



RNAs de espermatozoide: qual a sua função fisiológica?

Spermatozoal RNA: what is its physiological function?

R.C. Nishimura¹, M.A.N. Dode^{2,3}

¹Curso de Pós-Graduação em Ciências Animais, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, UnB, Brasília, DF, Brasil.

²Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, Brasil.

³Correspondência: margot.dode@embrapa.br

Resumo

A constatação da presença de RNAs em espermatozoides trouxe diversos questionamentos a respeito da contribuição dessa célula para o desenvolvimento embrionário. O gameta masculino, que até então era considerado apenas um transportador do genoma paterno, começou a ser estudado na busca de se descobrir se essa célula tão especializada possuiria outros atributos. Ainda existem muitas dúvidas quanto às funções dos RNAs presentes nos espermatozoides. Acredita-se que essas moléculas possam ter alguma função no início do desenvolvimento embrionário, ou ainda que possam indicar a qualidade da espermatogênese e estar envolvidas com a fertilidade masculina, no entanto mais estudos são necessários para defini-las.

Palavras-chave: desenvolvimento embrionário, espermatozoide, fertilidade masculina, gameta, RNA.

Abstract

The findings of spermatozoa RNAs brought several questions regarding potential contributions of this cell to embryo development. The male gamete, considered until recently as a simple transporter of male genome, began to be studied to discover if such a specialized cell would also have other functions. There are still many doubts related to the functions of RNAs found on spermatozoa, it is believed that these molecules may have some role in early embryonic development, or may indicate the quality of spermatogenesis and be related to male fertility, but further studies are necessary to better define them.

Keywords: embryo development, gamete, male fertility, RNA, sperm.

Introdução

Os espermatozoides são células altamente diferenciadas, que passam por muitas modificações desde a espermatogônia até a formação do espermatozoide maduro, sendo que, durante esse processo, organelas e quase todo o citoplasma são retidos pelas células de Sertoli durante a espermição.

Até recentemente, acreditava-se que o espermatozoide fosse apenas um meio por intermédio do qual se transportava o genoma masculino para o ovócito e que fosse incapaz de sintetizar proteínas e RNAs. Era postulado também que o mRNA (RNA mensageiro) encontrado nos espermatozoides seria um material residual de outras células presentes no ejaculado, proveniente de resquícios de citoplasma não absorvidos pelas células de Sertoli ou mRNA mitocondrial, e que, portanto, não teria função alguma (Miller et al., 2005). Todavia, muitos estudos comprovaram a existência de RNAs no espermatozoide que, no momento da fecundação, são inseridos no ovócito, juntamente com os centríolos e fatores de ativação. Destes, muitos permanecem estáveis até a ativação do genoma embrionário (Boerke et al., 2007).

Alguns autores têm sugerido que o RNA dos espermatozoides pode ter um papel nos eventos após a fecundação. Ostermeier et al. (2004) relataram pela primeira vez que o espermatozoide fecundante leva mRNA para o ovócito e que esse RNA permanece intacto por pelo menos até três horas após a fecundação. Esses autores demonstraram que alguns mRNAs detectados na célula espermática e no zigoto estão ausentes nos ovócitos não fecundados. Portanto, os RNAs do espermatozoide que são levados para o ovócito podem estar envolvidos no desenvolvimento embrionário inicial (Miller, 2007).

O papel biológico exato dos RNAs do espermatozoide, contudo, permanece desconhecido. Acredita-se que possa estar relacionado com a regulação da expressão de genes do início do desenvolvimento embrionário, epigenética e a condensação da cromatina do espermatozoide. Sabe-se que indivíduos de alta e baixa fertilidade possuem tipos e quantidade de transcritos diferentes, sugerindo que a presença de certos transcritos poderia ter uma aplicação clínica interessante se estes pudessem ser utilizados para avaliar o potencial de fertilidade de uma amostra de sêmen (Lalancette et al., 2008).

Esta revisão tem como objetivo abordar algumas evidências da presença de vários RNAs nas células espermáticas e a possível função destes na fertilidade e no desenvolvimento embrionário.



