



IKER  
GAZTE  
NAZIOARTEKO  
IKERKETA EUSKARAZ

## II. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2017ko maiatzaren 10, 11 eta 12  
Iruñea, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:  
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)

### ZIENTZIAK ETA NATURA ZIENTZIAK

**Mas hartzailearen deskribapena  
giza espermatozoideetan:  
angiotentsina 1-7 bidezko  
aktibazioaren eragina  
espermatozoideetan**

*Lorea Cortes, Asier Valdivia eta  
Ekaitz Agirregoitia*

152-158 or.

<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.ii.05.22>

ANTOLATZAILEA:



ELKARLANEAN:



LAGUNTZAILEAK:



UDALBILTZA



Universidad  
de Navarra

## Mas hartzailearen deskribapena giza espermatozoideetan: angiotentsina 1-7 bidezko aktibazioaren eragina espermatozoideetan

Cortés Lorea<sup>1</sup>, Valdivia Asier<sup>2</sup>, Agirregoitia Ekaitz<sup>1</sup>.

(1) *Medikuntza eta Erizaintzako Fakultateko Fisiologia saila*, (2) *Farmazia Fakultateko Zelulen Biologia eta Histologia saila*  
loreacm@gmail.com

### *Laburpena*

Errenina-Angiotensina sistemak (*Renin Angiotensin System, RAS*) organismo mailan duen funtzio nagusiaz gain, RAS-ean parte hartzen duten hainbat elementuk ugaltze-funtzioarekin zerikusia duten ehunetan deskribatu dira azkeneko urtetan, RAS tokian tokiko erregulazio sistema bat dela frogatuz. Ikerketa honetan espermatozoideetan RAS-aren hainbat osagaien (Angiotentsina 1-7-ren eta honen Mas hartzailearen) eragina zein den zehaztu da. Alde batetik, Mas hartzailea proteina mailan espermatozoideetan dagoela baieztatu da. Bestetik, espermatozoideen mugikortasunean duen eragina zehaztu da eta azkenik, biziraupen bidezidorretan zerikusia duela baieztatu da.

Hitz gakoak: Ang 1-7, Mas hartzailea, espermatozoidea, mugikortasuna, biziraupena

### *Abstract*

*In addition to the principal role of The Renin Angiotensin System (RAS) in the whole organism, this system has other important local functions related to the correct function of male reproduction system. In this research we describe some RAS components (Angiotensin 1-7 and its Mas receptor) and their effects on spermatozoa. Firstly, the presence of Mas receptor in human spermatozoa will be laid down. Secondly, the effect of Angiotensin 1-7 on sperm motility will be described. Finally, it will be researched if those molecules have any effect on cell survival pathways.*

*Keywords: Ang 1-7, Mas receptor, spermatozoa, motility, survival.*

### **1. Sarrera eta motibazioa**

Gaur egun Munduko Osasun Erakundearen arabera ugalkortasun-arazoak herrialde garatuetako problemarik garrantzitsuenetarikoak dira. Izan ere, ugalkortasun adina atzeratzeko joera dago, eta honek ugalkortasun-biologian ondorio fisiologikoak ekar ditzake. Emankortasun-arazo horien oinarri biokimikoak ezezagunak dira oraindik, batez ere klinika mailan aztertu ohi direlako. Hori dela eta, emankortasunarekin loturiko ikerketak ugalkortasun-arazoak sendatzeko abiapuntua dira.

Oraintxe aipaturiko ikerketaren alderik garrantzitsuenetarikoa ugaltze-zelulen azterketa da, horien artean espermatozoideena. Espermatozoidea arren gameto haploidea da, eta zelula honen heltze prozesuaren eta fisiologiaren azterketak emankortasun-arazoak gainditzeko balio du. Espermatozoideek ugaltze-gaitasuna eskuratzeko heltze prozesua pairatu behar dute. Espermatozoidea guztiz heltzeko oozitoarekin kontaktuan jarri behar da. Hala ere, kontaktua eman baino lehen hainbat aldaketa fisiologiko pairatu beharko ditu. Horien artean, kapazitazioa, hiperaktibazioa, eta erreazio akrosomikoa (Schuel et al., 2005; Stauss et al., 1995; Yanagimachi, 1994). Espermatozoideek pixkanaka-pixkanaka mugikortasuna eskuratzen doaz: prozesua epididimoan hasten den arren, espermatozoideen mugikortasuna areagotzen doa ugaltze-traktu emean zehar lekualdatzen doan bitartean (Kim et al., 2005). Gaur egun, arren ugaltzeko abilezia zuzenki lotuta dago espermatozoideek duten mugikortasunarekin, eta espermatozoide hauen egoera fisiologikoarekin.

