



RNA espermático, uma visão holística *Spermatic RNA, a holistic view*

L.P. Rauber

Instituto Federal Catarinense, Concórdia, SC, Brasil.
Correspondência: lucio.rauber@ifc-concordia.edu.br

Resumo

Durante a espermatogênese, as histonas são trocadas por protaminas, o que impede a transcrição de novos RNAs. A tradução também fica sob um controle rígido para garantir uma expressão temporal e espacial apropriada das proteínas. Entretanto, a origem, a quantidade, a qualidade e as funções dos RNAs espermáticos não são completamente compreendidas. A aplicação de bibliotecas de DNA complementares (cDNA) associadas à tecnologia de microarranjos aumenta o conhecimento sobre os valores normais de fertilidade do macho. Essas técnicas devem auxiliar como diagnóstico complementar de infertilidade ou como prognose sobre a capacidade de fertilização do macho.

Palavras-chave: espermatozoide, fertilidade, microarranjo, transcritos.

Abstract

During spermatogenesis, histone is replaced by protamine, avoiding the production of newly RNA. The translation also stays under a stringent control to ensure appropriate temporal and spatial protein expression. However, the origin, quantity and functions of RNA from sperm cells are not completely understood. The application of complementary DNA (cDNA) libraries associated with microarray technology in sperm cells is expanding the knowledge regarding normal values for fertility in the male. Such approaches may be helpful as complementary diagnostic tools for infertility or for the prognosis of male fertilization capacity.

Keywords: fertility, microarray, sperm cell, transcripts.

Introdução

O gameta masculino é uma célula altamente especializada, adaptada às suas funções de transporte e entrega do material genético paterno ao gameta feminino. Durante o desenvolvimento, o gameta passa por três fases distintas. Primeiro por uma fase proliferativa, segundo por uma fase de redução meiótica e, finalmente, por uma fase de diferenciação. Até iniciarem a fase de diferenciação, as proteínas nucleares (histonas) são as mesmas encontradas em células somáticas; em seguida, estas são trocadas gradualmente por protaminas (Johnson et al., 2011). Essa troca faz com que termine a produção de novos RNAs. Os espermatozoides do ejaculado contêm uma grande quantidade de transcritos repetidos que participam de diferentes funções celulares, desde o metabolismo basal até a capacitação espermática e a fertilização. O transcrito é o somatório de todos os RNAs produzidos por uma população específica de células, e seu estudo, normalmente utilizando técnicas como o microarranjo, examina esses RNAs em uma determinada condição.

Esta revisão bibliográfica aborda as particularidades do RNA contido em espermatozoides e como o conhecimento desse transcrito permite entender as possíveis funções dessas moléculas e relacioná-las com eventos específicos, como fertilização, e até mesmo com o desenvolvimento embrionário inicial.

Transcritos, proteínas e seus controles em espermatozoides

Transcrição

Observa-se uma alta síntese de RNA nas espermatogônias A (Fig. 1), com decréscimo gradual até se tornarem espermatogônias do tipo B e espermatócitos no início da prófase I (Söderström e Parvinen, 1976). Não se observa síntese de RNA nas fases de leptóteno, zigóteno e na fase inicial de paquíteno, entretanto um aumento súbito da transcrição ocorre na fase intermediária de paquíteno em espermatócitos primários, decrescendo gradativamente até o final desta fase. As células em diplóteno e na segunda divisão meiótica não sintetizam RNA. Uma baixa taxa de transcrição ocorre em espermatócitos secundários e na fase inicial de espermátide arredondada até a fase de formação do acrossoma na espermiogênese (Söderström e Parvinen, 1976). No final da espermiogênese, não é detectada síntese de RNA (Kierszenbaum e Tres, 1975; Söderström e Parvinen, 1976; Kleene, 2003), e espermatozoides ejaculados também não sintetizam novos RNAs (Grunewald et al., 2005).

A transcrição e a degradação de alguns mRNAs são reguladas individualmente durante a espermatogênese (Shih e Kleene, 1992). Já são conhecidos vários fatores que regulam a espermatogênese e a maturação espermática, como fatores de transcrição, proteínas que se ligam à região promotora da cromatina e proteínas ligantes de mRNA (Bettgowda e Wilkinson, 2010). Provavelmente, exista um programa específico de controle da transcrição e da tradução durante as fases de mitose, meiose e diferenciação do gameta (Eddy, 1999; Miller et al., 1999).

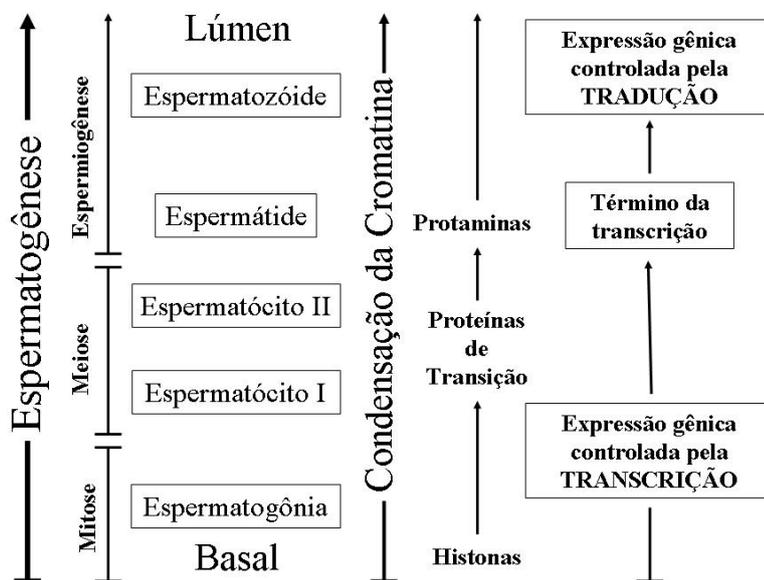


Figura 1. Controle da expressão gênica durante a espermatogênese (baseado em Steger, 2001).

