

ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE CUATRO miRNAs EN INDIVIDUOS FÉRTILES E INFÉRTILES: IMPLICACIONES REPRODUCTIVAS

UAB

Universitat Autònoma de Barcelona

albert.salas@uab.cat
ester.anton@uab.cat

Albert SALAS-HUETOS, Joan BLANCO, Francesca VIDAL y Ester ANTON

Unitat de Biologia Cel·lular (Facultat de Biociències). Universitat Autònoma de Barcelona. 08193 Bellaterra.

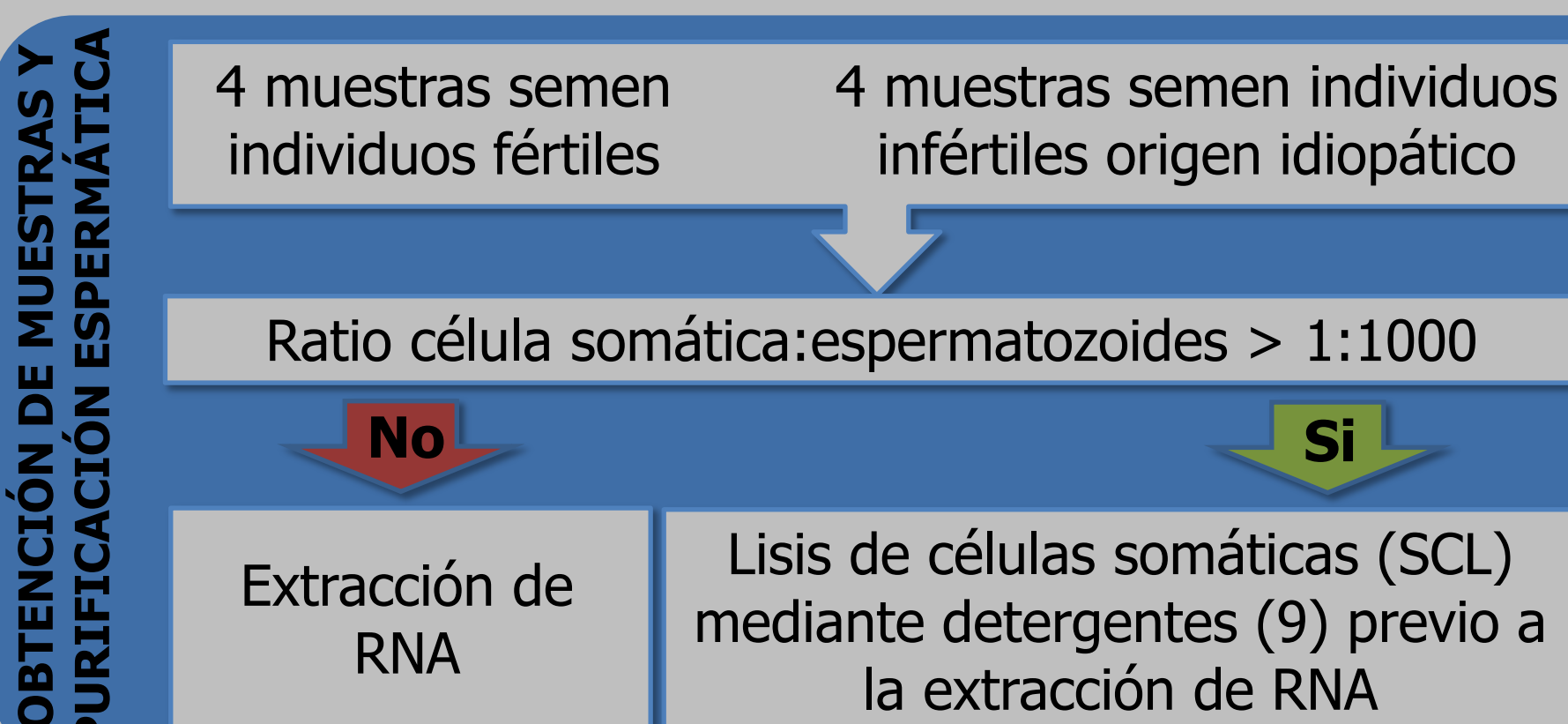
Introducción

Los miRNAs son moléculas de 22-24nt (1, 2) implicadas en la regulación de la expresión génica de numerosos procesos biológicos (3-7). Se han identificado perfiles alterados de expresión de miRNAs en varios casos de infertilidad masculina (6, 8) poniendo de manifiesto el papel fundamental de estas moléculas en la regulación de la fertilidad.

Objetivo

Caracterizar los patrones de expresión de hsa-miR-23a, hsa-miR-744, hsa-let-7f y hsa-miR-1 en RNA espermático procedente de individuos fértiles e infértiles y relacionar las posibles diferencias de expresión con la presencia del fenotipo infértil.

Material y métodos



Resultados

Se obtuvo una fracción espermática purificada (figura 1) con una pérdida promedio de espermatozoides del 28.44% (rango 2.62%-48.65%).

