



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

I. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2015eko maiatzaren 13, 14 eta 15
Durango, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)

ZIENTZIA ZEHATZAK ETA NATUR ZIENTZIAK

**Opioide-hartzaileen deskribapena
eta kokapena saguen hozi-zelula
maskulinoetan**

*H. Estomba, I. Muñoa, I. Urizar,
M. Gianzo, L. Casis, J. Irazusta
eta N. Subiran*

328-334 or.

<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.i.44>

ANTOLATZAILEA:



BABESLEAK:



oman ta zabal zazu



LAGUNTZAILEAK:



UDALBILTZA



Opioide-hartzaileen deskribapena eta kokapena saguen hozi-zelula maskulinoetan

Estomba H, Muñoa I, Urizar I, Gianzo M, Casis L, Irazusta J, Subiran N.

Medikuntza eta Odontologia Fakultatea. Fisiologia Saila.

Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU)

haizea.estomba@ehu.es

Laburpena

Hainbat ikerketen arabera barne-peptido opioideak (BPO) arren zelula mota ezberdinetan aurkitzen dira. Aurretik egindako ikerketek, hiru opioide-hartzaileak (μ , delta eta kappa) soilik arratoiaren testikulueta Sertoli zeluletan eta giza espermatozoideetan deskribatu dituzte. Espermatozoideak transkribapen eta itzulpen mailan jarduerarik gabeko zelulak izanda, pentsa liteke espermatogenesisian zehar, lehenagoko urratsetan, adierazi direla. Emaitza hauek opioide-hartzaileek espermatogenesisian duten jarduera erakusteaz gain, sistema opioideak ugalkortasunean, ama zeluletan, epigenetikan, minbizian eta zahartzea bezalako prozesuetan duten ekarpena ulertzen lagun dezake.

Hitz gakoak: sistema opioidea, espermatogenesisia, meiosis, ugalkortasuna, ugalketa.

Abstract

Numerous studies have demonstrated the presence of endogenous opioid peptides (EOPs) in different male cell types. Previous studies have described the three opioid receptors (μ , delta and kappa) in testicular rat Sertoli cells and in human spermatozoa. Because of spermatozoa are not active cells in transcription and in translation phase it could be thought that those opioid receptors have been expressed during the spermatogenesis. These results contribute to resolve several long-standing issues concerning the role of opioid receptors in spermatogenesis and provide new insight into the function of the opioid system in fertility, stem cells, epigenetics, cancer and ageing.

Keywords: opioid system, spermatogenesis, meiosis, fertility, reproduction.

1. Sarrera eta motibazioa

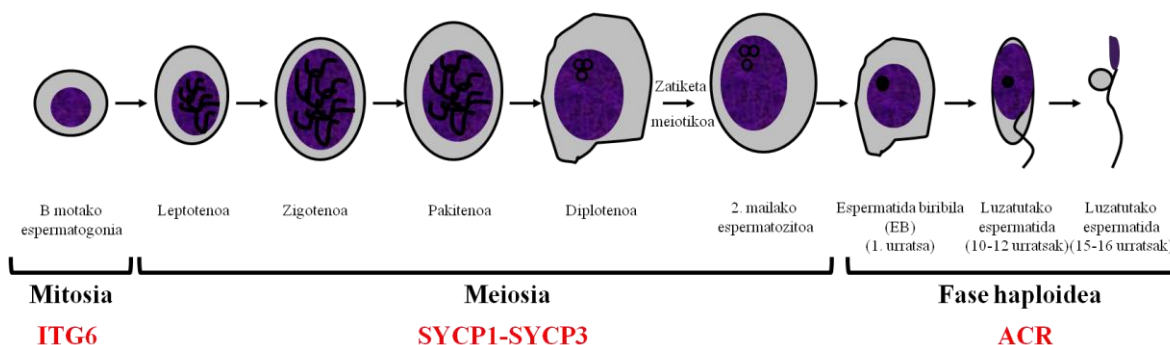
Sistema opioidea zelula arteko komunikazio sistemaren baitan dago eta bere jarduera biologikoa barne-peptido opioideen (BPO) bitartez burutzen du. BPO-etan ezagutzen den efektu fisiologikoa nagusiena analgesia edo minaren murriztapena da. Azken urteotan, aldiz, BPO-ak bestelako funtzio fisiologiko batzuetan ere parte hartzen dutela ikusi izan da (Feng et al., 2012). Zehazki, sistema ugalkor maskulinoko hainbat ehun eta organoetan topatu izan dira. Honek, BPO-ek funtzio ugalkor maskulinoaren erregulazioan duten presentzia azaltzen du (Subiran et al., 2011). Esan bezala, BPO-ak komunikazio zelularrean parte hartzen duten sustantziak dira eta euren seinalea G proteinei lotutako opioide-hartzaileen bidez askatzen dute. Nagusiki, hiru opioide-hartzaile ezagutzen dira: μ opioide-hartzailea (MOR), delta opioide-hartzailea (DOR) eta kappa opioide-hartzailea (KOR) (Gaveriaux-Ruff C. eta Kieffer BL, 1999).