Corpo cromatoide e corpúsculos residuais

A origem do corpo cromatoide é, provavelmente, nucleolar e mitocondrial, e ele é formado durante o estágio de paquíteno da primeira divisão meiótica; sua localização varia durante a espermatogênese até ser eliminado pelos corpúsculos residuais (Parvinen, 2005). O acúmulo de RNA contendo cauda de adenosina nos corpos cromatoides de espermátides indica que o controle da tradução, quando o núcleo torna-se gradualmente inativo, fica concentrado nessa estrutura citoplasmática (Parvinen, 2005; Kotaja e Sassone-Corsi, 2007). A presença de Dicer, uma nuclease que cliva RNA, o qual se apresenta na forma de fita dupla, proteínas argonautas e micro-RNAs (miRNAs), sugere que esses corpos ocupam posição privilegiada no controle pós-transcricional da expressão gênica por pequenos RNAs de interferência (Kotaja et al., 2006). As proteínas argonautas ligadas a miRNAs fazem parte de um complexo que identifica RNAs complementares, os quais são posteriormente clivados pela Dicer. Esse complexo é conhecido pela sigla em inglês RISC (*RNA-induced silencing complex*), ou seja, essas estruturas impedem que o mRNA seja traduzido em proteína. Breucker (1985), em trabalho que utilizou testículo humano como modelo, estudou a formação dos corpúsculos residuais da espermátide e suas mudanças morfológicas durante e após a espermição. O volume caudal de citoplasma na espermátide contém complexos de Golgi, mitocôndrias, corpo cromatoide, estruturas em forma de flor (de origem não identificadas pelo autor), ribossomos, alguns vacúolos e, esporadicamente, gotas lipídicas (Breucker et al., 1985). Quando o corpúsculo residual se desprende caudalmente do citoplasma do espermatozoide livre, os corpos cromatoides desaparecem, as mitocôndrias ficam na periferia, os ribossomos formam um complexo único com os vacúolos contendo grânulos, e um complexo agregamento de vesículas substitui o complexo de Golgi (Breucker et al., 1985). Blanco-Rodríguez e Martínez-García (1999) acreditam que a função principal dos corpúsculos residuais é remover seletivamente componentes que não são necessários ao espermatozoide maturo, os quais, inevitavelmente, são eliminados junto ao mRNAs e ao RNA ribossômicos (rRNAs).

Transcritos

Os mRNAs específicos de células espermáticas são sintetizados e postos sob um controle rigoroso de tradução, garantindo a expressão no local e no tempo apropriados (Penttilä et al., 1995). A ausência virtual de citoplasma e o número insuficiente de ribossomos inibem a tradução em espermatozoides (Miller e Ostermeier, 2006). Espermatozoides ejaculados contêm altos níveis de transcritos repetidos, que são facilmente convertidos



em DNA complementar (cDNA) pela técnica de transcriptase reversa, até mais do que mRNAs funcionais (Miller, 2000). Gilbert et al. (2007) sugeriram que a população de RNA espermático é, em sua maioria, composta por mRNAs naturalmente truncados e parcialmente adenilados. É interessante que alguns transcritos específicos resultam em proteínas truncadas, como é o caso da vasopressina ou da α -tubulina, para cuja função normal faltam domínios essenciais quando elas são comparadas com proteínas codificadas pelos mesmos genes em células somáticas (Kleene, 2001).

Muitos genes que são expressos em linhagens espermatogênicas e células somáticas, como a α -tubulina ou a *heat shock protein 70 kDa (HSP70)*, produzem transcritos que diferem em estrutura sob influência de diferentes regiões promotoras, processamentos alternativos após a transcrição (*splicing*) e inserção da cauda de poli(A; poliadenilação) na extremidade contrária, ou seja 5' (Kleene, 2005). Uma variedade de mRNAs que codificam fatores envolvidos na síntese de mRNA e no início da tradução tem a expressão de 50 a 1.000 vezes mais elevada em células espermatogênicas do que em células somáticas (Kleene, 2003), por exemplo, a proteína ligadora de TATA, envolvida no início da transcrição. A região promotora TATA box é a mais estudada em eucariotas e é responsável pelo controle da expressão de vários genes. Outro exemplo de transcrito com alta expressão é o fator de iniciação de alongamento eIF-4E, que é um dos fatores responsáveis pelo reconhecimento do mRNA e acoplamento da subunidade menor do ribossomo, permitindo o início de tradução em eucariotas (Kleene, 2003). Acredita-se que a superexpressão de alguns genes envolvidos com a transcrição e a tradução garanta sua permanência nos espermatozoides mesmo após a perda do corpúsculo residual que acaba eliminando grande parte dos RNAs.

Micro-RNA e RNA de interferência

A maior parte do controle da expressão gênica ocorre antes da transcrição, o que poupa energia da célula, evitando a produção de transcritos desnecessários. Contudo, as células podem lançar mão de controles pós-transcricionais que inibem ou destroem os mRNAs já prontos. O miRNA e o RNA de interferência (iRNA) usam pequenas moléculas de RNA para inibir a expressão gênica pela degradação de mRNA, repressão da tradução, ou impedir que o maquinário responsável pela transcrição acesse a cromatina (Kotaja e Sassone-Corsi, 2007). O pequeno RNA de interferência siRNA promove a clivagem de mRNAs que possuem sequências totalmente complementares às suas, enquanto os miRNAs regulam a expressão gênica inibindo a síntese proteica ou afetando a estabilidade do mRNA por meio do pareamento imperfeito das bases na porção final 3' do mRNA alvo (Kotaja et al., 2006; Kotaja e Sassone-Corsi, 2007). Nesses casos, o gene não será expresso, ou seja, não resultará em uma proteína, e pode-se dizer que houve o silenciamento.