### **2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak**

Errenina-Angiotentsina sistema (*RAS, Renin Angiotensin System*) peptidikoaren funtzio erregulatuak ezagunenak presio-arterialaren mantenuarekin eta elektrolito eta fluidoaren oreka-homeostatikoarekin harreman dutakoak izan ohi dira. RAS-ren osagaien artean honako hauek aurki ditzakegu: errenina, angiotentsina II-a (Ang II), Mas hartzailea, azkeneko honi lotzen zaion Angiotentsina 1-7-a (Ang 1-7) eta abar.

Dena den, azkeneko 10 urteetan burututako ikerketek sistemaren osagai berriak aurkitu dituzte eta horiek hainbat ehunetan agertzen direnez, sistemaren zeregina zabalagoa eta tokian tokiko prozesu fisiologikoen erregulazioarekin lotutakoa dela plazaratu dute. Esate baterako, ugaltze-aparatu arraren funtzionalitatea tokiko errenina-angiotentsina sistemaren menpekora dela frogatuta dago: Alde batetik, RAS-ren osagai batzuk aurkitu dira ugaltze-aparatuaren barnean (Alenina et al., 2002; Fuchs et al., 2005; Langford et al., 1993; Leung eta Sernia, 2003; Speth et al., 1999). Horretaz gain, arratzen eta gizakien espermatozoiden helduetan Angiotentsina I eta II-ren hartzaileak aurkitu dira (König et al., 1998; Vinson et al., 1995). RAS-ren osagai guzti horiek arren ugalkortasunarekin erlazionaturiko funtzioak betetzen dituzte; alde batetik, AngII-a espermatozoiden mugikortasunarekin zerikusia duten prozesuetan inplikaturik dago, batez ere hiperaktibazioan, abiadura eta erreakzio akrosomikoaren indukzioan (Gur et al., 1998; Vinson et al., 1996).

Ang 1-7k ere arren ugaltze-aparatuaren zereginak ditu (Passos-Silva, et al., 2013), hala nola, ugaltze-aparatuaren barnean hainbat leku desberdinetan aurkitzen da (Reis et al., 2010). Azpimarratzekoa da Ang 1-7-k AngII-ren eraginekin kontrako efektuak eragiten dituela ehun askotan, esate baterako basodilatazioa, diuresia, natriuresia, eta abar (Ferrario et al., 1997; Ferrario et al., 2005). Beraz, AngII molekularen efektuen erregulatuzailea da. Modu berean, Ang 1-7 molekularen hartzaileak, hau da, Mas hartzaileak espermatozoiden hainbat prozesuetan eginkizun garrantzitsua du (Leal et al., 2009). Horren adibidea da, espermatozoiden prozesua andatuta duten indibiduoek, Ang 1-7 eta Mas hartzaile kopurua murriztuta dutela (Leal et al., 2009; Reis et al., 2010). Horrek guztiak adierazten du Mas hartzaileak espermatozoiden erregulazioan duela, Ang 1-7 molekulekin batera. Dena den, oraindik ez da deskribatu Mas hartzailearen espermatozoidetan dagoen edo ez, eta zer nolako eragin eduki ditzakeen espermatozoiden fisiologian. Arren ugalkortasunean eragina duela jakinik, gure hasierako hipotesia da Mas hartzailearen espermatozoidetan aurkitzen dela, eta efektuaren bat izango duela espermatozoidetan.

Ang II-k eta Ang 1-7k (Mas hartzailearen bidez) eragiten dute, bakoitzak bere modura, hainbat zelulen biziraupenean edo heriotzan (Giani et al., 2007; Muñoz et al., 2010). Horretarako, hainbat bidezidor zelular desberdin erabiltzen dituzte, edo bidezidor konkretu batean eragin kontrajarriak dituzte. AngII-k espermatozoiden bidezidor hauetan dituen eragina aztertuta dagoen arren, oraindik ez dakigu zein eragin eduki ote ditzakeen Ang 1-7-k (Mas hartzailearen bidez) espermatozoidetan. Gure hasierako hipotesia da Ang 1-7-k Mas hartzailearen bidez espermatozoiden biziraupen bidezidorrak aktibatzen dituela, konkretuki PI3K/Akt bidea. Bestalde, aipatuta dago Ang 1-7-k AngII-ren efektu kontrajarriak eragiten dituela; hori dela eta, AngII-k espermatozoiden mugimendua sustatzen duela jakinik, Ang 1-7-k espermatozoiden mugimendua geldiarazten duela uste dugu.