Histórico

Acreditou-se durante muito tempo que o genoma masculino fosse o único material introduzido no citoplasma do ovócito que detinha papel determinante no processo de fecundação. A descoberta de que os espermatozoides introduzem também centríolo (Simerly et al., 1995), fatores solúveis que ativam o ovócito (Saunders et al., 2002), e RNAs (Ostermeier et al., 2004) mudou essa percepção. Ainda que o núcleo espermático seja transcricionalmente inativo, essa célula contém um complexo sistema de mRNAs, sendo que alguns são transcritos imediatamente antes da inativação nuclear e outros são remanescentes da espermatogênese.

Os mamíferos são bastante eficientes quanto à produção de espermatozoides, gerando grandes quantidades a partir de uma população renovável de células e tendo por principal objetivo a transmissão do genoma paterno ao ovócito. Todo o processo acontece dentro dos túbulos seminíferos e é bastante controlado, tanto em termos de tempo quanto de espaço. O DNA dos espermatozoides está inicialmente associado às histonas, que são gradualmente substituídas por protaminas durante a espermiogênese mediante o auxílio de proteínas de transição (Gaucher et al., 2010). Essa troca possibilita uma compactação maior do DNA, necessária para o núcleo do espermatozoide. As proteínas que participam desse processo, assim como as demais necessárias à espermiogênese, precisam estar disponíveis para a célula, mesmo com a inativação da transcrição nuclear, que inevitavelmente acontece antes da sua síntese. Para isso, a transcrição é separada da tradução e os mRNAs necessários para a espermiogênese são estocados por longos períodos antes da tradução (Hecht, 1998). Nos estágios finais da espermiogênese, mudanças morfológicas profundas que transformam espermátides em espermatozoides resultam na perda de quase todo o citoplasma, exceto por uma fina camada localizada entre as membranas. O citoplasma residual, incluindo todos os elementos do aparato de tradução, é absorvido pelas células de Sertoli. No passado, aceitava-se que não deveria existir nenhum tipo de RNA na célula espermática, exceto possíveis RNAs intranucleares e mitocondriais remanescentes (Miller et al., 2005).

O estudo do RNA de espermatozoides teve seu início nos primeiros experimentos que buscavam entender o fluxo das informações genéticas nessas células. Durante a condensação e alongação, a maquinaria transcricional é desligada e a maior parte do citoplasma das espermátides redondas é perdida e fagocitada pelas células de Sertoli. Acreditava-se que o restante não fosse capaz de suportar a tradução de mRNA (Miller e Ostermeier, 2006).

No final dos anos 50 e início dos anos 60, foi demonstrado que os espermatozoides eram capazes de incorporar marcadores radioativos no RNA e em proteínas (Abraham e Bhargava, 1963), sendo que mais tarde se concluiu que o espermatozoide era transcricionalmente ativo, embora essa atividade se restringisse à mitocôndria (Maclaughlin e Terner, 1973). Enquanto geralmente se aceita que o núcleo espermático é transcricionalmente inativo, foi provado que, em certas circunstâncias, a repressão transcricional e a traducional podem ser desfeitas (Gur e Breitbart, 2006).

Em 1989, Pessot et al. demonstraram a presença de RNA intranuclear usando hibridização *in situ* e conseguiram verificar tipos de RNA nuclear por meio de eletroforese de espermatozoides humanos e de ratos. Kumar et al. demonstraram em 1993 a presença de mRNA em espermatozoides humanos, que foram localizados na parte média e na cauda. Miller (1997) publicou evidências da presença de numerosos mRNAs no ejaculado usando técnica de RT-PCR padrão e, num estudo independente complementar, Wykes et al. (1997) localizaram RNA no núcleo celular ou ao redor dele usando hibridização *in situ*. Além disso, em 2004, Ostermeier et al. demonstraram que o espermatozoide também insere RNAs no ovócito no momento da fecundação.

Ainda, ao se avaliarem perfis de RNA no ejaculado humano, selecionando as células com gradiente de densidade, foi possível verificar que estes parecem deter alguma correlação com a motilidade e/ou capacitação do esperma, já que níveis diferentes de mRNAs específicos foram encontrados em cada um dos grupos (Lambard et al., 2004).