Rassoulzadegan et al. (2006) mostraram que a exposição do genoma de embriões de camundongo ao miRNA induz mudanças epigenéticas permanentes e hereditárias. Foi sugerido que 20% dos RNAs encontrados no espermatozoide de camundongo são miRNAs e podem ser liberados dentro do oócito durante a fertilização, influenciando, assim, o desenvolvimento inicial do embrião (Amanai et al., 2006). Em outro estudo, Krawetz et al. (2011) encontraram, em espermatozoides humanos, uma grande variedade de pequenos RNAs e também sugerem sua função no desenvolvimento embrionário inicial. Mais recentemente, foi comprovado que os espermatozoides de bovinos também apresentam uma grande quantidade de miRNAs e que há maior concentração desses transcritos em touros de baixa fertilidade, quando comparados com touros de alta fertilidade, sugerindo que os miRNAs influenciam a fertilidade (Govindaraju et al., 2012). Infelizmente ainda não se sabe quais mRNAs, espermáticos ou embrionários, são controlados pelos pequenos RNAs espermáticos.

Transcritos desconhecidos

Uma complexa variedade de transcritos já foi encontrada em espermatozoides e vários deles não possuem similaridades com as anotações dos bancos genéticos (Miller et al., 1999; Zhao et al., 2006; Gilbert et al., 2007; Lalancette et al., 2008; Yang et al., 2009). Essas sequências podem ser de genes desconhecidos, de transcritos alternativos ou de RNA que não codificam proteínas (ncRNA).

A classificação de ncRNAs é muito difícil, especialmente quando a sequência completa do genoma não está disponível, porque muitos deles são simplesmente transcritos primários não processados ou são formados por introns (sequências de nucleotídeos removidas do pré-mRNA durante o *splicing*); ou ainda podem ser resultados alternativos de processamentos que receberam a cauda de poli(A), sendo reconhecidos pela célula como um mRNA (Mattick, 2003). Apenas há pouco tempo os ncRNAs estão sendo estudados de forma sistemática e está sendo atribuída a eles alguma função celular significativa. Existem várias especulações sobre sua função específica, principalmente sobre interações com DNA, RNA e proteínas, formando o chamado RISC ou regulando mRNAs por se ligar a suas regiões que não são traduzidas, as UTRs (Kotaja e Sassone-Corsi, 2007). Para Mattick (2003), conclusões sobre as vias reguladoras da expressão gênica, resultantes de estudos que utilizaram microarranjos, ficam incompletas caso não forem incluídas sequências de ncRNA.

A compreensão sobre o genoma de mamíferos e a regulação genética continua simplista, porque a transcrição pode começar de várias posições e em ambas as direções do material genético (Carninci, 2006). Um



estudo recente em suínos mostrou que várias sequências de RNA no espermatozoide codificariam proteínas sem funções fisiológicas conhecidas (Yang et al., 2009). Zhao et al. (2006), ao utilizarem uma técnica conhecida como *serial analysis of gene expression* (SAGE), encontraram, em espermatozoides humanos, 54 sequências que foram consideradas novas. Além disso, Peddinti et al. (2008) identificaram 10,6 e 9,8% de mRNAs que codificam proteínas hipotéticas nos espermatozoides de bovinos com alta e baixa fertilidade, respectivamente. A produção de transcritos alternativos deve ser benéfica para os espermatozoides e essas variações podem modificar funções específicas da proteína ou realocá-las dentro do espermatozoide. Algumas proteínas ou ncRNAs devem ter funções diferentes em células e organismos diferentes. Nesses casos, uma análise do genoma e da proteômica deve ser acompanhada de uma análise funcional de forma comparativa, demonstrando seu significado biológico (Suzuki e Hayashizaki, 2004).

Regulação da tradução

Todos os mRNAs em células espermáticas em meiose ou já haploides possuem a tradução reprimida, mas existem diferenças individuais nessa repressão (Kleene, 2001; Eddy, 2002). A produção de novas proteínas já foi demonstrada em espermatozoides de humanos, bovinos, camundongos e ratos, e indicou que os espermatozoides são capazes de realizar tradução (Gur e Breitbart, 2006). Gur e Breitbart (2006) demonstraram que a incorporação de aminoácidos foi completamente bloqueada com inibidores de tradução mitocondrial, mas não por inibidores dos ribossomos citoplasmáticos, indicando que a síntese de proteína deve envolver ribossomos mitocondriais e não citoplasmáticos. Além disso, a inibição da síntese proteica resultou em redução significativa da motilidade espermática (Gur e Breitbart, 2006). Na realidade, apenas poucos mecanismos de controle positivo e negativo da tradução foram rigorosamente demonstrados *in vivo*, como, por exemplo, o encurtamento da cauda de poli(A) e proteínas ligantes de RNA (Penttilä et al., 1995; Kleene, 2003).

Extração e caracterização do RNA de espermatozoides

Para se obter uma quantidade suficiente de RNA para um estudo diferencial de expressão gênica, é necessário iniciar a extração de RNA com um grande número de espermatozoides, além de aperfeiçoar as técnicas empregadas. Até agora, os melhores resultados, em relação à quantidade e qualidade, são obtidos com os métodos baseados no protocolo de Chomczynski e Sacchi (Savchuk, 2006).