Taldeak aurretik egindako ikerketetan Mas hartzailearen mRNA-ren presentzia identifikatu zen giza espermatozoidetan (Blazquez, 2014). Hala ere, oraindik proteinaren presentzia ez da baieztatu ezta proteina hori aktiboa den ala ez. Hori dela eta, gure helburuak hauek dira:

- *Western Blot* teknika bidez Mas hartzailearen presentzia aztertzea giza espermatozoidetan.
- Beste ehun askotan Ang 1-7-k zelulen biziraupeneko bidezidorren aktibazioa (konkretuki PI3K/Akt bidezidorrena) eragiten duela frogatuta dago. Beraz, helburua Ang 1-7-k espermatozoidetan bidezidor honetan duen eragina aztertzea izango da, Akt proteinaren aktibazioaren azterketaren bidez.
- Ang 1-7-ak, ehun batzuetan AngII-ren efektu kontrajarriak izan ohi ditu. Ang II-k espermatozoiden mugikortasuna areagotzen duela jakinik, ikerketaren beste helburu bat Ang 1-7-k espermatozoiden mugikortasunean duen eragina aztertzea izango da.

### 3. Ikerketaren muina

#### 3.1 Metodoak

Esperimentuetan erabilitako laginak Barakaldoko Gurutzetako Unibertsitate Ospitaleko Lagunduriko Ugalketa Unitatetik eskuratu dira, esperma-emaielen adostasun informatua lortu ondoren. Laginak fase-kontrasteko mikroskopia baten bidez aztertu dira.

Mas hartzailearen proteina detektatzeko, Western Blot prozedura erabili da. Bertan, proteinak pisu molekularren arabera banatu eta gero, Mas hartzailearekiko espezifiko den antigorputz baten bidez detektatzen da proteina. Saio hauetarako erabili den zelula kantitate minimoa 30 milioikoa da. Lagin bakoitzaren proteinak erauzi dira RIPA detergentearen inkubazioen eta laginen sonikazioaren bidez. Western Blot saioetarako, lortutako proteina kantitate maximoa erabili da (10 µg ingurukoa).

Biziraupen bidezidorretan duen eragina neurtzeko, bidezidor intrazelular hauetan parte hartzen duen molekula baten aktibazioa (hots, Akt-ren fosforilazioa) aztertu da, Ang 1-7-ren eta A779 antagonistaren kantitate desberdinekin espermatozoideak hainbat denbora tartetan inkubatu ondoren, aurretik deskribatutako Western Blot teknikaren bidez. Aktibazioaren datuak lagin bakoitzaren proteina totalaren kantitatearekiko eta proteina aldagaiz baten kantitatearekiko normalizatu dira.

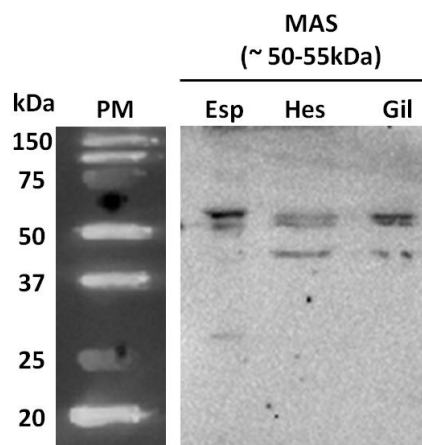
Ang 1-7-k espermatozoideen mugimenduan duen eragina ikertzeko, inkubazio-saioak burutu dira Mas hartzailea aktibatzen duen molekularren (Ang 1-7) eta inaktibatzen duenaren (A779) hainbat kontzentrazioekin zenbait denbora tartetan. Saiodi bakoitzeko espermatozoideen mugikortasuna software informatiko batekin neurtu dira. Software honek espermatozoideak hiru kategoriatan sailkatzen ditu: a mugikortasun motakoak (mugikortasun progresibo azkarra, non espermatozoideen abiadura  $\geq 25 \mu\text{m/s}$ ), b motakoak (mugikortasun progresibo motela, non abiadura  $\leq 25 \mu\text{m/s}$ ), c motakoak (mugikortasun ez-progresiboa, non abiadura  $\leq 5 \mu\text{m/s}$ ) eta d motakoak (mugikortasun eza).