Zenbait ikerketek hiru opioide-hartzaileak arratoiaren testikulueta topatu arren, hauen kokapena soilik Sertoli zelula somatikoetan adierazten dela ondorioztatu zuten (Fabbri et al., 1985). Dirudienez, BPO-ak *de novo* sintetizatzen dira testikulueta Leydig eta Sertoli zelula somatikoetan. Honetaz gain, peptido opioide hauek, azken zelula hauen jarduera inhibitzeko gaitasuna dute. Hala ere, peptido opioide hauen ekintza zuzena ez da guztiz ulertzen, izan ere, peptido opioideen hartzaileek hozi-zeluletan duten adierazpen-maila, oraindik ere, ezezaguna da. Azken urteotan opioide-hartzaileak (MOR, DOR eta KOR) eta sistema opioideko bestelako osagaiak giza espermatozoideetan deskribatu izan dira. Aurretik egindako lan hauetan, opioide-hartzaile hauek, giza espermatozoideen mugikortasunean eragiten dutela ondorioztatu zen (Fernandez et al., 2002; Agirregoitia et al., 2006; Subiran et al., 2008; 2012). Bestalde, hartzaile hauen presentzia hozi-zelula maskulinoetan deskribatu ez denez, euren eginkizuna espermatogenesisian zehar, oraindik ere, ezezaguna da.

Espermatogenesisia zelula espermatikoen garapen prozesuari deritzo. Hozzi-zelula maskulinoen heltze prozesu honetan hiru fase zelular bereizten dira: mitosia, meiosis eta fase haploide bereizgarria. Espermatogenesisiko zelulen heltze prozesua epitelio seminifero kanpoko aldetik barrurantzko noranzkoan gertatzen da. Honela, heltze prozesuaren azken fasean dauden zelula haploideak lumenera askatzen dira. Espermatogenesisia A1 motako espermatogoniak deritzen zelulen zatiketa mitotikoekin hasten da. Zatiketa hauen ondorioz bestelako espermatogonia mota ezberdinak sortzen dira eta, azkenik, B motako espermatogoniak sortzen dira. Azken espermatogonia hauekin mitosi fasea amaitzen da, izan ere, B motako espermatogonia bakoitza bitan zatitu eta lehen mailako espermatozitoak deritzen bi zeluletan bihurtzen da (de Rooij DG, 2001). Lehen mailako espermatozito hauek meiosi fasean sartzen dira. Fase honetan bi zatiketa meiotiko ematen dira; lehen zatiketa meiotikoa, lehen mailako espermatozitoen DNA kopurua bikoiztu eta materiala genetikoa konbinatu ondoren amaitzen da. Lehen mailako espermatozito bakoitzetik, bigarren mailako espermatozitoak deritzen beste bi zelula sortzen dira. Zelula hauetan bigarren zatiketa meiotikoa gertatzen da. Prozesu hau lehen zatiketa meiotikoarena baino azkarragoa da, izan ere, ez da DNA bikoizketarik ezta materiala genetikoaren konbinaketarik gertatzen. Bigarren mailako espermatozito bakoitzetik haploideak diren lau zelula sortzen dira. Beraz, zelula haploideek jatorrizko DNAREN kopuru erdia izango dute (Roeder GS, 1997) (1. irudia).

