

I. RESUM

Els miRNAs són molècules de 22-24nt implicades en la regulació de l'expressió gènica de nombrosos processos biològics: cicle cel·lular, desenvolupament embrionari, gametogènesi entre d'altres. Recentment s'han identificat perfils alterats d'expressió de miRNAs en diversos casos d'infertilitat idiopàtica posant de manifest el paper fonamental d'aquestes molècules en la regulació de la fertilitat.

Aquest treball de recerca s'emmarca en el projecte titulat: **miRNAs en fertilitat humana**. El projecte té com a objectiu final valorar si existeix una expressió diferencial dels miRNAs entre individus fèrtils i infèrtils. L'objectiu principal d'aquest treball de recerca és el desenvolupament de la primera fase del projecte: optimitzar un mètode que ens permeti aïllar i purificar el transcriptoma complet de l'espermatozoide humà.

El treball que es presenta a continuació engloba la optimització del procés d'extracció d'RNA total en espermatozoides. Aquesta optimització ha permès obtenir un RNA de bona qualitat i puresa i s'ha confirmat la presència de miRNAs. Els resultats ens permetran estudiar la relació dels miRNAs amb l'espermatogènesi i la infertilitat masculina.

II. ACRÒNIMS

AGO: Proteïnes de la família Argonauta
DE: Desviació estàndard
DEPC: Pirocarbonat de dietil
DGCR8: *DiGeorge syndrome Critical Region gene 8*
DICER: Ribonucleasa de tipus III
DROSHA: Enzim RNasaIII de classe 2
fg: femtograms
FU: Unitats de fluorescència
miRISC: *miRNA-Induced Silencing Complex*
miRNA: micro RNA
ml: mil·lilitres
mRNA: RNA missatger
ncRNA: RNA no codificant
ng: nanograms
nt: nucleòtids
pre-miRNA: micro RNA precursor
pri-miRNA: micro RNA primari
rDNasaI: DNasa recombinant
RIN: *RNA integrity number*
RNA pol-II: RNA polimerasa II
rRNA: RNA ribosòmic
SCL: *Somatic Cell Lysis*
SCLB: *Somatic Cell Lysis Buffer*
siRNA: RNA petit d'interferència
snoRNA: RNA petit nucleolar
snRNA: RNA petit nuclear
SWU: *Swim-up*
TRBP: *Transactivating Response RNA-Binding Protein*
tRNA: RNA de transferència
µl: microlitres

1. INTRODUCCIÓ

1.1. El transcriptoma

El transcriptoma es defineix com el conjunt de molècules d'RNA presents en una cèl·lula, en un grup de cèl·lules o en un organisme (Lewin 2008). Inclou des de molècules d'RNA funcionals o ncRNAs, fins a mRNAs codificants. Els ncRNA no són traduïts a proteïnes i representen el 96% de les molècules d'RNA de la cèl·lula. Engloben RNA ribosòmic (rRNA), de transferència (tRNA), RNAs nuclears (snRNA) i nucleolars (snoRNA), RNAs petits d'interferència (siRNA) i microRNAs (miRNA) (Eddy 2001; Buckingham 2003; He et al. 2009) (Figura 1).

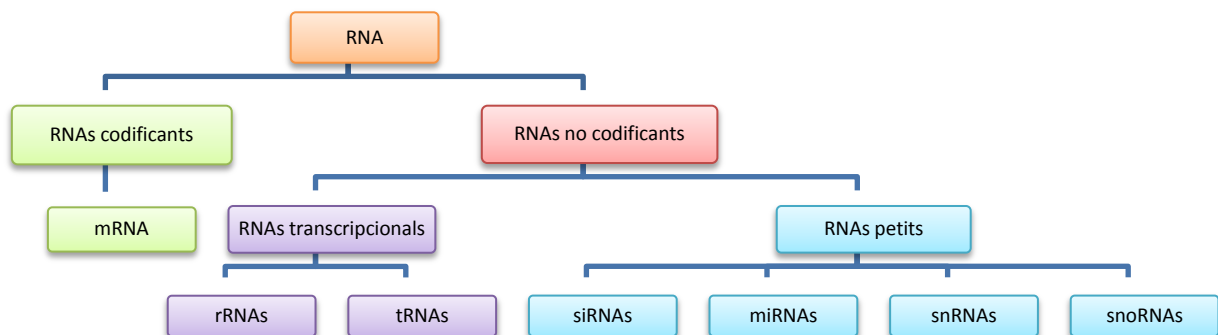


Figura 1: Conjunt de molècules d'RNA que formen el transcriptoma (Adaptat de Buckingham 2003).

1.2. miRNAs

Els miRNAs són molècules formades per una cadena de 22-24nt, que formen estructures semi-complementàries a les regions 3' no traduïdes dels mRNA als que regulen (Ambros 2001; Boyd 2008). Es sintetitzen en el nucli per la RNA pol-II en forma de molècules precursors (pri-miRNA). Aquestes molècules són processades per grups catalitzadors anomenats DGCR8 i DROSHA. El complex DROSHA processa les molècules pri-miRNA fins als precursors de miRNA (pre-miRNA), de 60-70nt. Aquests són exportats al citoplasma via exportina-5', i processats per els complexos TRBP i DICER. Després del processat, els miRNA s'uneixen a complexos proteics formant els miRISC, que contenen proteïnes de la família AGO (Inui et al. 2010) (Figura 2).