Miller e Ostermeier (2006) sugeriram que os espermatozoides não só transportam o material genético paterno, como seu RNA armazenado também pode ser entregue ao oócito, sendo essencial para o controle da expressão gênica do zigoto antes da ativação do seu próprio genoma. O RNA do espermatozoide tem sido extraído por diversos grupos de pesquisa. Inicialmente eram avaliados apenas mRNAs específicos ou pequenos grupos de mRNAs, por meio de técnicas como a reação em cadeia da polimerase quantitativa e em tempo real (RT-qPCR), que estudam transcritos previamente escolhidos; atualmente, prefere-se a técnica de microarranjos (Alcivar et al., 1989; Miller et al., 1994; Ostermeier et al., 2002; Lambard et al., 2004; Dadoune et al., 2005; Zhao et al., 2006; Gilbert et al., 2007; Yang et al., 2009).

As técnicas para extração de RNA estão padronizadas para a maioria dos tipos celulares e dos tecidos, e vários produtos comerciais estão disponíveis para esse propósito. No caso de espermatozoides, há a limitação devido ao baixo volume citoplasmático, à baixa concentração total de RNA e à resistência da membrana celular à lise.

O protocolo que mais foi utilizado para a extração de RNA de espermatozoides é o método desenvolvido por Chomczynski e Sacchi (1987), em que se utiliza o sal caotrópico tiocianato de guanidina e extração com fenol ácido e clorofórmio (Alcivar et al., 1989; Miller et al., 1994; Ostermeier et al., 2002; Lambard et al., 2004). Mais recentemente, prefere-se a extração com o reagente comercial Trizol[®] (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), que é baseado no mesmo método porém mais simplificado, e tem sido utilizado com poucas modificações (Dadoune et al., 2005; Zhao et al., 2006; Gilbert et al., 2007; Govindaraju et al., 2012). Outra possibilidade é a dissociação das células com uma solução caotrópica e a subsequente filtração desse material em uma coluna de sílica onde se ligam seletivamente e quantitativamente mRNAs e grandes rRNAs (Ostermeier et al., 2005; Gur e Breitbart, 2006). Como desvantagem, este método exclui grande parte da população de RNA espermático que é composta por pequenos fragmentos os quais não se ligam à matriz, além de que parte da população de RNA se liga de forma irreversível, resultando em baixa concentração do RNA isolado.

A quantidade de RNA extraída de 1×10^6 de espermatozoides de humanos, bovinos e suínos fica em torno de 5 a 10 ng (Miller et al., 2005; Lalancette et al., 2008; Rauber, 2008). De acordo com o manual do Trizol, a quantidade esperada para 1×10^6 de células somáticas é entre 5 e 15 μg . A quantidade de RNA recuperada de espermatozoides é similar entre as espécies, mas 1.000 vezes menor do que a isolada em células somáticas. Isto significa que há apenas poucos transcritos por espermatozoide e poucas cópias de um mesmo transcrito por célula, já que cada uma possui apenas $10 \text{ a } 20 \times 10^{-15}$ g de RNA total (Krawetz, 2005). Outro ponto importante é que espermatozoide não possui, ou possui muito pouco, RNA ribossomal 28S e 18S (Fig. 2), o que contribui para a baixa concentração de RNA recuperado após a extração (Lalancette et al., 2008; Rauber, 2008; Yang et

al., 2009), uma vez que 80% do RNA encontrado em células somáticas correspondem ao RNA ribossomal.

Gilbert et al. (2007) mostraram que o RNA extraído de espermatozoides bovinos é composto por grande quantidade de RNAs curtos, os quais eles interpretaram como sendo resultado de uma segmentação natural da população de mRNA, mas que atualmente são tratados como pequenos RNAs (Krawetz et al., 2011; Govindaraju et al., 2012). A população de RNA extraído de espermatozoides suínos também é composta predominantemente por pequenos fragmentos com comprimento entre 20 e 100 nucleotídeos (Rauber, 2008; Yang et al., 2009). A ausência de rRNAs e a predominância de pequenos RNAs fazem com que a imagem em gel de agarose do RNA extraído de espermatozoides se assemelhe muito com o RNA degradado, como mostra a Fig. 2.

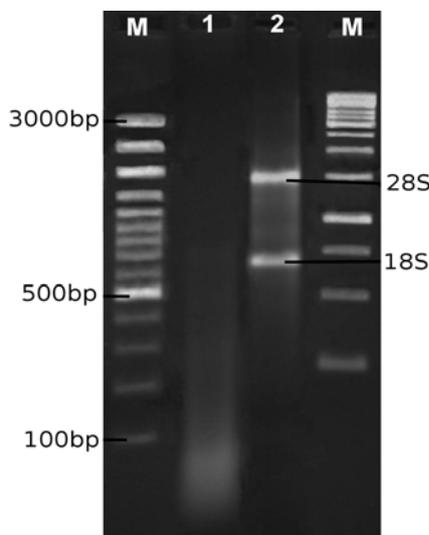


Figura 2. Comparação de 300 ng de RNA total extraído de espermatozoides (1) e de células HeLa (2) em gel de agarose a 1%, 4,5V/cm por 60 min.

Diversos grupos amplificaram RNA espermático utilizando diferentes técnicas, as quais permitem um melhor aproveitamento do material (Gilbert et al., 2007; Platts et al., 2007; Gau et al., 2008; Lalancette et al., 2008). Por exemplo, a amplificação de mRNA via RNA polimerase T7 funciona muito bem e faz parte do protocolo para preparação de amostras para a hibridização nos *GeneChips* da Affymetrix (Affimetrix GeneChip, Santa Clara, USA), a técnica de microarranjo comercial mais utilizada no momento.