Aurretik aipatutako guztia kontuan hartuta, ikerketa-lan honen helburu nagusia opioide-hartzaileak espermatogenesisian zehar deskribatzea eta kokatzea izan zen.

1. irudia: Espermatogenesisian zeharreko zelula espermatikoen garapen prozesua. Fase bakoitzeko adierazle diren markatzaile espezifikoak ere aurkezten dira.



2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Orain arte egindako arloko ikerketek hiru opioide-hartzaile klasikoak (MOR, DOR eta KOR) giza espermatozoidetan deskribatu izan dituzte. Honetaz gain, hartzaile hauek espermatozoiden mugikortasunean eragindako seinale opioide ezberdinak ere ezarri dituzte. Aldiz, hartzaile hauen presentzia hozzi-zelula maskulinoetan deskribatu ez denez, euren eginkizuna espermatogenesisian zehar, oraindik ere, ezezaguna da. Izan ere, hiru opioide-hartzaileak arratoien testikuluetan topatu arren, hauen kokapena soilik Sertoli zelula somatikoetan adierazten dela ondorioztatu zen (Fabbri et al., 1985). Kontuan izanik espermatozoiden helduak transkribapen eta itzulpen mailan jarduerarik gabeko zelulak direla opioide-hartzaile hauek espermatogenesisian zehar adierazten direla pentsa liteke.

Hau dela eta, ikerketa-lan honetan bi helburu nagusi hauek jorratu dira;

- Saguen espermatogenesisian zeharreko MOR, DOR eta KOR-en adierazpena zehaztea
- Saguen zelula espermatogenikoetan opioide-hartzaileak kokatzea

3. Ikerketaren muina

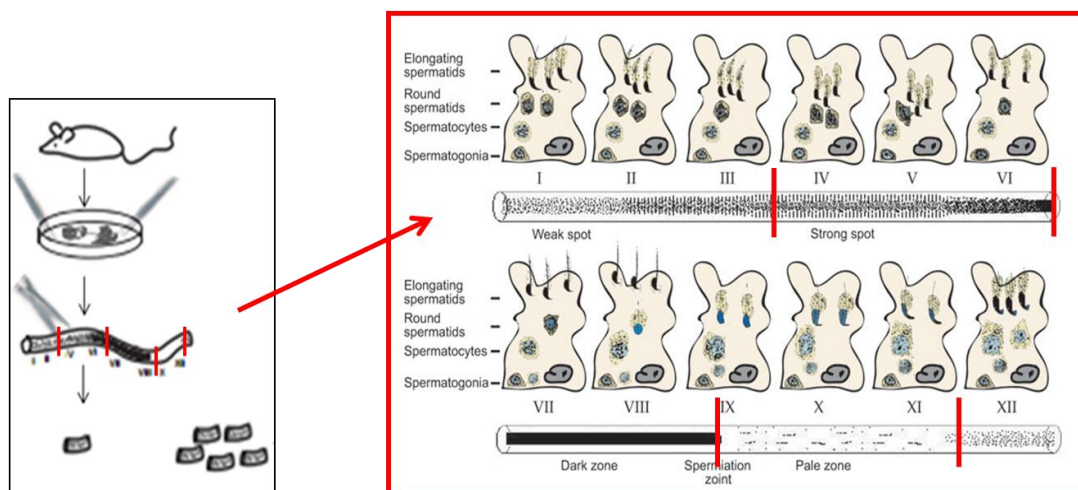
Hozi-zelula maskulinoetako MOR, DOR eta KOR-en deskribapena eta kokapena ezagutzeko metodologia ugari erabili zen. Opioido-hartzaileen gene zein proteinen adierazpenak deskribatzeko erabilitako teknikak, hurrenez hurren, qRT-PCR-a eta western blot-a izan ziren. Bestalde, aipatutako opioido-hartzaileek zelula espermatogenikoetan zuten kokapena ezagutzeko, erabilitako teknika immunotindaketa bidezkoa izan zen.