Els complexos miRISC regulen l'expressió gènica mitjançant tres mecanismes (Figura 2): (1) impedit l'allargament de la cadena polipeptídica després de l'inici de la traducció, (2) bloquejant l'extrem 3' del mRNA dificultant l'inici de la traducció, o (3) desestabilitzant la molècula de mRNA a través de la desadenilació de la cua poli-A (Doench i Sharp 2004). A més d'aquest rol inhibidor de la traducció, també s'ha descrit un rol activador (Vasudevan et al. 2007).

Figura 2: Transcripció, processament, maduració i mecanismes d'acció dels miRNAs (Adaptat de Inui et al. 2010).

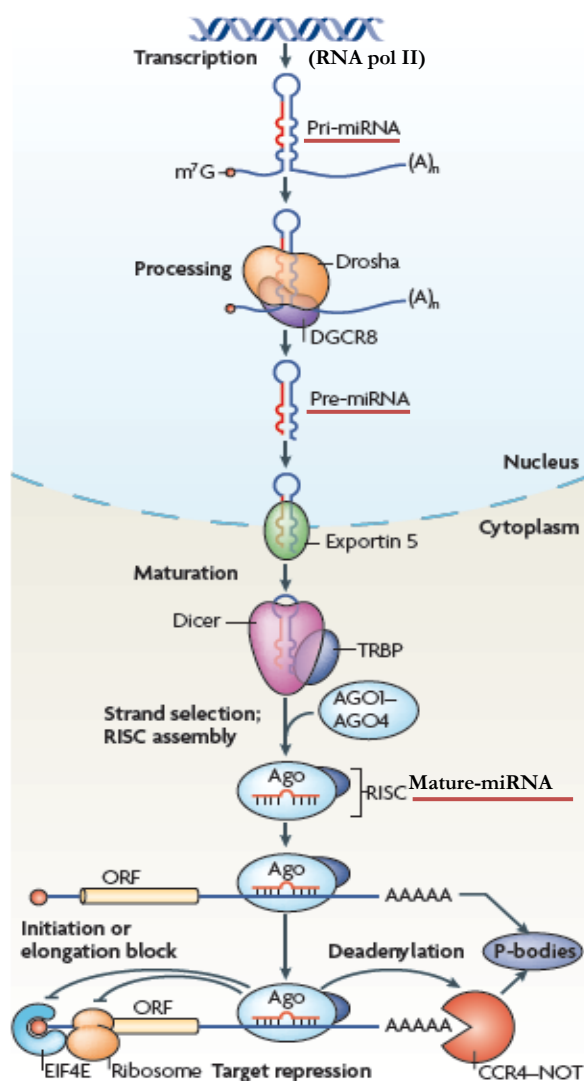
En humans, s'han identificat fins a 940 tipus de molècules de miRNAs (Sanger miRBase <http://www.mirbase.org/>; Universitat de Manchester 2010) i s'estima que poden participar en la regulació de més d'un 30% dels gens codificants (Filipowicz et al. 2008).

En aquest sentit, els miRNAs s'han relacionat amb un elevat nombre de funcions: regulació del cicle cel·lular (Chan et al. 2005; Lu et al. 2005), desenvolupament embrionari (Boerke et al. 2007) i regulació de la gametogènesi (Lian et al. 2009). D'altra banda, la presència d'un perfil alterat de miRNAs s'ha vinculat a l'aparició de processos tumorals (Lu et al. 2005) o a infertilitat masculina (He et al. 2009).

1.3. miRNAs i fertilitat

Estudis realitzats amb models murins, revelen que durant el desenvolupament de les cèl·lules germinals, alguns miRNAs es troben altament expressats en les cèl·lules germinals primordials i en espermatogonis, a la vegada que existeix una expressió diferencial de diversos miRNAs entre teixit testicular de ratolins pre-púbere i adults (Hayashi et al. 2008). Tot plegat suggereix un paper crucial dels miRNAs en la regulació de l'espermatogènesi. També s'ha demostrat que diversos gens involucrats en l'espermatogènesi murina, són dianes dels miRNAs que es troben diferencialment expressats (Yan et al. 2007).

D'altra banda, s'han identificat perfils alterats d'expressió de miRNAs en diversos casos d'infertilitat idiopàtica (Lian et al. 2009; McCallie et al. 2010) posant de manifest el paper fonamental d'aquestes molècules en la regulació de la fertilitat. Lian i col·laboradors (2009) descriuen que pacients amb azoospermia no obstructiva, tenen alterada l'expressió dels miRNAs en línia germinal. Per altra banda, McCallie i col·laboradors (2010) descriuen que blastocists morfològicament transferibles obtinguts de parelles amb ovaris poliquístics i infertilitat per factor



masculí, mostren una disminució significativa en l'expressió de miRNAs en comparació amb els blastocists de donants fèrtils.

1.4. El transcriptoma de l'espermatozoide humà

L'espermatozoide és una cèl·lula haploide molt especialitzada en el transport del DNA patern, en el reconeixement específic per l'oòcit, en la penetració de les cobertes oocitàries i en l'activació de l'oòcit (Grootegoed et al. 2000).

Està descrit que el transcriptoma de l'espermatozoide humà conté més de 5.000 mRNAs (Boerke et al. 2007) i més de 68 miRNAs (Ostermeier et al. 2005), amb una quantitat mitjana de 20 a 70fg per espermatozoide (Pessot et al. 1989; Dadoune 2009).

S'ha demostrat que alguns d'aquests transcrits són necessaris pel desenvolupament del zigot i de l'embrió (Wykes et al. 1997; Kramer i Krawetz 1997; Miller 1997; Krawetz 2005; Lalancette et al. 2008), tot indicant que la preservació dels diferents tipus d'RNA en l'espermatozoide madur no seria el resultat d'un procés estocàstic (Krawetz 2005).