Ferramentas de biologia molecular para investigação de infertilidade

Para se obter sucesso na reprodução, não há dúvida de que se deve utilizar sêmen de qualidade, e a escolha dos métodos de avaliação que serão empregados é muito importante. Amostras de sêmen podem se sujeitar a diferentes testes *in vitro* para testar sua habilidade de realizar diferentes etapas da fertilização (Gadea, 2005). O espermograma é baseado em uma bateria de exames, complementares ao exame clínico, que são simples de serem realizados e de baixo custo, mas esses testes geralmente examinam um ou poucos dos eventos relacionados à fertilização. A fertilização *in vitro* é um ótimo sistema para testar a fertilidade, mas infelizmente é caro e demorado, assim como a taxa de prenhez, que seria o ideal. O que se busca é um teste preciso e rápido que tenha uma ótima correlação entre os testes *in vitro* e os resultados de fertilidade. Fatores como raça, idade e manejo afetam a produção espermática (Kunavongkrit et al., 2005), e se, por exemplo, o reprodutor apresentar uma pequena degeneração testicular, esta pode não afetar a libido mas pode afetar a motilidade espermática ou a qualidade do acrossoma. O mais complicado não é identificar o animal infértil, mas identificar reprodutores subfêrteis.

Vários métodos podem ser utilizados na investigação de RNA de espermatozoides, como RT-PCR (transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase), hibridização *in situ* e arranjos (Ostermeier et al., 2002; Wang et al., 2004; Zhao et al., 2006; Carreau et al., 2007; Gilbert et al., 2007; Jones et al., 2007). O transcrito cobre todos os RNAs sintetizados em um organismo ou tecido, incluindo os codificadores de proteínas, os ncRNA, com processamentos alternativos, com cauda de poli(A) ou iniciados, senso e antisense. O transcrito de mamíferos tem sido baseado em projetos de sequenciamento em larga escala (Okazaki et al., 2002).

Estimativas conservativas sugerem que existem aproximadamente 20.000 genes que codificam proteínas no genoma mamífero. Microarranjos projetados para cobrir todo genoma por intervalos regulares e dados de sequenciamentos concordam que muito mais do genoma é transcrito do que se imaginava (Carninci, 2006). A análise comparativa entre transcritos é útil para a identificação de processamentos alternativos, de



promotores alternativos, ncRNAs, vias metabólicas e pequenos peptídeos.

A técnica de microarranjo baseia-se em fixar em uma lâmina ou *chip* uma coleção de fragmentos de DNA ou cDNA, onde se faz a hibridização com o material extraído do tecido estudado. Com os microarranjos podem-se analisar milhares de genes simultaneamente, identificando de forma semiquantitativa se um gene tem expressão maior ou menor que o grupo-controle, ou identificar formas alternativas de um gene. A utilização de microarranjos no estudo de mRNA espermático teve início em 2002 com o estudo de Ostermeier e colaboradores. Eles desenvolveram um microarranjo contendo 27.016 sequências diferentes para investigar cDNAs de espermatozoides do ejaculado humano. Essa técnica tem sido aplicada em estudos sobre a fertilidade e a qualidade de sêmen em humanos, bovinos e em suínos (Wang et al., 2004; Zhao et al., 2006; Gau et al., 2008; Lalancette et al., 2008; Rauber, 2008); mais recentemente, ela foi utilizada no estudo de miRNAs em bovinos (Govindaraju et al., 2012).

Um estudo baseado em achados de microarranjos associados ao PCR em tempo real detectou, no homem, um decréscimo significativo dos transcritos para *TPX-1* (testis-specific protein 1) e *LDHC* (lactate dehydrogenase C, transcrito variante 1) de espermatozoides com baixa motilidade (Wang et al., 2004). Jedrzejczak et al. (2007) avaliaram os níveis de transcritos para proteínas ligantes de histona específicas de espermátides H1-like protein (HILS1) e proteínas de transição (TNP1 e TNP2) por RT-qPCR em espermatozoides isolados de homens com espermatozoides normais e com espermatozoides com baixa motilidade. Os níveis de expressão gênica desses transcritos foram inferiores nos espermatozoides com baixa motilidade. O mesmo grupo encontrou, em espermatozoides humanos selecionados pela técnica de migração ascendente (*swim up*), decréscimo nos níveis de transcritos para C-C chemokine receptor 5 (CCR5) e cytochrome P450 aromatase (P450arom), que devem estar associados com a fertilidade (Jedrzejczak et al., 2006).

Gau et al. (2008) utilizaram um microarranjo de testículo suíno para identificar genes com resposta precoce induzida por estímulo térmico curto e médio, e procuraram relacioná-los com a qualidade de sêmen de cachorros. Dois dos genes com maior expressão foram para proteínas de choque térmico (HSP). Proteínas como as HSP são detectadas em espermatozoides, e particularmente a HSP70 parece ser correlacionada com a qualidade do sêmen, tendo papel crucial na fertilização e no desenvolvimento embrionário inicial (Turba et al., 2007). Também com a tecnologia de microarranjo, Platts et al. (2007) mostraram que espermatozoides humanos com defeitos morfológicos possuem defeitos na transcrição e nas vias de regulação de proteínas, como ubiquitina e proteassomas. Outro estudo prático, que utilizou o microarranjo, mostrou diferenças substanciais de transcritos encontrados em espermatozoides bovinos de touros com diferentes níveis de fertilidade (Lalancette et al., 2008). Touros com alta taxa de fertilidade (>71%) exibiram maior porção de transcritos associados ao processo de tradução, glicosilação e degradação de proteínas, quando comparados com touros de baixa fertilidade (<65%).

