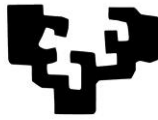


eman ta zabal zazu



Universidad  
del País Vasco

Euskal Herriko  
Unibertsitatea

# μ, σ eta κ opioide-hartzaileen deskribapena, kokapena eta funtzionaltasuna hozi-zelula maskulinoetan

---

Haizea Estomba Iturriza

Leioa, 2015eko Azaroa

**Zuzendariak:**

*Jon Irazusta Astiazaran*

*Nerea Subirán Ciudad*

Fisiologia Saila

Medikuntza eta Odontologia Fakultatea

Euskal Herriko Unibertsitatea





*Etxekoei,  
beti nere alboan egoteagatik.*

*Maite zaituztet!!!*



## ESKERRAK

Esku artean duzuen doktore-tesi hau 4 urtez gogorki landutako ikerketa-lan baten azken emaitza da. Inguruan jasotako laguntza guztiagatik izan ez balitz, ezin izango nuke aurrera jarraitu. Mila esker guztioi!

Lehenik eta behin, Jon Irazusta eta Nerea Subirán doktoreei eskerrak eman nahi nizkieke beraien zuzendaritzapean lan hau ondo ateratzen egindako ahaleginengatik.

Eskerrik asko, laborategiko kideei hasieratik eskuzabalik hartu eta erakutsitako gertutasunagatik. Luis, Javi, Bego, Gorka, Asier, Fátima, Usue, Idoia eta Jon. Maider eta Amaia (erizainak). Eskerrak ere zuri, Arantza! Laborategian, klasean eta kalean erakutsi didazun interesa eta prestutasunagatik. Segi beti bezain irribarretsu! Baina batez ere, Lorena eta Itxarori, esker mila! Hasieran zuekin bazkaltzen pasatako momentuak eta izandako elkarrizketak nere burua kokatzen eta lasaitzen lagundu zidatelako. Eta gaur egun, oraindik ere, hala izaten jarraitzen duelako (ezta, Itxari?). Zuek uste datorren urtean Tolosara autobusa antolatzerik izango degula?

Nere eskerrik beroenak bulegoko kideei, pasatako amorru, negar eta algara guztiak ulertu eta partekatzen uzteagatik. Itziar, Iraia, Marta, Maider, Peio eta Ainhoa. Ziur nago urte guzti hauetan borrokatutakoak emango duela merezitako bere fruitua. Hoberenak zerate!

Lagunei, zer esango dizuet ba? Zuek bezelako jendea ondoan izanda edozer da posible! Eskerrik asko beti izan duzuen pazientziagatik (ez dela gutxi) baina, batez ere, eman didazuen maitasunagatik. Zuekin KM ondoan hartutako kafe guztiak ez dute preziorik. Berta (ahizpa txikia), Inge (lagun zintzoa), Joni (nere txantxikua), Eneko (nere matxi). Enerito eta Olatzita (nere loretxo eta aholkulari finak). Aiora, Olaia, Lorea, Onintza, Aiora J. eta Oihane (nahiago nuke ardi guztiak zuek bezain galduak egongo balira!). Kuadrilakoei, bereziki, Leire, Kristina, Ainhoa, Amaia, Sayalero eta Gara (mila-mila esker hor egoteagatik, nextak!). Miresgarriak zerate guztiak!

Bukatzeko, bihotzez eskertu nahi diet nire bizitzan hartutako erabaki guztiak beti errespetatu eta ulertu dituzten guraso eta anaiari. Zuengandik ikasi det, kostata ahala kostata, ametsengatik gogor borrokatzea zer den. Ozen esan dezaket zuetaz harro nagola!



## LABURDUREN ZERRENDA

**ABP:** androgenoak lotzen dituen proteina

**AC:** adenilato ziklasa

**ACR:** akrosina

**ACTB:**  $\beta$ -aktina

**ACTH:** hormona adrenikortikotropikoa

**ADP:** adenosina 5'-difosfatao

**ANOVA:** bariantzaren analisia

**AR:** androgeno hartzailea

**ATP:** adenosina 5'-trifosfatao

**BPO:** barne-peptido opioidea

**BSA:** behi-serum albumina

**BZA:** azido bizinkoninikoa

**cAMP:** AMP ziklikoa

**CDK:** ziklina menpeko kinasa

**cDNA:** DNA osagarria

**CRH:** kortikotropina hormona askatzailea

**CTCF:** zuzendutako zelulen guztizko fluoreszentsia

**DAMME:** D-ala<sup>2</sup>-Mephe<sup>4</sup>-Met-(O)-OI-entzefalina

**DEPC:** dietilpirokarbonatoa

**DNA:** azido desoxirribonukleikoa

**dNTP:** desoxirribonukleotido trifosfatao

**DOR:**  $\sigma$  opioide-hartzailea

**DPDPE:** [D-Pen<sup>2,5</sup>]-Entzefalina

**DSB:** harizpi bikoitzeko apurketak

**ECL:** kimioluminiszentzia-areagotzailea

**EDTA:** azido diaminoetanotetraazetikoa

**ERK:** zelula kanpoko seinaleek erregulatutako kinasa

**FSH:** hormona folikulu-estimulatzailea

**FSHR:** FSH hartzailea

**GDP:** guanosina 5'-difosfatao

**GnRH:** hormona gonadotropina-askatzailea

**GTP:** guanosina 5'-trifosfatao

**hCG:** giza gonadotropina hormona kronikoa

**IP<sub>3</sub>:** inositol tri-fosfatao

**ITG6:** alfa-6 integrina

**KOR:**  $\kappa$  opioide-hartzailea

**LH:** hormona luteinizatzailea

**LHR:** LH hartzailea

**LPH:** lipotropina

**MAPK:** MAP kinasa

**MOR:**  $\mu$  opioide-hartzailea

**mRNA:** RNA mezularia

**MSH:** melanotropina

**NC:** nozizeptina

**nor-BIN:** norbinaltorfina

**NSZ:** nerbio sistema zentrala

**ORL<sub>1</sub>:** nozizeptina hartzailea (orfanina)

**P/S:** penizilina/estreptomizina



**PAGE:** poliakrilamidazko gel elektroforesia

**PBS:** fosfato/gatz-indargetzailea

**PCR:** polimerasaren kate-erreakzioa

**PDYN:** pro-dinorfina

**PENK:** pro-entzefalina

**PI:** propidio ioduroa

**PKA:** cAMParen menpeko proteina kinasa

**PKC:** C proteina kinasa

**PLC:** C fosfolipasa

**PNOC:** pro-nozizeptina

**POMC:** proopiomelanokortina

**PVDF:** polibinilideno difluorua

**RNA:** azido erribonukleikoa

**RT:** alderantzizko transkripzioa

**SDS:** sodio dodezil sulfatoa

**SYCP1:** konplexu sinaptonemalaren proteina-1

**SYCP3:** konplexu sinaptonemalaren proteina-3

**TAE:** tris/azetato indargetzailea

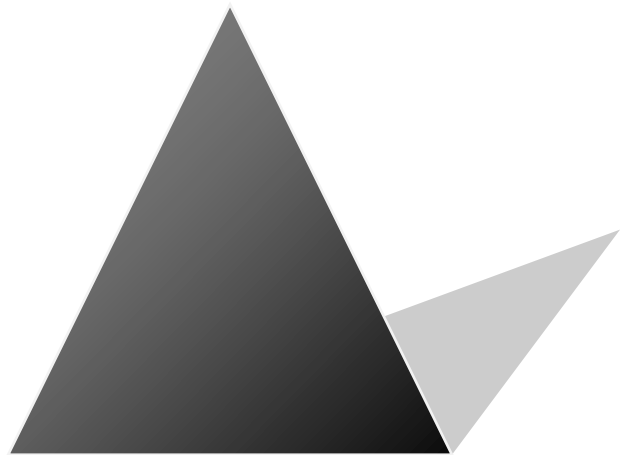
**TBS:** tris/gatz-indargetzailea

**TEMED:** N,N,N,N'-tetrametiletilenodiamina

**U50488:** 3,4-Dikloro-*N*-metil-*N*-[2(1-pirrolidinil)ziklohexil] benzeneazetamida

**WB:** western blot

**AURKIBIDEA**





<b>LABURPENA .....</b>	<b>1</b>
<b>SARRERA.....</b>	<b>5</b>
1. UGALKORTASUN MASKULINOA.....	7
1.1 Ugaltze-aparatu maskulinoaren anatomia fisiologikoa.....	7
1.2 Testikuluaren anatomia fisiologikoa.....	9
1.3 Estadioen antolamendua tubulu seminiferoetan .....	15
1.4 Espermatogenesisia: gameto arren garapena .....	22
1.5 Espermatogenesiaren erregulazioa.....	26
2. SISTEMA OPIOIDEA .....	39
2.1 Opioide-hartzaileak.....	40
2.2 Barne-peptido opioideak .....	46
3. SISTEMA OPIOIDEAREN INPLIKAZIOA UGALKORTASUN MASKULINOAN .....	51
3.1 Sistema opioideak hormonon bidez bideratutako ugaltze-funtzioaren kontrola	51
3.2 Sistema opioideak bideratutako funtzio testikularraren kontrola .....	53
3.3 Sistema opioideak bideratutako funtzio espermatikoaren kontrola .....	58
<b>HELBURUAK.....</b>	<b>61</b>
<b>MATERIALAK ETA METODOAK .....</b>	<b>65</b>
1. MATERIALAK.....	67
1.1 Gailuak .....	67
1.2 Erreaktiboak.....	68
1.3 Hazkuntza medioak.....	68
1.4 Soluzioak .....	69

## Aurkibidea

2. METODOAK .....	73
2.1 Animaliak .....	73
2.2 Giza testikuludun zehar-ebakiak.....	76
2.3 qRT-PCR analisia .....	76
2.4 Hartzaileen proteinen presentzia.....	83
2.5 Hartzaileen proteinak kokatzea.....	89
2.6 Ziklo-zelularra .....	95
2.7 Analisi estatistikoa .....	95
<b>EMAITZAK .....</b>	<b>97</b>
1. helburua: $\mu$ , $\sigma$ eta $\kappa$ opioide-hartzaileen deskribapena eta kokapena hozi-zelula maskulinoetan .....	99
1.1 Saguen tubulu seminiferoetako estadioetako MOR, DOR eta KOR-en adierazpen genikoa .....	99
1.2 Saguen tubulu seminiferoetako estadioetako MOR, DOR eta KOR-en proteinen presentzia.....	101
1.3 Saguen zelula testikularretako populazioetako opioide-hartzaileen azterketa	105
1.4 MOR, DOR eta KOR-en kokapena .....	107
2. helburua: $\mu$ , $\sigma$ eta $\kappa$ opioide-hartzaileen funtzionaltasuna espermatogenesisian.....	115
2.1 MOR-ren funtzionaltasuna espermatogenesisian.....	115
2.2 DOR-ren funtzionaltasuna espermatogenesisian .....	118
2.3 KOR-ren funtzionaltasuna espermatogenesisian .....	121
2.4 MOR, DOR eta KOR-en geneen adierazpena espermatogenesisian.....	124
2.5 MOR, DOR eta KOR-en funtzionaltasuna espermatogenesisiko meiosian zehar .....	133

<b>EZTABAIDA .....</b>	<b>141</b>
<b>ONDORIOAK.....</b>	<b>171</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>175</b>
<b>ERANSKINAK .....</b>	<b>197</b>

## IRUDIEN AURKIBIDEA

<b>1. irudia:</b> Gizonezkoen ugaltze-aparatuaren atalak .....	9
<b>2. irudia:</b> Testikuluaren atalak .....	10
<b>3. irudia:</b> Tubulu seminiferoen antolaketa .....	11
<b>4. irudia:</b> Testikuluetako zelulen kokapena.....	14
<b>5. irudia:</b> Tubulu seminiferoaren zehar-ebakia .....	15
<b>6. irudia:</b> Saguen estadiokako zikloen mapa .....	18
<b>7. irudia:</b> Gizonezkoen estadiokako zikloen mapa .....	20
<b>8. irudia:</b> Tubulu seminiferoen zehar-ebakiak ugaztun espezie ezberdinetan .....	21
<b>9. irudia:</b> Espermatogenesiaren irudi eskematikoa .....	25
<b>10. irudia:</b> Espermatogenesiaren hormona bidezko erregulazioaren irudi eskematikoa .....	27
<b>11. irudia:</b> Ziklinen adierazpena ugaztunen espermatogenesisian zehar.....	30
<b>12. irudia:</b> Opioideak hartzaileetara lotzeko proposatutako ereduak .....	40
<b>13. irudia:</b> Opioide-hartzaileetatik aktibatutako barne-seinaleztapena.....	46
<b>14. irudia:</b> Peptido opioideen aitzindari polipeptidikoaren eskema .....	47
<b>15. irudia:</b> Sistema opioideak bideratutako ugaltze-funtzioaren kontrola .....	52
<b>16. irudia:</b> Tubulu seminiferoen dekapulazioaren prozedura .....	74
<b>17. irudia:</b> Tubulu seminiferoen estadiokako sailkapenaren eskema .....	75
<b>18. irudia:</b> Transferentzia <i>sandwich</i> -eko muntaiaren ordena .....	87
<b>19. irudia:</b> Immunozitokimikako esperimenduaren eskema .....	91
<b>20. irudia:</b> Testuan aipatutako fluorokromo ezberdinen kitzikapen eta jasotze fluoreszentzien histograma.....	91

<b>21. irudia:</b> Immunohistokimikako esperimentuaren eskema .....	94
<b>22. irudia:</b> MOR, DOR eta KOR geneen adierazpenaren azterketa tubulu seminiferoetako estadioetan .....	101
<b>23. irudia:</b> MOR, DOR, eta KOR proteinen western blot (A) eta optika-dentsitate bidezko (B) analisisa .....	104
<b>24. irudia:</b> Fluxuzko zitometriaz aztertutako ziklo zelularreko zelula testikularren MOR, DOR eta KOR.....	106
<b>25. irudia:</b> Saguen zelula espermatogenikoetako opioide-hartzaileen azterketa immunozitokimikoa .....	110
<b>26. irudia:</b> MOR, DOR eta KOR-en fluoreszentsia intentsitateen kuantifikazioa CTCF/ $\mu\text{m}^2$ balioetan adierazita .....	111
<b>27. irudia:</b> Giza tubulu seminiferoetako zehar-ebakietako zelula testikularren opioide-hartzaileen azterketa immunohistokimikoa.....	113
<b>28. irudia:</b> MOR-ren funtzionaltasunaren azterketa testikuluetako ziklo zelularrean zehar .....	117
<b>29. irudia:</b> DOR-ren funtzionaltasunaren azterketa testikuluetako ziklo zelularrean zehar .....	120
<b>30. irudia:</b> KOR-ren funtzionaltasunaren azterketa testikuluetako ziklo zelularrean zehar .....	123
<b>31. irudia:</b> Espermatogenesisian zehar heltze prozesuan dauden zelula espermatikoen irudi eskematikoa.....	125
<b>32. irudia:</b> Morfinarekin tratatutako zelula espermatogenikoen markatzaileen ( <i>ITG6</i> , <i>SYCP1</i> , <i>SYCP3</i> eta <i>ACR</i> ) geneen adierazpen erlatiboa esposizio denbora labur eta luzean .....	127
<b>33. irudia:</b> DPDPE-rekin tratatutako zelula espermatogenikoen markatzaileen ( <i>ITG6</i> , <i>SYCP1</i> , <i>SYCP3</i> eta <i>ACR</i> ) geneen adierazpen erlatiboa esposizio denbora labur eta luzean .....	129



## Aurkibidea

- 34. irudia:** U50488-rekin tratatutako zelula espermatogenikoen markatzaileen (*ITG6*, *SYCP1*, *SYCP3* eta *ACR*) geneen adierazpen erlatiboa esposizio denbora labur eta luzean ..... 132
- 35. irudia:** Morfina agonista opioidearekin tratatutako zeluletako *B3*, *A1* eta *E2* ziklinen geneen adierazpen erlatiboa inkubaketa-denbora labur (A) eta luzean (B) ..... 135
- 36. irudia:** DPDPE agonista opioidearekin tratatutako zeluletako *B3*, *A1* eta *E2* ziklinen geneen adierazpen erlatiboa inkubaketa-denbora labur (A) eta luzean (B) ..... 137
- 37. irudia:** U-50488 (U 50) agonista opioidearekin tratatutako zeluletako *B3*, *A1* eta *E2* ziklinen geneen adierazpen erlatiboa inkubaketa-denbora labur (A) eta luzean (B).... 139

**TAULEN AURKIBIDEA**

<b>1. taula:</b> Saguen tubulu seminiferoako luzerako estadioen ezaugarri-taula.....	19
<b>2. taula:</b> Gizonezkoen tubulu seminiferoako luzerako estadioen ezaugarri-taula.....	21
<b>3. taula:</b> Espermatogenesisian parte hartzen duten ziklina espezifikoaren <i>knockout</i> sagu arrek ugalkortasunean pairatutako ondorioen laburpen taula.....	37
<b>4. taula:</b> Opioido-hartzaileen estekatzailerik sintetiko eta naturalak.....	44
<b>5. taula:</b> Estekatzailerik opioidoen afinitate-profilak <i>binding</i> esperimentu bidez lortuak..	49
<b>6. taula:</b> Hiru opioido-hartzaileen agonisten (Morfina, DPDPE eta U-50488) kontzentrazioak molarretan (M) adierazita .....	76
<b>7. taula:</b> PCRaren ezaugarriak .....	80
<b>8. taula:</b> qRT-PCR bidez egindako mRNAren analisisian erabilitako <i>primer</i> -ak.....	82
<b>9. taula:</b> Western blot-ean erabilitako antigorputzak .....	88
<b>10. taula:</b> Immunofluoreszentzian erabilitako antigorputzak .....	92



**LABURPENA**

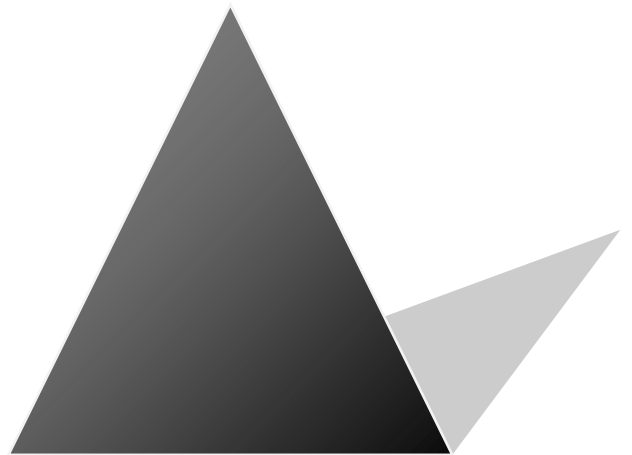




Hainbat ikerketen arabera barne-peptido opioideak arren zelula mota ezberdinetan aurkitzen dira. Honek, sistema opioideak funtzio testikularraren erregulazioan parte hartzen duela adierazten du. Espermatogenesisian sistema opioideak betetzen duen funtzioa ezezaguna da, izan ere, hiru opioide-hartzaile nagusiak,  $\mu$  opioide-hartzailea (MOR),  $\sigma$  opioide-hartzailea (DOR) eta  $\kappa$  opioide-hartzailea (KOR), soilik arratoien testikuluetakoko Sertoli zeluletan eta giza espermatozoideetan deskribatu dira orain arte. Espermatozoideak transkribapen eta itzulpen mailan jarduerarik gabeko zelulak direla jakinik, opioide-hartzaile hauek espermatogenesisian zehar adierazten direla pentsatzera eramán gintuen. Hau dela eta, gure lehen helburua MOR, DOR eta KOR sagu zein gizonezkoen hozi-zeluletan deskribatzea eta kokatzea izan zen. Bestalde, bigarren helburu gisa, hiru opioide-hartzaileek espermatogenesisian zehar duten funtzionaltasuna zehaztu nahi izan zen. Opioide-hartzaileen gene zein proteinen adierazpenak qRT-PCR, western blot eta fluxuzko zitometriaz deskribatu ziren. Honetaz gain, immunofluoreszentzia bidez giza zein sagu laginen hozi-zeluletan opioide-hartzaileak kokatu ziren. Funtzionaltasunari dagokionez, hiru opioide-hartzaileek saguen ziklo espermatogenikoan efektu modulatzailea dutela ondorioztatu zen. Izan ere, MOR, DOR eta KOR-en aktibazioak nagusiki fase meiotikoan dauden espermatozitoengan eragiten dutela ikusi da konplexu sinaptonemaleko proteinen erregulazioa modulatzuz. Gainera, hiru opioide-hartzaileen aktibazioak inkubaketa-denboraren menpeko ziklinen erregulazioan aldaketak sortzeko eta zelulen meiosiranzko sarrera kontrolatzeko gaitasuna dutela, ere, behatu da. Eraitza hauek guztiek opioide-hartzaileek espermatogenesisian duten funtzioa ulertzen laguntzeaz gain, sistema opioideak ugalkortasunean duen ekarpena ulertzen lagun dezake.

The presence of endogenous opioid peptides in different testicular cell types has been extensively characterized and provides evidence for the participation of the opioid system in the regulation of testicular function. In fact, opioid receptors are exclusively expressed by Sertoli cells but the exact role of the opioid system during the spermatogenesis has remained controversial since the presence of the  $\mu$ -opioid receptor (MOR),  $\sigma$ -opioid receptor (DOR) and  $\kappa$ -opioid receptor (KOR) in spermatogenic cells was yet to be demonstrated. Moreover, the presence of opioid receptors in mature spermatozoa suggests that these receptors may be expressed at some point during spermatogenesis since mature spermatozoa are transcriptionally and translationally inactive cells. Because the effect of opioid receptors on spermatogenic cells remains unknown, the aim of this study was to characterize the expression and distribution of the three types of opioid receptors in male germ cells and analyse their role during spermatogenesis. Through a combination of quantitative real-time PCR, immunofluorescence, immunohistochemistry and flow cytometry approaches, we report for the first time the presence of active MOR, DOR and KOR in mouse male germ cells. They show an exposition time-dependent response to opioid agonist, hence suggesting their active involvement in spermatogenesis. Specifically, opioid receptors seem to be involved mainly in the meiosis of the mice spermatogenesis by modifying the expression of the synaptonemal complex proteins and cyclins that regulate the meiosis process. This thesis contributes to understand the role of the opioid receptors in the spermatogenesis and could help to develop new strategies to employ the opioid system as a biochemical tool for the diagnosis and treatment of male infertility.

**SARRERA**







## **1. UGALKORTASUN MASKULINOA**

### **1.1 Ugaltze-aparatu maskulinoaren anatomia fisiologikoa**

Ugaltze-aparatu maskulinoa honako atalek osatzen dute: testikuluak, epididimoa, hodi deferentea, hodi isurlea, guruin besikularra, prostata, guruin bulbo-uretralak eta uretra (1. irudia). Jarraian, atal bakoitzaren deskribapen anatomikoa eta funtzionamendua azalduko dira.

#### **1.1.1. Testikuluak**

Testikuluak espermatozoideak sortu eta metatzeko eta androgenoak jariatzeko organo pare espezializatuak dira. Hauek zakilaren azpian eta barrunbe abdominaletik at dagoen eskrotoan biltzen dira (Kierszenbaum eta Tres, 2012). Testikuluen zatiak eta hauen funtzioak 1.2 atalean sakonago azalduko dira.

#### **1.1.2 Epididimoa, hodi deferentea eta hodi isurlea**

Epididimoa, testikuluen atzealdean kokatzen den hodia da; haren funtzioa hodi deferentea eta testikuluak lotzea da. Arrek bi epididimo dituzte; testikulu bakoitzeko bat. Epididimoa oso garrantzitsua da espermatozoideen heltze-prozesuan eta mugikortasunean (Cosentino eta Cockett, 1986). Testikuluen eta epididimoaren jariakinek gametoen ugaltze-prozesurako ezinbestekoak diren zenbait propietate bereganatzen laguntzen dute (Jequier eta Crich, 1986).

Hodi deferentea epididimoaren edukia jaso eta hodi isurlera eramaten duen hodia da. Bide horretan dauden anpuluak haziaren biltegi gisa jokatzen du. Hodi isurlea uretran kokatzen den hodi laburra da. Bertara anpuluetakoa eta guruin besikularretakoa edukia jariatzen da. Hodi honek prostata zeharkatzen du.

### 1.1.3 Guruin osagarriak

Espermatozoideak epididimotik uretraraino garraiatzeko ekintzari emisio deritzo, eta bide horretan nahasten dira espermatozoideak eta guruin osagarrien jariakin guztiak. Ekintza hori epididimo, hodi deferente eta hodi isurleen muskuluen uzkurketek eragiten dute (Rhoades eta Tanner, 1997). Beraz, guruin osagarriak uretrarekin konektatuta daude, eta haien jariakinek espermatozoideen iraupena eta ugalkortasuna mantentzen dute (Jequier eta Crich, 1986).

#### a) Guruin besikularra

Guruin besikularraren jariakin gelatinakara hazi-likidoaren %40-80 izaten da. Jariatutako gaien artean fruktosa (espermatozoideen elikagai energetiko nagusia), azido askorbikoa eta prostaglandinak daude, besteak beste, eta ahalmen indargetzaile handia du (Jequier eta Crich, 1986).

#### b) Prostata

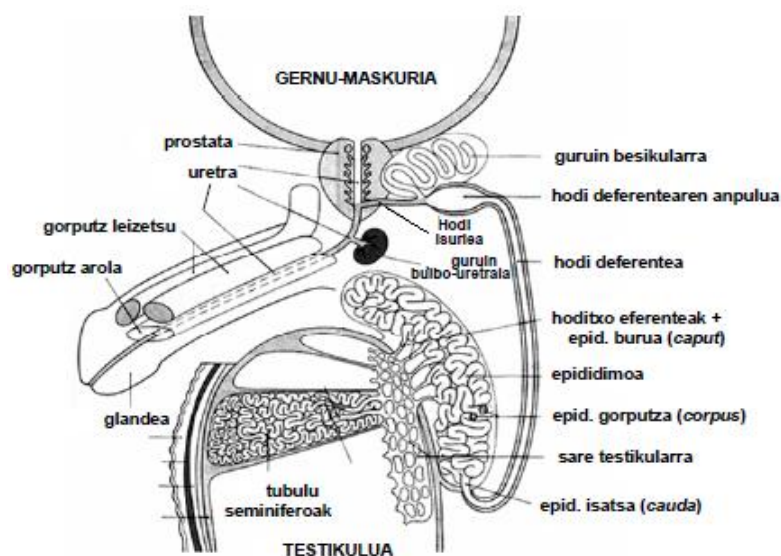
Prostata gernu-maskuriaren azpialdean dagoen guruina da, eta uretrarekin konektatuta dago (Rhoades eta Tanner, 1997). Prostataren jariakin urtsua hazi-likidoaren %13-33 izan ohi da, eta zinkez eta hainbat entzimaz (proteasa, fosfatasa azidoak...) osatua dago. Prostataren jariakin horrek pH azidoa du, eta ugalkortasunean zenbait prozesu garrantzitsu erregulatzen duten prostasoma izeneko mintzezko besikulak ditu (Jequier eta Chrich, 1986). Prostatometan, osagai lipidiko (kolesterola, esfingomielina...), ioi eta molekula txiki ( $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Zn}^{++}$ , GDP, ADP, ATP...) eta proteina ugari (%33,8 entzimak, %19 proteina garraiatzaileak, %17,3 seinaleen transdukziorako proteinak, %14,4 GTP proteinak eta %5,8 proteina txaperonak) identifikatu dira (Utleg eta lank., 2003).

#### d) Guruin bulbo-uretralak

Guruin bulbo-uretralak hazi-likidoari azken bi jariakinak gehitzen dizkio. Hauen funtzio nagusienetakoa euren jariakinen bidez uretraren pH azidoa neutralizatzea da. Bi jariakinek – gelatinakara, alde batetik, eta urtsua, bestetik – hazi-likidoaren % 2-5 osatzen dute, eta glukoproteinatan aberatsak dira (Jequier eta Crich, 1986).

#### 1.1.4 Uretra

Testikuluaren eta kanpo-ingurunearen arteko azken egitura da. Zati prostatikoa, zati membranosoa eta zati arola ditu. Hazi-isurtzea hazia uretratik kanporatzea da (Guyton eta Hall, 2011).