3.1 Opioido-hartzaileen geneen adierazpena

Opioido-hartzaileen geneen adierazpena ikertzeko erabilitako metodoa, aipatu bezala, qRT-PCR-a izan zen. Análisi honen laguntzaz DNA zati baten kopia kopurua handitzea eta, aldi berean, kuantifikatzea lortzen da.

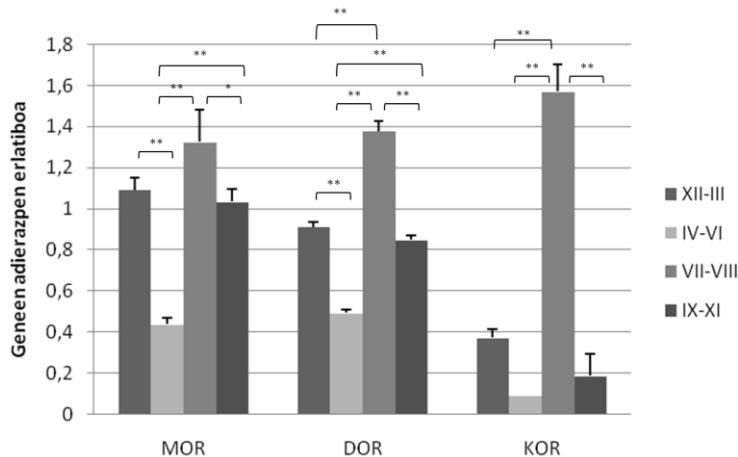
Kasu honetan, aztertutako geneen adierazpena tubulu seminiferoetako MOR, DOR eta KOR-ena izan zen. Honetarako, estadioetan oinarritutako tubulu seminiferoen sailkapena egin zen. Izan ere, saguen ziklo espermatogenikoa, elkarren jarraian dauden hamabi estadioetan bereizten da (Russell et al., 1990) (2. irudia). Estadio bakoitzak argi-xurgapen patroia bereizgarria izan arren, estadio guztiek oso antzekoak diren patroiak izan ditzakete. Hau dela eta, opioido-hartzaileen geneen adierazpena lau taldetan banatuz aztertu zen, non; lehen taldea XII-III bitartean zeuden estadioei zegokion, bigarren taldea IV-VI arteko estadioei, hirugarren taldea VII-VIII estadioei eta laugarren taldea IX-XI artean zeuden estadioei.

2. irudia: Tubulu seminiferoen taldekako sailkapenaren eskema.



Lortutako emaitzen arabera MOR, DOR eta KOR geneen adierazpena baieztatu zen saguen tubulu seminiferoetako estadio guztietan (3. irudia). Hiru opioido-hartzaileen geneen adierazpenean bi joera nagusi ikusi ziren. Alde batetik, espermatogenesiko zikloan zehar, opioido-hartzaileen adierazpena aldatzen zela antzeman zen. Bestetik, hiru opioido-hartzaileen adierazpen-patroia, zikloan zehar, errepikatzen zela behatu zen. Izan ere, opioido-hartzaile bakoitzeko geneen adierazpena XII-III estadioetan IV-VI estadioetako adierazpenarekin konparatuz, ikusten zen handiagoa zela. VII-VIII estadioetako gene-adierazpena bere aurreko estadioekin erkatzerakoan, hauen adierazpena ere, handitzen zen. Azkenik, IX-XI estadioetako gene-adierazpena VII-VIII estadioetako adierazpenarekin jaisten zen arren, IV-VI estadioetako gene-adierazpena baino balio altuagoak mantentzen ziren. Aipatutako aldaketa hauek guztiak, estatistikoki oso modu adierazgarrian gertatu ziren (** $P < 0,01$).