### 3.2 Emaitzak

#### Mas hartzailearen presentzia espermatozoideetan

Gure ikerketa taldearen aurreko lan batean, PCR (Polimerase Chain Reaction) eta immunofluoreszentzia teknikak erabiliz Mas hartzailearen presentzia baieztatu zen espermatozoideetan, RNA zein proteina mailan. Hala ere, proteina horren presentzia ez da oraindik baieztatu Western Blot teknikaren bidez. Horregatik, lan honetan Mas hartzailearen presentzia espermatozoideetan baieztatzeko Western Blot teknika erabili da. Ikerketaren emaitzen arabera, Mas hartzailea espermatozoideetan proteina mailan espresatzen da (**1. irudia**). Mas hartzailearen espresioaren kontrol positibo moduan heste lodiko eta giltzurrunetako zelulak erabili dira. Proteina honen masa molekular teorikoa 43kDa ingurukoa da, beraz, kontrol positibo bietan agertzen den 43 kDa-eko banda proteina natiboari dagokiola esan daiteke. 50 eta 55 kDa inguruko gainontzeko bandak, Mas hartzaile eraldatuari egokitu dakiokete. Espermatozoideetan, banda natiboa ez da agertzen,

**1. irudia:** Mas hartzailearen Western Blotaren analisia giza espermatozoideetan (Esp), giza hestean (Hes) eta giza giltzurrunean (Gil). Espermatozoideak Ang 1-7  $10^{-6}$  M-ekin inkubatua. Pisu molekularreko markatzaileak (kDa) ezkerrean agertzen dira. n=3

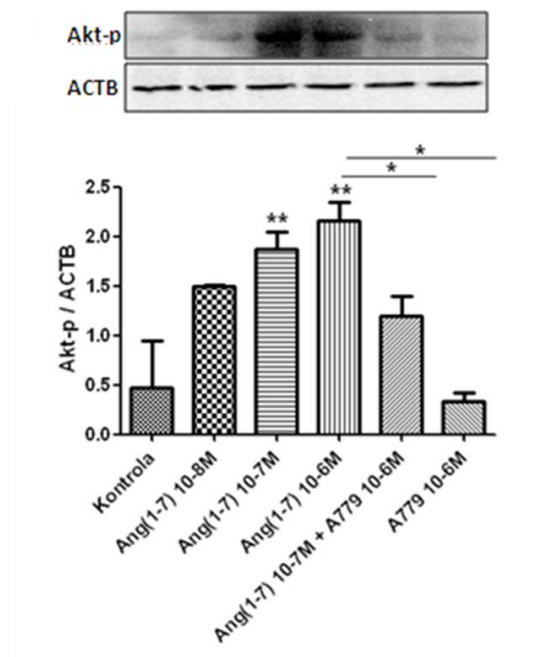


beraz pentsa dezakegu zelula hauetan proteina eraldatua soilik espresatzen dela, edota Ang 1-7-ren tratamenduaren ondorioz proteina eraldatzen dela. Dena den, hipotesi hauek baieztatzeko datu esperimental gehiago behar dira.

**Ang 1-7/Mas1 hartzailearen bidezko biziraupeneko bidezidorraren aktibazioaren azterketa**

Aurretiaz burututako ikerketetan Ang 1-7-k biziraupenerako PI3K/Akt bidezidorra aktibatzen duela frogatu da beste ehunetan. Hori dela eta, bidezidorraren aktibazioa espermatozoideetan gertatzen den ikertu dugu. Ikerketaren emaitzen arabera, hainbat tratamendu eta inkubazio denboratan bidezidorra aktibatzen dela baieztatu dugu (**2. irudia**), aktibazioaren intentsitatea Ang 1-7-ren dosiaren eta inkubazio denboraren menpekoa izanik. Emaitza hau bat dator beste ehunetan Ang 1-7-k dituen eraginekin.