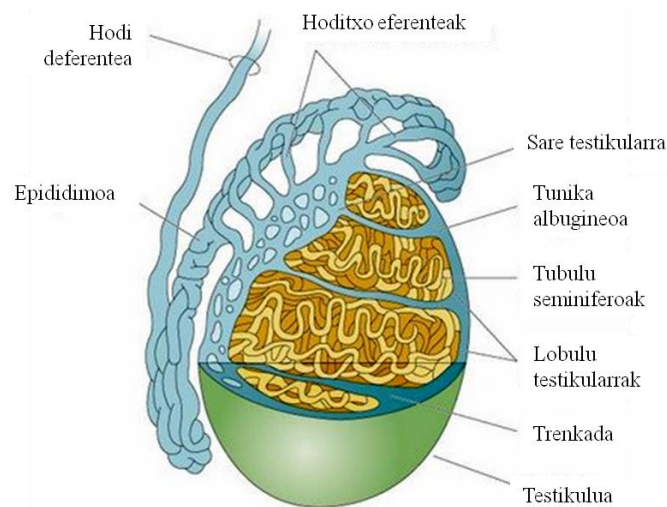


1. irudia: Gizonezkoen ugaltze-aparatuaren atalak. Azalpena testuan. (Debuse, 1998-tik moldatua).

### 1.2 Testikuluaren anatomia fisiologikoa

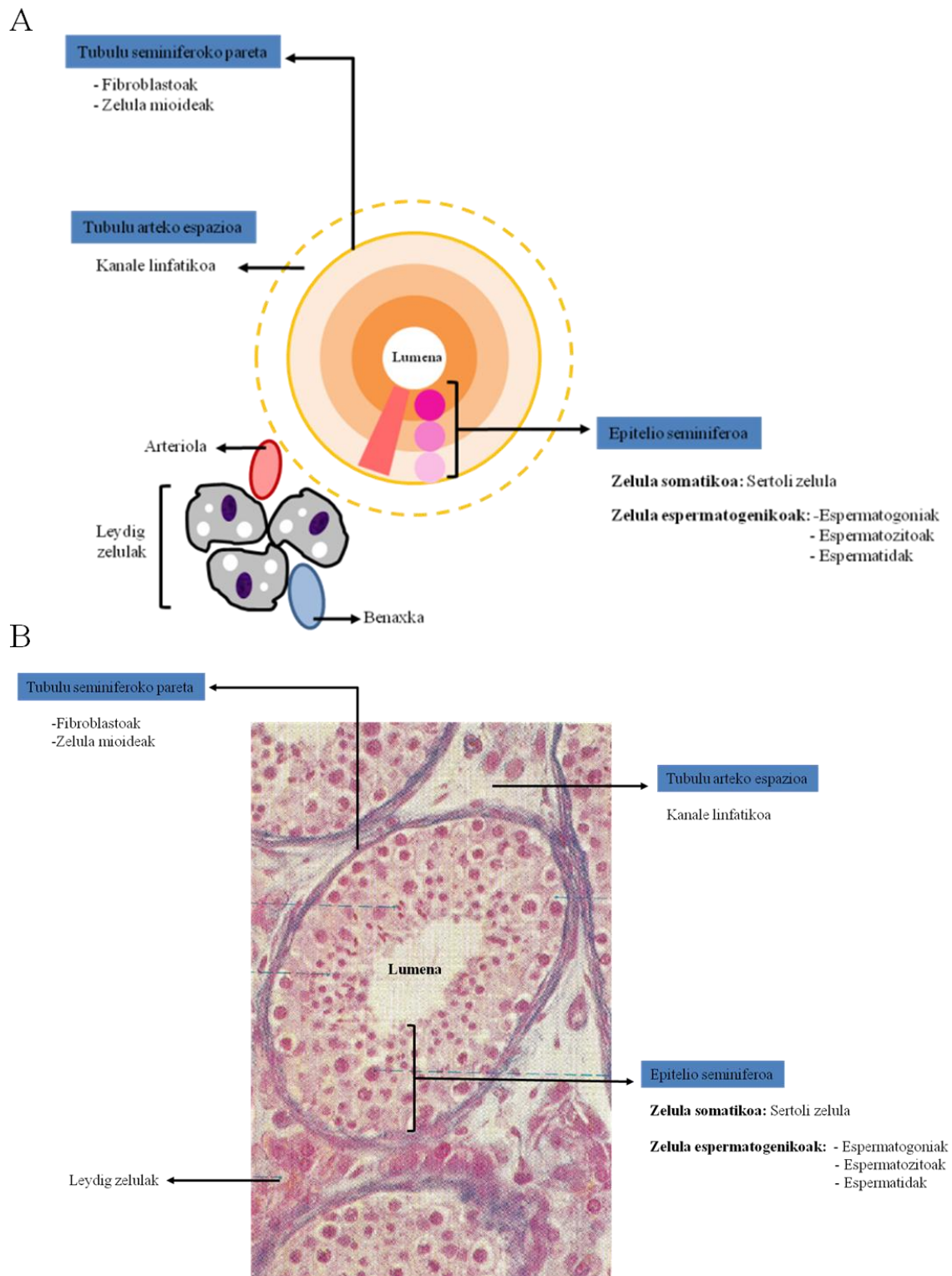
Lehenago azaldu den bezala, testikuluak espermatozoideak sortu eta metatzeko eta androgenoak jariatzeko organo espezializatuak dira. Hauek 300 bat konpartmentutan banatutako lobulu testikularrek osatzen dituzte. Lobulu hauetako bakoitza tunika

albugineoak mugatzen du eta bertan era oso trinkoan paketatutako bizpahiru tubulu seminifero daude. Nahiz eta lobuluek tubuluak banatu, tubulu guztiek sare testikularra deritzon gune biltzailera igortzen dute beren edukia (Rhoades eta Tanner, 1997), eta testikuluetakako hoditxo eferenteetatik epididimora eramaten dute (2. irudia) (Guyton eta Hall, 2011). Tubulu seminiferoeko epitelioa xafla basal eta kolagenozko zuntz, fibroblasto eta zelula mioide uzkurkorrez osatutako pareta batek inguratzen du. Zelula mioide uzkurkorrek geldirik dauden espermatozoideak, lumenean zehar, sare testikularrera bultzatzen dituzte. Espermatozoideak epididimoa zeharkatzen duenean mugitzeko gaitasuna eskuratzen du (Kierszenbaum eta Tres, 2012).



**2. irudia:** Testikuluaren atalak. Azalpena testuan. (Guyton eta Hall, 2011-tik moldatua).

Tubulu seminiferoen artean odol-hodi ugari (arteriolak, kapilarrak eta benaxkak) eta kanal linfatikoak topatzen dira. Honetaz gain, odol- zein linfa-zirkulaziora hertsiki lotuta, androgenoak sintetizatzen dituzten Leydig zelula somatikoak daude (3. A irudia). Aipatu berri diren elementu hauek guztiak tubulu seminifero baten egiazko zehar-ebaki histologikoan ere beha daitezke 3. B irudian (Kierszenbaum eta Tres, 2012).



**3. irudia:** Tubulu seminiferoen antolaketa. A) Tubulu seminiferoen antolaketa orokorraren irudi eskematikoa. (Kierszenbaum eta Tres, 2012-tik moldatua). B) Tubulu seminifero baten zehar-ebaki histologikoa. Tubulu seminiferoa lumenak eta honen inguruko zelula espezializatuak osatzen dute. Honetaz gain, tubulu seminiferoa xafla basal eta kolagenozko zuntz, fibroblasto eta zelula mioide uzkurkorrez eratutako paretak mugatzen du. Tubulu arteko espazioan, besteak beste, kanal linfatikoa eta Leydig zelula somatikoak daude. Mallory-azán, x 240 (Sobotta/Hammersen, 1982-tik moldatua).

### 1.2.1 Zelulak

Arestian aipatu den moduan, tubulu seminiferoa zelula somatiko eta germinalez osatua dago. Jarraian, zelula hauen deskribapena eta funtzioa zein den azalduko da.

#### a) Zelula somatikoak: Leydig eta Sertoli

Leydig zelulak Franz Leydig ikertzaileak deskribatu zituen lehen aldiz 1850. urtean (Weinbauer eta lank., 2010). Zelula somatiko hauek tubulu seminiferoen artean kokatzen dira eta odol- zein linfa-zirkulaziora hertsiki lotuta daude (4. A irudia). Leydig zelulek lipido tantak, gandor tubular bereizgarriak mitokondriak eta ongi garatutako erretikulu endoplasmatico leunak dituzte (Kierszenbaum eta Tres, 2012). Hain zuzen ere, lipido tanta horietan gertatzen dira testosteronaren ekoizpenerako beharrezkoak diren lehen urratsak. Izan ere, testosterona da hozi-zelulen garapen egokirako hormona nagusia (ikus 1.5.1 atala) (Weinbauer eta lank., 2010). Honetaz gain, Leydig zelulen nukleoak forma luzanga, biribila edo obalatua izan dezake. Ugaztun espezie bakoitzak aipatutako egitura hauen guztien artean ezaugarri bereziak erakusten ditu (Molenaar eta lank., 1984).

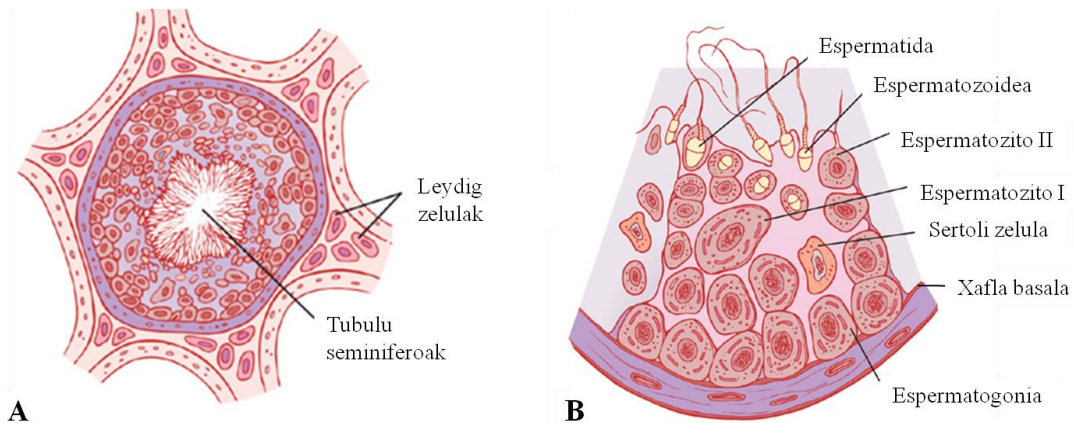
Sertoli zelulak hozi-zelulekin batera daude epitelio seminiferoan eta bertako zelula somatiko bakarrak dira (Chen eta Liu, 2015). Pubertarora arte epitelioko zelula mota nagusiak dira eta, ondoren, euren kopurua %10-era murrizten da. Gizonezko zaharretan, aldiz, hozi-zelulen kopuruak behera egiten duenez, berriro ere, Sertoli zelulak dira epitelioko osagai nagusia (Kierszenbaum eta Tres, 2012). Zelula somatiko hauek egitura zilindrikoa dute eta xafla basaletik tubulu seminiferoako lumenera luzatzen dira zelula espermatogenikoen bitartekari gisa jokatuz. Izan ere, Sertoli zelulek garapen-prozesuan dauden hozi-zelulak bereganatzen dituzte kripta izeneko inbaginazio zitoplasmatikoetan (4. B irudia). Bestalde, Sertoli zelulak epitelio seminiferoan elkarren ondoan kokatzen dira

euren artean lotura estuak sortuz. Lotura hauek direla eta, hesi bat sortzen da odol eta testikuluetakoko zirkulazioa banatuz, honi, odol-testikulu hesia deritzo. Hesi honek bi funtzio nagusi ditu; batetik, berezko ezaugarri antigenikoak dituzten zelula haploideen eta zelula immuneen arteko zatiketa fisikoa bermatzea eta, bestetik, prozesu meiotikorako eta espermatozoideen garapenerako beharrezkoa den ingurunea mantentzea (Weinbauer eta Lank., 2010). Honetaz gain, Sertoli zelulek bestelako funtzio hauek ere betetzen dituzte; 1) garatze-prozesuan dauden zelula espermatogenikoei sostengua, babesa eta elikagaiak ematea, 2) espermiogenesisia amaieran sortzen diren zelulen soberakinak fagozitatzea, 3) espermiazio deritzon prozesuan espermatida helduen askapena erraztea eta, azkenik, 4) lumenera proteina eta ioietan aberatsa den likidoa askatzea (Kierszenbaum eta Tres, 2012).

#### **b) Hozizelulak**

Hozizelulak, edo zelula espermatogenikoak, dira epitelio seminiferoan Sertoli zelulekin batera kokatzen diren zelula espezializatuak. Bi hauen arteko elkarrekintza beharrezkoa da hozizelulak garatu eta haueetatik espermatozoideak sortzeko. Hozizelulen artean, hiru zelula mota bereizten dira, hala nola; espermatogoniak, espermatozitoak eta espermatidak (4.B irudia). Haueetako bakoitzak epitelioan duen kokapena ez da zorizkoa, zehatza baizik. Honela, xafla basaletik gertuen espermatogoniak topatzen dira, ondoren espermatozitoak eta azkenik espermatidak. Hozizelulak garatuz joan ahala epitelioan aurrera egiten dute xafla basaletik lumenerantz eta honetarako ezinbestekoa da Sertoli zelulen ekarpen hormonalak (ikus 1.5.1 atala).





**4. irudia:** Testikuluetako zelulen kokapena. A) Tubulu seminiferotik kanpo dagoen Leydig zelula interstizialen kokapena. B) Tubulu seminiferoko zelula somatiko (Sertoli) eta germinalen (espermatogonia, espermatozito I, espermatozito II, espermatida eta espermatozoidea) kokapena. (Guyton eta Hall, 2011-tik moldatua).

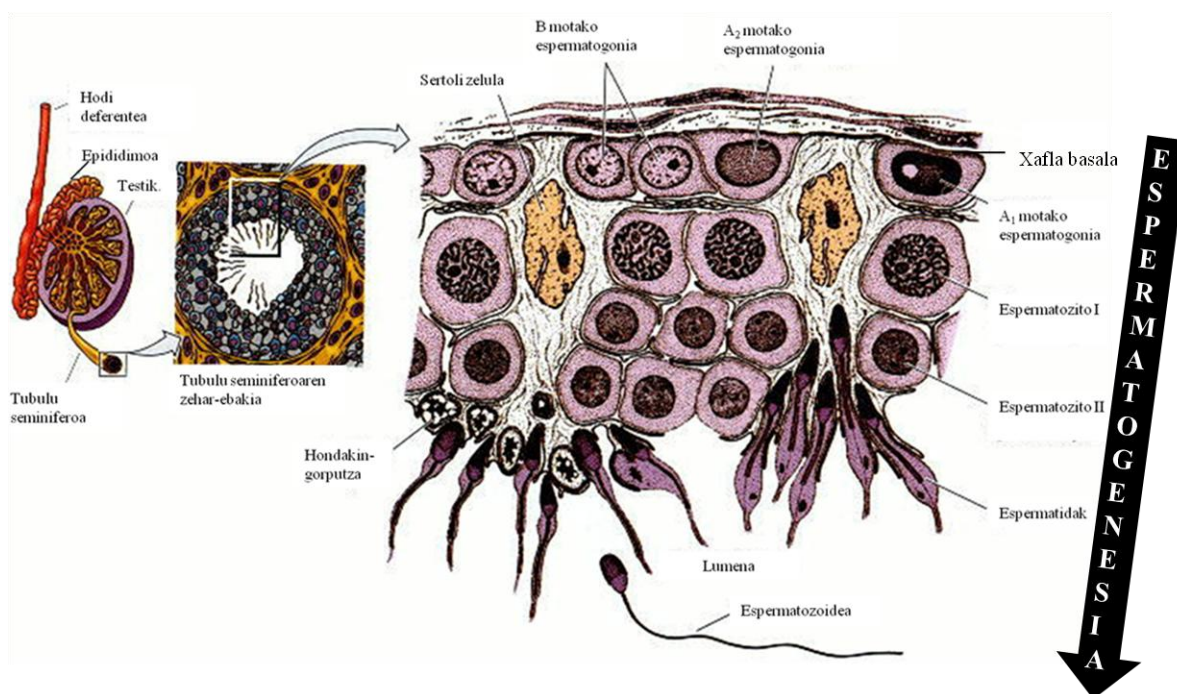
### 1.2.2 Tubulu seminiferoak

Testikulu baten luzerako ebaki bat egiterakoan ikus daiteke hau hainbat barrunbe edo lobuluetan banatzen dela. Lobulu hauetako bakoitzean bizpahiru tubulu seminifero biltzen dira oso modu trinkoan. Tubulu seminifero hauetako bati zehar-ebaki bat eginez gero, honek erdian zulo bat (lumena edo argiunea) duela ikus daiteke. Lumena inguratuz zelula espezializatu ez antolatutako epitelio seminiferoa dago eta, hau, bi zelula populazioz osatzen da: 1) zelula espermatogenikoak (espermatogoniak, espermatozitoak eta espermatidak) eta 2) Sertoli zelula somatikoak (5. irudia). Tubulu seminiferoko bi zelula populazio hauen artean elkarrekintza oso estua dago eta honen ondorioz gertatzen da hozi-zelulen garapen-prozesua edo espermatogenesisia (ikus 1.4 atala).

Garapen mailaren arabera, hozi-zelulek leku zehatza hartzen dute epitelioan. Espermatogoniak dira hozi-zelula guztien artean oinarritzkoenak eta, ondorioz, epitelioaren alderik kanpokoenean kokatzen dira xafla basalarekin kontaktu estua mantenduz. Jarraian, espermatozitoak topatzen dira, hauek epitelioaren erdigunean kokatzen dira Sertoli zelulez inguratuta. Azkenik, epitelioaren barrualdean eta lumenetik gertu espermatida biribilak

daude. Hauek zenbait aldaketa morfologiko jasoko dituzte luzatutako espermatida eta azkenik, espermatozoide bihurtuz. Azken hauek dira lumenean zehar bidaiatuko dutenak sare testikularrera heldu eta hemendik epididimoa zeharkatu arte. Espermatozoideak epididimoa zeharkatzen duenean mugitzeko gaitasuna eskuratzen du (Kierszenbaum eta Tres, 2012) (5. irudia).

Hoji-zelulen garapenerako beharrezkoa da Sertoli zelulen ekintza. Hau dela eta, epitelio seminifero osoan zehar kokatzen dira hozi-zelulak inguratuz (5. irudia).



**5. irudia:** Tubulu seminiferoaren zehar-ebakia. Tubulu seminiferoaren zehar-ebakia gertutik aztertzerakoan epitelioko bi zelula populazio espezializatuak ikus daitezke; Sertoli zelulak eta zelula germinalak (espermatozitoak, espermatozitoak eta espermatidak). (Gilbert SF, 2000 *Developmental Biology*-tik moldatutako irudia).

### 1.3 Estadioen antolamendua tubulu seminiferoetan

XIX. mende amaiera eta XX. mende hasiera artean hozi-zelulen garapen-prozesua, edo espermatogenesisia, aztertzen hasi ziren zenbait ikertzaile (St. George V. la von., 1878;

Brown H.H., 1885; Waldeyer W., 1906; Ebner V. von, 1888; Lenhossek M. von, 1898; Regaud C.; 1901; Duesberg J., 1908; Curtis G.M., 1918). Honetarako arratoien tubulu seminiferoen zehar-ebakiak erabili zituzten. Behatutakoa aztertzean ohartu ziren tubulu seminiferoetan garapen maila jakineko hozi-zelulak behin-behineko konbinazio zehatzetan antolatzen zirela. Honetaz gain, konturatu ziren iragankortasun jakineko hozi-zelula konbinazio horien garapena sinkronikoa zela. Hain zuzen ere, aipatutako ezaugarri hauek (iragankortasuna eta sinkronizazioa) biltzen dituzten hozi-zelulen konbinazio zehatzei zelula-asoziazio edo **estadio** deritze eta zenbaki erromatarrez adierazten dira (Ebner, V. von, 1871; Benda, C., 1887; Fürst, C., 1887; Regaud, C., 1901). Espezie bakar batek estadio bat baino gehiago biltzen ditu bere tubulu seminiferoan eta estadio guztiak dira beharrezkoak hozi-zelulen garapen egokirako. Bestalde, espezie batetik bestera estadio kopurua aldatzen da ( ikus 6. eta 7. irudiak) (Russell eta lank., 1990).

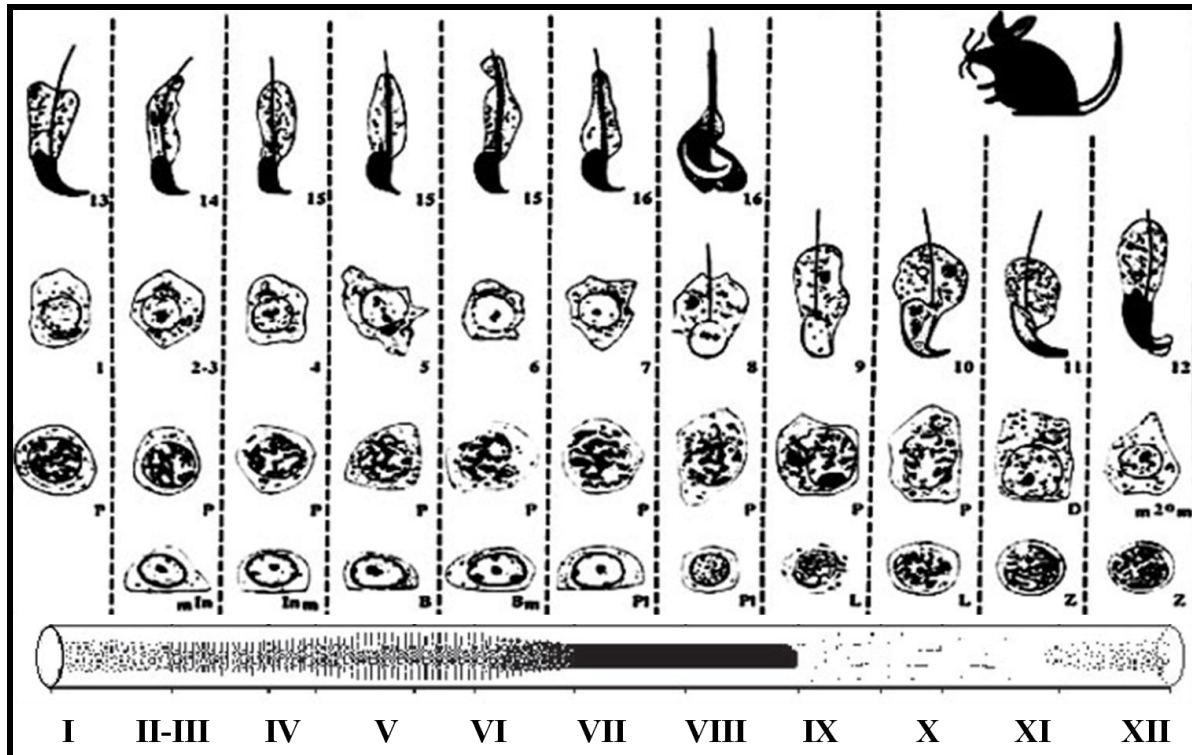
Tubulu seminiferoeko lokalizazio zehatz batean estadio guztiak segidan gertatzen dira ziklikoki errepikatzen den sekuentzia edo estadioen ziklo bat osatuz. Izan ere, hainbat ziklo behar dira espermatida heldua sortu eta lumenera askatu ahal izateko (Russell eta lank., 1990; Kierszenbaum eta Tres, 2012). Estadioen kopuruarekin gertatzen den bezala, espeziearen arabera zikloen kopurua ere aldatzen da. Beraz, ziklo bakar batean estadio guztiak elkarren segidan antolatzen direla eta hau ziklikoki errepikatzen dela jakinik, erraz uler daiteke tubulu seminiferoeko toki zehatz batean hozi-zelulen belaunaldi guztiak aldi berean egotea. Izan ere, hozi-zelula belaunaldi jakin baten garapena bere aurreko eta ondorengo belaunaldien garapenarekin batera gertatzen da aldi berean eta, ondorioz, belaunaldiak gainjarri egiten dira. Gainjarpen hauen ondorioz ikusten dira, hain zuzen ere, tubuluetako zehar-ebakietan aipatutako zelula konbinazio zehatzak (ikus 6. eta 7. irudiak) (Kierszenbaum eta Tres, 2012).

Nahiz eta hozi-zelulak ez diren tubuluko luzeran zehar mugitzen, badago estadio hauek sailkatzeko beste irizpide bat. Irizpide hau denbora parametroa distantziarengatik aldatzean datza. Beraz, kasu honetan, estadioen sailkapena tubulu seminiferoeko luzeraren arabera definitzen da (Russell eta lank., 1990). Zenbait ikertzailek arratoien tubulu seminiferoetako luzerako ebakiak egin zituzten hozi-zelulen desberdintze-prozesua, edo espermatogenesisia, tubuluetako luzeran zehar deskriba zitekeen jakiteko (Perey eta lank., 1961). Ikerketa hauetan tubuluetako ardatz longitudinalean zehar iragankortasun jakineko hozi-zelulen konbinazio zehatzak topatu zituzten. Gainera, hozi-zelula konbinazio bakoitzaren garapena tubuluaren luzeran zehar sinkronikoa zela ere ikusi zuten. Tubuluko ardatz longitudinalean topatutako zelula-asoziazio hauek segmentu gisa izendatu zituzten. Estadioekin gertatzen den bezala, hauek ere zenbaki erromatarrez adierazten dira. Hau honela izanda, eta ezaugarri berberak (iragankortasuna eta sinkronizazioa) biltzen dituztela ikusita, lan honetan segmentuak eta estadioak parekotzat hartzen dira. Beraz, hemendik aurrera estadioak aipatzerakoan luzerako tubulu seminiferoen segmentuez ari garela kontuan hartu beharko da. Kasu honetan ere, tubulu seminiferoeko estadio kopurua espeziearen araberakoa da (Russell eta lank., 1990).

### **1.3.1 Saguen estadioen antolaketa tubulu seminiferoetan**

Lehenago esan bezala, espezie bakoitzak estadio kopuru ezberdina du, honetaz gain, estadio guztiek osatutako zikloen kopurua ere ezberdina izan ohi da espermatozoide heldua sortu eta lumenera askatu ahal izateko.

Saguen kasuan tubulu seminiferoeko ziklo batek 12 estadio (I-XII) ditu eta espermatozoide helduak sortu eta hauek lumenera askatzeko 8.8 ziklo beharrezkoak dira (6. irudia) (Russell eta lank., 1990). Ondoren azaltzen den taulan (1. taula) saguen epitelio seminiferoeko estadio bakoitza definitzeko erabilitako irizpideen ezaugarriak adierazten dira.



**6. irudia:** Saguen estadiokako zikloen mapa. Zenbaki erromatarrez 12 estadioak (I-XII) adierazten dira. Kasu honetan II eta III estadioak bakar batean elkartu dira. Marra eten bertikalek hozi-zelula mota ezberdinen konbinazioak edo estadioak mugatzen dituzte. Hozi-zelula baten garapen-maila edo urratsa horizontalki aztertzen da beheko ezker muturretik hasita goiko eskuin muturrera arte. (Russell eta lank., 1990-tik moldatutako irudia).

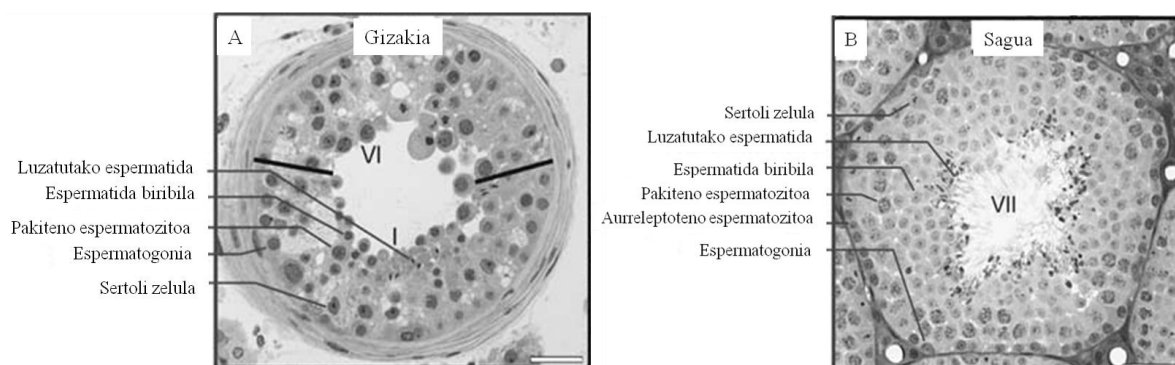
**1. taula:** Saguen tubulu seminifero luzeako estadioen ezaugarri-etaula. Azaldutako estadioen irizpide bakoitza saguen estadiokako zikloen mapan (6. irudia) irudikatuta ikus daiteke.