De forma semelhante, também existem relatos da presença de RNA em espermatozoides bovinos. Além disso, a comparação entre espermatozoides obtidos de animais de alta e baixa fertilidade mostrou que tais grupos possuem um transcriptoma diferente, levando a acreditar que esses RNAs que foram diferencialmente expressos estariam, de alguma forma, correlacionados à fertilidade. (Gilbert et al., 2007; Lalancette et al., 2008; Bissonnette et al., 2009; Feugang et al., 2010).

Tipos de RNA

Boerke et al. (2007) classificaram os RNAs presentes nos espermatozoides em quatro grupos, sendo eles: mRNAs sem função, com potencial função, “estrangeiros” e de interferência. O grupo dos mRNAs sem função seria composto por mRNAs espermátide-específicos, provavelmente sem nenhuma função no ovócito fecundado. É possível que os mRNAs tivessem ficado presos no núcleo após terem completado sua função na espermiogênese e, devido à sua longevidade especializada, seriam estáveis o suficiente para se manterem íntegros até o final da espermatogênese. Os mRNAs com função potencial seriam formados pelos mRNAs especificamente expressos nas espermátides, mas com potencial função no ovócito fecundado. Um exemplo é o



mRNA que traduz a AKAP-4, uma proteína que está envolvida na sinalização de cascatas potencialmente relevantes para ativação inicial do ovócito após a fecundação. Baixas quantidades de mRNAs de espermatozoide funcionalmente intactos e estáveis podem ser transferidos para o ovócito fecundado. A maioria destes mRNAs será degradada pelo ovócito e alguns persistirão até a ativação do genoma embrionário. Estes mRNAs podem traduzir proteínas envolvidas na resposta ao estresse, embriogênese, morfogênese e implantação, embora essas possibilidades ainda não tenham sido comprovadas. O grupo dos mRNA “estrangeiros” seriam mRNAs não originados nos testículos. Estes mRNAs estariam presentes no plasma seminal e teriam sua origem nas glândulas acessórias. Os RNAs de interferência, compreendendo também os miRNAs (micro-RNAs, Lee et al., 1993; Ruvkun, 2001; e os piRNAs, PIWI interacting RNAs, Peng e Lin, 2013), são transcritos pequenos, não codantes, que podem estar presentes nos espermatozoides e conter potencial função após a fecundação. Em células somáticas, esses transcritos contribuem para a regulação gênica, a estrutura da cromatina e inibem os elementos de transposição (Johnson et al., 2011), assim, a presença dessas formas de RNA corrobora a afirmação de que RNAs de interferência de espermatozoide poderiam estar envolvidos na regulação gênica embrionária.

Função biológica

A função e o papel biológico desses RNAs ainda continuam desconhecidos, mas existem especulações e estudos que apontam para algumas possibilidades. Uma delas é que o RNA seja requerido pelo próprio espermatozoide, em que um espermatozoide capacitando está apto a traduzir pelo menos alguns de seus mRNAs de novo. Esses RNAs seriam traduzidos com a maquinaria mitocondrial e talvez sejam traduzidos para suplementar as proteínas que foram degradadas ou desnaturadas (Aoki et al., 2006).

Outra possibilidade é que o RNA aja no zigoto, após a fecundação. Sabe-se que o espermatozoide introduz uma carga de RNA no ovócito e que este permanece intacto por algumas horas após a fecundação (Ostermeier et al., 2004). O espermatozoide também introduz um fator pós-fecundação que confere um efeito epigenético no genoma do zigoto. Foi demonstrado que o RNA introduzido no ovócito pelo espermatozoide pode alterar o fenótipo de um rato sem afetar seu genótipo (Rassoulzadegan et al., 2006). Ainda, existem evidências de que os sncRNA (RNAs pequenos não codantes) possam estar relacionados ao controle do início da expressão gênica embrionária, à repressão de elementos transponíveis (segmentos de DNA ou RNA que podem se movimentar de uma região do genoma para outra e se inserir em um gene, causando uma mutação (Fedoroff, 2001; Cowley e Oakey, 2013) e à conformação da cromatina do espermatozoide. Krawets et al. (2011) conseguiram identificar diversos tipos de pequenos RNAs, sendo que alguns deles podem estar envolvidos na regulação do desenvolvimento e na epigenética do embrião em estágio inicial.

