *Andrologia* 31:323-325.

WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen © World Health Organization (2010).

Wick MJ, Minnerath SR, Lin X, Elde R, Law PY and Loh HH (1994). Isolation of a novel cDNA encoding a putative membrane receptor with high homology to the cloned mu, delta, and kappa opioid receptors. *Brain Res Mol Brain Res* 27: 1: 37-44.

Wickstrom M., R. Larsson, P. Nygren y J. Gullbo. (2011). Aminopeptidase N (CD13) as a target for cancer chemotherapy. *Cancer Sci.* 3: 501–508.

Wiedeman PE, Trevillyan JM (2003). Dipeptidyl peptidase IV inhibitors for the treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Current opinion in investigational drugs* (London, England: 2000) 4(4):412-20.

Wilcox CS, Williams CM, Smith TB, Frederickson ED, Wingo C, Bucci CM (1988). Diagnostic uses of angiotensin-converting enzyme-inhibitors in renovascular hypertension. *American Journal of Hypertension* 1(4):S344-S9.

Wilk S, Barret AJ, Rawlings ND, Woessner JF (2004). Aspartyl aminopeptidase. *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Elsevier Academic Press.1.

Wilk S, Thurston LS (1990). Inhibition of angiotensin III formation by thiol derivatives of acidic amino acids. *Neuropeptides* 16(3):163-8.

Wilk S, Wilk E, Magnusson RP (1998). Purification, characterization, and cloning of a cytosolic aspartyl aminopeptidase. *Journal of Biological Chemistry* 273(26):15961-70.

Wilk S, Wilk E, Magnusson RP (2002). Identification of histidine residues important in the catalysis and structure of aspartyl aminopeptidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 407(2):176-83.

Wilkes MM, Yen SS (1981). Augmentation by naloxone of efflux of LRF from superfused medial basal hypothalamus. *Life Sci.* May 21; 28(21):2355-9.

Williams N and Clouet DH (1982). The effect of acute opioid administration on the phosphorylation of rat striatal synaptic membrane proteins. *J Pharmacol Exp Ther* 220: 2: 278-286.

Williams PJ, Mistry HD, Innes BA, Bulmer JN and Broughton Pipkin F (2010). Expression of AT1R, AT2R and AT4R and their roles in extravillous trophoblast invasion in the human. *Placenta* 31:448-455.

Wittert G, Hope P and Pyle D (1996). Tissue distribution of opioid receptor gene expression in the rat. *Biochem Biophys Res Commun* 218: 3: 877-881.

Wong A, Zhou D, Rini JM. (2012). The X-ray crystal structure of human Aminopeptidase N reveals a novel dimer and the basis for peptide processing. *J. Biol. Chem.* 44: 36804–36813.

Woolley CS, McEwen BS (1992). Estradiol mediates fluctuation in hippocampal synapse density during the estrous-cycle in the adult-rat. *Journal of Neuroscience* 12(7):2549-54.

Wysocki J, González-Pacheco FR, Battle D (2008). Angiotensin-converting enzyme 2: possible role in hypertension and kidney disease. *Curr Hypertens Rep.* 10:70-7.

Wysocki J, Ye M, Soler MJ, Gurley SB, Xiao HD, Bernstein KE, Coffman TM, Chen S, Battle D (2006). ACE and ACE2 activity in diabetic mice. *Diabetes.* 55:2132-9.

X

Xu Y, Duan X, Li M, Jiang L, Zhao G, Meng Y and Chen L (2005). Synthesis of the Key Precursor of Hirsutellide A. *Molecules*, 10, 259-264.

Y

Yoshida M, Kawano N and Yoshida K (2008). Control of sperm motility and fertility: diverse factors and common mechanisms. *Cell Mol Life Sci* 65:3446-3457.

Yoshikawa K, Aizawa T (1988). Expression of the enkephalin precursor gene in rat Sertoli cells. Regulation by follicle-stimulating hormone. *FEBS Lett.* Sep 12; 237(1-2):183-6.

Yoshikawa K, Maruyama K, Aizawa T, Yamamoto A (1989). A new species of enkephalin precursor mRNA with a distinct 5'-untranslated region in haploid germ cells. *FEBS Lett.* Mar 27; 246(1-2):193-6.

Yoshimoto T, Fischl M, Orlowski RC, Walter R (1978). Post-proline cleaving enzyme and post-proline dipeptidyl aminopeptidase: comparison of two peptidases with high specificity for proline residues. *Journal of Biological Chemistry* 253(10):3708-16.

Yoshioka S, Fujiwara H, Yamada S, Nakayama T, Higuchi T, Inoue T, Mori T, Maeda M (1998). Membrane-bound carboxypeptidase-M is expressed on human ovarian follicles and corpora lutea of menstrual cycle and early pregnancy. *Molecular human reproduction* 4(7):709-17.

Yu Y, Zhang Y, Unni E et al. Meistrich M (2000). Abnormal spermatogenesis and reduced fertility in transition nuclear protein 1-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:4683-8.

Z

Zenzen MT (2000). Smoking and reproduction: gene damage to human gametes and embryos. *Hum Reprod Update.* 2000 Mar-Apr; 6(2):122-31.

Zhao M, Shirley C, Yu Y et al (2001). Targeted disruption of transition protein 2 gene affects spermatogenesis in mice. *Mol. Cell. Biol.* 21:7243-755.

Zhou ZF, Xiao BL, Zhang GY, Zhuang LZ (1990). A study of the effect of B-EP and naloxone on the function of the hypothalamo-pituitary-testicular axis of the rat. *J Androl.* May- Jun; 11(3):233-9.

Zhu YX, Hsu MS, Pintar JE (1998b). Developmental expression of the mu, kappa, and delta opioid receptor mRNAs in mouse. *Journal of Neuroscience* 18(7):2538-49.

Zhu YX, Pintar JE (1998a). Expression of opioid receptors and ligands in pregnant mouse uterus and placenta. *Biology of Reproduction* 59(4):925-32.

Zhuo JL, Ferrao FM, Zheng Y and Li XC (2013). New frontiers in the intrarenal Renin-Angiotensin system: a critical review of classical and new paradigms. *Front Endocrinol (Lausanne)* 4:166.

Zhuo JL, Li XC (2011). New insights and perspectives on intrarenal rennin-angiotensin system: focus on intracrine/intracellular angiotensin II. *Peptides.* 32:1551-65.

Zubkova E, Robaire B (2006). Effects of ageing on spermatozoal chromatin and its sensitivity to in vivo and in vitro oxidative challenge in the Brown Norway rat. *Hum. Reprod.* 21(11):2901-10.

Zubkova E, Wade M & Robaire B (2005). Changes in spermatozoal chromatin packaging and susceptibility to oxidative challenge during aging. *Fertil. Steril.* 84 Suppl 2:1191-8.