2. OBJECTIUS

Aquest treball de recerca s'emmarca en el projecte titulat: **miRNAs en fertilitat humana**. El projecte que va començar l'octubre de 2009, està enfocat a determinar si els patrons de miRNAs presents en espermatozoides d'individus amb fertilitat provada són diferents als patrons de miRNAs en espermatozoides d'individus amb infertilitat idiopàtica.

L'objectiu principal d'aquest treball de recerca és el desenvolupament de la primera fase del projecte: optimitzar un mètode que ens permeti aïllar i purificar el transcriptoma complet de l'espermatozoide humà.

Per aconseguir-ho, es van plantejar els següents objectius concrets:

1. Seleccionar una metodologia per eliminar la presència de cèl·lules somàtiques de l'ejaculat i aïllar la fracció espermàtica tot minimitzant la pèrdua d'espermatozoides durant el procés.
2. Optimitzar la metodologia d'extracció del total d'RNAs en espermatozoides humans mitjançant la utilització del mètode TRIzol®.
3. Determinar la quantitat, puresa i integritat de l'RNA obtingut.
4. Establir la presència de miRNAs entre el conjunt de transcrits obtinguts.

3. MATERIAL I MÈTODES

3.1. Recollida de mostres

Es van obtenir mostres d'ejaculat a partir de donants voluntaris. Les mostres van ser emmagatzemades durant un temps màxim de 24 hores a 4°C fins al seu tractament.

3.2. Aïllament de la fracció espermàtica

Es van testar dues metodologies:

A. *Swim-up* (SWU): Aquest mètode aprofita la capacitat natatòria dels espermatozoides per separar-los de la resta de cèl·lules presents en el semen, com limfòcits o cèl·lules de descamació de l'epiteli seminal. Es va adaptar el protocol comercial descrit per PureSperm Wash (Nidacon, USA):

1. Incubar la mostra i el PureSperm Wash a 37°C durant 30 minuts.
2. Afegir 0.5ml de PureSperm Wash en un tub cònic de 10ml.
3. Transferir 0.25ml de mostra al fons del tub.
4. Incubar a 37°C i 5%CO₂ durant 60 minuts amb una inclinació de 45°. Els espermatozoides mòbils pujaran cap a la capa superior.
5. Recuperar 2/3 de la part superior.
6. Centrifugar a 500g durant 5 minuts per tal de recuperar la fracció espermàtica.

B. *Somatic cell lysis* (SCL): Aquest mètode consisteix en lisar les cèl·lules somàtiques presents en l'ejaculat mitjançant una barreja de detergents (SCLB) composta de 0.1% SDS (dodecilsulfat sòdic) i 0.5% Triton X-100 en H₂O miliQ. El SCL es va dur a terme segons el protocol adaptat de Goodrich i col·laboradors (Goodrich et.al. 2007):

1. Traspasar l'ejaculat en un tub cònic de 15ml.
2. Afegir 1ml de solució SCLB, i ressuspendre l'ejaculat.
3. Ajustar el volum a 13ml amb SCLB.
4. Homogeneïtzar la solució amb un vòrtex i incubar-la en gel picat durant 30 minuts.
5. Transcorreguts 20 minuts realitzar un recompte cel·lular mitjançant una cambra de Neubauer. Si el nombre de cèl·lules somàtiques és inferior a 1 per cada 10000 espermatozoides, continuar amb el pas 6. Si és superior, centrifugar la mostra a 200g durant 15 minuts, i repetir el pas 5 fins assolir la ràtio 1:10000. Donat que una cèl·lula somàtica conté 100 vegades més RNA que un espermatozoide, això implica acceptar la presència d'un màxim de l'1% de l'RNA total recuperat d'origen somàtic.
6. Centrifugar la mostra a 200g durant 15 minuts per tal de recuperar la fracció espermàtica.

Per tal de poder triar el mètode d'aïllament més efectiu, es va comparar el número d'espermatozoides abans i després dels dos tractaments (SWU i SCL).

3.3. Extracció i purificació de l'RNA total

L'extracció d'RNA total es va efectuar mitjançant el mètode TRIzol® (Invitrogen™, USA). L'optimització de l'extracció es va fer mitjançant diverses modificacions del protocol de Chomczynski i Sacchi (1987):

1. Homogeneïtzar i lisar els espermatozoides mitjançant l'addició d'1ml de reactiu TRIzol® per cada $5-10 \times 10^6$ d'espermatozoides.
2. Afegir 0.2ml de cloroform per cada 1ml de TRIzol®, homogeneïtzar i centrifugar les mostres durant 15 minuts a 12,000g i 4°C. Aquest pas permet separar la mostra en tres fases: la fase inferior o orgànica que conté majoritàriament lípids i proteïnes, la interfase que conté el DNA i la fase superior o aquosa on es troba l'RNA.
3. Recuperar la fase superior i repetir una segona vegada el pas 2.
4. Transferir la fase recuperada en un eppendorf i afegir 0.5ml d'isopropanol fred, per cada 1ml de TRIzol® utilitzat inicialment. Incubar a -20°C durant 4/5 hores per tal de precipitar l'RNA.
5. Centrifugar la mostra a 12,000g durant 10 minuts.
6. Eliminar el sobrenedant i afegir 1ml d'etanol 75% (fred), per cada 1ml de TRIzol® utilitzat. Centrifugar les mostres a 12,000g durant 4 minuts a 4°C.
7. Repetir dues vegades més el pas 6.
8. Assecar el pellet durant 30 minuts a temperatura ambient, i dissoldre'l en 10µl d'H₂O DEPC (Sigma-Aldrich).
9. Afegir 0.5µl de rDNaseI (Ambion) i 1µl de 10X Buffer en la solució d'RNA.
10. Incubar durant 20 minuts a 37°C.
11. Inactivar la rDNaseI, mitjançant la repetició dels passos 2-8 del protocol.
12. Emmagatzemar les mostres a -80°C.