<b>Saguen epitelio seminifero estadioen sailkapenerako irizpideak</b>	
<b>ESTADIOAK</b>	<b>IRIZPIDEAK</b>
<b>I</b>	Pakiteno (P) faseko espermatozitoak; 1 eta 13 urratseko espermatidak.
<b>II-III</b>	Bitarteko espermatogoniak (mIn); pakiteno (P) faseko espermatozitoak; 2-3 eta 14 urratseko espermatidak.
<b>IV</b>	Zatiketa mitotikoa pairatzen duen bitarteko espermatogonia (Inm); pakiteno (P) faseko espermatozito I; 4 eta 15 urratseko espermatidak.
<b>V</b>	B motako espermatogoniak (B); pakiteno (P) faseko espermatozito I; 5 eta 15 urratseko espermatidak.
<b>VI</b>	Zatiketa mitotikoa pairatzen duen B motako espermatogonia (Bm); pakiteno (P) faseko espermatozito I; 6 eta 15 urratseko espermatidak.
<b>VII</b>	Aurreleptoteno (Pl) eta pakiteno (P) faseko espermatozito I; 7 eta 16 urratseko espermatidak.
<b>VIII</b>	Aurreleptoteno (Pl) eta pakiteno (P) faseko espermatozito I; 8 eta 16 urratseko espermatidak.
<b>IX</b>	Leptoteno (L) eta pakiteno (P) faseko espermatozito I; 9 urratseko espermatida.
<b>X</b>	Leptoteno (L) eta pakiteno (P) faseko espermatozito I; 10 urratseko espermatida.
<b>XI</b>	Zigoteno (Z) eta diploteno (D) faseko espermatozito I; 11 urratseko espermatida.
<b>XII</b>	Zigoteno (Z) faseko espermatozito I; bigarren zatiketa meiotikoa pairatzen duen espermatozito II (m <sup>2</sup> m); 12 urratseko espermatida.



**2. taula:** Gizonezkoen tubulu seminiferoen luzerako estadioen ezaugarri-etaula. Azaldutako estadioen irizpide bakoitza gizonezkoen estadiokako zikloen mapan (7. irudia) irudikatuta ikus daiteke.

<b>Gizonezkoen epitelio seminiferoen estadioen sailkapenerako irizpideak</b>	
<b>ESTADIOAK</b>	<b>IRIZPIDEAK</b>
<b>I</b>	A motako (Dark A , Pale A) eta B motako (B) espermatogoniak; pakiteno (P) faseko espermatozito I; espermatida goiztiarra (Sa) eta berantiarra (Sd).
<b>II</b>	A motako (Dark A , Pale A) eta B motako (B) espermatogoniak; pakiteno (P) faseko espermatozito I; espermatida goiztiarra (Sa) eta berantiarra (Sd); hondakin-gorputzak (Rb).
<b>III</b>	A motako (Dark A , Pale A) espermatogoniak; aurreleptoteno (Pl) eta pakiteno (P) faseko espermatozito I; espermatida goiztiarra (Sb).
<b>IV</b>	A motako (Dark A , Pale A) espermatogoniak; leptoteno (L) eta pakiteno (P) faseko espermatozito I; espermatida goiztiarra (Sb).
<b>V</b>	A motako (Dark A , Pale A) espermatogoniak; leptoteno (L) eta pakiteno (P) faseko espermatozito I; espermatida berantiarra (Sc).
<b>VI</b>	A motako (Dark A , Pale A) espermatogoniak; zigoteno (Z) faseko espermatozito I; espermatozito II (II); espermatida berantiarra (Sc).



**8. irudia:** Tubulu seminiferoen zehar-ebakiak ugaztun espezie ezberdinetan. Gizakiaren (A) zehar-ebakiak bi estadio erakusten ditu plano berean, aldiz, saguaren (B) argazkian estadio bakarra bereizten da. A irudiko I estadioa espermatidaren belaunaldiek (luzatutakoa eta biribila), pakiteno espermatozitoek eta espermatogoniek osatzen dute. B irudiko VII estadioa, berriz, espermatida zein espermatozito belaunaldi ezberdinek eta espermatogoniek osatzen dute. Eskala-barra, 40  $\mu$ m. (Hess eta Renato de Franca, 2008-tik moldatutako argazkia).



## 1.4 Espermatogenesisia: gameto arren garapena

Zelula ama germinaleatik espermatozoideetara doan desberdintze-prozesua da espermatogenesisia. Prozesu hori testikuluetan gertatzen da, tubulu seminiferoetan hain zuzen ere, eta bizitza osoan mantenduko da nahiz eta zahartzaroan urritze txiki bat nabaritzen den (Sadler, 2004).

Zelula espermatogenikoek 3 fasetan bereizten diren aldaketak pairatzen dituzte espermatogenesisian zehar. Esate baterako, espermatogoniek etengabeko zatiketa mitotikoak pairatzen dituzte (espermatozitogenesisia), espermatozitoek zatiketa meiotikoak eta espermatiden populazioak, aldiz, espermiogenesisia deritzon desberdintze prozesua jasaten dute (9. irudia) (Dudeck eta Fix, 2004).

### 1.4.1 Espermatozitogenesisia

Hozizelulen fase ugalkorrari deritza. Zelula germinatibo primordialak (46, 2c), bitelozakuaren paretetan agertzen dira garapen enbrionarioan zehar eta, zatiketa mitotikoak jasaten dituzten bitartean, mugimendu ameboideen bidez, gonadetara heltzen dira. Pubertaroan, zelula germinatibo primordialak A motako espermatogonio (46, 2c) bihurtzen dira. A motako espermatogoniek zatiketa mitotikoak pairatzen dituzte etengabe, arra zelula amez hornitzeko. Zatiketa bakoitzean ezaugarri bereizgarriak dituen espermatogonia berri bat sortzen da. Espermatogonien artean hiru talde bereizten dira; 1) ama-zelulak, 2) espermatogonia ugalkorrak eta, azkenik, 3) espermatogonia desberdintzatuak. Azken talde honetan, aurrerago aipatuko diren B motako espermatogoniak (46, 2c) daude (Russell eta Lank., 1990).

Espermatogoniak tubulu seminiferoeko alderik kanpokoenean kokatzen dira. Hauen azaleraren zati bat xafra basalarekin kontaktuan dago eta beste zati bat, berriz, Sertoli zelula

somatikoekin kontaktuan mantentzen da. Espermatogonien heltze prozesua zubi zitoplasmatikoen bitartez lotuta mantentzen direlako gertatzen da. Zubi hauei esker, espermatogonien garapena sinkronizatuta mantentzen da eta, beraz, ondoren datozen zelula belaunaldien garapen prozesua ere sinkronizatua mantentzea lortzen da. Jakina denez, egunero milioika espermatozoide ekoizten dira arren testikuluetan eta, hau, hainbat espermatogonien ama-zelulen aldi bereko lanaren emaitza da (Russell eta lank., 1990).

### 1.4.2 Meiosia

B motako espermatogoniak lehenengo meiosian sartzen dira eta, DNA bikoizten dutenean, espermatozito primario bihurtzen dira (46, 4c).

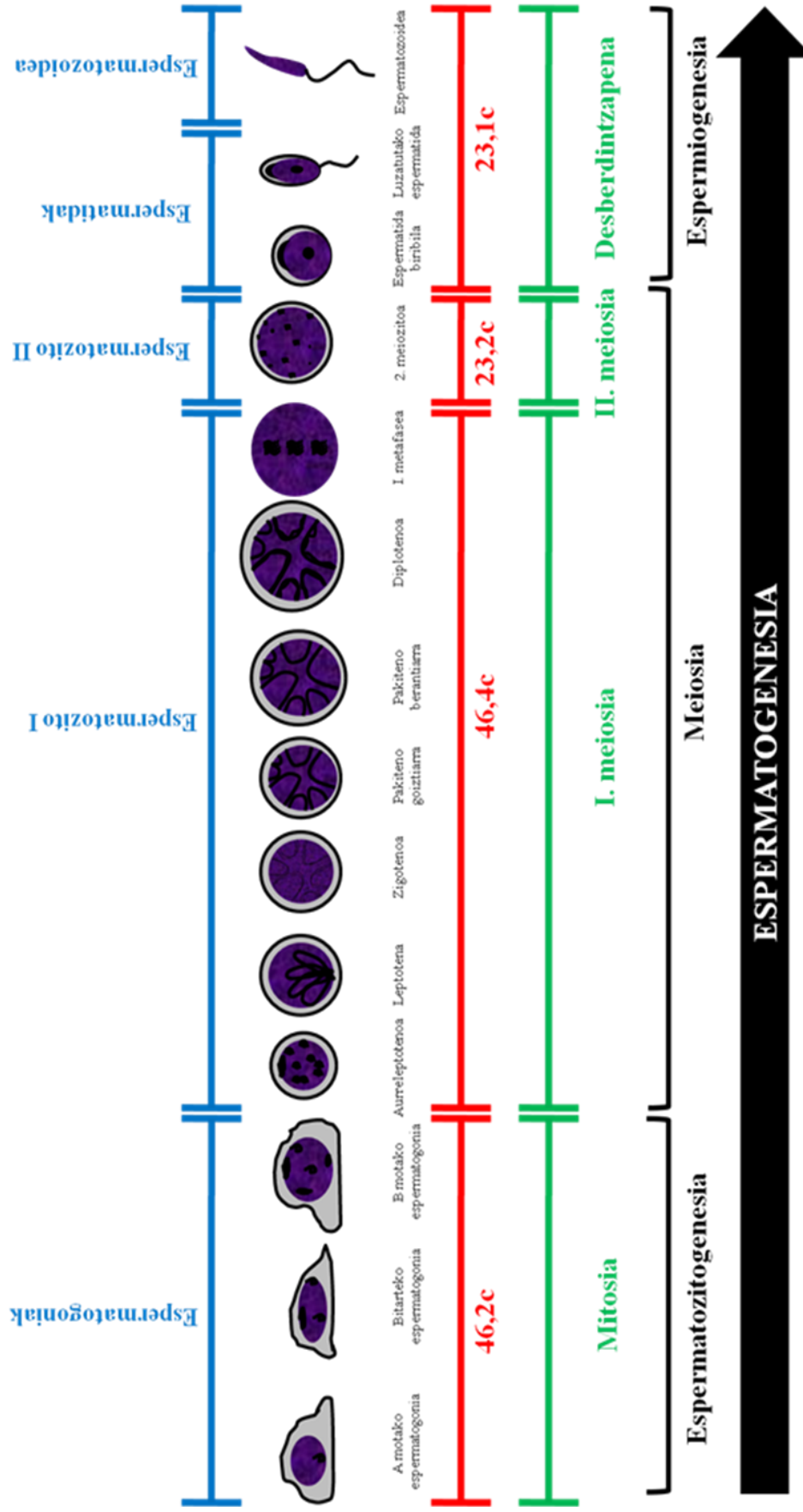
Lehen zatiketa meiotikoa profase luzea izateagatik bereizten da. Lehen zatiketa meiotikoko profaseak honako azpifaseak ditu: leptotenoa, zigotenoa, pakitenoa, diplotenoa eta diakinesia. Aipatu berri diren azpifase hauek lau oinarritzko gertakariak bereizten dituzte; 1) konplexu sinaptonemala sortzen da kromosoma homologoen arteko sinapsi edo elkarketa errazteko, 2) sinapsia edo kromosoma homologoen arteko elkarketa, 3) kromosoma homologoen kromatida ez-ahizpen arteko geneen informazio-trukea (gurutzamendua) eta 4) gurutzatutako kromosoma homologoen banaketa (Kierszenbaum eta Tres, 2012).

Espermatozito primario horiek lehenengo meiosia bukatzen dute, eta bakoitzak 2 espermatozito sekundario sortzen ditu (23, 2c).

Espermatozito sekundario horiek, bigarren meiosia eginda, bakoitzak 2 espermatida sortzen ditu (23, 1c). Bigarren zatiketa meiotikoa lehen zatiketa baino azkarragoa da, izan ere, ez da DNA bikoizketarik ezta materiala genetikoaren konbinaketarik gertatzen.

### 1.4.3 Espermiogenesisia

A motako espermatogoniek espermatogenesisia egiten hasten direnetik espermatidak sortu arte, zitozinesia osatugabea da. Hori dela eta, zelula batetik eratorritako zelula-klon luzeak zubi zitoplasmatikoen bidez lotuak agertzen dira. Zelula germinatibo heldu (espermatozoideak) independente bilakatzeko, espermatidek zenbait aldaketa morfologiko pairatzen dituzte. Aldaketa horiek, besteak beste, hauek dira: akrosoma garatzea, nukleoa kondentsatzea, zitoplasmaren zati nagusia desagertzea eta burua, erdiko zatia eta isatsa eratzea. Prozesu honetatik gelditzen den zitoplasma soberakina Sertoli zelulek fagozitatzen dute espermiazioa hasten denean. Nukleoaren kondentsazioa histona somatikoak arginina eta lisinan aberatsa den protaminengatik ordezkatzean datza. Honek espermiogenesisi prozesuaren amaiera adierazten du. Ordezkapen honek espermatozoideetako geneen DNA egonkortu eta babesten du (Kierszenbaum eta Tres, 2012). Dena den, espermatozoide horiek ez dute ernaltzeko gaitasunik emearen ugaltze-traktuan ernaltzeko gaitasuna lortu arte.



**9. irudia: Espermatogenesisaren irudi eskematiko a.** Zelula germinaleatik eratortako A motako espermatozoidak, espermatogenesisa prozesuaren lehenengo zelulak dira. Zehulen zatiketaren bidez zehula-klonak eratzten dira eta zelula berri horiek guztiak, zubi zitoplasmatikoen bidez, lotuak geratzen dira espermatozoidak hondakin-gorputzetatik banatzen diren arte. Espermatogenesisian parte hartzen duten hozi-zelula mota ezberdinen izen generikoak marrakiazko goiko aldean adierazi dira (urdinez). Desberdintze-prozesuan zehar zelulen DNA kopurua (gorriz) eta honekin bat datozen faseen izenak (berdez) ere azaldu dira. Hauen azpian espermatogenesisaren hirur zat nagusiak daude (espermatozitozogenesisa, meiosis eta espermiogenesisa).

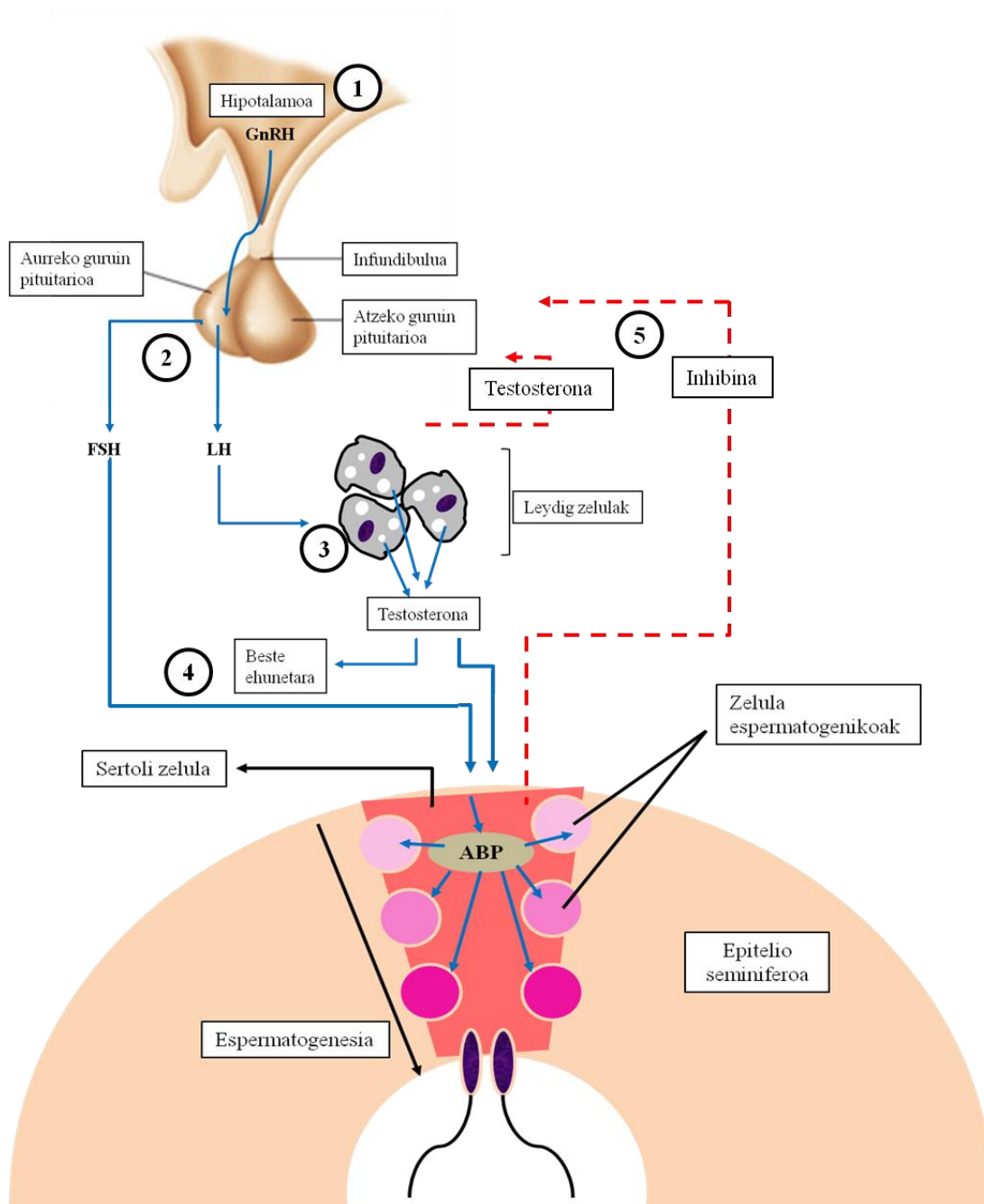
## 1.5 Espermatogenesiaren erregulazioa

### 1.5.1 Espermatogenesiaren erregulazioa hormonon bidez

Lehenago esan bezala, espermatogenesisia zelula ama germinaleetatik espermatozoideetara doan desberdintze-prozesua da. Honetarako, beharrezkoa da hozi-zelulen garapenak iraupen jakina eta sinkronizatua izatea. Hau dela eta, espermatogenesiaren hormona bidezko erregulazioa gertatzen da ardatz hipotalamo-hipofisarioaren bitartez. Hipotalamoak hormona gonadotropina-askatzailea (GnRH- *gonadotropin release hormone*) jariatzen eta hau, odolean zehar garraiatzen da aurreko guruin pituitariora (10. irudia 1). Bertan GnRH zelula gonadotropikoen GnRH hartzaileekin (GnRH- *GnRH receptor*) lotu eta ondorioz, gonadotropinak askatzen dira: hormona luteinizatzailea (LH- *luteinizing hormone*) eta hormona folikulu-estimulatzailea (FSH- *follicle stimulating hormone*) (10. irudia 2) (Weinbauer eta lank., 2010).

LH Leydig zelulen mintzeko LH hartzaileetara (LHR- *LH receptor*) lotu (Simoni eta lank., 1997) eta, ondorioz, testosterona ekoiztu eta jariatzen da (10. irudia 3) (Lei eta Rao, 2001; Sriraman eta lank., 2005). Jariatutako testosteronaren proportzio bat testikulueta kanal linfatikoan gelditzen da eta gainontzekoa odol-zirkulazioan zehar beste organoetara (burmuinera, giltzurrunetara eta muskuluetara, besteak beste) garraiatzen da (Weinbauer eta lank., 2010). Kanal linfatikoan barreiatuta gelditzen den testosterona, berriz, epitelio seminiferoan sartzen da. Hain zuzen ere, testosterona da testikulueta espermatogenesisia erregulatzen duen hormona nagusia, bere kontzentrazioaren arabera egiten baitu aurrera zelula espermatogenikoen desberdintzapen prozesuak. Odol eta testikulueta testosterona kontzentrazioa alderatuz azken honena 80 aldiz altuagoa dela behatu da (Coviello eta lank., 2005). Zehazki, Leydig zeluletan, testosterona kontzentrazio altua konstante mantentzen da androgeno hartzaileei (AR- *androgen receptor*) esker. Izan ere, hartzaile hauen adierazpena

konstante mantentzen da Leydig zeluletan eta, ondorioz, pentsa liteke testosteronaren seinalea etengabe adierazten dela zelula hauetan (Rey eta lank., 2009).



**10. irudia:** Espermatogenesiaren hormona bidezko erregulazioaren irudi eskematikoa. Gezi urdinez espermatogenesiaren bidezidor estimulatzaileak adierazi dira, aldiz, kolore gorri etenez bidezidor inhibitzaileak. Hipotalamoan GnRH jariatzen da (1) eta honek, aurreko guri pituitarioa estimulatzen du bertako FSH eta LH askatuz (2). Leydig zeluletan LH-ren estimulazioz testosterona ekoiztu eta kanporatzen da (3). FSH-aren estimulazioaz, berriz, ABP-a sintetizatzen da Sertoli zeluletan (4). LH eta FSH-ak erregulazio prozesuan negatiboki eragin dezakete hipotalamoko GnRH jariatpena geldiaraziz (5).

Testosteronak espermatogenesisian duen eragina FSH-ren laguntzarekin indartzen da. Izan ere, FSH Sertoli zeluletan dauden FSH-rekiko espezifikoak diren hartzaileekin lotzen da (FSHR- *FSH receptor*) seinale sekuentzia bat askatuz eta, ondorioz, ABP-a (androgenoak lotzen dituen proteina-*androgen-binding protein*) sintetizatuz (10. irudia 4). ABP-androgeno konplexuak zelula espermatogenikoen inguruan testosterona kontzentrazioa altu mantentzen du espermatogenesisia modu egokian gertatzen dela ziurtatuz (Kierszenbaum eta Tres, 2012). Bestalde, aipatu berri den konplexuaz gain, Sertoli zeluletan kokatzen diren AR-ek ere laguntzen dute testosterona kontzentrazioa altu mantentzen. Kasu honetan testosterona AR-ri lotzen zaio eta, ondorioz, azken honek Sertoli zelulen nukleoan zenbait geneen itzulpena erregulatzen da. Hau dela eta, zenbait proteinen maila erregulatzen da espermatogenesisirako beharrezkoak diren baldintzak mantenduz (Smith eta Walker, 2014). Honetaz gain, FSH-k Sertoli zelulen zatiketa zelularra ere estimulatu du (Meachem eta lank., 2005).

Bestalde, androgenoek ere espermatogenesisian eragin negatiboa izan dezakete. Erregulazio negatibo honi atzeraelikadura edo feedback negatiboa deritzaio eta, bertan, aipatu berri diren bi sexu hormonek jokatzen dute. Hauetako bakoitzak feedback erregulazio prozesu bereiz eta independentea du: LH-testosterona ardatza eta FSH-inhibina ardatza. Bi ardatz hauen erregulazio negatiboa dela eta hipotalamoko GnRH jariapena gelditzen da (10. irudia 5). Zehazki, LH-testosterona ardatza organismoan, testosterona kontzentrazio altuegia pilatzen denean aritzen da. Kasu honetan testosterona bera da negatiboki GnRH askapena ekiditen duena. Aldiz, FSH-inhibina ardatza espermatozoideen ekoizpen-maila handiegia denean aritzen da (Schlatt eta Ehmcke, 2014). FSH-ak Sertoli zelulen bidez inhibina proteina erregulatzailerik sintetizatzen du. Azken honek testosteronaren modu berean jokatzen du, hipotalamoko GnRH jariapena geldiaraziz (Kierszenbaum eta Tres, 2012).

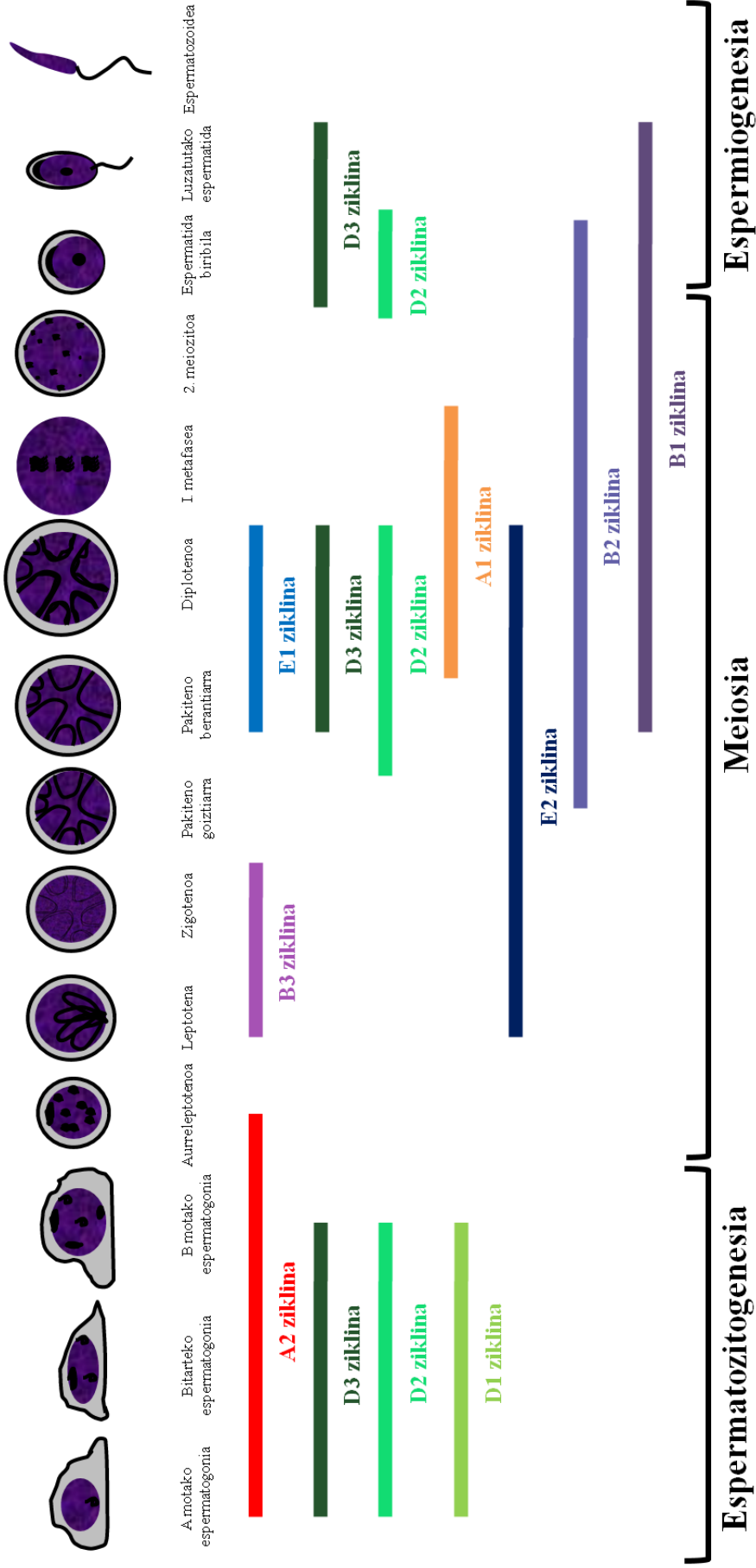
### 1.5.2 Espermatogenesiaren erregulazioa ziklinen bidez

Zelula berrien ekoizpenerako, beharrezkoa da hauek euren DNA bikoiztu eta bi zelula-alabetan banatzea. Honetarako, ziklo zelularren erregulazioa ezinbestekoa da. Hain zuzen ere, ziklo zelularren funtzio garrantzitsuenetako bat da geneen egonkortasuna mantentzea zelula berrien sorrera prozesuan. Beraz, ziklo zelularra kontrolatzen duen makineria zelular honek, DNAREN bikoizketa modu egokian gertatu dela eta beharrezkoak diren konponketen ostean informazio genetikoak zelula belaunaldi berrietan ongi banatu dela ziurtatzen du. Aipatutako makineria zelular hau, besteak beste, ziklina izeneko proteina erregulatzailerak eta euren azpi-unitate katalitikoak diren ziklina-menpeko kinasek (*Cdk-cyclin-dependent kinase*) osatzen dute (Bloom eta Cross, 2007; Blow eta Dutta, 2005; Malumbres eta Barbacid, 2005; Möröy eta Geisen, 2004; Satyanarayana eta Kaldis, 2009; Wolgemuth, 2011).