Diversos estudos que utilizaram microarranjos como ferramenta verificaram que homens com teratozoospermia (Platts et al., 2007), astenozoospermia (Jodar et al., 2012) e inférteis (Garcia-Herrero et al., 2011) possuem alguns tipos de RNA específicos, ou ainda outros em quantidade alterada quando comparados à quantidade presente em homens normais. Sendo assim, tem-se buscado explorar alguns RNAs de espermatozoide como possíveis marcadores de infertilidade em amostras de sêmen “anormais” por meio da PCR em tempo real (Steger et al., 2008; Avendano et al., 2009; Lima-Souza et al., 2012).

Considerações finais

Por algum tempo, nem mesmo se reconheceu a possibilidade da presença do RNA nos espermatozoides, sendo a sua função limitada à de mero transportador do genoma paterno. Hoje já é aceito que o espermatozoide é uma célula portadora de uma população de RNAs, e que estes não são somente remanescentes da espermatogênese. Embora não se saiba exatamente suas funções, existem indícios de que estes estariam relacionados à fertilidade, ao desenvolvimento embrionário inicial e ao controle da expressão gênica, sendo necessários ainda mais estudos para que realmente se compreendam as funções exercidas por essa célula tão especializada. A descoberta da função dos RNAs do espermatozoide no desenvolvimento embrionário inicial poderá tornar o seu conteúdo um potencial indicador de fertilidade, tanto em animais quanto em humanos.

Agradecimentos

Ao CNPq e à Embrapa Cenargen.

Referências

- Abraham KA, Bhargava PM.** Nucleic acid metabolism of mammalian spermatozoa. *Biochem J*, v.86, p.298-307, 1963.
- Aoki VW, Liu L, Carrell DT.** A novel mechanism of protamine expression deregulation highlighted by abnormal protamine transcript retention in infertile human males with sperm protamine deficiency. *Mol Hum Reprod*, v.12, p.41-50, 2006.