3.4. Anàlisi de la puresa i concentració

Per tal de determinar la concentració d'RNA obtingut i la seva puresa, les mostres van ser analitzades amb un espectrofotòmetre UV/visible d'alta sensibilitat (Nanodrop 1000; Thermo Scientific Inc., USA). Aquest permet avaluar concentracions i pureses tant d'àcids nucleics com de proteïnes amb uns límits de detecció per l'RNA compresos entre 2ng/µl i 3,000ng/µl.

La puresa es calcula a partir dels espectres d'absorció dels productes de la mostra a les longituds d'ona de 260nm i 280nm. Si la ràtio 260/280 és propera a 2.0, es considera que l'RNA presenta una puresa òptima (Chomczynski i Sacchi. 2006; Fleige i Pfaffl. 2006).

3.5. Valoració de la presència de miRNAs

A partir dels resultats del Nanodrop, les concentracions obtingudes es van ajustar a 1-100ng/ μ l, per tal de poder ser analitzades per nanoelectroforesi amb la plataforma Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Germany). Aquesta tecnologia es basa en la utilització d'uns xips que contenen una xarxa de canals gravats en un polímer microfluídic i que permeten l'anàlisi de fins a 11 mostres simultàniament. Breument, les mostres es marquen amb fluorescència i s'introdueixen en els pous corresponents. Mitjançant l'aplicació de camps elèctrics, les mostres passen pels diversos canals on un detector integra la informació de la fluorescència emesa pels diversos fragments d'RNA i dona un perfil de la composició de la mostra.

Per tal de valorar la presència de miRNAs, es va fer servir un tipus de xip anomenat *Small RNA*. Aquest permet elaborar un perfil electroforètic amb tots els fragments d'RNA de mides compreses entre els 4 i els 150nt (rang que inclou els miRNAs). Per tant, permet determinar la presència i la proporció relativa dels miRNAs presents en les fraccions d'RNA aïllades.

3.6. Confirmació de l'absència d'RNA d'origen somàtic i de qualitat de les extraccions

Es va utilitzar el xip *Nano RNA*, amb la plataforma Bioanalyzer 2100. Aquest presenta un rang de detecció de molècules més ampli (de 25 a 6,000nt) que ens permet confirmar l'absència d'RNA d'origen somàtic i determinar la integritat de l'RNA obtingut.

Els espermatozoides són transcripcionalment inactius i per tant no tenen rRNA (Ostermeier et al. 2002; Ostermeier et al. 2004; Grunewald et al. 2005). La manca de bandes electroforètiques corresponents a l'rRNA en les mostres d'RNA obtingudes indiquen l'absència d'RNA d'origen somàtic i per tant permeten confirmar l'aïllament de la fracció espermàtica. Aquest xip també ofereix la possibilitat de determinar la integritat de l'RNA obtingut mitjançant l'índex RIN que es calcula a partir de diversos indicadors entre els que s'inclou l'rRNA. Per calcular l'índex RIN es va utilitzar com a control, RNA extret de cèl·lules somàtiques (cèl·lules Jurkatt). Els valors pròxims a 10 indiquen una integritat òptima. L'obtenció de valors de RIN d'entre 9-10 en les mostres d'RNA provinents de cèl·lules Jurkatt, ens permetrà extrapolar una integritat òptima en les mostres d'RNA provinents dels espermatozoides. Per contra valors RIN inferiors a 9 s'interpretaran com extraccions d'RNA de mala qualitat (degradació de l'RNA obtingut).

4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

4.1. Selecció del mètode d'aïllament de la fracció espermàtica

Per determinar quin era el millor mètode d'aïllament de la fracció espermàtica, es van efectuar recomptes abans i després d'aplicar cadascun dels protocols esmentats.

Ambdós mètodes (SWU i SCL) són eficaços per tal d'aïllar correctament els espermatozoides. S'ha de tenir en compte que es basen en procediments totalment diferents. El SWU, recupera majoritàriament espermatozoides mòbils, en canvi el SCL permet recuperar tant els mòbils com els immòbils.

Tal com reflecteix la taula 1, hi ha clares diferències en el percentatge de pèrdua. El mètode del SWU, de mitjana, perd un 72.43% dels espermatozoides, en canvi, el mètode SCL, només perd un 33.4%

Taula 1: Quantitat d'espermatozoides abans i després de l'aïllament de la fracció espermàtica a partir dels dos mètodes aplicats.

Tècniques		Individus		Mitjana
		689Z	700Z	%±DE
SWU	Recompte inicial (n)	22.5*10 ⁶	35.2*10 ⁶	28.8*10 ⁶ ±8.9*10 ⁶
	Recompte post SWU (n)	5*10 ⁶	11.6*10 ⁶	8.3*10 ⁶ ±4.6*10 ⁶
	Pèrdua (%)	77.8	67.05	72.43±0.076
SCL	Recompte inicial (n)	22.5*10 ⁶	35.2*10 ⁶	28.8*10 ⁶ ±8.9*10 ⁶
	Recompte post SCL (n)	17.2*10 ⁶	20*10 ⁶	18.6*10 ⁶ ±1.9*10 ⁶
	Pèrdua (%)	23.56	43.18	33.4±0.138

Tenint en compte que s'ha demostrat cap de les dues tècniques modifiquen els patrons de RNA total ni el patró miRNA espermàtic (Miller 1997; Goodrich et al. 2007) podem concloure que, el millor mètode d'aïllament de la fracció espermàtica per els nostres estudis és el *Somatic Cell Lysis*, ja que és el que permet minimitzar la pèrdua d'espermatozoides.