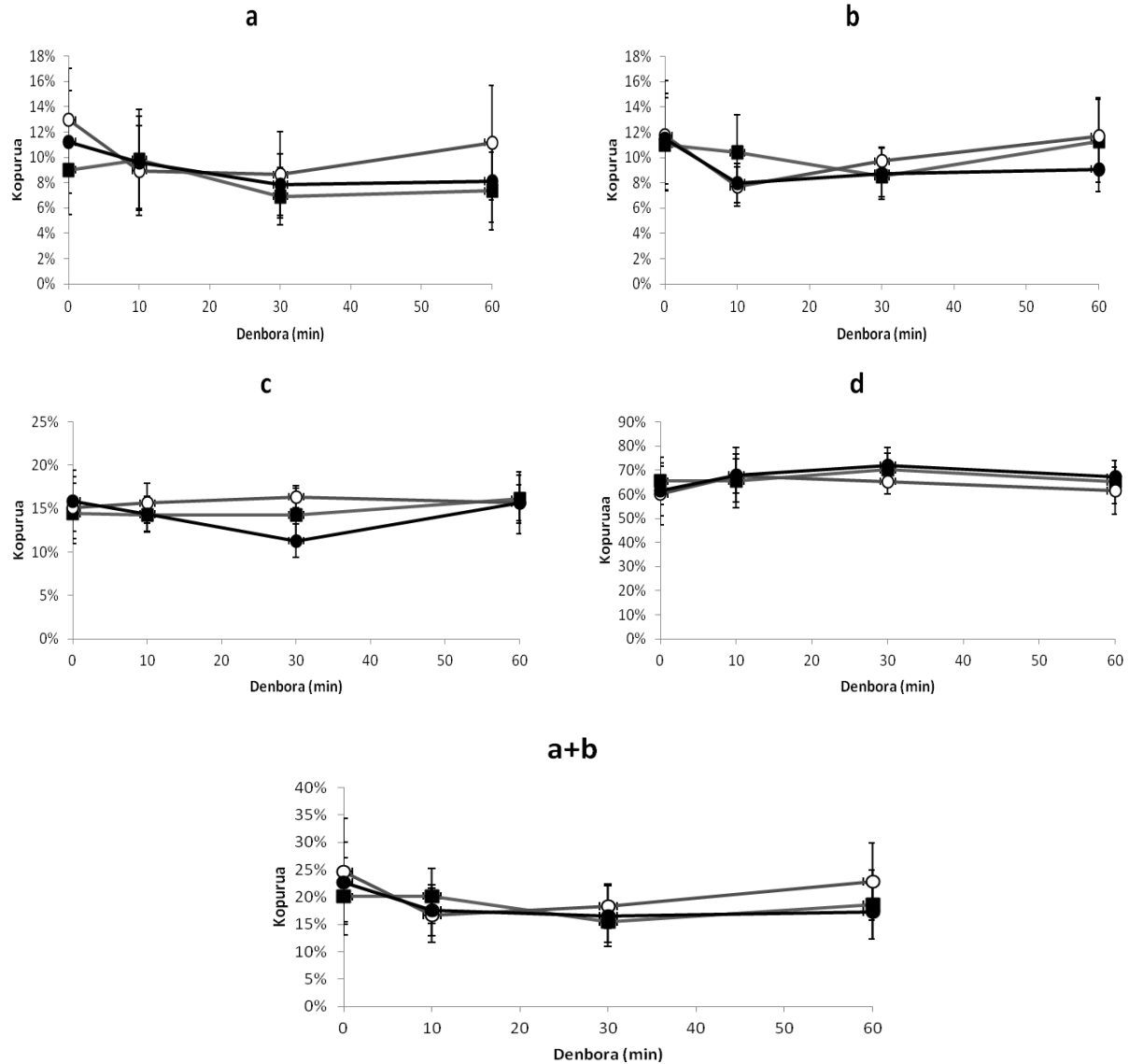
**2. irudia.** Akt aktibatuaren (Akt-p) banden intentsitatea jasotako tratamenduaren arabera T=0min denbora tartean. Goiko banden ilarak Western Blotaren bidez lorturiko emaitzei dagokie, eta beheko grafikoa banda hauen intentsitatearen neurketari dagokio. Emaitzak β-aktina (ACTB) kontzentrazioarekiko eta kargatu zen proteina kopuruarekiko normalizatuta daude. Datu estatistikoki adierazgarriak “\*” ikurraz adierazita daude. “\*\*” ikurrak kontrolarekiko adierazgarriak direla adierazten du.