Ugaztunetan ziklo zelularra erregulatzen duten lau ziklina mota nagusi deskribatu dira; A, B, D eta E motako ziklinak (Wolgemuth eta lank., 2013). Hauek, era berean, azpi-mota gehiagotan banatzen dira eta guztiek hartzen dute parte espermatogenesia bezalako desberdintze-prozesuaren erregulazioan (11. irudia).

Jarraian, aipatu berri diren lau ziklina moten inguruko informazioa azalduko da. Hauek zehazki espermatogenesiaren zein urratsetan parte hartzen duten eta betetzen duten funtzioaren inguruko informazioa adieraziko da, besteak beste (ikus 3. taula).





11. irudia: Ziklinen adierazpena ugaztunen espermatogenesisian zehar. Koloretako barek ziklina bakoitzak zelula mota ezberdinen adierazpena erakusten du mRNA eta proteina mailan. (Wolgenuth eta Roberts, 2010-tik moldatua).

### a) A motako ziklinak

Ugaztunen A motako ziklinak sakonki aztertu izan dira lerro zelular somatikoetan, aldiz, hauen adierazpen-patroia hozi-zeluletan ez da oso ezaguna. Beste ziklina batzuekin gertatzen ez den bezala, A motako bi ziklinak (A1 eta A2) beharrezkoak dira zelula mitotiko zein meiotikoen ziklo zelularrean (Wolgemuth, 2011). Hauen adierazpen-patroia espermatogenesisian zehar aldakorra dela behatu da (Ravnik eta Wolgemuth, 1999; Sweeney eta lank., 1996; Wolgemuth, 2008) A ziklina mota bakoitzak erregulazio prozesuan beharrezkoak diren elementuak dituela adieraziz (Wolgemuth eta lank., 2013).

#### *A1 ziklina*

A1 ziklinaren genea (*Ccna1*) izan zen bien artean topatu zen azkena eta bere adierazpena espezifikoa da arren hozi-zeluletan (Ravnik eta Wolgemuth, 1996; Sweeney eta lank., 1996). Bere gabeziak antzutasuna dakarrela behatu da (3. taula) (Liu eta lank., 1998<sub>a,b</sub>). Zehazki, A1 ziklinaren mRNA eta proteina, pakiteno eta diploteno fasean dauden espermatozitoetan adierazten da (11. irudia) (Sweeney eta lank., 1996). Azterketa zitologiko eta histologikoek erakutsitakoaren arabera, A1 ziklinaren adierazpenik azaltzen ez duten espermatozitoen garapena diploteno fasean gelditzen da (Liu eta lank., 1998<sub>a</sub>; Nickerson eta lank., 2007). Zenbait ikerketen arabera, A1 ziklina beharrezkoa da espermatozitoen lehen profase berantiarretik lehen metafaserako trantsizioan (Wolgemuth eta lank., 2013). A1 ziklinarik gabeko saguekin (*knockout* saguekin) egindako esperimentuetan ikusi da ziklina honek fetuaren garapenean ez duela eraginik. Ordea, ondorengoen ugalkortasunean eragina du (Liu eta lank., 1998<sub>a</sub>; van der Meer eta lank., 2004). Hau dela eta, zelula hauek ziklo zelularren I. metafasearekin jarraitu beharrean, apoptosia pairatzen dute (Liu eta lank., 1998<sub>a</sub>; Salazar eta lank., 2005).

### *A2 ziklina*

A2 ziklina genearen (*Ccna2*) adierazpen-patroia, *Ccna1*-en aldean, zabalagoa da. Izan ere, zatiketa mitotikoa pairatzen duten hainbat ehunetako zeluletan adierazten da. Kasu honetan ez da behatu ziklina honen gabeziak ugalkortasunean inolako eragina izan dezakeenik. Ikerketen arabera A2 ziklinaren adierazpena A motako espermatogonietatik B motako espermatogonietara hedatzen da (11. irudia). Espermatogonia mota ezberdinen artean A2 proteinaren tindaketaren intentsitatea aldatzen dela behatu da, honek, garapen zelularrean zehar proteina kopuru ezberdina pilatzen dela erakusten du (Wolgemuth eta lank., 2013). Funtzionamenduari dagokionez, *knockout* saguetan ikusi da gene honen gabeziak heriotza enbrionarioa dakarrela (3. taula) (Murphy eta lank., 1997). Beraz, gene hau enbrioaren garapenerako beharrezkoa dela esan liteke.

### **b) B motako ziklinak**

B motako ziklina ugari deskribatu dira izaki bizidunetan, zehazki, ornodunetan hiru B ziklina mota definitu dira: B1, B2 eta B3. Saguen B1 eta B2 ziklinak kodifikatzen dituzten geneek homologia handia erakusten dute bestelako animalien (euli, zizare, igel eta ugaztunen) B motako ziklinen geneekin (Wolgemuth eta lank., 2013). Bestalde, B3 ziklina kodifikatzen duen geneak ez du aurretik aipatutako ziklinen geneekin inongo antzekotasunik. Gaur egun, B ziklinen funtzioa espermatogesian zehar, ez da guztiz ezagutzen (Wolgemuth eta lank., 2013).

### *B1 ziklina*

B1 ziklina zelula mitotikoak dituzten organo gehienetan adierazten dira. Bere adierazpena, testikuluetan izan ezik, B2 ziklinarena baino handiagoa da. Izan ere, testikuluetan bi ziklina hauen adierazpena nahiko antzekoa da (Brandeis eta Hunt, 1996).

Ugalkortasunari dagokionez, ezin esan daiteke ziklina honen faltak inolako eraginik duenik. B1 ziklina genea (*Ccnb1*) espermatozitoetan adierazi arren, nagusiki meiosi ondorengo espermatidetan topatzen da (11. irudia) (Chapman eta Wolgemuth, 1992). B motako ziklinen funtzioa espermatogenesisian oraindik guztiz ulertzen ez den arren (Wolgemuth eta lank., 2013), uste da B1 ziklina beharrezkoa dela saguen enbrioien garapenerako. Izan ere, B1 gabeko sagu enbrio guztiak hil egiten dira hamargarren egunerako (3. taula) (Brandeis eta lank., 1998).

### *B2 ziklina*

B1 ziklina bezala, B2 ziklina ere zelula mitotikoak dituzten organo gehienetan adierazten da. Lehen esan bezala, organo gehienetan B2 ziklinak adierazpen baxuagoa erakutsi arren testikuluetan antzekoa dute (Brandeis eta Hunt, 1996). Bestalde, bere gabeziak ez du arren ugalkortasunean eraginik (3. taula) (Chapman eta Wolgemuth, 1992; Brandeis eta lank., 1998). B2 ziklina genea (*Ccnb2*) profasean, bereziki, pakiteno eta diplotenoan zehar adierazten da (11. irudia). Espermatiden fase goiztiarretan ere mRNA topatu izan da (Chapman eta Wolgemuth, 1992). Lehen esan bezala, ziklina honen galerak ez dakar ondorio larririk orain arte behatutako saguen bideragarritasunean eta, bai ar, bai eta emeak ere, ugalkorrek dira (Brandeis eta lank., 1998).

### *B3 ziklina*

B3 ziklina *Drosophila*-ren zelula mitotiko eta meiotikoetan adierazten da (Jacobs eta lank., 1998) eta emeen ugalkortasunean ezinbestekoa dela ikusi da. Bestalde, sagu arretan, ziklina honen erregulazio desegoki batek antzutasuna ondoriozta dezake (3. taula) (Nguyen eta lank., 2002; Refik-Rogers eta lank., 2006). B3 ziklina genearen (*Ccnb3*) mRNA zelula meiotikoen profasearen fase goiztiarrean adierazten da, zehazki, leptoteno eta zigoteno

faseetan (11. irudia). Bere adierazpena, berriz, fase pakitenoan dauden espermatozitoetan asko jaisten da (Nguyen eta lank., 2002). Zigotenoaren ondorengo faseetan B3 ziklina adierazten duten sagu transgenikoek espermatogenesisian arazoak dituzte (Refik-Rogers eta lank., 2006). B3 ziklinaren adierazpena zigotenotik pakitenorako trantsizioan murriztea beharrezkoa da espermatogenesisia ohikoa den moduan gertatzeko eta, ondorioz, ugalkortasunean arazorik ez egoteko (Nguyen eta lank., 2002). Esan liteke, beraz, B3 ziklina kromosoma homologoen parekaketa, sinapsia eta harizpi bikoitzeko apurketen konponketa gertatzen deneko faseetan adieraztea ez dela zori hutsa. Ondorioz, baliteke B3 ziklina espermatogenesisiko zelulak pakitenoan behar baino lehenago ez sartzeko inhibitzaile lanetan aritzea (Nguyen eta lank., 2002).

#### **d) D motako ziklinak**

Ugaztunetan hiru D ziklina mota bereizten dira: D1, D2 eta D3. Hauen papera nagusiki zelula mitotikoetan ikertu arren, bestelako gertaera zelularretan ere parte hartzen dutela behatu da. Hala nola, zelulen desberdintzean (Kato eta lank., 1993; Sicinski eta lank., 1995; Bartkova eta lank., 1998), apoptosian (Freeman eta lank., 1994) eta baita transkripzio faktoreen aktibazioan ere (Zwijnsen eta lank., 1998). Edozein D ziklina motaren galerak ugalkortasunean eraginik ez izan arren, hauen hiruren galerak heriotza enbrionarioa dakar (Kozar eta lank., 2004).

##### *D1 ziklina*

Esan bezala, D ziklinen adierazpena ez da espezifikoa hozi-zeluletan. D1 ziklinaren mRNA, nagusiki, Sertoli zeluletan adierazi arren (Ravnik eta lank., 1995), espermatogonietan ere topatzen da (11. irudia) (Wolgemuth eta Roberts, 2010). Bere gabeziak ez du arren ugalkortasunean eraginik. Izan ere, D1 gabeko sagu ar guztiak

ugalkorrak direla ikusi da (3. taula) (Sicinski eta lank., 1995; Beumer eta lank., 2000). Bestalde, *knockout* saguek gorputzaren tamaina txikiagoa dute eta asaldura neurologikoak erakusten dituzte (Mullany eta lank., 2008).

### *D2 ziklina*

D2 ziklinak espermatogenesisian zehar adierazpen patroiz zabala erakusten du. D1 ziklinaren kasuan bezala, honek ere ez du ugalkortasunean eraginik (3. taula) (Sicinski eta lank., 1996; Beumer eta lank., 2000). Ziklina hau bereziki espermatozitoen pakiteno eta diploteno fasean adierazten da eta maila baxuagoan bada ere, espermatida biribiletan ere bai (11. irudia) (Ravnik eta lank., 1995; Zhang eta lank., 1999; Beumer eta lank., 2000). Bestalde, saguen VIII estadioan dauden epitelio seminiferoen espermatogonietan eta Leydig zeluletan ere adierazten dela behatu da (Beumer eta lank., 2000). D2 ziklinarik gabeko sagu arrek (*knockout* saguek) testikulu hipoplastikoak erakusten dituzten arren, honek ez du eraginik euren ugalkortasunean (Sicinski eta lank., 1996).

### *D3 ziklina*

Oro har, D motako ziklinak espermatogonietan adierazi arren, D2 eta D3 ziklinak espermatozitoetan, eta maila baxuagoan, espermatida biribiletan ere adierazten direla behatu da (Ravnik eta lank., 1995; Zhang eta lank., 1999; Beumer eta lank., 2000). Honetaz gain, D3 ziklinaren adierazpena luzatutako espermatidetan ere neurtu da (11. irudia) (Zhang eta lank., 1999). Bestalde, zelula somatikoetan, bereziki Sertoli zeluletan, D3 ziklinaren adierazpena detektatu da (Zhang eta lank., 1999). Zelula hauetan ikusi da euren zatiketa mitotikoa gelditu arren, D3 ziklina adierazten jarraitzen duela (Beumer eta lank., 2000). Azkenik, D3 ziklina D1 ziklinarekin batera, Leydig zeluletan adierazten dela ere behatu da (Beumer eta lank., 2000). *Knockout* animaliekin egindako ikerketek erakutsitakoaren

arabera, D3 ziklinarik gabeko saguek ez dute ugalkortasunean inolako arazorik pairatu (3. taula) (Zhang eta lank., 1999; Beumer eta lank., 2000; Sicinska eta lank., 2003).

### **e) E motako ziklinak**

A motako ziklinak bezala, ugaztunen E motako ziklinek ere, bi azpimota erakusten dituzte: E1 eta E2. Bi proteina hauek mekanismo ugariren ugaltze zelularren erregulazioan parte hartzen dute (Wolgemuth eta lank., 2013). Bi gene hauek gabeko saguak heriotza enbrionarioa pairatzen dute ernaldian zehar (Geng eta lank., 2003).

#### *E1 ziklina*

E1 ziklinaren adierazpena fase berantiarrean dauden pakiteno espermatozitetan hasten da eta fase diplotenora arte zabaltzen da (11. irudia). Espermatozitoetan E1 ziklinaren mRNA (*Ccne1*) neurgarria izan arren, proteina oso maila baxuan adierazten da. Aldiz, E2 proteina falta denean espermatozitoetako E1 proteina-mailak gora egiten duela behatu da. Hau dela eta, uste da E2 ziklinaren faltan E1 ziklinak nolabaiteko funtzio konpentsatzailea betetzen duela (Martinerie eta lank., 2014). Bestalde, ziklina honen gabeziak ez du ugalkortasunean inolako ondorioz (3. taula) (Geng eta lank., 2003).

#### *E2 ziklina*

Ziklina honek erakusten duen adierazpen patroia aurrekoa baino zabalagoa da. Izan ere, lehen zatiketa meiotikorako hain beharrezkoa den konplexu sinaptonemalean eragiten du (Martinerie eta lank., 2014). Bertan gertatutako akatsen ondorioz, gene honen (*Ccne2*) adierazpena eteten da zelula espermatojenikoetan aldaketak sortuz eta, beraz, ugalkortasuna murriztuz (3. taula) (Geng eta lank., 2003; Martinerie eta lank., 2014). E2 ziklinaren mRNA eta proteinen adierazpena I. profasean dauden espermatozitoetan behatu da, leptoteno fasean

dauden espermatozitoetatik hasita diploteno fasean dauden espermatozitoetan amaituz (11. irudia).

**3. taula:** Espermatogenesisian parte hartzen duten ziklina espezifikoen *knockout* sagu arrek ugalkortasunean pairatutako ondorioen laburpen taula (Wolgemuth eta Roberts, 2010-tik moldatua).

<b>Ziklina (<i>knockout</i>)</b>	<b>Adierazpena testikuluetan</b>	<b>Ondorioa ugalkortasunean</b>
<b>A1</b>	Pakiteno berantiar-diploteno	Antzutasuna
<b>A2</b>	Espermatogoniak-aurreleptoteno	Heriotza enbrionarioa
<b>B1</b>	Espermatozitoak-luzatutako espermatidak	Heriotza enbrionarioa
<b>B2</b>	Espermatozitoak-espermatida biribilak	Ugalkorra
<b>B3</b>	Leptoteno-zigoteno	Ugalkortasun murriztua
<b>D1</b>	Espermatogoniak	Ugalkorra
<b>D2</b>	Espermatogoniak, pakiteno goiztiar-diploteno, espermatida biribilak	Ugalkorra
<b>D3</b>	Espermatogoniak, pakiteno goiztiar-diploteno, espermatida biribilak-luzatutako espermatidak	Ugalkorra
<b>E1</b>	Pakiteno berantiar-diploteno	Ugalkorra
<b>E2</b>	I. Profasean zehar	Ugalkortasun murriztua





## 2. SISTEMA OPIOIDEA

Gorputzeko organo eta ehunen integrazio funtzionalean, beharrezkoa da zelula-zelularen eta zelula-ingurunearen arteko komunikazio-sistema egokia izatea. Zenbait zelula (neuronak eta zelula miokardikoak) komunikazio elektriko zuzenaz komunikatzen dira euren artean. Hala ere, komunikabiderik hedatuenak oinarri kimikoa dute. Seinale kimiko hauek zenbait mekanismok gidatzen dituzte, hala nola; komunikazio parakrinoa (erlatiboki gertu dauden zelulen artekoa), komunikazio autokrinoa edo autokomunikazioa (zelula batek bere buruari ezarritakoa) eta jariapen holokrinoa edo hormonalak (urrun dauden zelulen artekoa). Organismoaren komunikazio kimikoa osatzen duten sustantzien jatorria oso anitza da. Izan ere, lipidoak, proteinak, aminoazido eraldatuak eta gasak ere topa daitezke. Sustantzia kimikoek seinale zehatzak eragiten dituzte zelulan eta, modulaturiko transdukzio-bidearen arabera, zelula-barneko eraldaketa zehatza gertatzen da. Sustantzia hauen artean **jarduera biologikoa duten peptidoak** aurkitzen dira. Hauei biopeptido, peptido erregulatuak, peptido bioaktibo edo hormona peptidiko, ere, deritze (Guyton eta Hall, 2011).

Barne-peptido opioideak (BPO) organismo guztian zehar barreiatuta dauden peptido bioaktibo mota bat dira. Lehen opioide-hartzaileak topatu zirenean (1973) (Simon eta lank., 1973; Terenius, 1973; Pert eta Snyder, 1973) hartzaile hauen estekatuak izan zitezkeen barne-sustantzia peptidikoetan pentsatzen hasi zen. Akil eta lankideek (1976) ikusi zuten espezie ezberdinen burmuineko atal zehatzetan analgesia efektua sortu ondoren naloxonaren bidez efektua ezabatu eta hasierako egoerara itzultzen zela. Analgesia-efektu hori dela eta, ikertzaileek pentsatu zuten erantzun horren atzean barne-sustantzia narkotikoren bat egon zitekeela. Hau baino lehenago, 1975. urtean, Hughes eta lankideek ezaugarri opioideak zituzten txerrien burmuinetik eratorritako bi pentapeptido isolatu zituzten: metionil-



Opioide-hartzaileak kodifikatzen dituzten hiru gene topatu dira:  $\mu$  opioide-hartzailea (MOR),  $\delta$  opioide-hartzailea (DOR) eta  $\kappa$  opioide-hartzailea (KOR). Hartzaile hauen geneen arteko homologia handia da eta, beraz, hiru geneek aitzindari komun bat dutela pentsa liteke (Gaveriaux-Ruff eta Kieffer, 1999). Opioide-hartzaileen moten artean, mintzean zeharreko domeinu eta zelula barnean geratzen diren bukleen homologia handia izan arren (%73-76 eta % 86-100, hurrenez hurren), N- zein C- muturren eta zelulaz kanpoko 2. eta 3. bukleen homologia txikia da (% 9-10, % 14-72 eta %14-20, hurrenez hurren) (Chen eta lank., 1993). Beraz, erraz uler daiteke hartzaile moten arteko homologia txikiko leku horiek peptido ezberdinen ezagupenean inplikaturik egongo direla (Jordan eta Devi, 1998).

Mintzean zeharreko hirugarren domeinu zitoplasmatikoa, 2. eta 3. barne-bukleak eta C- muturreko zatiren bat G proteina heterotrimerikora lotzen dira (Merkouris eta lank., 1996).

90. hamarkadan, opioide-hartzaileekin homologia handia erakusten duen nozizeptina lotzen duen opioide-hartzailea (nozizeptina dinorfinaren antzeko peptidoa da; NOR edo  $ORL_1$ -Orfanina FQ/nozizeptina hartzailea-) deskribatu zen (Wick eta lank., 1994; Mollereau eta lank., 1994).

### 2.1.2 Ezaugarri farmakologikoak

Opioideak peptidoak dira, eta peptido horien hartzaileak, estekatzaileekiko duten itxurazko afinitatearen arabera, hiru mota farmakologikoki ezberdinetan sailkatu dira:  $\mu$  opioide-hartzailea ( $\mu$  = mu, morfinarengatik; MOR),  $\delta$  opioide-hartzailea ( $\delta$  = delta, entzefalinarengatik; DOR) eta  $\kappa$  opioide-hartzailea ( $\kappa$  = kappa, ketoziklazozinarengatik; KOR) (Lord eta lank., 1977). Antagonisten hautakortasunari dagokionez, naloxonak hartzaile guztietan antagonista opioide gisa jokatu arren, hartzaile bakoitzarekiko afinitate

ezberdina erakusten du. Zehazki, afinitate handiena MOR-ekin du ( $K_i = 1,78 \text{ nM}$ ) (Stein, 1999).

Bestalde,  $ORL_1$  hartzaileak aipatu berri diren opioide-hartzaileekin konparatuta, ezaugarri farmakologiko guztiz ezberdinak ditu. Zenbait ikerketek erakutsitakoaren arabera, nozizeptina da  $ORL_1$  hartzailearen barne estekatzaile nagusia. Honek, nozizeptinaren MOR, DOR eta KOR hartzaileak aktibatzen gaitasun eza erakusten du (Pan eta lank., 1996). Laugarren opioide-hartzaile honen inguruko ezagutza ez dago oraindik oso garatua. Bere seinaleztapenaren inguruko jakintza eta itu-zelula berriak identifikatu ahala,  $ORL_1$  hartzaileak etorkizunean farmakologikoki erabilgarria izatea espero da (Al-Hasani eta Bruchas, 2011).

### 2.1.3 Opioideen antolamendua ehunetan

#### a) $\mu$ opioide-hartzailea (MOR)

Nerbio-sistema zentralari dagokionez,  $\delta$ -hartzaile eta  $\mu$ -hartzaileen mRNAren banaketa nahiko antzekoa den arren, badira ezberdintasunak. Kortexean,  $\delta$ -mRNAren maila handia da;  $\mu$ -mRNAren maila, aldiz, nahiko eskasa da (klase bietako hartzaileak ugariak izan arren). Talamoan eta hipotalamoan, berriz,  $\delta$ -mRNA gutxi (baita  $\delta$ -hartzaileak ere) eta  $\mu$ -mRNA ugari agertzen da. Gorputz ildaskatuan (kaudatu-putamenean) eta *accumbens* nukleoan, mRNA eta hartzaile mota biak azaltzen diren arren,  $\delta$ -mRNA lausotuago banatzen da (Mansour eta lank., 1994).  $\mu$ -hartzaileak dendritetan eta gorputz zelularretan kokatzen dira gehienbat, eta, ziur aski, postsinaptikoki funtzionatzen dute (Elde eta lank., 1995).  $\mu$ -hartzailea ehun periferikoetan ere deskribatu da, besteak beste, arratoiaren hodi deferentean (Lemaire eta lank., 1978), barean, guruin adrenalean eta giltzurrunean (Wittert eta lank., 1996) eta saguaren hestean (Pol eta lank., 2001).

### b) $\delta$ opioide-hartzailea (DOR)

Opioide-hartzaileak, nagusiki, nerbio-sistema zentralean deskribatu izan dira. DOR dentsitate handia beha daiteke kortexean eta kaudatu-putamenean (Pilapil eta lank., 1987).  $\delta$ -hartzailearen mRNA, kortexean, kaudatu-putamenean, hipokanpoan eta amigdalan banatzen da (Simonin eta lank., 1994).  $\delta$ -hartzaileak, batez ere, axoietan kokatzen dira; beraz, ziur aski gune presinaptikoan funtzionatzen dute gehienetan (Elde eta lank., 1995). Ehun periferikoetan,  $\delta$ -hartzailea, besteak beste, linfuzitoetan (Sharp eta lank., 1998), hestean eta guruin adrenaletan (Wittert eta lank., 1996) adierazten da.

### d) $\kappa$ opioide-hartzailea (KOR)

Nerbio-sistema zentralean, KOR-k kortexean, amigdalan eta klaustroan ikus daitezke (Pilapil eta lank., 1987). KOR-ren mRNA, besteak beste, kortexean, talamoan, hipotalamoan, gorputz ildaskatuan eta *accumbens* nukleoan agertzen da (Peckys eta Landwehrmeyer, 1999).  $\kappa$ -hartzaileak dendritetan eta gorputz zelularretan kokatzen dira gehienbat, eta, ziur aski, postsinaptikoki funtzionatzen dute (Elde eta lank., 1995). Ehun periferikoei dagokienez,  $\kappa$ -hartzailea hestean (Wittert eta lank., 1996) eta, batez ere, zelula immuneetan agertzen da (Rivière, 2004).

### e) $ORL_1$ opioide-hartzailea

Aipatu berri diren gainontzeko opioide-hartzaileak bezala,  $ORL_1$  hartzailea, bereziki, nerbio-sistema zentralean deskribatu da. Bestalde, kaudatu-putamenean eta zerebeloan ez da hartzaile honen arrastorik topatu.  $ORL_1$  hartzailearen mRNA eta lotura-guneen adierazpenak bat datoza eta, beraz, uler daiteke hartzaile hau neuronon zirkuitu lokaletan adierazten dela. Ehun periferikoetan,  $ORL_1$  hartzailea, muskulu leunetan, gongoil periferikoetan eta sistema immunean zehar ere adierazten dela behatu da. Anatomikoki hartzaile honek erakusten duen

banaketa zabala dela eta, pentsa liteke bere jarduera biologikoa, ere, anitza dela (besteak beste, zentzumen-pertzepzioan, memoria prozesuetan edo emozio-portaeran) (Mollereau eta Mouledous, 2000). Azken ikerketetan  $ORL_1$  hartzaila espermatozitoen mintz plasmaticoan ere deskribatu da. Ikerketa honetan  $ORL_1$  hartzailak espermatozitoen meiosisaren garapenean eginkizun garrantzitsua izan dezakeela proposatzen da (Eto eta lank., 2013).

**4. taula:** Opioido-hartzaileen estekatzaile sintetiko eta naturalak. DPDPE: [D-Pen<sup>2</sup>, D-Pen<sup>5</sup>]-entzefalina, DAMGO: [D-Ala<sup>2</sup>, N-MePhe<sup>4</sup>, Gly-ol]-entzefalina, NC: Nozizeptina, nor-BIN: norbinaltorfina, CTOP: H-D-Phe-Cys-Tyr-Orn-Thr-Pen-Thr-NH<sub>2</sub>.

	MOR	DOR	KOR	ORL <sub>1</sub>
<b>Estekatzaile naturala</b>	β-endorfina Endomorfina	Met-entzefalina Leu-entzefalina	Dinorfina A (1-17) Dinorfina B (1-8)	Nozizeptina
<b>Agonista sintetikoa</b>	U696593	DPDPE	DAMGO	NC(1-13)NH <sub>2</sub>
<b>Antagonista selektiboa</b>	CTOP	Naltrindola	Nor-BIN	[Nphe <sup>1</sup> ]NC(1-13)NH <sub>2</sub>
<b>Antagonista ez-selektiboa</b>	Naloxona	Naloxona	Naloxona	Naloxona ez aktiboa

#### 2.1.4 Seinalezapena opioido-hartzaileen bidez

Opioido-hartzaileak nagusiki G proteina inhibitzaileetara lotzen dira. Agonistek G proteina horiek aktibatzean, hainbat aldaketa gertatzen dira (ikus 13. irudia):

1. *Adenilato ziklasa (AC) entzimaren inhibizioa.* Honen ondorioz, cAMParen kontzentrazio-mailak txikitzen dira eta A proteina kinasaren (PKA) aktibazioa murrizten da (Sharma eta lank., 1977; Al-Hasani eta Bruchas, 2011).

2. *Tentsioaren menpeko kaltzio-kanalen inaktibazioa.* Hiru opioido-hartzaileak gai dira burmuin aldeko tentsioaren menpeko kaltzio-kanalak inaktibatzeke G<sub>αo</sub> azpiunitateen bidez

(Hescheler eta lank., 1987; Surprenant eta lank., 1990). Horren ondorioz, kaltzioa neurona barnera sartzea ekiditen da eta neurotransmisoreen askapenaren inhibizioa gertatzen da (Al-Hasani eta Bruchas, 2011).

3. *Potasio-kanalen irekiera*. Opioido-hartzaileek potasio-kanalak aktibatzen dute eta, ondorioz, mintzaren hiperpolarizazioa (North eta lank., 1987; Al-Hasani eta Bruchas, 2011) eta jarduera bioelektriko neuronalaren inhibizioa eragingo dute.