4.2. Extracció i purificació de l'RNA

Es va extreure i purificar RNA total seguint el protocol descrit a l'apartat de material i mètodes a partir de mostres de semen de 6 individus. El nombre d'espermatozoides utilitzats va oscil·lar entre 3.12*10⁶ i 22.36*10⁶, i es van obtenir concentracions d'RNA entre 26.8 i 43.5ng/μl (Taula 2).

Taula 2: Resultats de les extraccions d'RNA en sis individus.

Mostra	Número d'espermatozoides (n)	Concentració RNA (ng/ μ l)	RNA total (ng)	RNA/espermatozoide (ng)	Puresa
705Z	19.24*10 ⁶	26.8	268	1.4*10 ⁻⁵	1.71
706Z	22.36*10 ⁶	35	350	1.6*10 ⁻⁵	1.62
707Z	13.5*10 ⁶	41.4	414	3.1*10 ⁻⁵	1.65
708Z	7.8*10 ⁶	41.5	415	5.3*10 ⁻⁵	1.6
709Z	17.1*10 ⁶	42.5	425	2.5*10 ⁻⁵	1.63
710Z	3.12*10 ⁶	43.5	435	13.9*10 ⁻⁵	1.61
mitjana\pmDE	13.8*10⁶\pm7.2*10⁶	38.45\pm6.44	384\pm64.4	4.6*10⁻⁵\pm4.7*10⁻⁵	1.63\pm0.04
Jurkatt 1	1.03*10 ⁶	419	4190	4.16*10 ⁻³	1.93
Jurkatt 2	25*10 ⁶	773	7730	1.54*10 ⁻³	1.73
Jurkatt 3	1*10 ⁶	433.2	4332	4.33*10 ⁻³	1.99
mitjana\pmDE	9.01*10⁶\pm13.8*10⁶	541\pm200.41	5410\pm2004.1	3.3*10⁻³\pm1.5*10⁻³	1.83\pm0.14

4.2.1. Quantitat d'RNA per espermatozoide

Els nostres resultats mostren que el mètode TRIzol obté una mitjana de $4.6 \cdot 10^{-5}$ ng d'RNA (equivalent a 46fg) per cada espermatozoide, ajustant-se al que s'ha descrit a la bibliografia (20-70fg; Pessot et al. 1989; Dadoune 2009). El control positiu d'RNA procedent de cèl·lules Jurkatt va confirmar que la quantitat d'RNA en aquest tipus cel·lular és 100 vegades superior a la quantitat descrita en espermatozoides (Taula 2), coincidint també amb el que s'ha descrit a la bibliografia (Linschooten et al. 2009).

4.2.2. Anàlisi de la puresa

El grau de puresa mitjà obtingut a partir de les extraccions d'RNA és de 1.63 (taula 2). Segons el protocol de Chomczynski i Sacchi (1987), un grau òptim de la puresa estaria pròxim a 2. Tot i així, s'ha descrit que les mostres amb poca quantitat d'RNA, mostren pureses inferiors degut a una major proporció de TRIzol (Krebs et al. 2009). Aquest desplaça la corba d'absorbància cap a 270nm, fet que provoca una disminució de la ràtio 260/280. Per altra banda, l'elevat grau d'empaquetament dels àcids nucleics en els espermatozoides requereix una elevada presència de protamines (Oliva 2006). Aquest fet podria dificultar la recuperació de l'RNA i influir negativament en les pureses obtingudes.

Així doncs, a partir de totes les dades obtingudes en relació al mètode d'extracció i purificació de l'RNA, podem concloure que el mètode d'extracció utilitzat proporciona pureses acceptables (1.63) i la concentració final s'ajusta a la descrita en la bibliografia (46fg/espermatozoide).

4.3. Valoració de la presència de miRNAs

Totes les mostres analitzades van presentar miRNA. La concentració d'RNAs petits va oscil·lar entre 10.2 a 2832.2pg/ μ l (Taula 3).

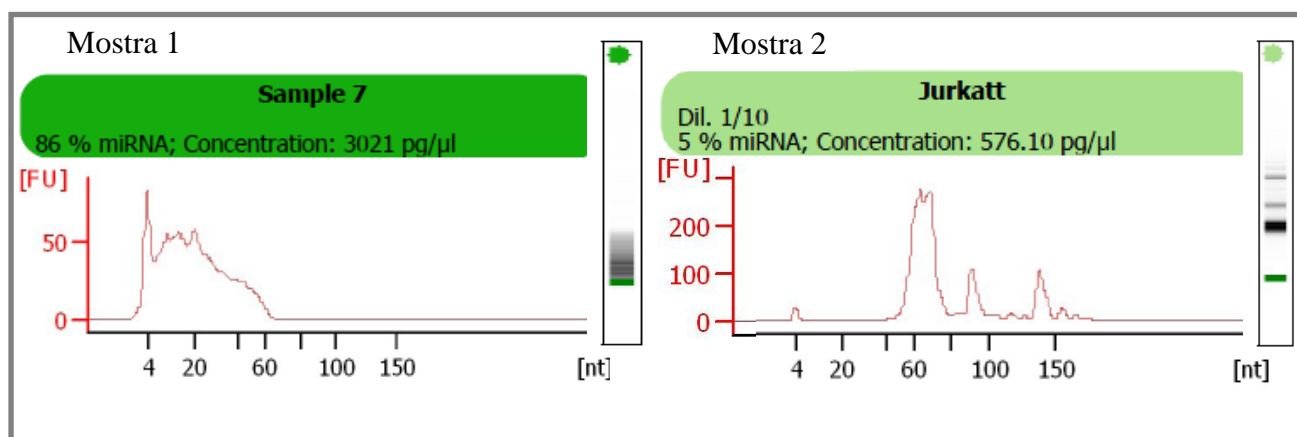
En les mostres provinents d'espermatozoides, entre un 23-82% de la fracció total d'RNAs petits es va correspondre a miRNAs. Els xips d'*Small RNAs* van mostrar aquesta fracció com a un pic electroforètic al voltant de la regió dels 22nt (Gràfic 1; mostra 1).