**Ang 1-7-k espermatozoideen mugikortasunean duen eragina**

AngII-ak espermatozoideen mugikortasuna areagotzen du. Ang 1-7k AngII-ren kontrako efektuak eragin ohi dituzenez, Ang 1-7-rekin hainbat inkubazio egin eta gero lortutako espermatozoideen mugikortasuna aztertu dugu. Ikerketaren emaitzen arabera edozein tratamendua erabilia ere ez da mugikortasunaren aldaketa esanguratsurik gertatzen (**3.irudia**). Esan beharra dago oso lagin gutxirekin egin dela ikerketa hau, eta gainera, lagin hauen egoera ez dela batere ona izan (mugikortasuna andeatuta zuten tratamendua ezarri aurretik). Beraz, lagin berriekin esperimentuak egiten jarraituko du ikerketa taldeak.

3. irudia. Mas hartzaillearen agonista eta antagonistaren eraginaren konparaketa giza espermatozoideen mugikortasunean denboran zehar a, b, c, d eta a+b motako mugikortasunean portzentajeen sortutako erantzuna. ■ Kontrola, ○ Ang 1-7  $10^{-6}$  M, ● Ang 1-7  $10^{-7}$  M eta A779 ( $10^{-6}$  M).



#### 4. Ondorioak

- Mas hartzaillea giza espermatozoideetan proteina-mailan espresatzen da.
- Ang 1-7 peptidoak PI3K/Akt biziraupen bidezidorra aktibatzen du espermatozoideetan.
- Ang 1-7-k  $10^{-8}$  M –  $10^{-6}$  M kontzentrazio tartean ez du eraginik espermatozoideen mugikortasunean.

#### 5. Etorkizunerako planteatutako norabidea

Mas hartzaillea espermatozoideetan dagoela guztiz baieztatuta geratu den arren, oraindik ez dago oso argi zein izan daitekeen hartzaille horren funtzioa espermatozoideetan. Litekeena da AngII-k eragiten dituen kontrako efektuak eragitea (esate baterako, hiperaktibazioaren inhibizioa eta abar) (Ferrario et al., 1997; Ferrario et al., 2005), baina oraindik ikertze arazo dago zein ondorio fisiologiko

eragin ditzakeen Ang 1-7-a (Mas hartzailaren bidez) espermatozoideetan. Gainera, oraindik ere ezezagunak dira Mas hartzaila aktibatuak erabiltzen dituen mekanismo molekularrak zelula barnean erantzuna sorrarazteko. Ang 1-7-k Mas hartzailaren bidezko biziraupen bidezidor baten aktibazioa eragiten duenez, bidezidor honen aktibazioa sakonki aztertzea izango da etorkizunerako bidea.

Beste ehun askotan, Ang 1-7-k bestelako biziraupen bidezidorretan eragiten duela ikusi da, beraz, ikerketaren beste helburuetako bat da espermatozoideetan bestelako biziraupen bidezidor hauen aktibazioan eraginik duen ikertzea.

Bestalde, biziraupen bidezidorrez gain, Ang 1-7-k bidezidor apoptotikoetan (hots, heriotz-mekanismoetan) eraginak dituela frogatuta dago bestelako ehunetan. Kasu honetan, heriotz bidezidor hauek inaktibatzen ditu, zelularen biziraupena bermatuz. Hori dela eta, ikerketa taldearen beste helburuetariko bat espermatozoideetan eragin berdina duen ikertzea da.