4. *Zelula barneko kaltzioaren askapena*. Opioido-hartzaileen aktibazioak, G proteina heterotrimerikoaren  $\beta\gamma$  azpiunitateen bitartez, fosfolipasa  $C_\beta$ -ren ( $PLC_\beta$ ) aktibazioa dakar. Honek, inositol trifosfatoarekin ( $IP_3$ ) eta kaltzioaren menpeko proteina kinasaren (PKC) aktibazioarekin batera, zelula barneko kaltzioaren askapenean laguntzen du (Chan eta lank., 1995; Tsu eta lank., 1995). Azken ikerketetan ikusi da PKC-k, besteak beste, gizonezkoen espermatozoideen erreakzio akrosomikoa erregulatzen duela (Urizar eta lank., 2014). Oraindik ere, ez dago argi zein den  $G_{\beta\gamma}$  azpiunitatearen inplikazioa nozizeptinak bideratutako  $PLC_\beta$ ren aktibazioan (New eta Wong, 2002).

5. *MAP kinasek (MAPK) bideratutako transdukzioaren estimulazioa*. Opioido-hartzaile guztiek MAPK-en bidea aktibatzen dute  $G_{\beta\gamma}$  azpiunitateen bitartez (Law eta lank., 2000).  $ORL_1$ -en aktibazioaren kasuan, berriz, ERK-ren aktibazioa, partzialki, PLC-ren aktibazioaren bitartez gertatzen da (Fukuda eta lank., 1997; Lou eta lank., 1998).



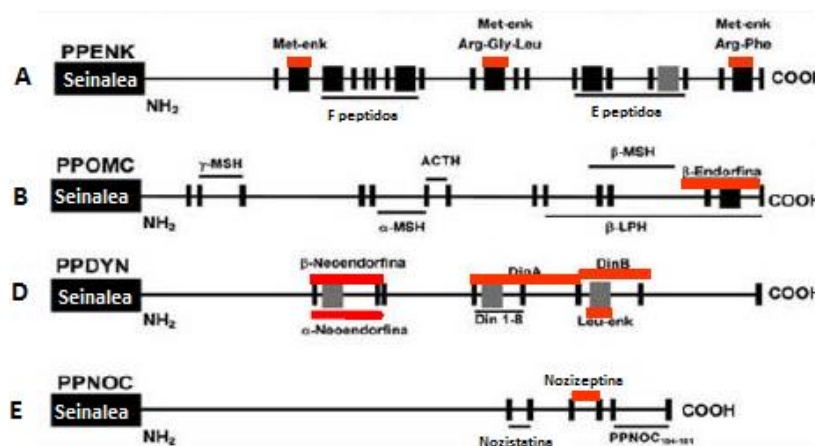


Pentapeptido horien sintesiaren arduraduna garunean isolatutako entzefalina konbertasa izeneko karboxipeptidasa bat da (Hughes, 1983).

**Proopiomelanokortina (POMC)** (Nakanishi eta lank., 1979). Aitzindari honek barne-opioideak ez diren peptidoak ere gordetzen ditu. Izan ere,  $\beta$ -endorfina peptido opioideaz gainera, hormona adrenikortikotropikoa (ACTH),  $\alpha$  eta  $\beta$ -lipoproteina (LPH),  $\alpha$  eta  $\beta$ -melanotropina (MSH), eta beste zenbait peptidoen aitzindaria da. Molekula horiek sintetizatzen dituen entzima POMC entzima bihurtzailea da (Turner eta lank., 1986).  $\beta$ -endorfina peptido opioidearen aitzindaria den entzima bihurtzaile hau gizonezkoen testikulu eta zelula espermatikoetan ere kokatu dute azken ikerketek (Urizar eta lank., 2014).

**Prodinorfina (PDYN)** (Kakidani eta lank., 1982). Besteak beste, dinorfina A (1-17), dinorfina B (1-13) eta  $\beta$ -neo-endorfina sortzen ditu.

**Pronozizeptina (PNOC)** (Mollereau eta lank., 1996). PNOC kodifikatzen duen geneak homologia handia du PENK, POMC eta PDYN kodifikatzen duten geneekin, ebolutiboki, oinarri komuna dutela erakutsiz. PNOC molekula bakoitzak nozizeptina kopia bakarra du eta, beraz, gainontzeko peptido opioideen antzeko prozesamendua du.



**14. irudia:** Peptido opioideen aitzindari polipeptidikoekiko eskema. A) proentzefalina, B) proopiomelanokortina, D) prodinorfina eta E) pronozizeptina. Gorriz aitzindari bakoitzak ekoizten dituen peptido opioideak adierazten dira. (Rosario Vega, 2005-tik moldatua).

### 2.2.2 Barne-peptido opioideak

Gaur egun, 20 barne-peptido opioide ezagutzen dira eta 5-32 aminoazido arteko luzera izan dezakete. Guztien ezaugarri komuna amino muturretik karboxi muturrera errepikatutako aminoazido-sekuentzia da (“Tyr-Gly-Gly-Phe-Met” edo “Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu”), Met eta Leu-entzefalina alegia. Salbuespenak nozizeptina eta endomorfina dira; azkenak 4 aminoazido baino ez ditu. Ugaztunen peptido opioide naturalak Met-entzefalina, Leu-entzefalina,  $\beta$ -endorfina, Dinorfina A, Dinorfina B,  $\alpha$ -Neoendorfina, Nozizeptina eta Endomorfina dira (Florez, 1998).

Peptido opioideek euren hartzaileekiko afinitate bereizgarria dute. Met- eta Leu-entzefalina DOR-ren barne-estekatzaileak direla onartzen da. Nahiz eta  $\delta$ -hartzailearekiko afinitate handiagoa izan, afinitate txikiagoaz, MOR-rekin lotzeko gaitasuna dute.  $\beta$ -endorfinak MOR eta DOR-rekin antzeko afinitatez lotzen dira eta dinorfinak, nagusiki, KOR-rekin lotzen dira. Nozizeptina ORL<sub>1</sub>-ren barne-estekatzaile gisa deskribatu zen gainontzeko opioide-hartzaileak (MOR, DOR eta KOR) aktibatzeko gaitasuna galduz (Pan eta lank., 1996).

### 2.2.3 Peptido opioideen eta euren hartzaileen ekintza fisiologikoak

Peptido opioideen ekintza ezagunena minaren ezabapena edo analgesia izan arren, gaur egun, funtzio fisiologiko ugari ezagutzen zaizkie, esate baterako; 1) burmuinaren garapenean zein birsorkuntza eta plastikotasunean (memoria eta ikaskuntza bezalako goimailako funtzioetan) parte hartzea, 2) funtzio sensorialen erregulazioa, 3) aldaketen eragile elikadura-portaeran, 4) depresioa edota antsietatea bezalako buruko arazoaren modulazioa, 5) heste-, giltzurrun- eta gibel-funtzioen parte hartzea, 6) odol-presioaren eta erantzun kardiobaskularraren modulazioa, 7) arnasketaren modulazioan parte hartu arnasketaren

urritasuna eta erantzun termoerregulatzaila eraginez, 8) erantzun immuneen modulazioa, 9) lokomozioaren, eta oro har, aktibitate orokorraren erregulazioa eta, azkenik, 10) funtzio ugaltzailearen erregulazioa (Bodnar eta lank., 2014).

**5. taula:** Estekatzaile opioideen afinitate-profilak *binding* esperimentu bidez lortuak.

Estekatzaileak	K <sub>i</sub> (nM)				Erreferentzia
	μ	δ	κ	ORL <sub>1</sub>	
<b>[Met<sup>5</sup>]-entzefalina</b>	9,5	0,9	4440	-	Leslie, 1987
<b>[Leu<sup>5</sup>]-entzefalina</b>	20	3	835	-	Chang eta lank., 1981
<b>β-endorfina</b>	2	2,7	57	-	Leslie, 1987
<b>Dinorfina A</b>	0,7	3,2	0,12	110	Leslie, 1987 Butour eta lank., 1997
<b>Dinorfina B</b>	3,4	4,4	9	-	Leslie, 1987
<b>α-neoendorfina</b>	1,3	0,57	0,20	-	Leslie, 1987
<b>Endomorfina</b>	0,67	>500	>500	-	Goldberg eta lank., 1998
<b>Nozizeptina</b>	133	380	267	0,1	Pan eta lank., 1996 Gintzler eta lank., 1997



### **3. SISTEMA OPIOIDEAREN INPLIKAZIOA UGALKORTASUN MASKULINOAN**

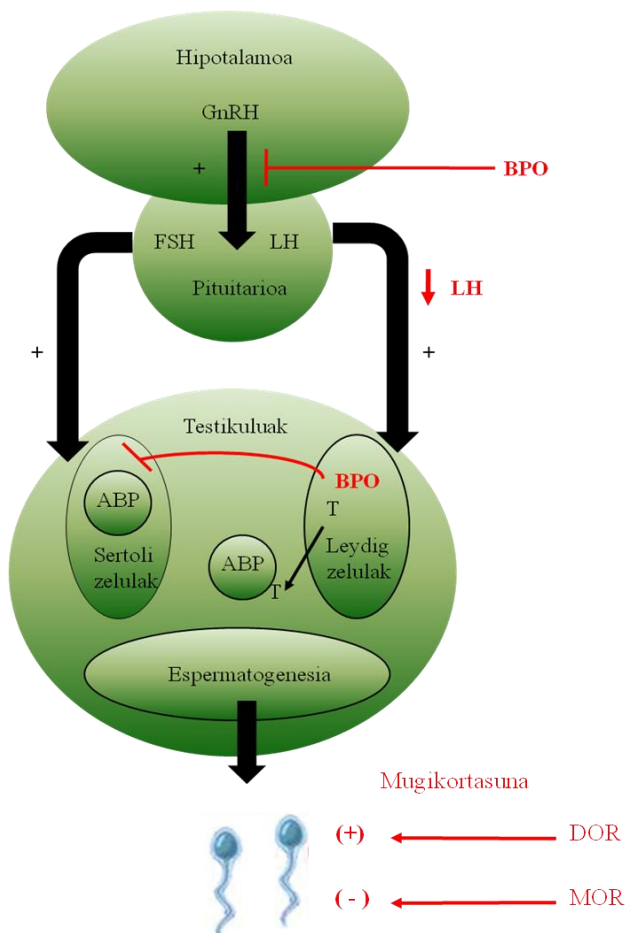
Peptido opioideak ar eta emeen ugaltze-aparatuen organo eta ehunetan aurkitzen dira. Hau dela eta, peptido opioideek, zenbait lekutan arituz, ugaltze-sisteman eragiten dutela aditzera eman da (Fabbri eta lank., 1989).

#### **3.1 Sistema opioideak hormonon bidez bideratutako ugaltze-funtzioaren kontrola**

Opioideek ugaltze-funtzioarengan gauzatzen duten lehen kontrola ardatz hipotalamo-hipofisarioaren bitartez gertatzen da bertako sexu hormonon askapena zuzenduz. Aurre hipofisiak hormona folikulu estimulatzailea (FSH) eta hormona luteinizatzailea (LH) jariatzen ditu eta, hauek, zuzenean espermatogenesisian laguntzen duten testikuluetakoko zelula somatikoetan jarduten dute. Hipotalamoan, aipatutako bi ugal-hormona hauen sintesia eta askapena hormona gonadotropiko askatzailearen (GnRH) bitartez kontrolatuta dago (ikus 1.5.1 atala). FSH-ren funtzio nagusia, pubertaroan zehar, Sertoli zelulen ugaritzea kontrolatzea da orduan adierazten baitira eskusiboki hormona honen hartzaileak (Rannikki eta lank., 1995). LH-ak, aldiz, helduen testikuluetakoko Leydig zeluletan jarduten du testosteronaren sintesia erregulatuz. Hain zuzen ere, Leydig zeluletan bakarrik sintetizatzen dira LH-renak diren hartzaileak (Heckert eta Griswold, 2002). Leydig zeluletatik aparte, LH hartzaileak, zelula espermatogenikoetan ere detektatu dira (Eblen eta lank., 2001; Lei eta lank., 2001).

Peptido opioideek, nerbio-sistema zentralaren bidez, ugal-funtzioa kontrolatzen dute. Morfina eransketa LH-ren askapenaren ezabapenarekin lotuta dago, aldiz, naloxona eta naltrexona bezalako antagonista opioideek, gizaki zein bestelako animali espezieetan, LH

maila serikoaren gorakada eragiten dute (Cicero eta lank., 1979; Sirinathsinghji eta lank., 1983; Fraioli eta lank., 1985). Peptido opioideek bideratutako LH-ren askapenaren etete hau ekintza hipotalamikoaren ondorioz gertatzen da. Izan ere, arratoien guruin pituitarioko zeluletan behatutakoaren arabera, naloxonaren ekintzarekin, LH-ren askapen basala edo GnRHaren bidez estimulatutako LH-ren askapena ez da aldatzen (Wilkes eta Yen, 1981). Bestalde, naloxona bezalako GnRH-en antagonistekin egindako *in vivo* tratamenduetan behatu da GnRH-ren askapena guztiz blokeatzen dela (Wilkes eta Yen, 1981; Blank eta Roberts, 1982). Ikerketa hauetan oinarrituz, ezagutu da peptido opioideek, nerbio-sistema zentralaren bidez, ugaltze-funtzioa kontrolatzen dutela GnRHaren jariatzea ekidinez (15. irudia) (Delitala eta lank., 1981; Fraioli eta lank., 1982; Sirinathsinghji eta lank., 1983; de Gandarias eta lank., 1993; de Gandarias eta lank., 1996).



**15. irudia:** Sistema opioideak bideratutako ugaltze-funtzioaren kontrola.

- (1) NSZ-an BPO-ek GnRH-ren jariatzea inhibitzen dute LH-ren askapena murriztuz. (2) Maila testikularrean BPO-ek LH-ren estimulazioaz askatzen dira Leydig zeluletan eta ondorioz, Sertoli zeluletan efektu inhibitzailea dute. Zehazki, BPO-ek testosterona-maila (T) erregulatuz FSH-ren estimulazioaz Sertoli zeluletan sintetizatutako ABP ekoizpena inhibitzen dute. (3) Peptido opioideen aitzindariak kodifikatzen dituzten geneak hozi-zeluletan adierazten dira, aldiz, testikuluetak zelula somatikoetan gene hauek ez dira eraginkortasunez itzultzen. (4) Sistema opioidean parte hartzen duen opioide-hartzaile bakoitzak espermatozoideen mugikortasuna erregulatzen du modu ezberdinean. (Subirán eta lank., 2011-tik moldatua).

(3)

(4)

### 3.2 Sistema opioideak bideratutako funtzio testikularraren kontrola

Espermatogenesisia ardatz hipotalamo-hipofisarioko mekanismo endokrinoek eta testikuluetakoko zelulen arteko mekanismo parakrino eta autokrinoek kontrolatzen dute (ikus 15. irudia).

Sertoli zelulek hozi-zelulen desberdintzapenean beharrezkoak diren ezaugarri metaboliko eta estrukturalak ematen dituzte. FSH hartzailearen akats funtzional batek testikuluen tamainaren txikitzea dakar Sertoli zelula kopuruaren gutxitzea dela eta (Dierich eta lank., 1998). Honako akats funtzionalak dituzten gizonezkoek arazo espermatogenikoak erakusten dituzte eta, ondorioz, euren likido seminalak oligozoospermia edota teratozoospermia pairatzen dute. Hala ere, honelako arazoak dituzten gizonezkoak ugalkorrak izan daitezke (Tapanainen eta lank., 1997).

Leydig zelulak testikuluetakoko testosterona ekoizteaz arduratzen dira. Testosterona eta honen metabolitoak (dihidrotestosterna eta estradiola) dira arren ugaltze-funtzioa erregulatzen duten sexu hormona nagusiak. Testikuluetakoko testosterona kontzentrazioa, odol periferikoaren aldean, 80 aldiz handiagoa da (Coviello eta lank., 2005) eta, hau, espermatogenesi egokirako beharrezkoa da (ikus 1.5.1 atala ). Aipatu berri den testosteronaren testikulu barruko kontzentrazio hau bi hormonen ekoizpenari esker lortzen da. Batetik, LH-ak estimulatutako Leydig zeluletakoko testosteronaren ekoizpenari esker eta, bestetik, FSH-ak estimulatutako Sertoli zeluletakoko ABP-aren (*androgen-binding protein*) sintesiari esker (16. irudia). Proteina honek testosterona tubulu seminifero lumen aldera garraiatzen du (ikus 1.5.1 atala) (Hansson eta lank., 1973; Ritzén eta lank., 1976; Huang eta lank., 1991). Azken behaketen arabera, badirudi morfina agonista opioideak aromatasia eta 5-alfa erreduktasa bezalako geneen adierazpenean eragiten duela testosterona kontzentrazio-maila murriztuz (Aloisi eta lank., 2010).



Peptido opioideak testikulueta daude eta bertako jarduera erregulatzen laguntzen dute zelulen arteko komunikazioan bitartekari gisa jokatuz. Peptido opioideek euren jarduera opioide-hartzaileak aktibatuz burutzen dute. *Binding* esperimenduetan behatutakoaren arabera hiru opioide-hartzaileak (MOR, DOR eta KOR) arratoien testikulueta topatu ziren arren, euren kokapena Sertoli zeluletara mugatu zen (Fabbri eta lank., 1985 ; Zhou eta lank., 1990). Azken ikerkek Sertoli zeluletara FSH-ren seinalea heldu ondoren nozizeptinaren adierazpena areagotu egiten dela neurtu dute. Hau dela eta, uste da nozizeptina FSH-ren bitartekari gisa jokatzen duela espermatogenesisia komunikazio parakrinoaren bidez (Eto eta lank., 2012).

Honetaz gain, PENK, POMC eta PDYN aitzindari opioideak kodifikatzen dituzten geneak sagu eta arratoien testikulueta, ere, adierazten direla ikusi da. Peptido opioideen *de novo* sintesiarekin funtzio testikularra erregularra izan daiteke (Pintar eta lank., 1984; Chen eta lank., 1986; Kilpatrick eta lank., 1986; Douglass eta lank., 1987). Bestalde, sagu transgenikoetan, PENK aitzindari opioidearen gain-adierazpenak morfologikoki ezohikoak diren testikuluak eta mugikortasun urriko espermatozoideak ekoizten ditu. Hau dela eta, pentsa liteke sistema opioideak baduela zerikusirik espermatogenesisiaren erregulazioan (O'Hara eta lank., 1994).

Testikulueta zelula somatiko eta germinaletan aitzindari opioideak kodifikatzen dituzten geneen adierazpena bereizgarria da (Garret eta Douglass, 1989). Sagu zein arratoien PENK aitzindari opioideak testikulueta zelula somatiko eta germinaletan bereizgarriki adierazten diren tamaina aldagarriko mRNA zatiak erakusten ditu (Garret eta Douglass, 1989). Testikulueta hozi-zelulek kodifikatutako PENK-aren mRNA-k du tamaina handiena (1,7 kb). Hau, promotore espezifiko baten zuzendaritzapean adierazten da (Kilpatrick eta lank., 1990). Aldiz, Leydig, Sertoli eta tubuluaren arteko zelulek adierazitako

mRNA txikiagoa da (1,45 kb) (Kilpatrick eta lank., 1987; Kew eta lank., 1989; Garret eta Douglas 1989; Yoshikawa eta lank., 1988; Yoshikawa eta lank., 1989). Aipatutako PENK aitzindariaren bi mRNA zati hauek sekuentzia kodifikatzaile bera dute, soilik 5' zati ez-kodifikatzailean bereizten dira (Kilpatrick eta lank., 1990). Bestalde, hainbat ikerketen arabera, behatu zen hozi-zeluletan adierazten zen PENK mRNA espezifikoa ez zela eraginkortasun handiz itzultzen eta, beraz, pentsatu zen Leydig zeluletako tamaina txikiagoko mRNA zela testikuletako peptido opioideen *de novo* sintesiaren erantzule nagusia (Kilpatrick eta lank., 1990). Bestetik, Sertoli zelulek ere testikuletako PENK-etik eratorritako peptidoen *de novo* sintesian laguntzen dutela behatu da. Izan ere, FSH-ren ekintza dela eta, PENK genearen adierazpena eta met-entzefalinaren maila areagotu egiten dira (Kew eta Kilpatrick, 1989). Honetaz gain, Mehta eta lankideek (1994) behatu zuten espermatogenesisian zehar 1,45 kb-ko PENK-en mRNA testikuletako zelula interstizialetan erregulatuta dagoela eta, hau, pakiteno fasean dauden espermatozitoen agerpenarekin bat datorrela. Beraz, aipatu berri diren ikertzaileen arabera, hozi-zelulak espermatogenesisian zeharreko peptido opioideen maila erregulatzeko gaitasuna izango lukete ondoko zelulen PENK genearen adierazpena kontrolatuz.

*In situ* hibridazio bidez egindako ikerketek erakutsi zuten POMC kodifikatzen duen genea Leydig zeluletan (Pintar eta lank., 1984), hozi-zeluletan (Kilpatrick eta lank., 1987) eta bai giza testikuletako tubulu seminiferoetan eta espermatozoideen flagelo zein tarteko zatian ere (Urizar eta lank., 2014) adierazten dela. Saguen testikuletan tamaina desberdineko bi POMC mRNA zati bereizten dira. Bata, nagusiki Leydig zeluletan eta hozi-zeluletako zenbait estadioetan adierazten da eta 675-750 nukleotidoko luzera du bestea, berriz, txikiagoa da eta pakiteno fasean dauden espermatozitoetan adierazten da. PENK-aren mRNAekin gertatzen den bezala, Leydig zeluletako mRNA da POMC-tik eratorritako

peptido opioideak sintetizatzearen erantzule. Aldiz, espermatogenesisian zehar adierazitako mRNA ez da hain modu eraginkorrean itzultzen (Kilpatrick eta lank., 1987). Behaketa hauek lehenagotik egindako ikerketen emaitzekin bat datoz, izan ere, ikerketa horiek  $\beta$ -endorfina (POMC-aren prozesamenduaren ondorioz sortutako peptido opioide nagusia) hainbat espezieen Leydig zeluletan (Tsong eta lank., 1982) eta gizakien espermatozoideen alde akrosomikoan (Urizar eta lank., 2014) immunodetektatu zuten. Leydig zeluletan sintetizatutako  $\beta$ -endorfina bi bidezidorrek kontrolatzen dute; hormonalak eta lokalak. Bidezidor hormonalari dagokionez, arratoi helduetan behatutakoaren arabera, hipofisiak jariatutako LH-aren ekintzaz kontrolatzen dute peptido opioide honen sintesia (Chen eta lank., 1986). Bestalde, bidezidor lokalari dagokionez,  $\beta$ -endorfinaren sintesia CRH-ren (*corticotropin-releasing hormone*) ekintzaz kontrolatzen da. CRH-ak Leydig zelulen funtzioa modu autokrinoan erregulatzen du (Audhya eta lank., 1989; Ulisse eta lank., 1990). Bertan, espezifikoki faktore honen hartzaileak adierazten dira (Ulisse eta lank., 1989) hauen ekoizpena LH-ak estimulatuz. Hazkuntza zelularrean mantendutako Leydig zeluletako  $\beta$ -endorfina maila areagotzen da CRH-rekin estimulatzerakoan, aldiz, zelulek aurkako joera erakusten dute CRH-ren  $\alpha$ -helizea deritzon antagonistaren aurrean (Eskeland eta lank., 1989).

Nahiz eta *de novo* nagusiki Leydig zeluletan sintetizatu, peptido opioideek ez dute inolako aldaketarik eragiten hCG-ek (*human chronic gonadotropin hormone*) estimulatutako testosteronaren ekoizpenean, testosteronaren ekoizpen basalean, hazkuntza-zelularrean mantendutako Leydig zeluletan eta arratoiaren ehun testikularretan (Sher eta lank., 1982; Margioris eta lank., 1983; Fabbri eta lank., 1986). Aurreko emaitza hauek guztiak *binding* ikerketek baieztatu zituzten. Izan ere, ez zen Leydig zeluletan opioide hartzaileen presentzia behatu (Fabbri eta lank., 1988). Aldiz, arratoiaren testikuluetan, naloxona eta nalfemene

bezalako opioide antagonistak txertatzerakoan testosterona basalaren jariapena gutxitu eta bere maila serikoa, ere, murrizten zela ikusi zen (Gerendai eta lank., 1986). Honek adieraz lezake peptido opioideek badutela testosteronaren jariapena erregulatzeko nolabaiteko gaitasuna.

Bestalde, ekintza parakrino baten bidez, Leydig zeluletan sintetizatutako  $\beta$ -endorfinak Sertoli zeluletan ekintza inhibitzailea du (Gerendai eta lank., 1984; 1991). Hau, opioide hartzaileak soilik Sertoli zeluletan topatu izanarekin bat dator (Fabbri eta lank., 1985; Zhou eta lank., 1990). Zehazki,  $\beta$ -endorfinak, Sertoli zeluletako FSH-ak estimulatutako ABP-aren ekoizpena inhibitzen du eta inhibizio hau naloxonarekin eteten da (Fabbri eta lank., 1985). Funtzio honetaz gain ikusi da, testikuluetan sintetizatzen den  $\beta$ -endorfina endogenoak FSH-ak estimulatutako Sertoli zelulen ugaritzea eta bereizmena inhibitzen duela (Orth eta lank., 1986). Are gehiago,  $\beta$ -endorfinak arratoi jaioberrien testikuluetan nalfemene antagonista opioidearekin egindako *in vivo* tratamenduetan, ABP-ren ekoizpena estimulaten du (Gerendai eta lank., 1986). Beraz, peptido opioideek, Sertoli zelulen jarduera inhibitzeaz gain, testikulueta heldutasun sexuala pubertarora arte atzeratuko lukete Sertoli zelulen ugaritzea eta garapena inhibituz (Fabbri eta lank., 1985).

PDYN-ari dagokionez, mezulariaren aldizkako *splicing* baten ondorioz, arratoien testikulueta mRNA-ren tamaina burmuinekoa baino txikiagoa da. Testikulueta 65 nukleotido mRNA-k proteinaren sekuentzia kodifikatzailea berdin mantentzen du eta, hainbat behaketek erakutsitakoaren arabera, bere itzulpenaren eraginkortasuna burmuinekoa bezalakoa da (Garrett eta Douglass, 1989). Hau, testikuluetaik erauzitako dinorfina A eta dinorfina B peptidoen presentziarekin bat dator (Douglass eta lank., 1987). Aipatutako aitzindari hau, nagusiki, Sertoli zeluletan adierazten eta itzultzen da. PDYN-tik eratorritako produktuak Sertoli zeluletan (Collard eta lank., 1990) eta bai arratoien testikulueta

konpartimentu interstizialetan ere immunolokalizatu izan dira. Hau dela eta, dinorfinek Sertoli zelulen jardura modu autokrinoan erregulatzeko gaitasuna dutela proposatu da (Douglass eta lank., 1987). Azken ikerketen arabera neurokinina B eta dinorfina A bezalako peptidoek ahuntzen burmuineko GnRH askapenean parte hartzen dutela ikusi da (Wakabayashi eta lank., 2010).

Laburbilduz, peptido opioideak arren gonaden zelula mota ezberdinetan topatzen dira espermatogenesisia erregulatzeko duten mekanismoetan parte hartuz. Aitzindari opioideak testikuluetakoko zelula somatiko eta germinaletan modu bereizgarrian adierazten dira eta *de novo* sintesi bidez, lokalki, funtzio testikularra erregulatzeko gaitasuna dute (15. irudia). Zehazki, gonadotropinak eta CRH-ek, Leydig zeluletan, parakrinoki Sertoli zelulen funtzioa inhibitzen duten peptido opioideen ekoizpena estimulatzeko dute.

### **3.3 Sistema opioideak bideratutako funtzio espermatikoaren kontrola**

MOR, DOR eta KOR gizonezkoen mintz espermatikoan topatu ondoren (Agirreagoitia eta lank., 2006) pentsatu zen espermatozoideen gaineko peptido opioideen efektu zuzena gerta zitekeela. Likido seminalean sistema opioidearen beste osagaiak ere deskribatu izan dira. Esate baterako, entzefalina eta endorfina bezalako peptido opioideak topatu dira eta euren kontzentrazioa odoleko plasman dagoena baino 6-12 aldiz handiagoa dela neurtu da (Sharp eta lank., 1981). Honetaz gain, entzefalina degradatzen duten entzimak gizonezkoen likido seminal osasuntsu eta subugalkorretan aurkitu dira (Irazusta eta lank., 2004). Bestalde, espermatozoideetan ere, askotariko peptido opioideak topatu dira, hala nola met-entzefalina, leu-entzefalina eta  $\beta$ -endorfina (Sastry eta lank., 1982; Urizar eta lank., 2014) eta proentzefalinatik eratorritako produktuak (Kew eta lank., 1990).