3. irudia: MOR, DOR eta KOR geneen adierazpena tubulu seminiferoetako estadioetan.



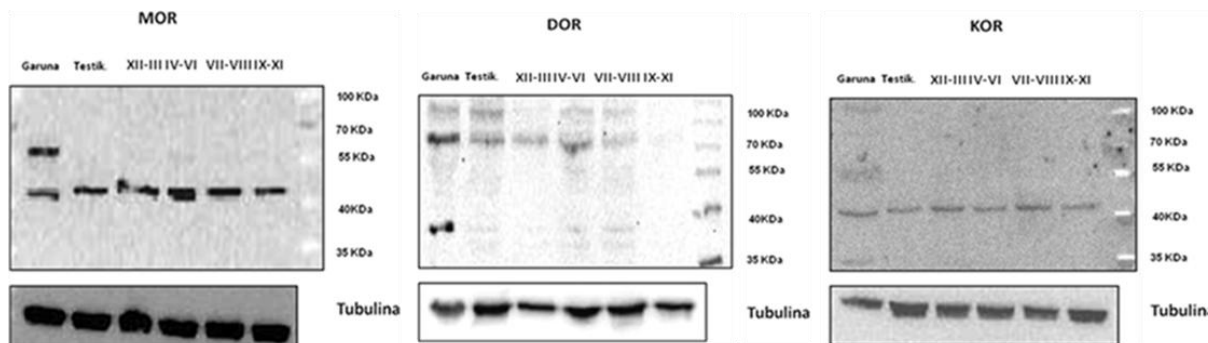
3.2 Opioido-hartzaileen proteinen adierazpena

Saguen tubulu seminiferoetako ziklo espermatogenikoan zehar dauden opioido-hartzaileen proteinak hautemateko western blot teknika erabili zen. Proteinak tamaina eta kargaren arabera banatzen dira poliakrilamidazko gel batetan. Ondoren, gel horretan dauden proteinak mintz batetara transferitzen dira. Azkenik, mintzera transferitutako proteinak antigorputz espezifikoekin inkubatzen dira proteina-bandak agertuz.

Kasu guztietan, behatutako banden barne-kontrol gisa, tubulina erabili zen. Tubulina 50 kDa ditu eta egitura zelular guztietan berdin mantentzen da. Bestalde, kontrol positibo gisa garuna eta testikuluak erabili ziren. Hauetan lehenagotik opioido-hartzaileen proteinak topatu izan direnez, kontrol modura erabiltzea erabaki zen.

Hiru opioido-hartzaileen proteinen presentzia baieztatu zen tubulu seminiferoetako ziklo espermatogenikoan zehar (4. irudia). Zehazki, MOR-en aurkako antigorputz poliklonala erabiliz, estadioetan sailkatutako tubulu seminiferoetan eta testikuluetan 45 kDa-eko banda bakarria antzeman zen. DOR-ari dagokionez, honen aurkako antigorputz poliklonalak 72 eta 100 kDa-eko bandak agerrarazi zituen testikuluetako proteina-erazkinean eta, baita, tubulu seminiferoetako IV-VI eta VII-VIII estadioetan. XII-III estadioetako proteina-erazkinean 72 kDa-eko banda bakarria agertzen zen, aldiz, IX-XI estadioen kasuan ez zen banda nabarmenik bereizten. Azkenik, KOR-ren proteina-erazkinean, estadioetan sailkatutako tubulu seminiferoetan eta testikuluetan 48 kDa inguruko bandak hauteman ziren. Garunean, ere, 48 kDa-eko immunoerreaktibotasuna zuen banda igarri zen.