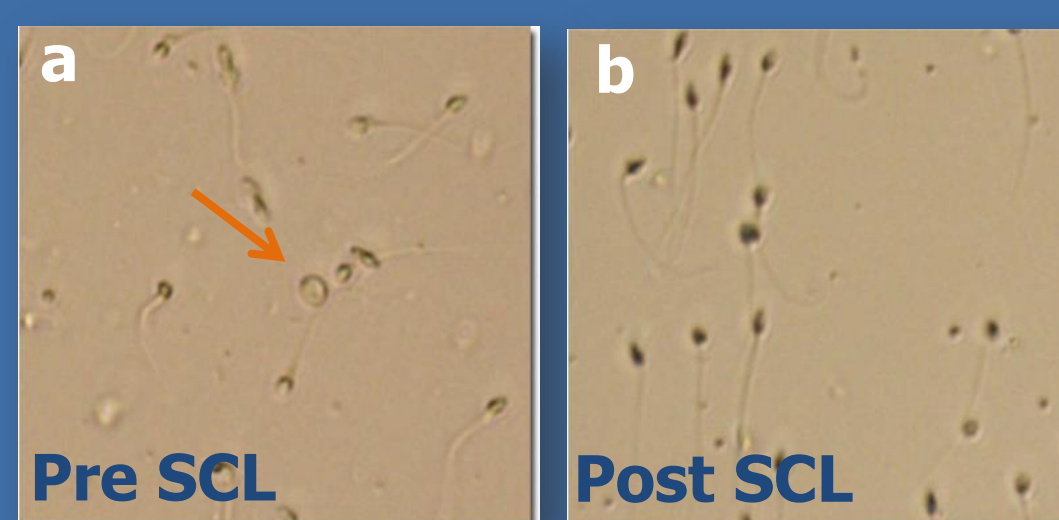


Figura 1: Fracción espermática antes (a) y después (b) del tratamiento con el método SCL. La flecha indica una célula somática.

- EXTRACCIÓN RNA**
- Extracción de RNA espermático mediante el método *TRIzol* (10) seguido de un tratamiento con DNasa I.
 - Determinación de la calidad y cantidad extraída mediante espectrofotometría (Nanodrop-2000).
 - Confirmación de la ausencia de DNA mediante la realización de una RT-PCR seguida de una PCR con cebadores exón-exón para el gen de la Protamina-1 (PRM1). Esta estrategia permite la diferenciación por tamaño de los productos resultantes de la amplificación del RNA de los resultantes de la amplificación del DNA.

Se obtuvo una media de $2.53 \cdot 10^{-5}$ ng de RNA por espermatozoide y una pureza de 1.72 (tabla 1).

La PCR para PRM1 confirmó la ausencia de DNA somático en todas las muestras (figura 2).

Tabla 1: Cantidad de RNA por spz. (ng) y pureza de las muestras.

Figura 2: Electroforesis al (2% agarosa). Línea 2: DNA (422b). Línea 3-10: cDNAs (331b).



Muestras	RNA/spz. (ng)	Pureza
738z	$3.63 \cdot 10^{-5}$	1.71
759z	$2.65 \cdot 10^{-5}$	1.63
766z	$3.04 \cdot 10^{-5}$	1.77
774z	$4.07 \cdot 10^{-5}$	1.81
790z	$1.52 \cdot 10^{-5}$	1.67
791z	$1.88 \cdot 10^{-5}$	1.72
794z	$2.26 \cdot 10^{-5}$	1.75
795z	$1.19 \cdot 10^{-5}$	1.73

- Obtención de cDNA mediante el kit de RT-PCR *TaqMan MicroRNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems) de los miRNAs especificados en la tabla.

miRNAs	Gen normalizador
hsa-miR-23a	Mamm-U6
hsa-miR-744	
hsa-let-7f	
hsa-miR-1	

Tabla 2: miRNAs analizados y gen normalizador utilizado en el análisis.

- ANÁLISIS EXPRESIÓN miRNAs**
- Realización de la PCR a tiempo real con el *TaqMan Universal PCR Master MixII* (ABI) analizando 3 réplicas para cada muestra mediante la plataforma *7900HT Fast Real-Time PCR* (ABI).
 - Cuantificación de las diferencias de expresión mediante el cálculo del estadístico *Fold Change* a partir de la variable Ct normalizada (ΔCt). Las diferencias de expresión se consideraron significativas cuando el valor de ΔCt se situaba fuera del intervalo de confianza calculado a partir de la media ($\pm 1.96 \cdot DE$) de ΔCt en las muestras control.

Se detectó la presencia de tres de los cuatro miRNA analizados: let-7f, miR-23a y miR-744. Ninguna de las muestras mostró resultados de Ct para miR-1 compatibles con la presencia de esta molécula en espermatozoides.

miR-23a y miR-744 mostraron cantidades equivalentes entre muestras control y problema. Let-7f mostró una reducción significativa de la expresión en tres de los cuatro individuos problema (gráfico 1).