Opioideen kontzentrazio ezberdineko inguruneak erabilia, frogatu da opioide horiek espermatozoideen mugikortasunean eragiten dutela. Dena den, peptido motaren, kontzentrazioaren eta inkubazio-denboraren arabera, efektu bat baino gehiago deskribatu dira:

Alde batetik, leu-entzefalina, edo met-entzefalinaren D-ala<sup>2</sup>-Mephe<sup>4</sup>-Met-(O)-OI-enkephalin (DAMME) analogoa erabiltzean, mugikortasunaren inhibizioa ikusi da (Foresta eta lank., 1985; Sastry eta lank., 1991); met-entzefalina erabiltzean, berriz, ez da efekturik ikusi edo mugimendua mantentzen dela deskribatu da (Fraiooli eta lank., 1984; Fujisawa eta lank., 1996). Azken ikerketek erakutsi dute met-entzefalinak giza espermatozoideen mugimenduaren erregulazioa modu autokrinoan areagotzen duela (Subirán eta lank., 2012). Bestalde, Agirregoitiak eta lankideek (2006) proposatu zuten behatutako opioideen jarduera aldakorra hartzaile ezberdinen aktibazioaren ondorioz gertatzen dela. Izan ere, morfinarekin ( $\mu$  opioide-hartzailearen agonista) edo naltrindolarekin ( $\delta$  opioide-hartzailearen antagonista) inkubatutako giza espermatozoideen mugikortasuna inhibitzen da.

Bestetik, lan batzuetan  $\beta$ -endorfina erabiltzean dosiaren menpeko mugikortasunaren inhibizioa ikusi arren, peptido hori naloxonarekin batera inkubatzeko, bi efektu kontrajarri deskribatu dira; mugikortasunaren inhibizioa ez ekiditea eta ekiditea (Fraiooli eta lank., 1984; Mari eta lank., 2005). Efektu kontrajarri honek adierazten du espermatozoideen mugikortasuna opioide-hartzaile ezberdinen aktibazioaren ondorioz gertatzen dela (15. irudia) (Subirán eta lank., 2008; Subirán eta lank., 2011).

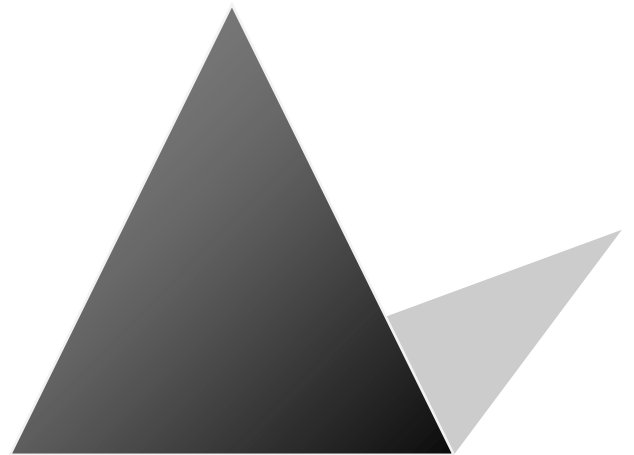
Azkenik, deskribatu da naloxona antagonistaren kontzentrazio baxuak mugikortasuna mantentzen laguntzen duela (Albrizio eta lank., 2005; Mari eta lank., 2005) baina kontzentrazio handiagoek mugikortasuna murriztu (Albrizio eta lank., 2005) edo areagotu egin dezakeela denboran zehar (Sastry eta lank., 1991). Naltrindol antagonistarekin ere

antzeko zerbait ikusi da. Izan ere, kontzentrazio baxuetan mugikortasuna areagotu eta kontzentrazio handiagoetan, berriz, murriztu egiten du (Albrizio eta lank., 2010).

Gauza azpimarragarria da hazi astenozoospermikoan topatutako met-entzefalina eta  $\beta$ -endorfinaren kantitatea normozoospermikoan topatutakoa baino txikiagoa dela (Fujisawa eta lank., 1996; El-Haggar eta lank., 2006).

Eiakulatutako zelula espermatikoak ugalkorrak izan daitezen, beharrezkoa da hauen aktibazioa eta kapazitazioa gertatzea obozitoa ernaldu ahal izateko, behin erreakzio akrosomikoa jazo denean. Zaldien espermatozoideen *in vitro* esperimentuetan ikusi da naloxonak kapazitazioa indusitzen duela erreakzio akrosomikoan inolako eraginik sortu gabe (Albrizio eta lank., 2005). Aldiz, beste ikerketa batzuek erakusten dutenez met-entzefalinaren analogoa den DAMME-ak dosiaren menpeko berezko erreakzio akrosomikoa inhibitzeko gaitasuna du (Foresta eta lank., 1986). Gauza bera gertatzen da naltrindol antagonistaren kontzentrazio baxuetan. Honek erreakzio akrosomikoaz gain, kapazitazioa eta bideragarritasuna, ere, murrizten du. Kontzentrazio altuetan, berriz, kontrako efektua gertatzen da (Albrizio eta lank., 2010). Gaur egun, oraindik, ez da sistema opioidea prozesu hauekin erlazionatzen duten ikerketa nahikoa egin.

# HELBURUAK







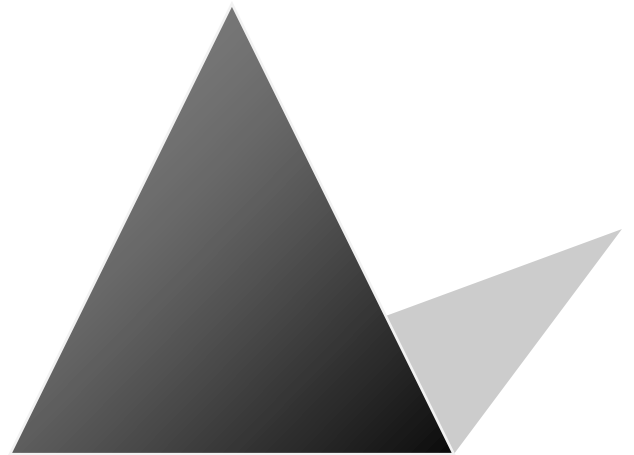
Sistema opioideak, zenbait lekutan arituz, ugaltze-sisteman eragiten duela aditzera eman da (Fabbri eta lank., 1989). Honek, sistema ugalkor maskulinoko hainbat ehun eta organoetan topatutako BPO-ek funtzio ugalkor maskulinoaren erregulazioan duten presentzia azaltzen du (Subirán eta lank., 2011). BPO-ak komunikazio zelularrean parte hartzen duten sustantziak izanik euren seinalea G proteinei lotutako opioide-hartzaileen bidez askatzen dute (Gaveriaux-Ruff eta Kieffer, 1999). Orain arte egindako arloko ikerketek hiru opioide-hartzaile klasikoak (MOR, DOR eta KOR) giza espermatozoideetan deskribatu izan dituzte (Agirregoitia eta lank., 2006). Honetaz gain, hartzaile hauek espermatozoideen mugikortasunean eragindako seinale opioide ezberdinak ere ezarri dituzte (Fernandez eta lank., 2002; Agirregoitia eta lank., 2006; Subirán eta lank., 2008; 2012). Aldiz, hartzaile hauen presentzia hozi-zelula maskulinoetan deskribatu ez denez, euren eginkizuna espermatogenesisian zehar, oraindik ere, ezezaguna da. Izan ere, hiru opioide-hartzaileak arratoien testikuluetan topatu arren, hauen kokapena soilik Sertoli zelula somatikoetan adierazten dela ondorioztatu zen (Fabbri eta lank., 1985). Kontuan izanik espermatozoide helduak transkribapen eta itzulpen mailan jarduerarik gabeko zelulak direla opioide-hartzaile hauek espermatogenesisian zehar adierazten direla pentsa liteke.

Aurrekariak kontuan hartuta eta antzutasuna dagoeneko kasuen ulermena areagotzeko asmoarekin, tesi honetarako, bi helburu nagusi jorratu dira:

1.  $\mu$ ,  $\sigma$  eta  $\kappa$  opioide-hartzaileak saguen hozi-zeluletan deskribatzea eta kokatzea.
2.  $\mu$ ,  $\sigma$  eta  $\kappa$  opioide-hartzaileen funtzionaltasuna saguen espermatogenesisian zehar zehaztea.



# **MATERIALAK ETA METODOAK**





## 1. MATERIALAK

Ikerketa honetan, honelako gailuak, erreaktiboak, hazkuntza-medioak eta soluzioak erabili ziren:

### 1.1 Gailuak

Mikrozentrifuga hozgarria. Thermo. Heraeus Fresco 21 Centrifuge.

Zentrifuga. Labofuge 200. Heraeus.

Hozkailua

-4°C eta -24°C-ko Izozkailuak

-80°C-ko Ultraizozkailua

Inkubagailu hezea. Incu Safe.

Bainu termostatizatzailea. Precistern. Selecta.

Inkubagailu lehorra. Hotcold S, 0°-60°C bero-tartea. Selecta.

Ultramoredun kanpaia. Faster Bio 48.

Lupa. COVER-015. Olympus.

Mikroskopia konfokala. Zeiss

Bolumen aldakorreko pipeta automatikoak. BioPette Plus/ Eppendorf Research.

Kanpaia

Nanodrop sistema. Spectrophotometer ND-1000.

Chemidoc sistema. Bio-Rad.

Fotometroa. Lan optics.

Termoegonkortutako irabiagailu magnetikoa. Asincro. Selecta.

Balantza Rocher 25. Labnet.

Elektroforesi- eta transferentzia-euskarriak. Mini Trans-Blot III. Bio-Rad.

RT-PCR sistema. Abi Prism 7000.

Fluxuzko zitometroa. FACScalibur, Becton Dickinson.

Laser-mikroskopia fokukidea. Olympus Fluoview FV500.

Atzera-aurrerako agitatzailea. AVO-1. SBS.

Termozikladorea. Digital Dry Bath. Labnet

## 1.2 Erreaktiboak

### 1.2.1 Opioideak

**Morfina hidroklorida** (Alcaliber S.A.)

**DPDPE:** [D-Pen<sup>2,5</sup>]-Entzefalina (Sigma-Aldrich)

**U-50488:** 3,4-Dikloro-*N*-metil-*N*-[2-(1-pirrolidinil)ziklohexil]benzeneazetamida (Sigma-Aldrich)

### 1.2.2 Beste erreaktibo batzuk

Pisu molekular ezaguneko proteinak (Invitrogen)

RNasa inhibitzailea (Promega)

*Transcriptor RT* + erreakzio-indargetzailea (Roche)

Azarezko hexameroak

TRIZOL<sup>®</sup> (Life technologies)

SYBR<sup>®</sup> Green (AmpliTaq Gold<sup>®</sup> DNA polimerasaduna) (Life technologies)

Pisu molekular ezaguneko nukleotidoak

Nukleotidoentzako karga-indargetzailea

*Fluoromount G* (Southern Biotech)

## 1.3 Hazkuntza-medioak

### 1.3.1 KREBS

Honako osagaiak nahastu eta H<sub>2</sub>O-tan berreseki 500 ml baina gutxiagotan eta glukosa gabe autoklabatzera eraman:

0,118 g/l NaCl

4,69\*10<sup>-3</sup> g/l KCl

0,013 g/l Glukosa

0,025 g/l NaHCO<sub>3</sub>

Jarraian, hurrenkera honetan gehitu azken osagaiak:

% 1,1 (b/b) MgSO<sub>4</sub> (H<sub>2</sub>O-tan disolbatuta eta autoklabatuta).

% 1,18 (b/b) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (H<sub>2</sub>O-tan disolbatuta eta autoklabatuta).

% 0,38 (b/b) CaCl<sub>2</sub>

500 ml arte doitu bolumena.

Ondorengo osagaien *stock*-ak egin:

0,50 g/l  $\text{CaCl}_2$

0,05 g/l  $\text{MgSO}_4$  egin eta autoklabatu.

0,1 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  egin eta autoklabatu.

Osagai hauei guztiei BSA % 10 gehitu zitzaien erabilera egoki batetarako.

### 1.3.2 RPMI hazkuntza-medioa

20 mM HEPES

0,3 g/l L-glutamina

2,0 g/l sodio bikarbonato

5000 unitate penizilina eta 5 mg estreptomizina/ml

% 10 KSR

## 1.4 Soluzioak

### 1.4.1 Fosfato/gatz-indargetzailea (Phosphate buffered saline; PBS)

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

1,5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

8,1 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

$\text{H}_2\text{O}$ -a bolumena bete arte

### 1.4.2 Tris-HCl/ 1M/ pH 8,8 Tris

1000 ml  $\text{H}_2\text{O}$

121,14 g Tris-Base

HCl-aren pH-a 8,8-ra heldu arte

### 1.4.3 Tris-HCl 0,5M pH: 6,8

1000 ml  $\text{H}_2\text{O}$

62,07 g Tris-Base

HCl-aren pH-a 6,8-ra heldu arte



#### **1.4.4 BZA erreaktiboa**

A erreaktiboa:

% 1 (b/b) BZA

% 2 (b/b) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

% 0,16 (b/b) Tartrato sodiko

% 0,4 (b/b) NaOH

% 0,95 (b/b) NaHCO<sub>3</sub>

Hauek guztiak pH 11,25-era doitu NaOH-rekin

B erreaktiboa:

% 4 CuSO<sub>4</sub>

#### **1.4.5 Sodio dodezil sulfatoa (SDS) - %10**

100 ml H<sub>2</sub>O

10 g SDS

#### **1.4.6 Persulfato amonikoa - %10**

10 ml H<sub>2</sub>O

1 g persulfato amoniko

#### **1.4.7 Gel banatzailea**

%30 akrilamida / % 1 bisakrilamida: akrilamida, %30etik nahi den %-ra eramateko, diluitu egin behar da (adibidez, % 12rako, 2,5 aldiz diluitu)

Tris-HCl 1 M pH 8,8: % 25 (bol)

% 10 SDS: % 1 (bol)

H<sub>2</sub>O: bolumena bete arte

% 10 (p/b) persulfato amonikoa: 50 µl

TEMED: 10 µl

#### **1.4.8 Gel kontzentratzailea**

%30 akrilamida / % 1 bisakrilamida: akrilamida % 4ra (7,5 aldiz diluitu)

Tris-HCl 0,5 M pH 6,8: % 25 (bol)

% 10 SDS: % 1 (bol)

H<sub>2</sub>O: bolumena bete arte

% 10 (p/b) persulfato amonikoa: 25  $\mu$ l  
TEMED: 5  $\mu$ l

#### **1.4.9 Elektroforesi-indargetzailea – 10X**

250 mM Trizman-Base  
% 1 (p/b) SDS  
2 M Glizina  
H<sub>2</sub>O-a bolumena bete arte  
pH 8,3 doitua atera behar da  
Erabiltzeko, H<sub>2</sub>O-arekin 10 aldiz diluitu behar da

#### **1.4.10 Transferentzia-indargetzailea – 10X**

250 mM Trizman-Base  
% 0,25 (p/b) SDS  
1,92 M Glizina  
H<sub>2</sub>O-a bolumena bete arte pH 8,3 doitua atera behar da  
Erabiltzeko, H<sub>2</sub>O-arekin 10 aldiz diluitu behar da. Diluitzean, % 20 (b/b) metanol gehitu behar zaio.

#### **1.4.11 *Blotto* soluzioa**

TBS  
% 0,1 Triton X-100

#### **1.4.12 Blokeo soluzioa**

*Blotto*  
% 5 esne gaingabetua

#### **1.4.13 Kimioluminiszentzia-areagotzailea (Enhanced chemiluminescence; ECL)**

1,25 mM luminol  
0,2 mM azido p-kumariko  
0,1 M Tris-HCl pH: 8,5  
H<sub>2</sub>O-a bolumena bete arte

Nahastura hori 4 °C-an eta iluntasunean gordetzen da erabilia izan arte. Erabiltze-egunean, iluntasunean gordeta dugun nahasturara % 0,3 (b/b) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (%30) gehitu behar zaio.

#### **1.4.14 Tris/azetato indargetzailea + EDTA (TAE)**

0,4 M Tris-Base

% 5,7 (b/b) Azido azetiko glazial

10 mM EDTA

pH 8

#### **1.4.15 Agarosa-gela**

% 2 agarosa

100 ml TAE (DEPC)

Irakiten jarri (1-2 min)

% 1 etidio bromuro

Gel-euskarria bota, eta orraziak jarri polimerizatu arte (20 min)

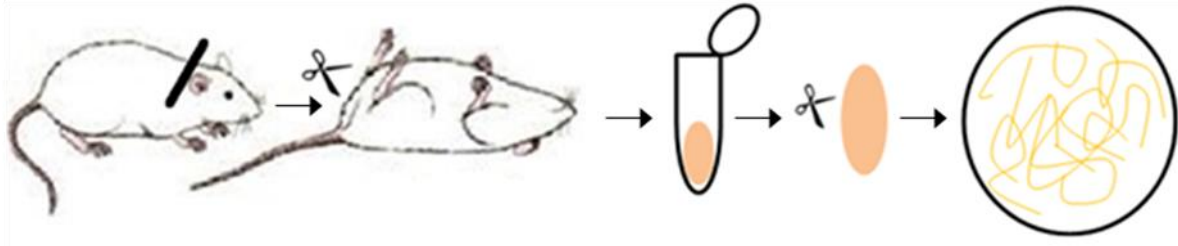
## 2. METODOAK

### 2.1 Animaliak

Esperimentuak zortzi asteko 200 *Swiss* sagu arrekin egin ziren, hauek zortzigarren astetik aurrera heldutasun sexuala lortzen baitute. *Swiss* saguak *ad libitum* mantentzen ziren animaliategiko arduradunen zaintzapean. Saguei proteinetan aberatsa zen pentsu espezifikoa- *Harlan Global diet 2014S*- eta iragazitako ura ematen zitzaien, honetaz gain, 12 orduko argi/ilun zikloetan mantentzen ziren. Laborategian ekoiztutako saguen erabilerarekin aldakortasun genetikoa murrizteaz gain, saguak euren artean odol-parekideak izatea ziurtatzen zen lortutako emaitzak konparagarriak izan zitezen. Ikerketa, animalien erabilera dela eta, UPV/EHUren Batzorde Etikoaren oniritziaz egin zen (CEEA/313M/ 2011 eta CEBA/176/2011).

#### 2.1.1 Zelula testikularren isolamendua

Saguak lepoko hezurra hautsiz hiltzen ziren eta ugal-organoa atera ondoren guraizeen laguntzaz testikuluak dekapsulatzen ziren barruko tubulu seminiferoak ateratzeko (16. irudia). Tubulu seminifero hauek  $2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  ko kontzentrazioko kolagenasa diluzioarekin tratatzen ziren 15 minutuz  $37^\circ\text{C}$ tan, jarraian  $0,25\%$ eko tripsina/1mM EDTAarekin nahastuz 10 minutuz  $37^\circ\text{C}$ tan, tubulu barruko zelulak kanporatzeko. Inkubaketa-denbora hauen ostean tripsina eta zelulek osatutako nahasketa  $41 \mu\text{m}$ -ko poro diametrodun nylonezko iragazki batetik pasatzen zen. Iragazketaren ondoren lortutakoa zentrifugatzen zen  $800 \text{ g}$ /minutuko abiadurarekin 10 minutuz, bertatik lortutako gain-jalkina bota eta hauspeakina KREBS eta  $10\%$ -eko BSArekin egindako diluzioarekin nahasten zen. Nahasketa hau berriro ere zentrifugatzen zen beste 10 minutuz  $800 \text{ g}$ /minutu-ra, hemendik lortutako hauspeakinean zelula testikularrak zeuden.

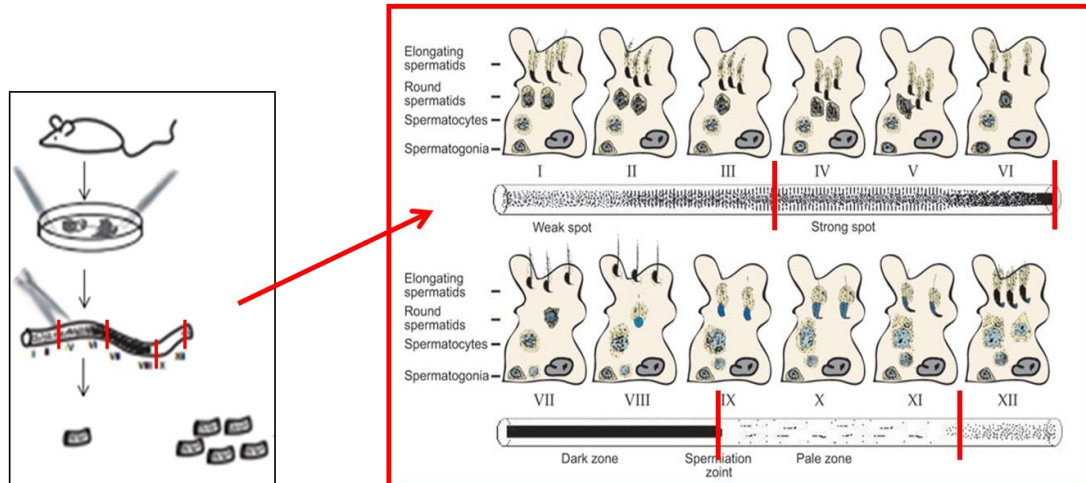


**16. irudia:** Tubulu seminiferoen dekapulazioaren prozedura.

### 2.1.2 Tubulu seminiferoetako estadioen sailkapena

Espermatogenesisa, epitelio seminiferoan zehar, ordena zehatzean gertatzen den garapen prozesu bat da. Espermatogenesisian zehar, espermatogonia, espermatozito eta espermatidek zatiketa zelularrak jasaten dituzte. Ondorioz, espermatogenesiko hozi-zelula hauek zubi zitoplasmatikoen bidez lotuta mantentzen dira zelula-asoziazioak edo konbinazio zelular zehatzak osatuz. Hain zuzen ere, zelula-asoziazio hauek momentuan partekatzen duten garapen-faseari estadio deritzo. Saguen espermatogenesisa, elkarren jarraian ematen den hamabi estadiotan bereizten da. Estadio bakoitzak argi-xurgapen patroia bereizgarria izan arren, estadio guztiek oso antzekoak diren patroiak izan ditzakete. Hau dela eta, espermatogenesisa lau taldetan sailkatu zen non; lehen taldea XII-III estadioei dagokion, bigarren taldea IV-VI estadioei, hirugarren taldea VII-VIII estadioei eta laugarren taldea IX-XI artean dauden estadioei (Kotaja eta lank., 2004).

Testikuluen dekapulazioaren ondotik eskuratzen ziren tubulu seminiferoak PBS zuen petri-kutxa batean mantentzen ziren. Jarraian pintza eta bisturi baten laguntzaz tubuluak sakabanatu eta taldekatzen ziren (17. irudia).



**17. irudia:** Tubulu seminiferoen estadiokako sailkapenaren eskema (Kotaja eta lank., 2004-tik moldatutako irudia. .

Tubuluetako zelulak andeatu ez zitezen komenigarria zen prozesu guztiak bi ordu baina gehiago ez irautea. Behin tubulu guztiak sailkatuta zeudela, baldin eta ez bazitzairen berehalako erabilera ematen,  $-80^{\circ}\text{C}$ -ko ultraizozkailuan gordetzen ziren.

### 2.1.3 Zelula espermatogenikoen hazkuntza-medioa eta agonistekin egindako tratamenduak

Erabilitako hazkuntza-medioa *Roswell Park Memorial Institute* 1640 (RPMI) izan zen. Bestalde, %10eko *Knockout Serum Replacement* (KSR) seruma ere erabili zen. Ondoren aipatzen diren antibiotikoak hazkuntza-medioan gehitu ziren; 5000 unitate penizilina eta 5 mg estreptomizina/ml %1ean eta L-glutamina 0,3 g/l hau ere %1ean. Zelula testikularren isolamenduaren bitartez lortutako zelulen inkubaketa-ingurunea RPMI hazkuntza-medioa izan zen KSR, L-glutamina eta P/S (*Penicillin/Streptomycin*)arekin nahastuta eta bertara substantziak gehitzen ziren. Zehazki, MOR, DOR eta KOR-en agonistak diren morfina, DPDPE eta U-50488 erabili ziren hurrenez hurren. Konposatu hauen *stock*-a ur distilatuan

egin zen. Zelula testikularrak aipatutako agonistekin tratatu genituen bi inkubaketa-denboratan: inkubaketa-denbora laburra (1h) eta inkubaketa-denbora luzea (24h). Erabilitako agonisten kontzentrazioa ezberdina izan zen. Morfina agonistaren kasuan erabilitako kontzentrazioa  $10^{-5}$ M izan zen eta bai DPDPE bai U-50488 agonisten kasuan erabilitako kontzentrazioa  $10^{-6}$ M izan zen (6. taula).

**6. taula:** Hiru opioide-hartzaileen agonisten (Morfina, DPDPE eta U-50488) kontzentrazioak molarretan (M) adierazita.

	Morfina	DPDPE	U-50488
Kontzentrazioa	$10^{-5}$ M	$10^{-6}$ M	$10^{-6}$ M

## 2.2 Giza testikuludun zehar-ebakiak

Giza testikuludun zehar-ebakiak *Zyagen* etxe komertzialean erosiz lortu ziren. Porta bakoitzean zeharkako mozketaz egindako tubulu seminiferoen bi lagin zeuden, lagin bakoitzak 7-10  $\mu$ m-ko lodiera zuen. Hauek erabili bitartean  $-80^{\circ}\text{C}$ -ko ultraizozkailuan mantentzen ziren. Giza testikuludun portetako lagin guztiak gizonezko osasuntsuenak izan ziren.

## 2.3 qRT-PCR analisia

### Oinarria

DNA zati zehatz baten kopia kopuru handia lortzeko, polimerasaren kate-erreakzioa (Polymerase Chain Reaction; PCR) erabiltzen da, oligonukleotido espezifikoak (*primer*-ak) erabiliz. Baina RNA mezulariaren (mRNA) azterketa egin nahi bada, lehenik eta behin, DNA osagarria (cDNA) eratu behar da alderantzizko transkriptasa baten bidez. Prozesu horri

alderantzizko transkripzioa (Retro-Transcription; RT) deritza. Beraz, lagin bateko mRNA guztien cDNA eratu eta gero, amplifikatu nahi den genearen sekuentzia-tartea mugatuko duten 2 *primer*-ak erabiliz, PCRa egingo da. Analisi honen laguntzaz DNA zati baten kopia kopurua handitzeaz gain, aldi berean kuantifikatzea ere lortzen da. Hori dela eta, teknika osoari qRT-PCR deritza.

## Protokoloa

### **1. RNA erauztea**

RNA totala eskuratzeko agonistekin tratatutako zelulak eta baita tubulu seminiferoen taldekako sailkapenean eskuratutako zelulak erabiltzen ziren. Honetarako, *Nucleo Spin RNA II Kit*-ean (Macherey-Nagel) azaldutako fabrikatzailearen argibideak jarraitzen ziren. Hozizelulak lisatu ondoren bertako biskositatea murrizteko asmoz lisatua iragazten zen. Lortutako nahasketa *ependorf* saiodiaren hondora eror zedin, zentrifuga-pultsu bat ematen zitzaion minutu batez (11000 g). RNA katearen lotura errazteko 350 µl etanol (%70) botatzen ziren pipetarekin ondo nahastuz eta zentrifugan pultsu bat emanez 30 segundoz (11000 g). Lortutako hauspeakinean 350 µl *Mintzen tanpoi gezatzailea (Membrane Desalting Buffer)* gehitu eta *ependorf*-a minutu batez 11000 g-tara zentrifugatzen zen, mintza lehertzeko. Soluzioari gatza kentzeak rDNAasaren liseriketa errazten du. DNAREN liseriketarako 10 µl *rDNasa indartzaile* eta 90 µl *rDNasa-rako erreakzio tanpoia (Reaction Buffer for rDNase)* nahasten ziren. Aurreko nahasketa honetatik 95 µl isurtzen ziren mintzera eta giro tenperaturan inkubatzen uzten zen 15 minutuz. Azkenean, mintza hiru bider garbitu eta lehortu behar zen aurreko pausuetako disoluzio indargetzailerik gelditzen ez zela ziurtatuz. Garbiketa prozesu hauen emaitza RNA erauzi totala zen.