## 6. Erreferentziak

- Alenina N, Baranova T, Smirnow E, Bader M, Lippoldt A, Patkin E, Walther T. (2002), “Cell type-specific expression of the Mas proto-oncogene in testis”, *J Histol Cytol.* 50, 691–696.
- Blázquez, P. (2014), “Detección e inmunolocalización del receptor Mas en los espermatozoides humanos” (Gradu amaierako lana) *Biologia Zelularreko saila, Medikuntza fakultatea, UPV/EHU.*
- Ferrario CM, Chapell MC, Tallant EA, Brosnihan KB, Diz DL. (1997), “Counterregulatory functions of angiotensin-(1-7)”, *Hypertension*, 30, 535-541.
- \_\_\_\_\_ Trask AJ, Jessup JA. (2005), “Advances in biochemical and functional roles of angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1-7) in regulation of cardiovascular function”, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 289, H2281-H2290.
- Fuchs S, Frenzel K, Hubert C, Lyng R, Muller L, Michaud A, Xiao HD, Adams JW, Capecchi MR, Corvol P, Shur BD, Bernstein KE. (2005), “Male fertility is dependent on dipeptidase activity of testis ACE”, *Nature Med.*, 11, 1140–1142.
- Giani JF, Gironacci MM, Muñoz MC, Peña C, Turyn D, Dominici FP. (2007), “Angiotensin-(1-7) stimulates the phosphorylation of JAK2, IRS-1 and Akt in rat heart in vivo: role of the AT1 and Mas receptors”, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 293, H1154-H1163.
- Gur Y, Breitbart H, Lax Y, Rubinstein S, Zamir N. (1998), “Angiotensin II induces acrosomal exocytosis in bovine spermatozoa”, *Am J Physiol*, 275, E87-93.
- Kim E, Baba D, Kimura M, Yamashita M, Kashiwabara S, Baba T. (2005), “Identification of a hyaluronidase, hyal5, involved in penetration of mouse sperm through cumulus mass”, *Proc Natl Acad.*, 102(50), 18028–18033.
- Köhn FM, Muller C, Drescher D, Neukamm C, Henkel Ri, Hagele W, Hinsch E, Habenicht UF & Schill WB. (1998), “Effect of angiotensin converting enzyme (ACE) and angiotensins on human sperm functions”, *Andrologia*, 30, 207–215.
- Langford KG, Zhou Y, Russell LD, Wilcox JN, Bernstein KE. (1993), “Regulated expression of testis angiotensin-converting enzyme during spermatogenesis in mice”, *Biol Reprod.*, 48, 1210–1218.
- 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.
- Leung OS, Sernia C. (2003), “The renin-angiotensin system and male reproduction: new functions for old hormones”, *J Mol Endocrinol.*, 30(3), 263–270.

- Muñoz MC, Giani JF, Dominici FP. (2010), “Angiotensin-(1-7) stimulates the phosphorylation of Akt in rat extracardiac tissues in vivo via receptor Mas”, *Regulatory peptides*, 161, 1-7.
- Passos-Silva, Verano-Braga, Santos. (2013), “Angiotensin- (1-7): beyond the cardio-renal actions”, *Clinical Science*, 124, 443-456.
- 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.
- Schuel H, Burkman LJ. (2005), “Endocannabinoid-signaling regulates functions of neurons and sperm”, *Biol Reprod.*, 73(6):,1078-1086.
- Speth RC, Daubert DL, Grove KL. (1999), “Angiotensin II: a reproductive hormone too?”, *Regul. Pept*, 79, 25–40.
- Stauss CR, Votta TJ, Suarez SS. (1995), “Sperm motility hyperactivation facilitates penetration of the hamster zona pellucid”, *Biol Reprod.*, 53(6), 1280–1285.
- Vinson GP, Puddefoot JR, Ho MM, Barker S, Mehta J, Saridogan E, Djahanbakhch O. (1995), “Type 1 angiotensin II receptors in rat and human sperm”, *J Endocrinol.* 144(2), 369-378.
- \_\_\_\_\_Mehta J, Evans S, Matthews S, Puddefoot JR, Saridogan E, Holt WV, Djahanbakhch O. (1996), “Angiotensin II stimulates sperm motility”, *Regul Pept.*, 67, 131-135.
- Yanagimachi R. (1994): *Mammalian fertilization. The Physiology of Reproduction (Knobil E, & Neill JD editoreak)*, Raven Press, New York.

## 7. Eskerrak eta oharrak

- Lan honetan aurkeztutako datuak behin-behinekoak dira.
- Lan honetako datuak aldizkari internazional batean publikatzeko zain dago ikerketa taldea.
- Eskerrak: Barakaldoko Gurutzetako Unibertsitate Ospitaleko Lagunduriko Ugalketa Unitateari (laginak ikerketa taldearekin partekatzeagatik), eta laginak ikerkuntzari eman dioten gizonezko guztiei. Eskerrak eman behar dizkiogu Maider Beitiari, teknikak burutzen irakasteagatik.