En les cèl·lules Jurkatt, es van obtenir concentracions d'RNAs petits que van oscil·lar entre 576.1 i 1020.8pg/ μ l, amb unes proporcions de miRNAs que van oscil·lar entre el 5-8%. En aquestes mostres, a més es van observar altres fraccions de transcrits amb mides situades al voltant de 65nt, 90nt i 140nt que es correspondrien a tRNAs, pre-miRNAs i rRNAs 5S o 5.8S respectivament (Gràfic 1; mostra 2).

Taula 3: Resultats de l'anàlisi de les sis mostres amb els xips *Small RNA* i els *Nano RNA*.

Mostra	Quantitat utilitzada d'RNA ng/ μ l	miRNAs	rRNA	Concentració RNAs petits pg/ μ l	% miRNAs	RIN
705Z	53.6	si	no	4399	51	-
706Z	70	si	no	2832.2	42	-
707Z	82.8	si	no	10.2	82	-
708Z	83	si	no	59.2	26	-
709Z	85	si	no	34.8	23	-
710Z	87	si	no	69.4	30	-
mitjana\pmDE	76.9\pm12.8	-	-	1234.2\pm1910	42\pm22.1	-
Jurkatt 1	41.9	si	si	1020.8	8	9.2
Jurkatt 2	77.3	si	si	849.3	7	9.2
Jurkatt 3	52	si	si	576.1	5	9.4
mitjana\pmDE	64.5\pm17.9	-	-	815.4\pm224	7\pm1.5	9.3\pm0.1

Gràfic 1: Resultat del xip *Small RNA*. La mostra 1 correspon a RNA extret de cèl·lules Jurkatt, la mostra 2 d'espermatozoides. Els pics mostrats en FU corresponen a RNAs de diferents mides.



Per tant, aquest estudi ens indica que el mètode TRIzol permet extreure el transcriptoma de l'espermatozoide, incloent els RNAs petits dels quals gairebé la meitat (42%) són miRNAs.

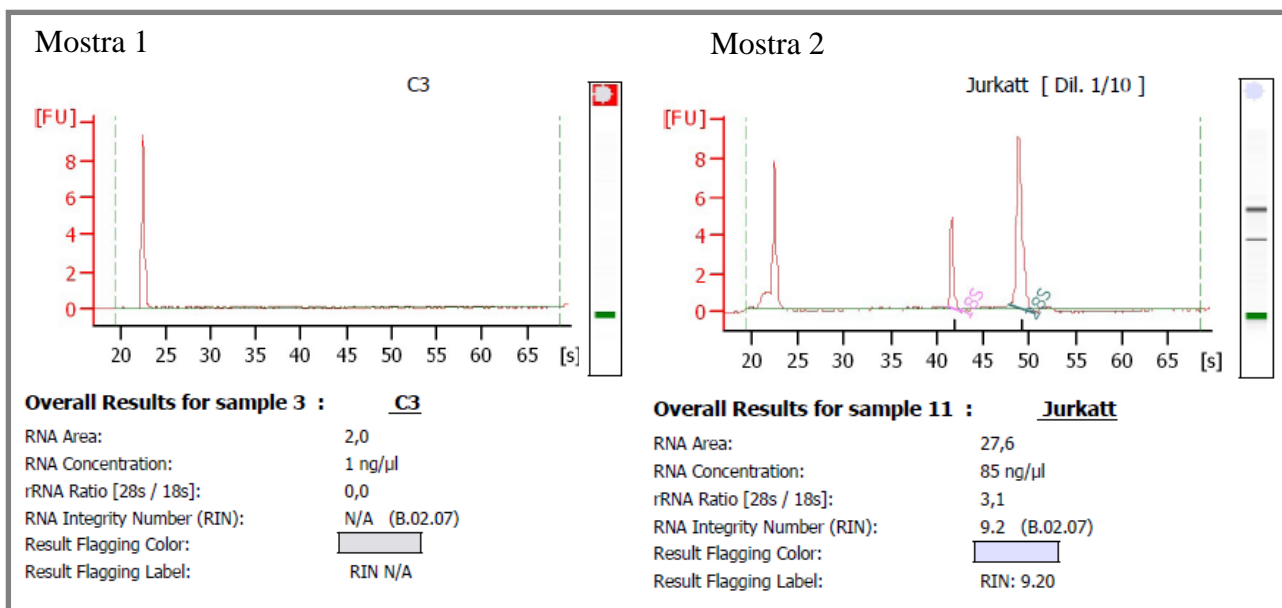
4.4. Confirmació de la qualitat de les extraccions i de l'absència d'RNA d'origen somàtic

Els resultats dels xips *Nano RNA* també es reflecteixen en la taula 3. Del total de mostres analitzades amb els dos xips, no hi ha cap mostra d'espermatozoides amb pics associats a rRNA (Veure gràfic 2, mostra 1). En canvi, quan ens fixem amb els gràfics obtinguts amb les cèl·lules Jurkatt (Gràfic 2, mostra 2), apareixen pics corresponents a les dues subunitats de l'rRNA (18S i 28S).