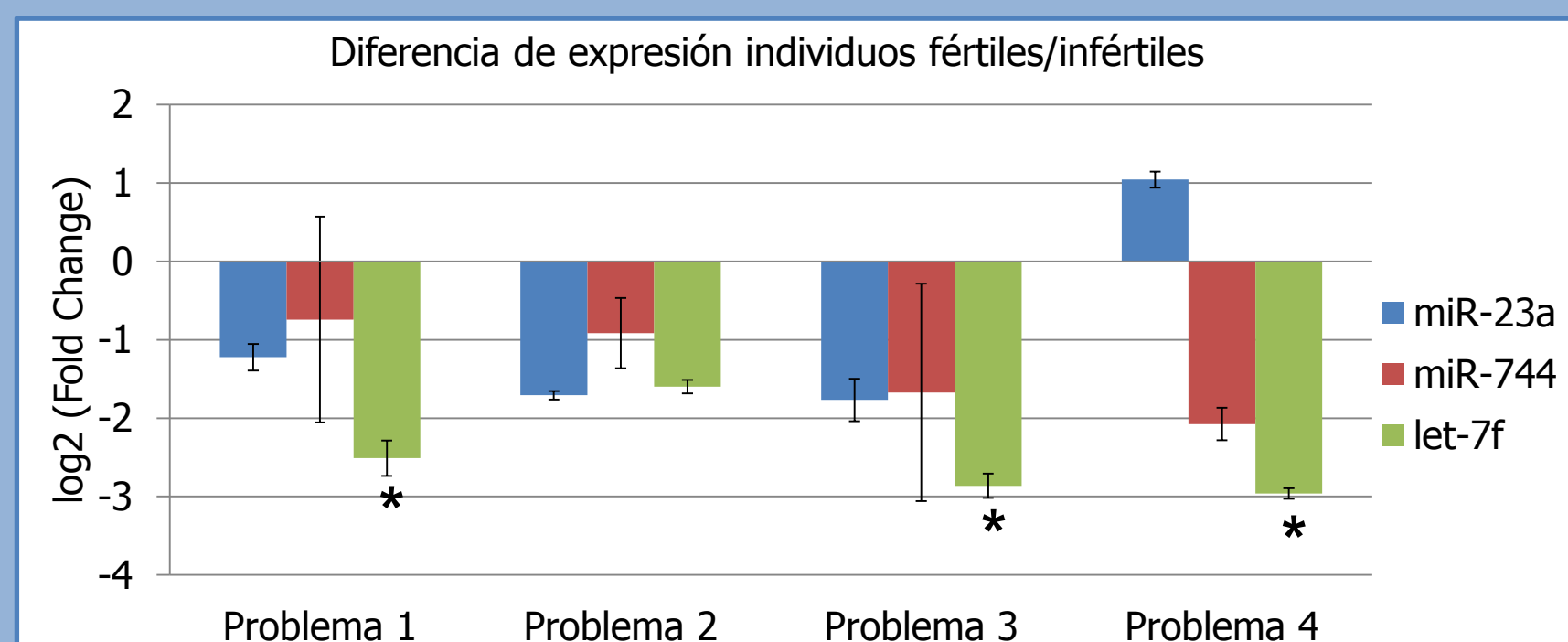


Gráfico 1: Diferencia de expresión de los diferentes miRNAs en los cuatro individuos problema respecto a la media de los cuatro individuos control. * = diferencia de expresión significativa

Conclusiones

Nuestros resultados sugieren la existencia de diferencias significativas de expresión para el miRNA hsa-let-7f entre individuos fértiles e infértiles. El análisis del transcriptoma, y en particular, la determinación de los perfiles de expresión de miRNAs ayudará a esclarecer las bases genéticas de la infertilidad masculina de origen idiopático.

Bibliografía: 1. Ambros (2001) *Cell* 107,823-826; 2. Boyd (2008) *Lab.Invest.* 88, 569-578; 3. Chan et al. (2005) *Cancer Res.* 65, 6029-6033; 4. Lu et al. (2005) *Nature* 435, 834-838; 5. Boerke et al. (2007) *Theriogenology* 68 Suppl. 1, S147-155; 6. Lian et al. (2009) *Reprod.Biol.Endocrinol.* 7, 13-23; 7. He et al. (2009) *Reproduction* 137, 901-911; 8. Mc.Callie et al. (2010) *Fertil.Steril.* 93, 2374-2382; 9. Goodrich et al. (2007) *Arch.Androl.* 53, 161-167; 10. Chomczynski y Sacchi (2006) *Nat.Protoc.* 1, 581-585.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido posible gracias a los proyectos FIS PS-09-00330 y 2009/SGR00282, al suministro de muestras del Instituto Valenciano de Infertilidad (Valencia) y la Unidad de Reproducción Asistida de la Clínica Teknon (Barcelona) y a la beca predoctoral PIF-UAB 456-01-1/E2010.