4. irudia: MOR, DOR eta KOR proteinen western blot analisia.



3.3 Opioide-hartzaileen proteinak kokatzea

Aurretik aipatu bezala espermatogenesisia deritzon hozi-zelula maskulinoen heltze prozesu honetan hiru fase zelular bereizten dira: mitosia, meiosis eta fase haploide bereizgarria. Aldi berean, fase zelular bakoitzak zelula mota ezberdinak biltzen ditu. Honela, mitosiko zelulak espermatogoniak, meiosi fasean daudenak espermatozitoak eta, azkenik, fase haploideko zelulak espermatidak biltzen dituzte.

Fase zelular bakoitzean adierazten diren opioide-hartzaileen proteinak kokatzeko erabilitako teknika immunofluoreszentzia bikoitza izan zen. Bikoitza da, izan ere, fase zelular bakoitzerako eta opioide-hartzaileetarako espezifikoak diren markatzaileak erabiltzen dira. Honela, espermatogonien markatzaile espezifikoa Alfa-6 integrina (ITG6), espermatozitoena Konplexu sinaptonemalaren proteina-1 eta -3 (SYCP1 eta SYCP3) eta espermatidena, berriz, akrosina (ACR) dira (1. irudia).

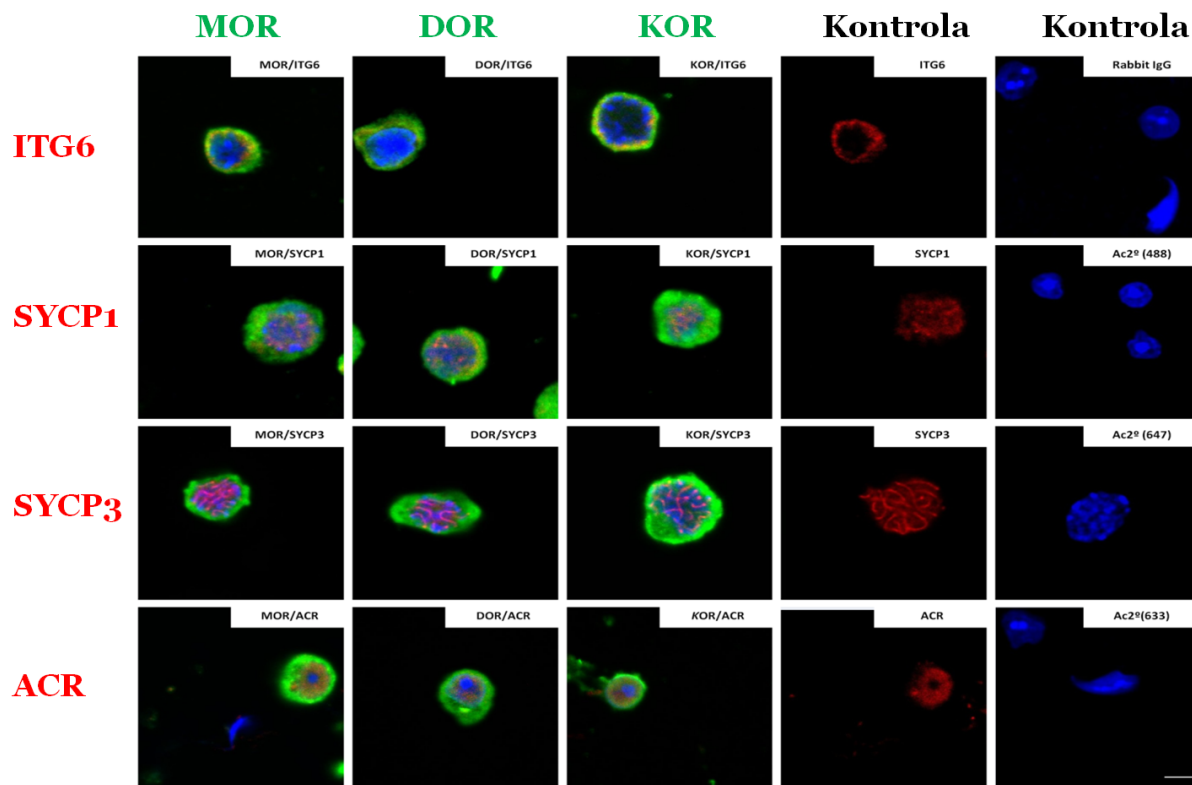
Azterketa immunozitokimikoen bidez MOR, DOR eta KOR-en presentzia espermatogonia, espermatozito eta espermatidetan baieztatu zen. Analisi honi esker opioide-hartzaile bakoitza zelulen alde periferikoan ikusi ahal izan zen. Honek, opioide-hartzaileak mintzean kokatzen direla adierazten zuen (5. irudia).