## 2. RNAREN Kuantifikazioa

RNAREN kuantifikaziorako *Nanodrop* espektrofotometroa erabiltzen zen. Honetarako 1,2µl DEPC-urarekin kalibratu eta zuria egiten zen. Jarraian erauzitako RNA laginak 260nm-tara neurtzen ziren (hauek ere 1,2 µl-ko bolumena zutela). Neurketa egin ostean aparatuek 260- eta 280 nm arteko absorbantzia erlazioa azaltzen zuen, RNAREN purutasuna zein zen erakutsiz (disolbatzailearen arabera den arren, neurri egokiena 1,8tik gorakoa da).

## 3. RNAREN OSOTASUNA

RNA 1 µg-rekin agarosa %1eko TAE 1x gel batean elektroforesi azkar bat egiten zen. Honetarako, RNA laginen egitura sekundarioak desegin behar ziren hauek, 10 minutuan 65°C-ra berotuz. Elektroforesia 10-15 minutu inguru mantentzen zen 125 V-tara. Ateratzen ziren banden osotasuna eta 28S zein 18S arteko erlazioa egokia zela baieztatzen zen.

## 4. Alderantzizko transkripzioa

DNA osagarriaren (cDNA) eraketarako erabilitako alderantzizko transkriptasa *SuperScript II RT* izan zen. Laburtuz, honakoa izan zen DNA osagarria eratzeko jarraitutako prozesua; 0,2 ml-ko *ependorf* saio-hodi batean nahasten ziren RNA total, 1 µl azarezko hexamero (50µM), 1 µl dNTP (desoxirribonukleotido trifosfato) (10mM) eta ur purua (RNasa-rik gabe) 12 µl arte. Azarezko hexameroak RNARA lotzeko, nahasketa 5 minututan 65°C-an berotzen zen, eta, horren ostean, izotzean uzten zen bi minutuz (RNAREN egitura sekundarioak desegiteko). Zentrifuga-pultsu batekin lagina berreskuratzen zen, eta 4 µl *5x First-Strand Buffer*, 2 µl DTT (0,1M) eta 1 µl RNasa inhibitzaile gehitzen zitzaizkion. Pipetarekin ondo nahastu eta gero, 1 µl *SuperScript II RT* gehitzen zen nahasketan eta, alderantzizko transkripzioa egiteko, 10 minutu uzten zen 25°C-an, 50 minutuan 42°C-an

(cDNA eratzeko) eta azkenik 15 minutuan 70°C-an (*RT* inhibitzeko). Lortutako cDNA erabili arte -4°C-an gordetzen zen.

## 5. Polimerasaren kate-erreakzioa (PCR)

PCRa egiteko 0,2 ml-ko *ependorf* saio-hodiak erabiltzen ziren. Lagin bakoitzeko, erreakzio-nahastura berdina sortzen zen aurrera (forward; f) eta atzerako (reverse; r) *primer*-ak izan ezik:

12,5 µl SyBr<sup>®</sup> Green koloratzailea

0,25 µl aurrerako *primer*-a

0,25 µl atzerako *primer*-a

0,25-25 µg/µl cDNA

7 µl H<sub>2</sub>O

Nahastea prest zegoenean, laginak termozikladorean sartzen ziren, eta, PCRa gauzatzeko, denbora-tarte, tenperatura eta ziklo egokiak ezartzen ziren (7. taula). Hasiera batean, lagina (cDNA) desnaturalizatu behar zen. Gero, *primer*-ak eta DNA polimerasa cDNAra lotzeko, tenperatura jaisten zen eta, behin hibridazioa emanda, tenperatura igotzen zen DNA polimerasak lan egin ahal izateko. Prozesu hori behin eta berriz errepikatuz, cDNAren tarte espezifikoaren amplifikazio esponentziala gertatzen zen.

## 7. taula: PCRaren ezaugarriak

Prozesua	Denbora	Temperatura	Ziklo zk.
Hasierako desnaturalizazioa	2´	95°C	1
Desnaturalizazioa	30´´	95°C	40
Hibridazioa	30´´	58°C	
Katearen hedapena	1´	72°C	
Azken hedapena	5´	72°C	1
Mantenua	-	4°C	1

Primer-en diseinua

Opioide-hartzaileen, zelula espermatogenikoen markatzaile espezifikoen eta ziklinen *primer*-en diseinurako interesezkoa zen genearen sekuentzia *National Center for Biotechnology Information* web orrian bilatzen zen. Topatutako sekuentzia FASTA formatura pasa ondoren, PRIMER3 izeneko programa informatikoan itsasten zen. Bertan, hainbat ezaugarri zehazten ziren, hala nola;

1. Erabiltzen zen fluorokromoa SyBr Green<sup>®</sup> zela kontuan izanik erabaki zen aurrerako eta atzerako *primer*-ak exoi ezberdinetan egotea. Fluorokromo honek DNA kate bikoitzetara inespezifikoki lotzeko joera du eta, beraz, *primer*-ak exoi berean egonda dimeroak sortzeko arriskua legoke okerreko seinalea jasoz.
2. Fusio tenperatura (T<sub>m</sub>) 59-61°C artekoa izatea.
3. GC nukleotidoen eduki totala % 30-80 artekoa izatea.
4. Anplikoien tamaina 150-200 bp artekoa izatea.
5. 3´muturreko azken bost nukleotidoek bi G edota C baino gehiago ez izatea, *primer* dimeroen eraketa ekiditeko.

Diseinatutako *primer*-ak (8. taula) aztergai ziren geneekiko espezifikoak izan behar ziren. Honetarako, BLAST izeneko tresna informatikoa erabiltzen zen. *Primer*-ak genoma osoarekin alderatzen ziren sekuentzia bakarrak zirela baieztatuz. Lortutako emaitzetatik gehien begiratzen zen aldagaia E balioa zen. Aldagai honen balio-tartea, gure sekuentzia eta hurrengoaren artean, zenbat eta handiagoa izan orduan eta espezifikotasun handiagoa zegoela esan nahi zuen, eta, beraz, hedapena modu fidagarriago batean gertatuko zela.

**8. taula:** qRT-PCR bidez egindako mRNAren analisisian erabilitako *primer*-ak. *mMOR*: sagu  $\mu$  opioide-hartzailea; *mDOR*: sagu  $\delta$  opioide-hartzailea; *mKOR*: sagu  $\kappa$  opioide-hartzailea; *mITG6*: sagu alfa-6 integrina hartzailea; *mSYCP1*: sagu SYCP1-hartzailea; *mSYCP3*: sagu SYCP3-hartzailea; *mACR*: sagu akrosina-hartzailea; *mB3*: sagu B3 ziklina; *mA1*: sagu A1 ziklina; *mE2*: sagu E2 ziklina; *mACTB*: sagu beta-aktina.

Genea	Sekuentzia (5'-3')	Izena
<i>mMOR</i>	(f) TGTCGGAGAACTGAGAGCAA (r) CCTGAACTGTGGAAGGAAGC	Mu opioide-hartzailea
<i>mDOR</i>	(f) TGTAAGAGGGCTGGGAATG (r) TTGGTTTGAGGGTTGGTTTT	Delta opioide-hartzailea
<i>mKOR</i>	(f) TGA CTGGGAAGGGAGGTC (r) AGCACTGGGAGAGCAGGTA	Kappa opioide-hartzailea
<i>mITG6</i>	(f) GCTTCCTCGTTTGGCTATGA (r) AATCGGCTTCACACTCA	Alfa-6 integrina
<i>mSYCP1</i>	(f) GCTTTTGGGAGAGGTTGAGA (r) CGCTGATGACTGTTCTTGCT	Konplexu sinaptonemalaren proteina-1
<i>mSYCP3</i>	(f) ATCTGGGAAGCCACCTTTG (r) AGCCTTTTCATCAGCAACATC	Konplexu sinaptonemalaren proteina -3
<i>mACR</i>	(f) CAGGAGCAAGAAGAGCAGGA (r) GAGTGAAGAAGGACGGGTTG	Akrosina
<i>mB3</i>	(f) GCCTTAGCGTTTCAGGAGAA (r) TGGGGTTTGCCTTTTTATTG	B3 ziklina
<i>mA1</i>	(f) ATACCTGCTCGGGAAAGAG (r) CTGAACCAAATCCGTTGCT	A1 ziklina
<i>mE2</i>	(f) AAACAGCACAGGATGTCAAAAA (r) TGGCAGAGGTGAGGGATTA	E2 ziklina
<i>mACTB</i>	(f) GGGCTATGCTCTCCCTCAC (r) CACGCACGATTTCCCTCT	Beta-aktina

## 2.4 Hartzaileen proteinen presentzia

### Proteinen kontzentrazioa neurtzea (BZA metodoa)

#### Oinarria

Metodo hau tubulu seminiferoen taldekako sailkapenean eskuratutako zelulen proteina-kontzentrazioa ezagutzeko erabili zen. Lagin hauen proteinen kontzentrazioa ezagutzeko azido bizinkoninikoaren metodoa (BZA metodoa) erabili zen. Metodo hau inguru alkalino batetan dauden proteinen lotura peptidikoek  $\text{Cu}^{++}$  ioiak banatzean datza. Sortutako  $\text{Cu}^+$  ioiak bi BZA molekulekin elkartzen dira bai euren egitura elektronikoa bai eta argi xurgapena 562 nm-ra aldatuz. Modu honetan partikulek purpura kolorea azaltzen dute. Konposatuaren xurgapena dagoen proteinaren kontzentrazioarekiko proportzionala da. Xurgapen eta proteinen kontzentrazioaren arteko erlazioa zein den ezartzeko, proteina-kontzentrazio ezaguna duten laginen segida egiten da. Erreakzioa gertatu ostean lagin bakoitzak duen xurgapena zehazten da espektrofotometria bidez. Lortutako balioekin grafiko bat egiten da non X ardatzean kontzentrazioa  $\mu\text{g/ml}$ -tan zehazten den eta Y ardatzean xurgapen unitateak. Kontzentrazio estandarren bidez egindako grafikoan azaltzen den lerroak proteina-kontzentrazioa eta xurgapenaren arteko erlazioa adierazten du.

Aldi berean, neurtu beharreko lagin esperimentalekin prozedura bera jarraitzen da. Modu honetan, eta lagin estandarrekin egindako grafikoa aurrean dugula, lagin esperimental hauek duten proteina-kontzentrazioa zein den zehaztu daiteke.

#### Protokoloa

Patroi zuzena 1 mg/ml kontzentrazioa zuen behi-umekiaren serum albuminaren (BSA) eta ur distilatuaren ( $\text{H}_2\text{O}_d$ ) bolumenak proportzionalki aldatuz egiten zen. Honetaz gain, 1 ml erreaktibo ere gehitzen zen BSA eta  $\text{H}_2\text{O}_d$  zuen saio-hodi bakoitzean. Erreaktiboak A

erreaktiboaren (BZA) 50 bolumenek eta B erreaktiboaren ( $\text{CuSO}_4$ ) bolumen batek osatzen zuten.

Laginak prestatzea:

Lagin bakoitza (50  $\mu\text{l}$ ) aurretik prestatutako 1 ml-ko erreaktibodun saio-hodi batetan nahasten ziren. Baldin eta laginen bolumena txikia bazen 25  $\mu\text{l}$  lagin + 25  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  nahasten ziren erreaktibora gehitu baino lehen. Patroi zuzena eta laginak zituzten saio-hodiak prest zeudenean hauek 30 minutuz mantentzen ziren  $37^\circ\text{C}$ -tan. Ondoren xurgapena neurtzen zen 562 nm-tan. Azkenik, laginen xurgapen emaitzak patroi zuzeneko emaitzekin erkatzen ziren proteinen kontzentrazioa ezagutzeko.

### **Elektroforesia (SDS-PAGE), transferentzia eta western blot-a**

#### Oinarria

Elektroforesia proteinak tamaina eta kargaren arabera banatzeko erabili ohi da, gero proteina hauek identifikatzeko edo purifikatzeko helburuarekin. SDSren presentzian egindako dimentsio bateko poliakrilamidazko gel elektroforesian (SDS-PAGE), proteinak, eremu elektriko bati esker, geleko poroetan zehar barreiatzen dira. Itxura eta tamaina alagarrietako proteinak gelean zehar barreiatzeko beharrezkoa da hauek desnaturalizatzea (SDSren laguntzarekin), honela euren egitura sekundario, tertziario eta baita kuarternarioak ere galtzen dituzte. Poroen tamaina akrilamida-kontzentrazioak baldintzatzen du, beraz, proteinen migrazio-abiadura gelaren poroen tamaina eta proteinen karga, neurri eta itxuraren araberakoa da.

Gelean korriarazitako proteinak mintz baten azalari itsasteari deritzo transferentzia. Honetarako erabiltzen den mintza nitrozelulosa, nylon edo PVDFzkoa (Polyvinylidene

difluoride) izan daiteke. Prozesu hau elektroforesiz egiten da, behin prozesua bukatuta, tindaketa itzulgarria egiteko aukera dago.

Immunodetekzioa antigorputz monoklonal edo poliklonal bidez antigeno espezifikoa ezagutzeko erabiltzen da. Kasu honetan, bilatzen dugun proteina espezifikoa aurkitzeko erabiliko da.

## Protokoloa

### **1. Elektroforesia**

#### Gela prestatzea

Bi kristal-laukirekin 0,75 mm-ko tarteko *sandwicha* sortu eta beheko aldea ixten zen. Kristalek sortutako tartean, gelaren zati banatzailea (beheko partean) eta kontzentratzailea (goiko partean) sortzen ziren:

Gel banatzailea: proteinak negatiboki kargatu eta desnaturalizatzen direnez, pisu molekularren arabera soilik banatuko dira. Akrilamidaren portzentajea aztertu nahi genuen proteinaren pisu molekularren arabera erabaki zen. Gure proteinak 40 kDa eta 100 kDa artean agertuko zirela espero zen eta, beraz, %10-eko bereizmena zuten gelak egitea erabaki zen.

Erlenmeyer batean, gel banatzailea eratzeko konposatu guztiak gehitzen ziren (amonio persulfatoa eta TEMED azkenean) eta nahasten ziren. Pipeta batez, nahasketa kristalen artean sartzen zen eta, gela zuzen geratzeko, nahasketaren gainean isopropanola gehitzen zen. Gela polimerizatzen zenean (15-20 min) gehitutako isopropanola ondo kentzen zitzaion.



Gel kontzentratzailea: proteinak gel banatzaileran igaro baino lehen lerrotatu behar ziren gel kontzentratzailean. Gel horrek beti %4-ko akrilamida-portzentaje berdina zuen Tris-HCl pH 8,8an.

Gel banatzailea bezala eraten zen, aldaketa bakarra Tris-HCl-aren pH 6,8 zen. Pipeta batekin, eraturako nahasketa gel banatzaile polimerizatuaren gainean botatzen zen kristalen tartea goraino bete arte eta orrazia jartzen zitzaion kaleak sor zitezten. Gela polimerizatzen zenean (15-20 min), orrazia kendu eta elektroforesi-ındargetzaileaz betetako elektroforesi-euskarrian jartzen zen.

## **2. Laginak prestatzea, kargatzea eta gela korriaraztea**

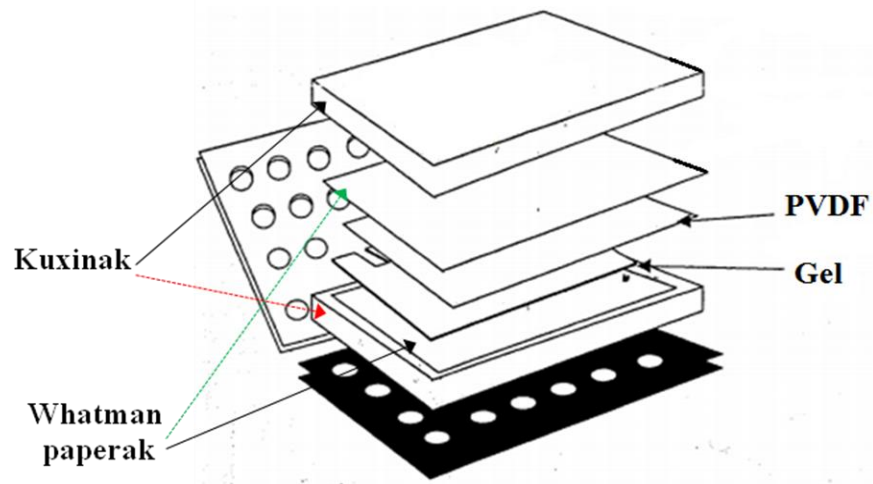
Tubulu seminiferoetako estadioen sailkapenean eskuratutako zelulak isolatu eta hauetatik proteinak erauzi ondoren, proteinentzako karga-ındargetzailearekin berreseki eta diluitzen zen eta 3-5 minutuan irakiten jartzen zen (100°C). Gelaren kale bakoitzeko 15µl (edo 15 µg) proteina kargatzen ziren (jakirik lagin guztiak 1µg/µl-ra eta, beraz, 1mg/ml-ra berdinduta zeudela) %10eko bereizmenarekin eraturako gelean. Kale batean pisu molekular ezaguneko proteinak kargatzen ziren. Proteinak 100 V-ean korriarazten ziren kontzentrazio-gela zeharkatu arte eta, hortik aurrera, korronea 200 V-ean eramaten zen bromofenol urdina gelaren bukaerara iritsi arte.

## **3. Transferentzia**

### *Sandwicharen muntaia*

Transferentzia-*sandwich*-aren muntaiaren ordena, polo negatibotik positibora, hau izan zen: kuxina, *Whatman* paperak (x3), gela (zati kontzentratzailerik gabe), transferentzia-mintza (PVDF), *Whatman* paperak (x3) eta kuxina (18. irudia). Burbuilak kentzeko,

azkeneko *Whatman* paperen gainetik zilindro bat pasatzen zen. Gela, *Whatman* paperak, PVDFa eta kuxinak, transferentzia-indargetzailean egonkortzen ziren (5-10 min).



**18. irudia:** Transferentzia *sandwich*-eko muntaiaren ordena.

#### 4. Geletik mintzerainoko transferentzia

Transferentzia-*sandwich*-a itxi eta transferentzia-*cassette*-an orientazio egokian jarri ostean (gela anodoari eta PVDFa katodoari begira), *cassette*-a transferentzia-indargetzailez beteriko transferentzia-euskarrian sartzen zen eta proteinak 100 V-ean transferitzen ziren 1,5 orduan.

#### 5. Immunodetekzioa

Lotura ez-espezifikoak ekiditeko, PVDFa blokeo-soluzioan ordu batean murgiltzen zen giro-tenperaturan. Garbiketa arin baten ostean, saguentzako untxi-antigorputz poliklonal primario espezifikoekin inkubatzen zen gau osoan 4°C-an (9. taula).

**9. taula:** Western blot-ean erabilitako antigorputzak. Untxian egindako anti-MOR:  $\mu$  opioide-hartzailea; anti-DOR:  $\delta$  opioide-hartzailea eta anti-KOR:  $\kappa$  opioide-hartzailea; sagan egindako anti- $\alpha$ -tubulina antigorputz monoklonala; Anti-Rabbit IgG\_HRP: untxiaren IgG-aren kontrako ahuntz-antigorputz sekundarioa; Anti-Mouse IgG\_HRP: saguaren IgG-aren kontrako ahuntz-antigorputz sekundarioa.

ANTIGENOA	OSTALARIA	DILUZIOA	ETXE KOMERTZIALA
<i>Anti-MOR</i>	Untxia	1:250	Millipore
<i>Anti-DOR</i>	Untxia	1:250	Millipore
<i>Anti-KOR</i>	Untxia	1:250	Millipore
<i>Anti-<math>\alpha</math>-Tubulina</i>	Sagua	1:16000	Sigma
<b>Anti-Rabbit IgG: HRP</b>	Ahuntza	1:3000	Abcam
<b>Anti-Mouse IgG: HRP</b>	Ahuntza	1:5000	Santa Cruz

Horren ostean, garbiketak egiten ziren Blotto soluzioarekin (3x5 min) eta peroxidarekin elkartutako untxiaren IgG-aren kontrako ahuntz-antigorputz sekundarioarekin inkubatzen zen ordu batean giro-tenperaturan. Blotto soluzioarekin PVDFaren azkeneko garbiketak egin ondoren (3x5 min), PVDFa ECLrekin ongi bustitzen zen eta *Chemidoc* gailuarekin aztertzen zen.

Azkenik, bandak ikusarazteko, aipatutako softwarearen hainbat aldagai doitu eta argazkia ateratzen zen. Bukatzeko, argazkiaz baliatuz, kale bakoitzean lortutako banda pisu molekularreko estandararekin alderatzen zen. Hartzaile bakoitzerako espero ziren kDa-ak lortzen baziren, lagin horretarako hartzailearen presentzia ondorioztatzen zen.

## 6. Stripping-a

PVDFtik antigorputzak erauzteko eta mintza berrerabiltzeko, *stripping* deituriko teknika erabili zen. PVDFa, guanidina-tiozianatoan (6 M) 5-10 segundoan murgiltzen zen (PVDFa gardendu arte) eta, Blotto soluzioarekin garbiketak egin eta gero (3x5 min), PVDFa

berrerabili egiten zen beste immunodetekzio baterako. Kasu honetan PVDFa, tubulinaren immunodetekziorako berrerabiltzen zen.

Tubulinak 50 kDa ditu eta egitura zelular guztietan berdin mantentzen da, hau dela eta, barne-kontrol gisa erabili zen. PVDFa Blotto soluzioarekin ordu batean giro-tenperaturan utzi ostean sagu-antigorputz monoklonal primario espezifikoa zuen tubulinarekin beste ordu batez giro-tenperaturan murgiltzen zen azidarekin konjugatuta zegoen Blotto soluzioan. Garbiketak egin ostean (3x5 min), PVDFa peroxidasarekin konjugatutako saguaren IgG-aren kontrako ahuntz-antigorputz sekundarioarekin inkubatzen zen ordu batean giro-tenperaturan. Blotto soluzioarekin azkeneko garbiketak egin ondoren (3x5 min), PVDFa ECLrekin ongi busti eta *Chemidoc* gailuarekin aztertzen zen.

## 7. Dentsitometria bidezko kuantifikazioa

PVDFan detektatutako banden intentsitatea dentsitometriaz (edo optika-dentsitateaz) kuantifikatu zen *Image Lab* softwarea erabilita. Eskuratutako intentsitate datuak  $\alpha$ -tubulina barne-kontrolaren banden intentsitatearekin normalizatzen ziren.

## 2.5 Hartzailen proteinak kokatzea

### Immunofluoreszentzia

#### Oinarria

Immunoziokimika eta immunohistokimika, hurrenez hurren, zelula eta ehunetan dauden proteina edo antigeno jakinak detektatzeko erabiltzen den teknika da. Immunodetekzio ez-zuzena antigorputz primario espezifikoa gehi antigorputz markatua erabiliz egiten da. Antigorputzen marka fluorogenikoa bada, antigeno espezifikoak fluoreszentzia-mikroskopia bidez detektatu eta lokalizatuko dira.

## Protokoloa

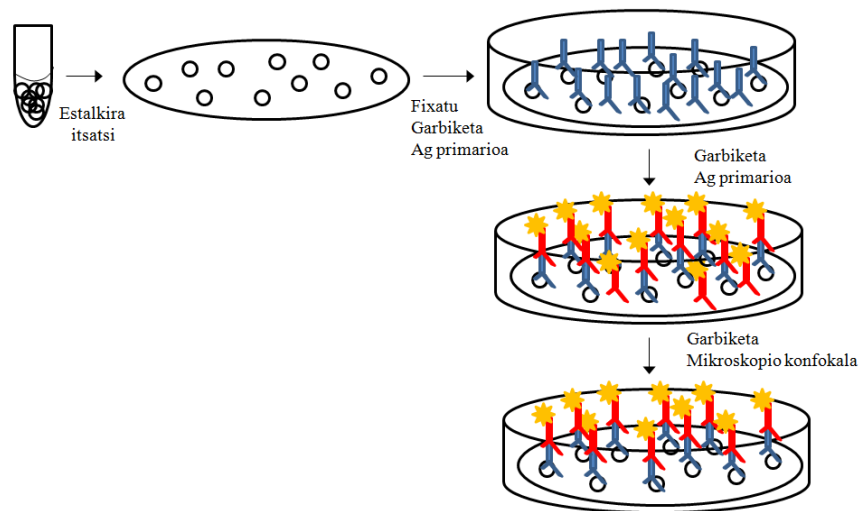
### a) Saguen zelula espermatogenikoen immunozitokimika

Zelula espermatogenikoetako opioide-hartzaileen kokapen zehatza ezagutzeko zelula espermatogenikoekiko espezifikokoak diren markatzaileen immunofluoreszentzia bikoitza egin zen. Alfa-6 integrina (ITG6), konplexu sinaptonemalaren proteina-1 (SYCP1) eta konplexu sinaptonemalaren proteina-3 (SYCP3) eta akrosina (ACR) erabili ziren, hurrenez hurren, espermatogonia (Phillips eta lank., 2010), espermatozito (Fraune eta lank., 2012) eta espermatiden (Ohta eta lank., 2009) markatzaile espezifiko gisa.

Kasu honetan immunofluoreszentzia dekapsulatutako testikuluetatik erauzitako zelula espermatogenikoetan zeuden hartzaileen kokalekua zehazteko erabili zen. Zelula testikularrak isolatu ondoren PBSan esekitzen ziren. Estalki bakoitza etanol eta ur distilatuarekin garbitu ondoren *Poly-L-lisina* jartzen zen, zelula testikularrak euskarri horretan itsas zitezten. Zelula testikularrak ondo itsatsi zirela ziurtatzeko 10 minutuz uzten genuen estalkia. Honen ondoren, soberan gelditzen zen tanta paper-iragazkiarekin lehortzen zen eta estalkiko zelulak finkatzeko paraformaldehido %4 (10 min) erabili zen. PBSarekin garbitu ondoren (3x5 min) metanol hotzarekin iragazkortzen zen (10 min). Iragazketa-prozesua amaituta zelulak PBS + %10 (bol/bol) behi-umekiaren serum albuminarekin blokeatzen ziren 30 minutuan.

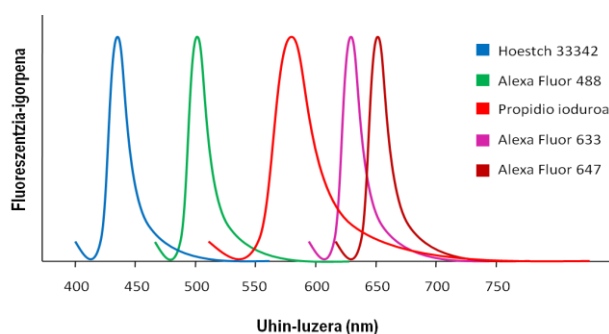
Zelulak untxi-antigorputz poliklonal primario espezifiko bakoitzarekin (10. taula) inkubatzen ziren gau osoan 4 °C-an. Horren ostean, PBSarekin garbitzen zen (3x5 min) eta konposatu fluorogenikoz konjugatutako untxi, sagu eta ahuntzaren IgG-en kontrako asto-antigorputz sekundarioarekin inkubatzen ziren (10. taula) iluntasunean, bi orduan eta giro-temperaturan. Estalkien azkeneko garbiketa egin ondoren (3x5 min), *Fluoromont G*-rekin

muntatu ziren porta baten gainean (19. irudia). Zelula espermatogenikoak mikroskopia fokukidearen bidez aztertu ziren, non argon ioi bidezko laserrarekin 488 nm-an kitzikatu eta 519 nm-an jasotzen zen. Bestalde, 633 eta 647 nm-an kitzikatzean, 648/688 nm-an jasotzen zen (20. irudia).



**19. irudia:** Immunozitokimikako esperimentuaren eskema. Estalkiek 12 mm-ko diametroa zuten eta inkubaketak egiteko, hazkuntza zelularerako erabiltzen diren 24 putzuko plakak erabiltzen ziren; irudian 24 putzutik bat irudikatzen da. Azalpen zabaldua testuan.

Zelula espermatogenikoen nukleoak markatu nahi zirenean, azkenaurreko garbiketan Hoestch 33342 koloratzailea (3  $\mu$ M) erabiltzen zen. Argon ioi bidezko laserrarekin 405 nm-an kitzikatuz, 440 nm-an jasotzen zen, baina, kasu honetan, modu sekuentzialean, antigorputz-sekundarioen eta Hoestch 33342-ren seinaleak nahas ez zitezen (20. irudia).