- Avendano C, Franchi A, Jones E, Oehninger S.** Pregnancy-specific {beta}-1-glycoprotein 1 and human leukocyte antigen-E mRNA in human sperm: differential expression in fertile and infertile men and evidence of a possible functional role during early development. *Hum Reprod*, v.24, p.270-277, 2009.
- Bissonnette N, Levesque-Sergerie JP, Thibault C, Boissonneault G.** Spermatozoal transcriptome profiling for bull sperm motility: a potential tool to evaluate semen quality. *Reproduction*, v.138, p.65-80, 2009.
- Boerke A, Dieleman SJ, Gadella BM.** A possible role for sperm RNA in early embryo development. *Theriogenology*, v.68, suppl. 1, p.S147-S155, 2007.
- Cowley M, Oakey RJ.** Transposable elements re-wire and fine-tune the transcriptome. *PLoS Genet*, v.9, p.e1003234, 2013.
- Fedoroff N.** How jumping genes were discovered. *Nat Struct Biol*, v.8, p.300-301, 2001.
- Feugang JM, Rodriguez-Osorio N, Kaya A, Wang H, Page G, Ostermeier GC, Topper EK, Memili E.** Transcriptome analysis of bull spermatozoa: implications for male fertility. *Reprod Biomed Online*, v.21, p.312-324, 2010.
- Garcia-Herrero S, Garrido N, Martinez-Conejero JA, Remohi J, Pellicer A, Meseguer M.** Differential transcriptomic profile in spermatozoa achieving pregnancy or not via ICSI. *Reprod Biomed Online*, v.22, p.25-36, 2011.
- Gaucher J, Reynoird N, Montellier E, Boussouar F, Rousseaux S, Khochbin S.** From meiosis to postmeiotic events: the secrets of histone disappearance. *FEBS J*, v.277, p.599-604, 2010.
- 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.
- Gur Y, Breitbart H.** Mammalian sperm translate nuclear-encoded proteins by mitochondrial-type ribosomes. *Genes Dev*, v.20, p.411-416, 2006.
- Hecht NB.** Molecular mechanisms of male germ cell differentiation. *BioEssays: News Rev Mol Cell Dev Biol*, v.20, p.555-561, 1998.
- Jodar M, Kalko S, Castillo J, Balleca JL, Oliva R.** Differential RNAs in the sperm cells of asthenozoospermic patients. *Hum Reprod*, v.27, p.1431-1438, 2012.
- Johnson GD, 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.
- 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.
- Kumar G, Patel D, Naz RK.** c-MYC mRNA is present in human sperm cells. *Cell Mol Biol Res*, v.39, p.111-117, 1993.
- 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.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V.** The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, v.75, p.843-854, 1993.
- Lima-Souza A, Anton E, Mao S, Ho WJ, Krawetz SA.** A platform for evaluating sperm RNA biomarkers: dysplasia of the fibrous sheath--testing the concept. *Fertil Steril*, v.97, p.1061-1066 e1-3, 2012.
- Maclaughlin J, Turner C.** Ribonucleic acid synthesis by spermatozoa from the rat and hamster. *Biochem J*, v.133, p.635-639, 1973.
- Miller D.** Ensuring continuity of the paternal genome: potential roles for spermatozoal RNA in mammalian embryogenesis. *Soc Reprod Fertil Suppl*, v.65, p.373-389, 2007.
- Miller D.** 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*, v.3, p.669-676, 1997.
- Miller D, Ostermeier GC.** Spermatozoal RNA: Why is it there and what does it do? *Gynecol Obstet Fertil*, v.34, p.840-846, 2006.
- Miller D, Ostermeier GC, Krawetz SA.** The controversy, potential and roles of spermatozoal RNA. *Trends Mol Med*, v.11, p.156-163, 2005.
- Ostermeier GC, Miller D, Huntriss JD, Diamond MP, Krawetz SA.** Reproductive biology: delivering spermatozoan RNA to the oocyte. *Nature*, v.429, n.6988, p.154, 2004.
- Peng JC, Lin H.** Beyond transposons: the epigenetic and somatic functions of the Piwi-piRNA mechanism. *Curr Opin Cell Biol*, v.25, p.190-194, 2013.
- Pessot CA, Brito M, Figueroa J, Concha Ii, Yanez A, Burzio LO.** Presence of RNA in the sperm nucleus. *Mol Cell Biol Res Commun*, v.158, p.272-278, 1989.
- 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.441, n.7092, p.469-474, 2006.

Ruvkun G. Molecular biology. Glimpses of a tiny RNA world. *Science*, v.294, n.5543, p.797-799, 2001.

Saunders CM, Larman MG, Parrington J, Cox LJ, Royse J, Blayney LM, Swann K, Lai FA. PLC zeta: a sperm-specific trigger of Ca(2+) oscillations in eggs and embryo development. *Development*, v.129, p.3533-3544, 2002.

Simerly C, Wu GJ, Zoran S, Ord T, Rawlins R, Jones J, Navara C, Gerrity M, Rinehart J, Binor Z, Asch R, Schatten G. The paternal inheritance of the centrosome, the cell's microtubule-organizing center, in humans, and the implications for infertility. *Nat Med*, v.1, p.47-52, 1995.

Steger K, Wilhelm J, Konrad L, Stalf T, Greb R, Diemer T, Kliesch S, Bergmann M, Weidner W. Both protamine-1 to protamine-2 mRNA ratio and Bcl2 mRNA content in testicular spermatids and ejaculated spermatozoa discriminate between fertile and infertile men. *Hum Reprod*, v.23, p.11-16, 2008.

Wykes, S. M, Visscher, D. W, Krawetz, S. A. Haploid transcripts persist in mature human spermatozoa. *Mol Hum Reprod*, v.3, p.15-19, 1997.