Opioide-hartzaileen proteinak, kasu honetan, fluorokromo berdez aurkeztu ziren. Bestalde, espermatogenesiko markatzaile espezifikoak fluorokromo gorritz ikus zitezkeen. Kasu guztietan behatu zen markatzaile espezifikoak opioide-hartzaileen tindaketekin batera azaltzen zirela. Zehazki, espermatogonien markatzaile espezifikoa den ITG6-arentzat positiboak ziren zeluletan, zegokien antigorputz primario eta sekundarioarekin inkubatzeko MOR, DOR eta KOR-en immunofluoreszentzia, gehiengo batean, zelulen alde periferikoan ikusten zen. Espermatozitoen markatzaile espezifikoak diren SYCP1 eta SYCP3-arentzat positiboak ziren zelulak ere opioide-hartzaileekin positiboki markatuta topatu ziren alde periferikoan. ACR-rekin markatutako espermatidetan, ere, MOR, DOR eta KOR-en presentzia baieztatu zen zelulen alderik kanpokoenean.

Markatzaile espezifiko bakoitzak zelula espermatogenikoetan duen kokapena ere aztertu zen. Honela, ITG6 markatzailea mintzean kokatu zen. SYCP1 eta SYCP3 markatzaileak, hurrenez hurren, leptoteno eta pakiteno fase meiotikoan dauden nukleoan lekutu ziren. Azkenik, ACR markatzailea espermatida biribilen nukleoan kokatu zen.

Antigorputzek izan zitzaizketen seinale ez-espezifikoak aztertu ziren. Behatutakoaren arabera, soilik antigorputz primario eta sekundarioekin inkubatutako zelulek ez zuten inolako seinalerik ematen. Beraz, esan liteke behatutako immunotindaketaren seinalea egokia izan zela.

5. irudia: Saguen zelula espermatogenikoetako opioide-hartzaileen azterketa immunozitokimikoa.



4. Ondorioak

Hainbat ikerketa lanek, testikulueta zelula mota ezberdinetan, BPO-ak deskribatu izan dituzte (Tsong et al., 1982; Fabbri et al., 1988; Soverchia et al., 2006). Honek, testikulueta funtzio erregulatzailer gisa, sistema opioideak, eginkizun garrantzitsua duela adierazten du. Orain arteko arloko ikerketek hiru opioide-hartzaileak (MOR, DOR eta KOR) soilik giza espermatozoideetan (Agirregoitia et al., 2006) eta testikulueta Sertoli zelula somatikoetan (Fabbri et al., 1985) deskribatu izan dituzte. Aldiz, ikerketa-lan honek, lehen aldiz, mu, delta eta kappa opioide-hartzaileen adierazpena zehaztu du batetik, eta espermatogenesiko zeluletan kokatu ditu, bestetik.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Etorkizunean, opioide-hartzaileek ugalkortasunean eta, batez ere, espermatogenesian duten garrantzia aztertzen jarraituko da.