A técnica de microarranjo pode avaliar simultaneamente dezenas de milhares de genes expressos em uma amostra biológica. No presente, SAGE, *oligo-microarrays*, *cDNA-microarrays* e Affymetrix GeneChips são as técnicas mais utilizadas para determinar a expressão gênica e os níveis de expressão (Van Ruissen et al., 2005). A comparação entre genomas, transcritomas e proteomas permite compreender o mecanismo de doenças, com o intuito de identificar e desenvolver novos diagnósticos e tratamentos mais efetivos (Suzuki e Hayashizaki, 2004).

A aplicação mais comum das bibliotecas de cDNA é a identificação de genes de interesse. Mas as técnicas como bibliotecas de cDNA e microarranjos podem servir como diagnóstico complementar e para a prognose da capacidade de fertilização do sêmen. O espermatozoide possui mRNAs diferentes aos de células somáticas, únicos das células germinativas masculinas. Quando associada à técnica de microarranjo, a biblioteca de cDNA específica de um tecido pode ser utilizada para monitorar um grande número de genes específicos do tecido e constitui uma ferramenta poderosa para estudos de diferenças da expressão gênica em se tratando de mRNA (Ying, 2004).

Particularmente importantes são as técnicas de análise do transcritoma. Entretanto, no caso de linhagens celulares especializadas como os espermatozoides, a construção de microarranjos baseados em bibliotecas de cDNA de espermatozoides possui várias vantagens sobre *chips* comerciais como o Affymetrix, por exemplo. As análises dessas bibliotecas revelam um grande número de cDNA que não é encontrado nos bancos públicos de dados (Zhao et al., 2006; Gilbert et al., 2007; Lalancette et al., 2008; Yang et al., 2009), os quais são baseados em *chips* comerciais. Esses transcritos desconhecidos estão presentes em altos níveis nas células espermáticas, mas suas funções ainda devem ser definidas. Além disso, transcritos do mesmo gene geralmente diferem quando se comparam espermatozoides com células somáticas, devido ao uso de promotores alternativos, processamentos alternativos e diferenças no ponto de poliadenilação (Kleene, 2005).

O RNA de espermatozoides pode ser extraído com protocolos simples como o Trizol, e a análise desses RNAs funciona como se fosse uma bola de cristal, já que nele visualiza-se o passado, como informações sobre a espermatogênese, e pode-se prever o futuro, com a análise de transcritos relacionados com a capacitação, a fertilização e o desenvolvimento embrionário. A aplicação de bibliotecas de cDNA associadas à tecnologia de microarranjo deve expandir o conhecimento atual sobre os valores de fertilidade no macho.

Em um futuro próximo, deverá haver maior conhecimento da genômica e proteômica, o que irá ajudar a



avaliar a fertilidade potencial de um reprodutor de maneira mais acurada. Tais ferramentas continuam caras e de difícil acesso, entretanto, com a popularização de técnicas como PCR e microarranjos, esses custos tendem a diminuir, tornando o uso da genômica acessível a um público maior. Um exemplo disso é o uso da genômica na identificação de diferenças genéticas responsáveis por características fenotípicas desejáveis utilizando o polimorfismo de um único nucleotídeo (SNP), que já é empregada para seleção de touros (Stothard et al., 2011). Pode-se concluir, com base no que foi exposto aqui, que o RNA espermático pode ser útil como diagnóstico complementar de infertilidade ou para identificar novos potenciais marcadores relacionados com a prognose da fertilidade do macho, mas grandes esforços ainda são necessários para a sua validação e popularização.

Agradecimentos

Ao Laboratório de Análise Funcional do Genoma (LAFUGA – Munique, Alemanha); aos Prof. Dr. Eckhard Wolf, Dr. Helmut Blum e Dr. Stefan Bauersachs; e ao DAAD.