Per altra banda, tots els valors d'integritat (RIN) obtinguts a partir de les cèl·lules Jurkatt mostren índex propers a 10 (rang 9.2-9.4), els quals indiquen una integritat òptima de l'RNA obtingut.

Per tant, els xips *Nano RNA* han permès confirmar un bon aïllament de la fracció espermàtica, ja que en totes les mostres d'espermatozoides s'ha descartat la presència d'RNA d'origen somàtic. També han indicat que s'ha efectuat una bona extracció d'RNA sense fragmentar-lo, ja que les mostres control presenten una integritat d'RNA òptima que es pot extrapolar a les mostres d'espermatozoides (taula 3 i gràfic 2).

Gràfic 2: Resultat del xip *Nano RNA*. La mostra 1 és una mostra d'RNA d'espermatozoides sense els pics corresponents a l'rRNA (RIN N/A). La mostra 2 prové del control realitzat amb cèl·lules Jurkatt on es veuen les 2 bandes de rRNA (18S i 28S) amb un RIN de 9.20.



5. PERSPECTIVES DE FUTUR

Tal com s'ha comentat anteriorment, aquest treball s'emmarca dins un projecte més ampli destinat a avaluar si existeixen patrons diferencials d'expressió de miRNAs en pacients fèrtils i en individus amb infertilitat idiopàtica. En aquest sentit, les perspectives de futur plantejades a partir d'aquests resultats inclouen: L'ampliació de la quantitat mostral per fer més robustes les conclusions d'aquest treball, el desenvolupament d'una RT-PCR amb primers de protamina 1 per comprovar l'efectivitat del tractament amb DNasa i la utilització de les extraccions per fer un array d'expressió dels miRNAs

Els resultats obtinguts es contrastaran amb les característiques del seminograma d'aquests individus per poder valorar la seva significança en relació amb la etiologia de la infertilitat. Finalment també es vol identificar els gens diana predits per els miRNAs diferencialment expressats en individus fèrtils i infèrtils i valorar la possible implicació en l'espermatogènesi masculina.

6. CONCLUSIONS

1. El millor mètode d'aïllament de la fracció espermàtica per els nostres estudis és el *Somatic Cell Lysis*, ja que és el que permet minimitzar la pèrdua d'espermatozoides.
2. S'ha optimitzat un mètode d'extracció d'RNA total a partir d'espermatozoides en el que s'obtenen pureses acceptables i una integritat òptima.
3. La metodologia utilitzada ha permès descartar la presència d'RNA d'origen somàtic i confirmar la presència de miRNAs en el conjunt de transcrits obtinguts.

III. BIBLIOGRAFIA

- Ambros, V. (2001) microRNAs: tiny regulators with great potential. *Cell*, **107**, 823-826.
- Boerke, A., Dieleman, S.J. and Gadella, B.M. (2007) A possible role for sperm RNA in early embryo development. *Theriogenology*, **68 Suppl 1**, S147-55.
- Boyd, S.D. (2008) Everything you wanted to know about small RNA but were afraid to ask. *Lab Invest*, **88**, 569-78.
- Buckingham, S. (2003) The Major World of microRNAs. *Nature*, Symposium Understanding the RNAissance.
- Chan, J.A., Krichevsky, A.M. and Kosik, K.S. (2005) MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res.*, **65**, 6029-6033.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, **162**, 156-159.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. (2006) The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat. Protoc.*, **1**, 581-585.
- Dadoune, J.P. (2009) Spermatozoal RNAs: what about their functions? *Microsc Res Tech*, **72**, 536-51.
- Doench, J.G. and Sharp, P.A. (2004) Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev.*, **18**, 504-511.
- Eddy, S.R. (2001) Non-coding RNA genes and the modern RNA world. *Nat. Rev. Genet.*, **2**, 919-929.
- Filipowicz, W., Bhattacharyya, S.N. and Sonenberg, N. (2008) Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat. Rev. Genet.*, **9**, 102-114.
- Fleige, S. and Pfaffl, M.W. (2006) RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Mol. Aspects Med.*, **27**, 126-139.
- Goodrich, R., Johnson, G. and Krawetz, S.A. (2007) The preparation of human spermatozoal RNA for clinical analysis. *Arch. Androl.*, **53**, 161-167.
- Grootegoed, J.A., Siep, M. and Baarends, W.M. (2000) Molecular and cellular mechanisms in spermatogenesis. *Baillieres Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, **14**, 331-343.
- Grunewald, S., Paasch, U., Glander, H. and Anderegg, U. (2005) Mature human spermatozoa do not transcribe novel RNA. *Andrologia*, **37**, 69-71.
- Hayashi, K., Chuva de Sousa Lopes, S.M., Kaneda, M., Tang, F., Hajkova, P., Lao, K., O'Carroll, D., Das, P.P., Tarakhovskiy, A., Miska, E.A., et al (2008) MicroRNA biogenesis is required for mouse primordial germ cell development and spermatogenesis. *PLoS One*, **3**, e1738.
- He, Z., Kokkinaki, M., Pant, D., Gallicano, G.I. and Dym, M. (2009) Small RNA molecules in the regulation of spermatogenesis. *Reproduction*, **137**, 901-11.
- Ibberson, D., Benes, V., Muckenthaler, M.U. and Castoldi, M. (2009) RNA degradation compromises the reliability of microRNA expression profiling. *BMC Biotechnol.*, **9**, 102.
- Inui, M., Martello, G. and Piccolo, S. (2010) MicroRNA control of signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **11**, 252-263.
- Kramer, J.A. and Krawetz, S.A. (1997) RNA in spermatozoa: implications for the alternative haploid genome. *Mol. Hum. Reprod.*, **3**, 473-478.