Alde batetik, opioide-hartzaileek euren funtzioa gauzatzeko zeluletan erabiltzen dituzten barne-bideak argitzen ahaleginduko gara seinaleztapen sare bat eraikiz. Honela, morfina, heroina edota metadona bezalako droga opioideek, besteak beste, giza ugalkortasunean sor ditzaketen efektuak ezagutu ahal izango dira.

Emaitza hauek guztiak ikerketa klinikoetara egokituko dira. Honela, sistema opioideak laguntza bidezko ugalketan duen garrantzia aztertuko da teknika hauek hobetzeko asmoz. Hau dela eta, ugalkortasun eza dagoeneko kasuetan zelula espermatoziko akasduak detektatu ahal izango dira teknikaren arrakasta handitzea ahalbidetuz.

6. Erreferentziak

- 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* 91: 4969-75.
- de Rooij D.G. (2001). “Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells”. *Reproduction* 121:347–354.
- Fabbri A., Tsai-Morris C.H., Luna S., Fraioli F., Dufau M.L. (1985). “Opiate receptors are present in the rat testis. Identification and localization in Sertoli cells”. *Endocrinology* 117(6):2544-6
- _____, Knox G., Buczko E., Dufau M.L. (1988). “Beta-endorphin production by the fetal Leydig cell: regulation and implications for paracrine control of Sertoli cell function”. *Endocrinology* 122(2):749-55
- Feng Y., He X., Yang Y., Chao D., Lazarus L.H., Xia Y. (2012). “Current research on opioid receptor function”. *Curr Drug Targets* Feb;13(2):230-46.
- Fernandez D., Valdivia A., Irazusta J., Ochoa C., Casis L. (2002). “Peptidase activities in human semen”. *Peptides* 23: 461-8.
- Gaveriaux-Ruff C., and Kieffer B.L. (1999). “Opioid receptors: gene structure and function”. *Opioids in Pain Control: Basic and Clinical Aspects*. Cambridge University Press.
- Roeder G.S. (1997). “Meiotic chromosomes: It takes two to tango”. *Genes Dev* 11:2600–2621.
- Soverchia L., Mosconi G., Ruggeri B., Ballarini P., Catone G., Degl’Innocenti S., Nabissi M., Polzonetti-Magni A.M. (2006). “Proopiomelanocortin gene expression and beta-endorphin localization in the pituitary, testis, and epididymis of stallion”. *Mol Reprod Dev* 73(1):1-8
- Subiran 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* 89: 1571-7.
- _____, Casis L., Irazusta J. (2011). “Regulation of Male Fertility by the Opioid System”. *Mol Med* 17(7-8):846-53.
- _____, Candenias L., Pinto F.M., Cejudo-Roman A., Agirregoitia E., Irazusta J. (2012). “Autocrine regulation of human sperm motility by the met-enkephalin opioid peptide”. *Fertil Steril* 98(3):617-625.
- Tsong S.D., Phillips D., Halmi N., Liotta A.S., Margioris A., Bardin C.W., Krieger D.T. (1982). “ACTH and beta-endorphin-related peptides are present in multiple sites in the reproductive tract of the male rat”. *Endocrinology* 110(6):2204-6

7. Eskerrak eta oharrak

Lan hau Eusko Jaurlaritzak eta UPV/EHU-k emandako diru-laguntzekin burutu ahal izan zen. Eusko Jaurlaritzak Iraia Muñoa eta Marta Gianzo doktoretza-aurreko diru-laguntzekin finantzatu zituen. Itziar Urizar UPV/EHU-k emandako doktoretza-aurreko diru-laguntzarekin finantzatu zen. Gangoi-Barrera fundazioak Haizea Estomba finantzatu zuen.