Referências

- Alcivar AA, Hake LE, Millette CF, Trasler JM, Trasler JM, Hecht NB.** Mitochondrial gene expression in male germ cells of the mouse. *Dev Biol*, v.135, p.263-271, 1989.
- Amanai M, Brahmajoyula M, Perry ACF.** A restricted role for sperm-borne MicroRNAs in mammalian fertilization. *Biol Reprod*, v.75, p.877-884, 2006.
- Bettgowda A, Wilkinson MF.** Transcription and post-transcriptional regulation of spermatogenesis. *Phil Trans R Soc*, v.365, p.1637-1651, 2010.
- Blanco-Rodriguez J, Martinez-Garcia C.** Apoptosis is physiologically restricted to a specialized cytoplasmic compartment in rat spermatids. *Biol Reprod*, v.61, p.1541-1547, 1999.
- Breucker H, Schäfer E, Holstein AF.** Morphogenesis and fate of the residual body in human spermiogenesis. *Cell Tissue Res*, v.240, p.303-309, 1985.
- Carninci P.** Tagging mammalian transcription complexity. *Trends Genet*, v.22, p.501-510, 2006.
- Carreau S, Lambard S, Said L, Saad A, Galeraud-Denis I.** RNA dynamics of fertile and infertile spermatozoa. *Biochem Soc Trans*, v.35, p.634-636, 2007.
- Chomczynski P, Sacchi N.** Single-step of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, v.162, p.156-159, 1987.
- Dadoue JP, Pawlak A, Alfonsi MF, Siffroi JP.** Identification of transcripts by macroarrays, RT-PCR and in situ hybridization in human ejaculate spermatozoa. *Mol Hum Reprod*, v.11, p.133-140, 2005.
- Eddy EM.** Male germ cell gene expression. *Recent Prog Horm Res*, v.57, p.103-28, 2002.
- Eddy EM.** Role of heat shock protein HSP70-2 in spermatogenesis. *Rev Reprod*, v.4, p.23-30, 1999.
- Gadea J.** Sperm factors related to *in vitro* and *in vivo* porcine fertility. *Theriogenology*, v.63, p.431-444, 2005.
- Gau BH, Chu IM, Huang MC, Yang KT, Chiou SH, Fan YH, Chen MY, Lin JH, Chuang CK, Huang SY, Lee WC.** Transcripts of enriched germ cells responding to heat shock as potential markers for porcine semen quality. *Theriogenology*, v.69, p.758-66, 2008.
- Gilbert I, Bissonnette N, Boissonneault G, Vallee M, Robert C.** A molecular analysis of the population of mRNA in bovine spermatozoa. *Reproduction*, v.133, p.1073-1086, 2007.
- Govindaraju A, Uzun A, Robertson L, Atli MO, Kaya A, Topper E, Crate EA, Padbury J, Perkins A, Memili E.** Dynamics of microRNAs in bull spermatozoa. *Reprod Biol Endocrinol*, v.10, p.82, 2012.
- Grunewald S, Paasch U, Glander HJ, Andereg U.** Mature human spermatozoa do not transcribe novel RNA. *Andrologia*, v.37, p.69-71, 2005.
- Gur Y, Breitbart H.** Mammalian sperm translate nuclear-encoded proteins by mitochondrial-type ribosomes. *Genes Dev*, v.20, p.411-416, 2006.
- Jedrzejczak P, Januchowski R, Taszarek-Hauke G, Laddach R, Pawelczyk L, Jagodzinski PP.** Quantitative analysis of CCR5 chemokine receptor and cytochrome P450 aromatase transcripts in swim-up spermatozoa isolated from fertile and infertile men. *Arch Androl*, v.52, p.335-341, 2006.
- Jedrzejczak P, Kempisty B, Bryja A, Mostowska M, Depa-Martynow M, Pawelczyk L, Jagodzinski PP.** Quantitative assessment of transition proteins 1, 2 spermatid-specific linker histone H1-like protein transcripts in spermatozoa from normozoospermic and asthenozoospermic men. *Arch Androl*, v.53, p.199-205, 2007.
- Johnson DG, Lalancette C, Linnemann AK, Leduc F, Boissonneault G, Krawetz SA.** The sperm nucleus: chromatin, RNA, and the nuclear matrix. *Reproduction*, v.141, p.21-36, 2011.
- Jones R, James PS, Howes L, Bruckbauer A, Klenerman D.** Supramolecular organization of the sperm plasma membrane during maturation and capacitation. *Asian J Androl*, v.9, p.438-444, 2007.
- Kierszenbaum AL, Tres LL.** Structural and transcriptional features of the mouse spermatid genome. *J Cell Biol* v.65, p.258-270, 1975.
- Kleene KC.** A possible meiotic function of the peculiar patterns of gene expression in mammalian spermatogenic cells. *Mech Dev*, v.106, p.3-23, 2001.