- Krawetz, S.A. (2005) Paternal contribution: new insights and future challenges. *Nat. Rev. Genet.*, **6**, 633-642.
- Lalancette, C., Miller, D., Li, Y. and Krawetz, S.A. (2008) Paternal contributions: new functional insights for spermatozoal RNA. *J. Cell. Biochem.*, **104**, 1570-1579.
- Lewin, B. (2008) *Genes IX*. Ed. Jones and Barlett Publishers, Inc., United States of America, pps.892.
- Lian, J., Zhang, X., Tian, H., Liang, N., Wang, Y., Liang, C., Li, X. and Sun, F. (2009) Altered microRNA expression in patients with non-obstructive azoospermia. *Reprod Biol Endocrinol*, **7**, 13.
- Linschooten, J.O., Van Schooten, F.J., Baumgartner, A., Cemeli, E., Van Delft, J., Anderson, D. and Godschalk, R.W. (2009) Use of spermatozoal mRNA profiles to study gene-environment interactions in human germ cells. *Mutat. Res.*, **667**, 70-76.
- Lu, J., Getz, G., Miska, E.A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., Sweet-Cordero, A., Ebert, B.L., Mak, R.H., Ferrando, A.A., et al (2005) MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*, **435**, 834-838.
- McCallie, B., Schoolcraft, W.B. and Katz-Jaffe, M.G. (2010) Aberration of blastocyst microRNA expression is associated with human infertility. *Fertil Steril*, **93**, 2374-82.
- Miller, D. (1997) RNA in the ejaculate spermatozoon: a window into molecular events in spermatogenesis and a record of the unusual requirements of haploid gene expression and post-meiotic equilibration. *Mol. Hum. Reprod.*, **3**, 669-676.
- Ostermeier, G.C., Dix, D.J., Miller, D., Khatri, P. and Krawetz, S.A. (2002) Spermatozoal RNA profiles of normal fertile men. *Lancet*, **360**, 772-777.
- Ostermeier, G.C., Goodrich, R.J., Moldenhauer, J.S., Diamond, M.P. and Krawetz, S.A. (2005) A suite of novel human spermatozoal RNAs. *J. Androl.*, **26**, 70-74.
- Ostermeier, G.C., Miller, D., Huntriss, J.D., Diamond, M.P. and Krawetz, S.A. (2004) Reproductive biology: delivering spermatozoan RNA to the oocyte. *Nature*, **429**, 154.
- Pessot, C.A., Brito, M., Figueroa, J., Concha, I.I., Yanez, A. and Burzio, L.O. (1989) Presence of RNA in the sperm nucleus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **158**, 272-278.
- University of Manchester (2010) miRBase. Base de dades online: <http://www.mirbase.org/>
- Vasudevan, S., Tong, Y. and Steitz, J.A. (2007) Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science*, **318**, 1931-1934.
- Wykes, S.M., Visscher, D.W. and Krawetz, S.A. (1997) Haploid transcripts persist in mature human spermatozoa. *Mol. Hum. Reprod.*, **3**, 15-19.
- Yan, N., Lu, Y., Sun, H., Tao, D., Zhang, S., Liu, W. and Ma, Y. (2007) A microarray for microRNA profiling in mouse testis tissues. *Reproduction*, **134**, 73-79.

IV. AGRAÏMENTS

L'última pàgina del treball; els agraiments. Sé que moltes persones és el primer que es llegiran, per veure si es troben entre els afortunats. Doncs aquí vénen!

Per començar agraeixo sincerament el tracte rebut, les correccions del treball, la bona voluntat i les hores dedicades dels meus directors: Dra. Ester Anton i Dr. Joan Blanco.

Agraeixo el treball a la meva família: Al meu pare, a la meva mare, als meus germans i a la meva família en general. Ells sempre s'interessen amb el què treballo, encara que els hi costi 1 hora d'explicació.

També voldria dedicar-lo a tota la Unitat de Biologia Cel·lular: Francesca Vidal, Montse Ponsà, Josep Santaló, Elena Ibáñez, Lleonard Barrios, Carme Nogués, Anna Genescà, Laura Tusell, Marta Martín, Marta Farré, Zaida Sarrate, Judit Pampalona, Marc Puigcerver, David Soler, Jonatan Lucas, Silvia Gasulla, Marta Pladevall, Sheyla González, Mariona Terrades, Laia Hernández, Lydia Garcia, Anna Godo, Anna Mallol, et.al. (per si hem deixó algú).

Més concretament, i amb el desig de que seguir sent companys de despatx, dedico el treball a la quasi doctora Assumpta Duran (ja et queda molt poc), a la Nerea Gaztelumendi i al Dani.

Amb moltes ganes i il·lusió de que surtin en aquestes pàgines, dedico el treball a les persones més properes, i que han estat dia a dia al meu costat. Sempre m'han donat energies per seguir continuant. A les persones més destacades d'aquest curs: Al Daniel Domínguez (quina sort, tu surts 2 vegades!), a la Tània Patiño (no sé si s'ho mereix, jejeje), a l'Òscar Molina (company i amic del grup d'investigació), a la Irene Miguel (sempre seràs la molecular de la Unitat), al Nuno Costa (tu si que ets un bon amic), al Sergi Novo (a veure quan tornem a fer una altra excursió), a la Cristina Frias ("esto no se aguanta"), a la Purificación Feijoo (una gran amiga), i espero no deixar-me a ningú!

En resum, salutacions i gràcies a tots els que heu fet possible aquest treball.