- Kleene KC.** Patterns, mechanisms and functions of translation regulation in mammalian spermatogenic cells. *Cytogenet Genome Res*, v.103, p.217-224, 2003.
- Kleene KC.** Sexual selection, genetic conflict, selfish genes, and the atypical patterns of gene expression in spermatogenic cells. *Dev Biol*, v.277, p.16-26, 2005.
- Kotaja N, Bhattacharyya SN, Jaskiewicz L, Kimmins S, Parvinen M, Filipowicz W, Sassone-Corsi P.** The chromatoid body of male germ cells: Similarity with processing bodies and presence of Dicer and microRNA pathway components. *Proc Nat Acad Sci USA*, v.103, p.2647-2652, 2006.
- Kotaja N, Sassone-Corsi P.** The chromatoid body: a germ-cellspecific RNA-processing centre. *Nat Rev Mol Cell Biol*, v.8, p.85-90, 2007.
- Krawetz SA.** Paternal contribution: new insights and future challenges. *Nat Rev Genet*, v.8, p.633-642, 2005.
- Krawetz SA, Kruger A, Lalancette C, Tagett R, Anton E, Draghici S, Diamond MP.** A survey of small RNAs in human sperm. *Hum Reprod*, v.26, p.3401-3412, 2011.
- Kunavongkrit VA, Suriyasomboon A, Lundeheim N, Heard TW, Einarsson S.** Management and sperm production of boars under differing environmental conditions. *Theriogenology*, 63, p.657-667, 2005.
- Lalancette C, Thibault C, Bachand I, Caron N, Bissonnette N.** Transcriptome analysis of bull semen with extreme nonreturn rate: use of suppression-subtractive hybridization to identify functional markers for fertility. *Biol Reprod* v.78, p.618-635, 2008.
- Lambard S, Galeraud-Denis I, Martin G, Levy R, Chocat A, Carreau S.** Analysis and significance of mRNA in human ejaculated sperm from normozoospermic donors: relationship to sperm motility and capacitation. *Mol Hum Reprod*, v.10, p.535-541, 2004.
- Mattick JS.** Challenging the dogma: the hidden layer of non-protein-coding RNAs in complex organisms. *BioEssays*, v.25, p.930-939, 2003.
- Miller D.** Analysis and significance of messenger RNA in human ejaculated spermatozoa. *Mol Reprod Dev*, v.56, p.259-264, 2000.
- Miller D, Briggs D, Snowden H, Hamlington J, Rollinson S, Lilford R, Krawetz SA.** A complex population of RNAs exists in human ejaculate spermatozoa: implications for understanding molecular aspects of spermiogenesis. *Gene*, v.237, p.385-392, 1999.
- Miller D, Ostermeier CG.** Towards a better understanding of RNA carriage by ejaculate spermatozoa. *Hum Reprod Update*, v.12, p.757-767, 2006.
- Miller D, Ostermeier CG, Krawetz SA.** The controversy, potential and roles of spermatozoal RNA. *Trends Mol Med* v.11, p.156-163, 2005.
- Miller D, Tang P-Z, Skinner C, Lilford R.** Differential RNA fingerprinting as a tool in the analysis of spermatozoal gene expression. *Hum Reprod* v.9, p.864-869, 1994.
- Okazaki Y, Furuno M, Kasukawa Tet al.** Analysis of the mouse transcriptome based on functional annotation of 60,770 full-length cDNAs. *Nature*, v.420, p.563-573, 2002.
- Ostermeier CG, Dix DJ, Miller D, Khatri P, Krawetz SA.** Spermatozoal RNA profiles of normal fertile men. *Lancet*, v.360, p.772-777, 2002.
- Ostermeier GC, Goodrich RJ., Moldenhauer JS, Diamond MP, Krawetz SA.** A suite of novel human spermatozoal RNAs. *J Androl*, v.26, p.70-74, 2005.
- Peddinti D, Nanduri B, Kaya A, Feugang JM, Burgess SC, Memili E.** Comprehensive proteomic analysis of bovine spermatozoa of varying fertility rates and identification of biomarkers associated with fertility. *BMC Syst Biol*, v.19, p.1-13, 2008.
- Parvinen M.** The chromatoid body in spermatogenesis. *Int J Androl*, v.28, p.189-201, 2005.
- Penttilä T-L, Yuan L, Mali P, Höög C, Parvinen M.** Haploid gene expression: temporal onset and storage patterns of 13 novel transcripts during rat and mouse spermiogenesis. *Biol Reprod*, v.53, p.499-510, 1995.
- Platts AE, Dix DJ, Chemes HE, Thompson KE, Goodrich R, Rockett JC, Rawe VY, Quintana S, Diamond MP, Strader LF, Krawetz SA.** Success and failure in human spermatogenesis as revealed by teratozoospermic RNAs. *Hum Mol Genet*, v.16, p.763-773, 2007.
- Rassoulzadegan M, Grandjean V, Gounon P, Vincent S, Gillot I, Cuzin F.** RNA-mediated non-Mendelian inheritance of an epigenetic change in the mouse. *Nature*, v.431, p.469-474, 2006.
- Rauber LP.** Qualitative and quantitative analysis of porcine sperm transcripts and characterization of a normalized cDNA library. 2008. Dissertação (Doutorado em Medicina Veterinária) - Ludwig-Maximilians Universität, Munique, 2008.
- Savchuk L.** Versuche zur Etablierung eines Verfahrens zur Isolierung von RNA aus Eberspermien. 2006. Dissertação (Doutorado em Medicina Veterinária) - Ludwig-Maximilians Universität, Munique, 2006.
- Shih DM, Kleene KC.** A study by in situ hybridization of the stage of appearance and disappearance of the transition protein 2 and the mitochondrial capsule seleno-protein mRNAs during spermatogenesis in the mouse. *Mol Reprod Dev*, v.33, p.222-227, 1992.
- Söderström KO, Parvinen M.** RNA synthesis in different stages of rat seminiferous epithelial cycle. *Mol Cell Endocr*, v.5, p.181-199, 1976.
- Steger K.** Haploid spermatids exhibit translationally repressed mRNAs. *Anat Embryol*, v.203, p.323-334, 2001.



Stothard P, Choi JW, Basu U, Sumner-Thompson JM, Meng Y, Liao X, Moore SS. Whole genome resequencing of black angus and holstein cattle for SNP and CNV discovery. *BMC Genomics*, v.12, p.1-14, 2011.

Suzuki M, Hayashizaki Y. Mouse-centric comparative transcriptomics of protein coding and non-coding RNAs. *BioEssays*, v.26, p.833-843, 2004.

Turba ME, Fantinati P, Bernardini C, Gentilini F, Bacci ML, Forni M. Relationships between innovative and traditional parameters to investigate semen quality in pigs. *Anim Reprod Sci* v.99, p.72-81, 2007.

Van Ruissen F, Ruijter JM, Schaaf GJ, Asgharnegad L, Zwijsenburg DA, Kool M, Baas F. Evaluation of the similarity of gene expression data estimated with SAGE and Affymetrix GeneChips. *BMC Genomics*, v.6, p.91, 2005.

Wang H, Zhou Z, Xu M, Li J, Xiao J, Xu Z-Y, Sha J. A spermatogenesis-related gene expression profile in human spermatozoa and its potential clinical applications. *J Mol Med*, v.82, p.317-324, 2004.

Yang CC, Lin YS, Hsu CC, Wu SC, Lina EC, Cheng WTK. Identification and sequencing of remnant messenger RNAs found in domestic swine (*Sus scrofa*) fresh ejaculated spermatozoa. *Anim Reprod Sci*, v.113, p.143-155, 2009.

Ying S-Y. Complementary DNA libraries: an overview. *Mol Biotech*, v.27, p.245-252, 2004.

Zhao Y, Li Q, Yao C, Wang Z, Zhou Y, Wang Y, Liu L, Wang Y, Wang L Qiao Z. Characterization and quantification of mRNA transcripts in ejaculated spermatozoa of fertile men by serial analysis of gene expression. *Hum Reprod*, v.21, p.1583-1590, 2006.