**20. irudia:** Testuan aipatutako fluorokromo ezberdinen kitzikapen eta jasotze fluoreszentzien histograma.

Antigorputz primarioarekin egindako inkubaketa izan ezik, kontrol negatiboak modu berdinean egin ziren. Antigorputz-primarioen espezifitatea ezagutzeko, antigorputz-primarioak immunoglobulina G inespezifikoekin inkubatu ziren. Prozesu hau aurretik azaldu den modu berean egiten zen baita ere.

**10.taula:** Immunofluoreszentzian erabilitako antigorputzak. Untxian egindako anti-MOR:  $\mu$  opioide-hartzailea; anti-DOR:  $\delta$  opioide-hartzailea eta anti-KOR:  $\kappa$  opioide-hartzailea; ITG6: Alfa-6 integrina hartzailea; SYCP1: SYCP1-hartzailea; SYCP3: SYCP3-hartzailea; ACR: akrosina-hartzailea; Anti-Rabbit IgG\_Alexa Fluor 488: untxiaren IgG-aren kontrako asto-antigorputz sekundarioa; Anti-Mouse IgG\_Alexa Fluor 647: saguaren IgG-aren kontrako asto-antigorputz sekundarioa; Anti-Goat IgG\_Alexa Fluor 633: ahuntzaren IgG-aren kontrako asto-antigorputz sekundarioa.

ANTIGENOA	OSTALARIA	DILUZIOA	ETXE KOMERTZIALA
Anti-MOR	Untxia	1:1000	Millipore
Anti-DOR	Untxia	1:1000	Millipore
Anti-KOR	Untxia	1:1000	Millipore
Anti-ITG6	Sagua	1:1000	Abcam
Anti-SYCP1	Ahuntza	1:700	Santa Cruz
Anti-SYCP3	Sagua	1:1000	Santa Cruz
Anti-ACR	Ahuntza	1:500	Santa Cruz
Anti-Rabbit IgG: Alexa Fluor 488	Astoa	1: 1000	Life Technologies
Anti-Mouse IgG: Alexa Fluor 647	Astoa	1:1000	Life Technologies
Anti-Goat IgG: Alexa Fluor 633	Astoa	1:500	Life Technologies

### Saguen zelula espermatogenikoen fluoreszentzia kuantifikazioa

Laser-mikroskopia fokukidean behatutako saguen zelula espermatogenikoen fluoreszentzia intentsitateak neurtzeko, *Image J* softwarea erabili zen. Argazkietako irudiak softwareara inportatuz eta bertako aldagaiak doituz aztertzen ziren. Irudi bakoitzean hiru kolore bereiz zitezkeen; urdina, gorria eta berdea. Kasu honetan soilik opioide-hartzaileen

fluoreszentzia intentsitatea kuantifikatu nahi zenez, kolore berdez markatuta zeuden zelulen azalera neurtzen zen.

Neurtutako aldagaien datuak excel orri batetara inportatu eta, azkenik, grafiko batetan adierazten ziren fluoreszentzien intentsitate balioak. Zuzendutako Zelulen Guztizko Fluoreszentzia edo CTCF (*Corrected Total Cell Fluorescence*) gisa. Honetarako, aztergai zen zelularen azalera kontrol gisa hartzen ziren fluoreszentzia gabeko batezbestekoekin biderkatu eta lortutako emaitza zelularen dentsitatearen balioari kentzen zitzaion. Eskuratutako CTCF balioa neurtutako zelularen azalerarekin zatitzen zen.

**$CTCF/\mu m^2 = [Dentsitatea - (Azalera * fluoreszentzia gabeko batazbestekoa)]/Azalera$**

b) Giza testikuludun zehar-ebakietako zelulen immunohistokimika

Immunofluoreszentzia giza testikuludun zehar-ebakietan zeuden hartzaileen kokalekua zehazteko erabili zen. Ebaketa bakoitza masa berezi batekin zigilatzen zen isuritako antigorputz eta garbitzaileak eror ez zitezen.

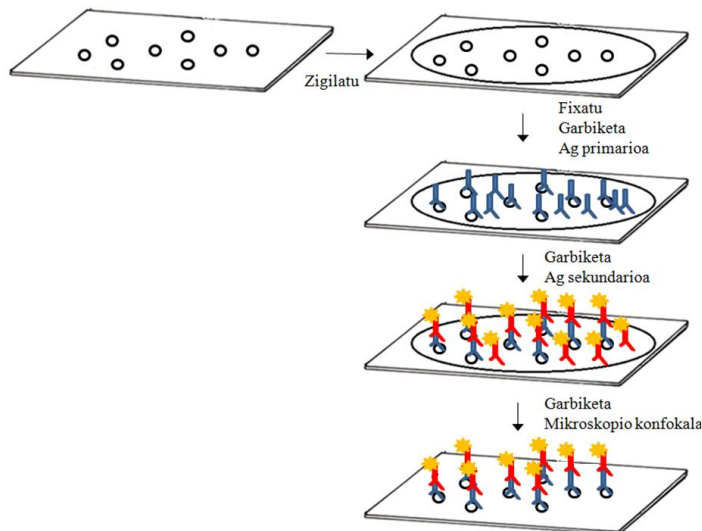
Gizon osasuntsuetatik ateratako testikuludun zehar-ebakiak *Zyagen* etxe komertzialaren bidez eskuratu ziren. Zehar-ebakietako zelulak finkatzeko paraformaldehido %4 (10 min) eta iragazkortzeko *Triton X-100* % 0,5 (10 min) erabili ziren. Azken pausu honen amaieran laginak PBSarekin garbitzen ziren (3x5 min). Finkatze-prozesua amaituta, laginak PBS + % 10 (bol/bol) behi-umekiaren serum albuminarekin blokeatzen ziren 30 minutuan irabiatuz.

Tindaketa ez-zuzena egiteko, laginak untxi-antigorputz poliklonal primario espezifiko bakoitzarekin (10. taula) inkubatzen ziren gau osoan 4°C-an. Hurrengo egunean laginak PBSarekin garbitzen ziren (3x5 min) eta sagu eta ahuntz-antigorputz poliklonal primario espezifiko bakoitzarekin inkubatzen ziren beste gau batez 4°C-an. Hirugarren egunean laginak PBSarekin garbitzen ziren (3x5 min) eta konposatu fluorogenikoz konjugatutako



untxiaren IgG-en kontrako asto-antigorputz sekundarioarekin inkubatzen ziren (10. taula) iluntasunean, ordu batez eta giro tenperaturan. Laginak PBSarekin garbitu ondoren (3x5 min) sagu eta ahuntzaren IgG-en kontrako asto-antigorputz sekundarioarekin inkubatzen ziren (10. taula). Laginak PBSarekin azken aldiz garbitu ondoren (3x5 min), zelula testikularren nukleoak propidio ioduroarekin (PI) markatzen ziren. Azken garbiketa ur distilatuarekin egiten zen eta hasieran jarritako masa zigilatzailea kentzen zen (21. irudia). *Fluoromont G* bidez muntatzen ziren ebaketak gain-estalki batekin. Ebakiak laser-mikroskopia fokukidearen bitartez aztertu ziren, non argon ioi bidezko laserrarekin 488 nm-an kitzikatu eta 519 nm-an jasotzen zen, bestalde, 540 nm-an kitzikatzean, 600nm-an jasotzen ziren (20. irudia).

Antigorputz primarioarekin egindako inkubaketa izan ezik, kontrol negatiboak modu berean egin ziren.



**21. irudia:** Immunohistokimikako esperimentuaren eskema. Porta bakoitzean zeharkako mozketaz egindako tubulu seminiferoen bi lagin zeuden, lagin bakoitzak 7-10  $\mu\text{m}$ -ko lodiera zuen; irudian bi laginetik bat irudikatzen da. Azalpen zabaldua testuan.

## 2.6 Ziklo-zelularra

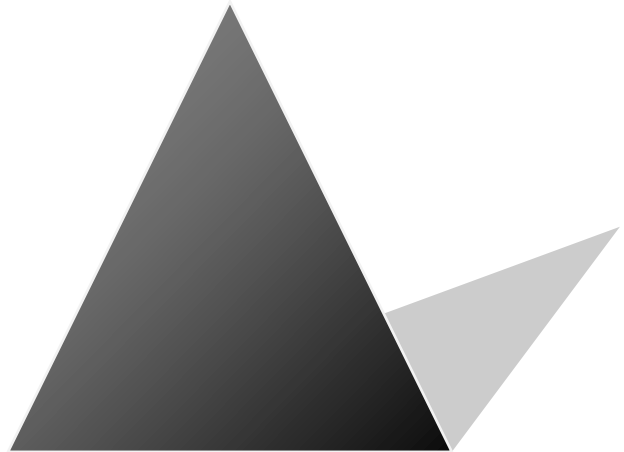
Zelula testikularren ziklo-zelularra aztertzeko propidio ioduroa (PI) deritzon tindatzailea erabili zen, konposatu honen *stock*-a ur distilatuan egin zen 1 µg/ml kontzentrazioan. PI konposatua erabiltzearen arrazoia DNArekin 1:1 proportzioan lotzen zela eta, beraz, zelula bakoitzean zegoen DNA kopuruaren adierazle ona zela izan zen. Honetarako, zelulak saguen testikuluetatik ateratzen ziren atal honetako 2.1.1 puntuan adierazten den bezala. PBSan zeuden zelula testikularrak atera ondoren %70-eko etanola gehitzen zitzaien eta 4°C-an uzten ziren ordu batez. Denbora hau pasa ondoren *ependorf* saio-hoietan zeuden zelulak zentrifugatzen ziren (800 g/ 5 min.) gainjalkina errefuxatuz eta 500 µl PBSarekin hauspeakina berresekiz. Diluzio honetan RNasa (1,25 µl) eta PI (25µl) konposatuak gehitzen ziren. Laginak zitometrora eraman baino lehen *ependorf* saio-hodietan zeuden zelulak 4°C-an uzten ziren beste ordubetez. Azkenik, zelulak zitrometora eraman eta argon ioi bidezko laserrarekin 488 nm-an kitzikatu eta 519 nm-an jasotzen ziren, bestalde, 540 nm-an kitzikatzean, 600nm-an jasotzen ziren (20. irudia).

## 2.7 Analisi estatistikoa

Emaitzen analisi estatistikoa Student-en t testa eta bariantzaren analisisia (*Analysis of variance*; ANOVA) eginez aztertu zen. Adierazgarritasunaren muga minimoa  $P < 0,05$ ean ezarri zen, aldiz,  $P < 0,01$ -eko balioak oso adierazgarritzat hartzen ziren. Hala konparatu ziren zelula testikular eta espermatogenikoetako batez bestekoen aldaketak tratamenduen artean eta inkubaketa-denbora ezberdinetan. *Post-hoc* analisirako, desberdintasun minimo adierazgarriaren testa (DMS) erabili zen. Analisi estatistikorako, SPSS 19.0 (*Statistical Package for the Social Sciences*) softwarea erabili zen.



**EMAITZAK**





## **1. helburua: $\mu$ , $\sigma$ eta $\kappa$ opioide-hartzaileen deskribapena eta kokapena hozi-zelula maskulinoetan**

Hoji-zelula maskulinoetako MOR, DOR eta KOR-en deskribapena eta kokapena ezagutzeko metodologia ugari erabili zen. Opioide-hartzaileen gene zein proteinen adierazpenak deskribatzeko erabilitako teknikak, hurrenez hurren, qRT-PCR-a eta western blot-a izan ziren. Teknika hauetaz gain, fluxuzko zitometriaz baliatuz, opioide-hartzaileen presentzia zelula testikularretako populazioetan aztertu zen. Azkenik, giza zein sagu laginetan, aipatutako opioide-hartzaileen kokapena ezagutzeko, immunotindaketen bidezko azterketak egin ziren. Eskuratutako informazio guztia bateratuz, lehen helburua osatu zen.

### **1.1. Saguen tubulu seminiferoetako estadioetako MOR, DOR eta KOR-en adierazpen genikoa**

qRT-PCR azterketen bidez *MOR*, *DOR* eta *KOR* geneen adierazpena aztertu zen tubulu seminiferoetako estadioetan oinarrituz. Izan ere, saguen ziklo espermatogenikoa, elkarren jarraian dauden hamabi estadioetan bereizten da (Russell eta lank., 1990). Estadio bakoitzak argi-xurgapen patroia bereizgarria izan arren, estadio guztiek oso antzekoak diren patroiak izan ditzakete. Hau dela eta, tubulu seminiferoetako opioide-hartzaileen geneen adierazpena lau taldetan banatuz aztertu zen non; lehen taldea XII-III bitartean zeuden estadioei zegokion, bigarren taldea IV-VI arteko estadioei, hirugarren taldea VII-VIII estadioei eta laugarren taldea IX-XI artean zeuden estadioei.

*MOR*, *DOR* eta *KOR*-en geneen adierazpena baieztatu zen saguen tubulu seminiferoetan aztertutako estadio guztietan. Hiru opioide-hartzaileen geneen adierazpenean bi joera nagusi ikusi ziren. Alde batetik, espermatogenesiko zikloan zehar, opioide-hartzaileen adierazpena

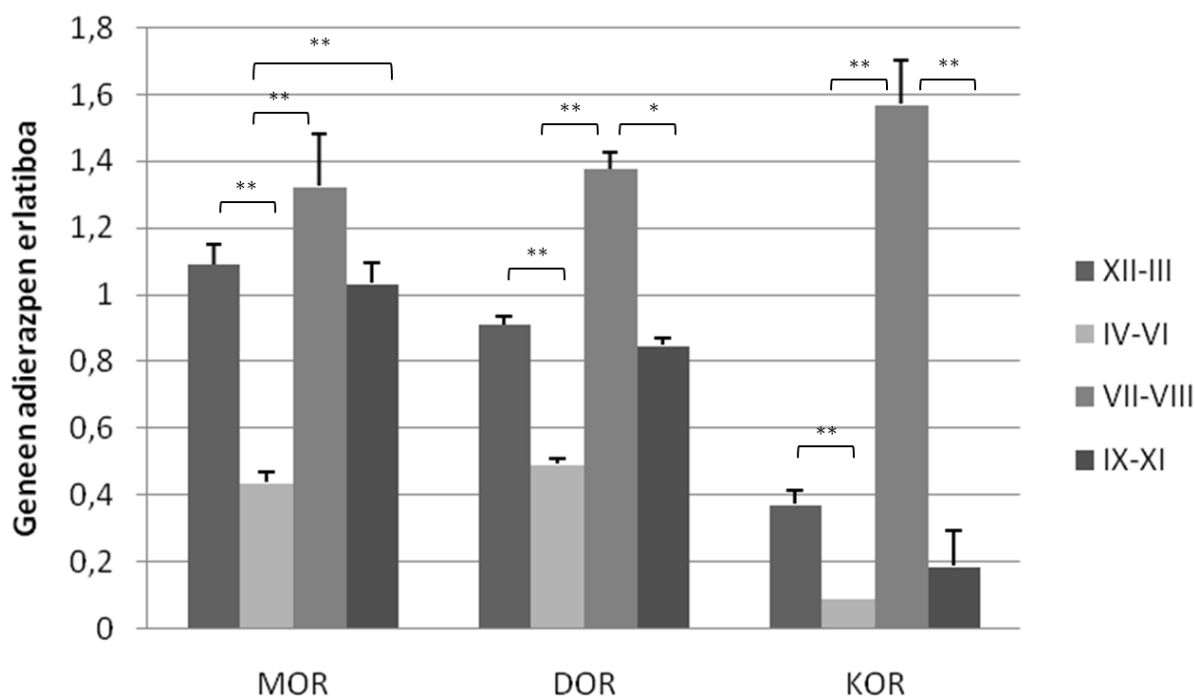
aldatzen zela antzeman zen. Bestetik, hiru opioide-hartzaileen adierazpen-patroia, zikloan zehar, errepikatzen zela behatu zen (22. irudia).

Zehazki, *MOR*-ren gene-adierazpena XII-III estadioetan IV-VI estadioetako adierazpenaren aldean, modu oso adierazgarrian handitzen zen (2,5 bider;  $P < 0,01$ ). VII-VIII estadioetako gene-adierazpena bere aurrekoarekin erkatzerakoan, hau ere, oso modu adierazgarrian handitzen zen (3 bider;  $P < 0,01$ ). Azkenik, IX-XI estadioetako *MOR*-ren gene-adierazpena jaitsi egiten zen VII-VIII estadioetako adierazpenaren aldean, beti ere, IV-VI estadioetako adierazpena baino balio altuagoa mantenduz modu oso adierazgarrian (2,4 bider;  $P < 0,01$ ).

*DOR*-ren kasuan ere, arestian aipatu bezala, adierazpen-patroi bera errepikatzen zen. Kasu honetan, XII-III estadioetako adierazpen balioak, IV-VI estadioetakoekin alderatuz, oso adierazgarriki igotzen ziren (2 bider;  $P < 0,01$ ). Bestetik, VII-VIII estadioetako gene-adierazpenaren balioa, bere aurrekoarekin konparatuz, ere oso modu adierazgarrian handitzen zen (3 bider;  $P < 0,01$ ). Ondorengo estadioen (IX-XI) adierazpen balioan beherakada igartzen zen arren, IV-VI estadioetako balioarekin berdinkatzerakoan, adierazpen-maila altuagoa erakusten zuen modu adierazgarrian (2 bider;  $P < 0,05$ ).

*KOR*-ren gene-adierazpena ere aztertu zen ziklo espermatogenikoan zeharreko estadioetan. XII-III estadioetako adierazpen-maila, IV-VI estadioetakoekin konparatuz, oso modu adierazgarrian (4 bider;  $P < 0,01$ ) handitzen zela behatu zen. VII-VIII estadioetan neurtutako gene-adierazpenaren igoera oso adierazgarria (18 bider;  $P < 0,01$ ) zen IV-VI estadioetakoekin alderatzerakoan. Azkenik, IX-XI estadioetako *KOR*-en gene-adierazpena jaitsi egiten zen oso adierazgarriki (11 bider;  $P < 0,01$ ) VII-VIII estadioetako adierazpenaren aldean.

Opioide-hartzaileen adierazpen genikoen adierazgarritasuna balioztatzeko beta-aktina (*ACTB*) gene normalizatzailerak erabili zen barne-kontrol gisa, bere adierazpena oso konstantea baita.



**22. irudia:** *MOR*, *DOR* eta *KOR* geneen adierazpenaren azterketa tubulu seminiferoetako estadioetan. *MOR*, *DOR* eta *KOR*-en adierazpen genikoak barne-kontrol gisa erabilitako beta-aktinaren (*ACTB*) genearen adierazpenaren balioekin normalizatu ziren. Adierazgarritasunaren muga minimoa  $p < 0,05$ ean ezarri zen (\*), aldiz,  $p < 0,01$ -eko balioak (\*\*) oso adierazgarritzat hartzen ziren,  $n=6$ .

## 1.2 Saguen tubulu seminiferoetako estadioetako MOR, DOR eta KOR-en proteinen presentzia

Saguen tubulu seminiferoetako ziklo espermatogenikoan zehar dauden opioide-hartzaileen (*MOR*, *DOR*, *KOR*) proteinen presentzia baieztatu zen western blot-a erabiliz (23. A irudia).

*MOR*-ren aurkako antigorputz poliklonala erabiliz, estadioetan sailkatutako tubulu seminiferoetan eta testikuluetan 45 kDa-eko banda antzeman zen. Kontrol positibo gisa garuna erabili zen. Garunean, aldiz, 45 kDa-eko bandaz gain, 60 kDa-eko

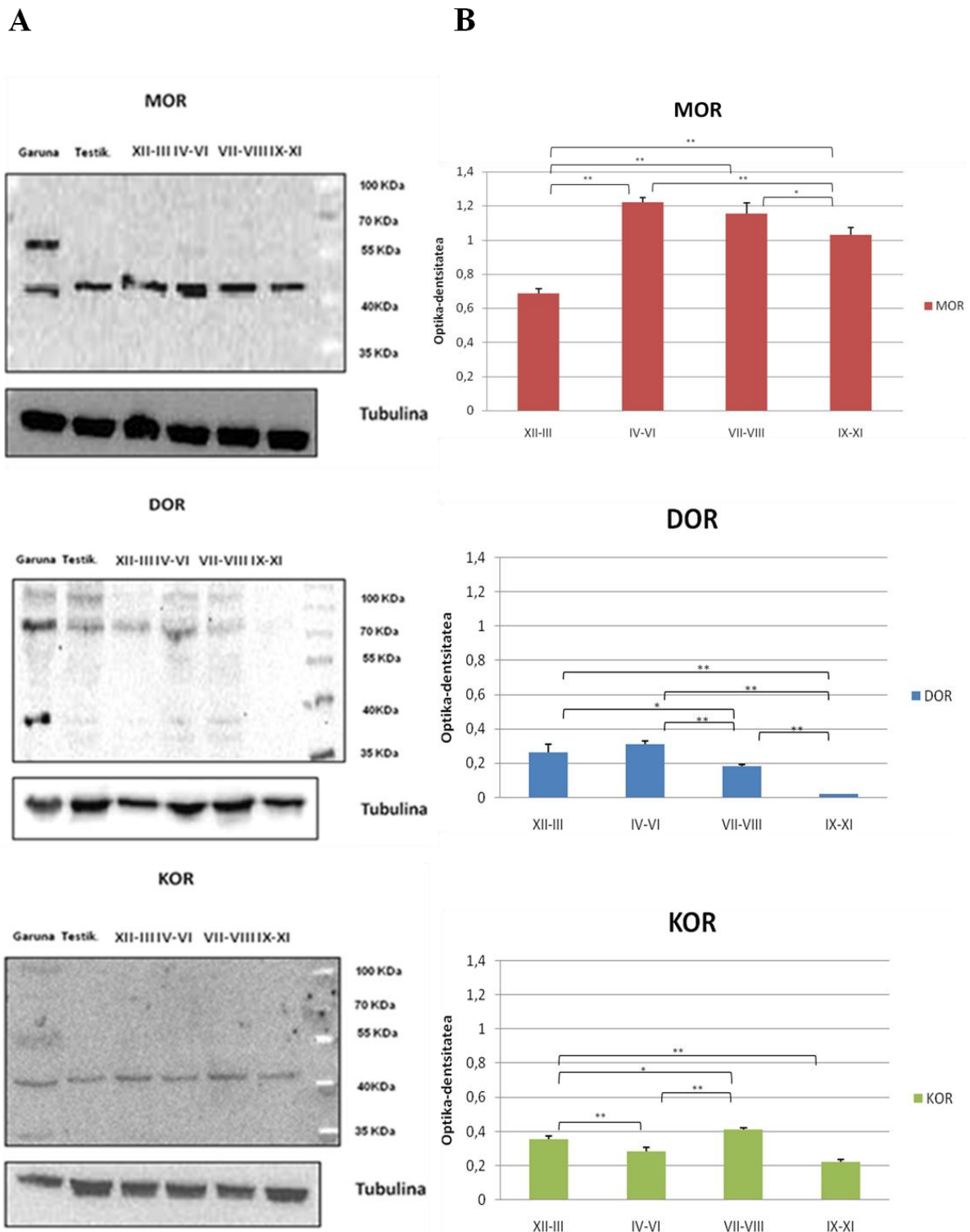


immunoerreaktibotasuna ere hautematen zen (23 A. MOR irudia). Barne-kontrol gisa erabilitako  $\alpha$ -tubulinaren kasuan 50 kDa-eko tamaina zuen banda baten presentzia ikus zitekeen bai kontrol positiboetan bai eta tubulu seminiferoen estadio guztietan ere. PVDFan detektatutako MOR proteinaren banden intentsitatea dentsitometriaz kuantifikatu zen. Neurketa hauetan ikusitakoaren arabera, XII-III estadioetako proteinek erakusten zuten, guztien artean, adierazpenik baxuena. Izan ere, IV-VI estadioetako banden intentsitatea, XII-III estadioetakoekin erkatzerakoan, modu oso adierazgarrian handitzen zela behatzen zen ( $P<0,01$ ). VII-VIII estadioetako proteinen adierazpenean jaitsiera gertatzen zen arren, oso modu adierazgarrian ( $P<0,01$ ), XII-III estadioetako proteinen adierazpena baino altuagoa zen. Amaitzeko, IX-XI estadioetako banden intentsitatea kuantifikatzerakoan, hau, aurreko estadioetako intentsitatea baino baxuagoa zela ikusten zen, beti ere, oso adierazgarriki ( $P<0,01$ ), XII-III estadioetako adierazpena baino balio altuagoa mantenduz (23 B. MOR irudia).

DOR-ren aurkako antigorputz poliklonalak 72 eta 100 kDa-eko bandak agerrarazi zituen testikulueta proteinen-erazkinean eta, baita, tubulu seminiferoetako IV-VI, VII-VIII eta XII-III estadioetan. IX-XI estadioen kasuan, aldiz, ez zen banda nabarmenik bereizten. Kontrol positibo gisa erabilitako garunean, 72 eta 100 kDa-eko bandez gain, 36 kDa-eko beste banda bat immunodetektatu zen (23 A. DOR irudia). Barne-kontrol bezala erabilitako  $\alpha$ -tubulinaren kasuan ere 50 kDa-eko pisu molekularreko bandak agertzen ziren kontroletan eta tubulu seminiferoetako estadioetan. *Immunoblotting*-ean topatutako DOR proteinaren banden intentsitatea ere aztertu zen dentsitometriaz. Kasu honetan, kuantifikatutako banden intentsitate txikiena IX-XI estadioetan behatu zen. IX-XI estadioetako proteinen adierazpena XII-III estadioetakoekin alderatzean, ikus zitekeen handipen bat gertatzen zela oso modu adierazgarrian ( $P<0,01$ ). IV-VI estadioetako banden intentsitatea XII-III estadioetakoena

baino handiagoa zela ikusten zen. Handipen hau ere IX-XI estadioetako banden intentsitatearekin konparatuta oso adierazgarria zen ( $P<0,01$ ) (23 B. DOR irudia).

KOR-ren aurkako antigorputz poliklonala erabiliz, estadioetan sailkatutako tubulu seminiferoetan eta testikuluetan 48 kDa inguruko bandak agertu ziren. Garunean, ere, 48 kDa-eko immunoerreaktibotasuna zuen banda antzeman zen (23 A. KOR irudia). Kasu honetan, ere,  $\alpha$ -tubulinarekin egindako proban esperotako 50kDa-eko pisu molekularreko bandak hautematen ziren. Dentsitometriaz neurtutako KOR proteinen banden intentsitatea, ere, aztertu zen. Hemen ere, DOR proteinaren kasuan bezala, IX-XI estadioetan ikusi zen proteina adierazpenik txikiena. XII-III estadioetako banden intentsitatea, IX-XI estadioetakoarekin erkatuz, ikusten zen oso modu adierazgarrian handitzen zela ( $P<0,01$ ). XII-III estadioetako banden intentsitateak IV-VI estadioetako intentsitateara beherakada bat behatzen zen modu adierazgarrian ( $P<0,05$ ). Proteinen adierazpena, IV-VI estadioetatik VII-VIII estadioetara, oso modu adierazgarrian handitzen zen ( $P<0,01$ ). Azkenik, VII-VIII estadioetatik IX-XI estadioetara beste beherakada bat gertatzen zen. Azken beherakada hau oso adierazgarria zen ( $P<0,01$ ) (23 B. KOR irudia).



**23. irudia:** A) MOR, DOR eta KOR proteinen western blot analisia saguen garunean (Garuna), testikuluetan (Testik.) eta tubulu seminiferoetako estadiokako sailkapenean (XII-III; IV-VI; VII-VIII eta IX-XI). Pisu molekularreko markatzaileak (kDa) bloten eskuinaldean agertzen dira, n = 5. B) MOR, DOR eta KOR proteinen western blot analisiaren banden intentsitatearen kuantifikazioa optika-dentsitateaz saguen garunean (Garuna), testikuluetan (Testik.) eta taldeka sailkatutako tubulu seminiferoetan (XII-III, IV-VI, VII-VIII eta IX-XI). Adierazgarritasunaren muga minimoa  $p < 0,05$ ean ezarri zen (\*), aldiz,  $p < 0,01$ -eko balioak (\*\*) oso adierazgarritzat hartzen ziren, n=5.

### 1.3. Saguen zelula testikularretako populazioetako opioide-hartzaileen azterketa

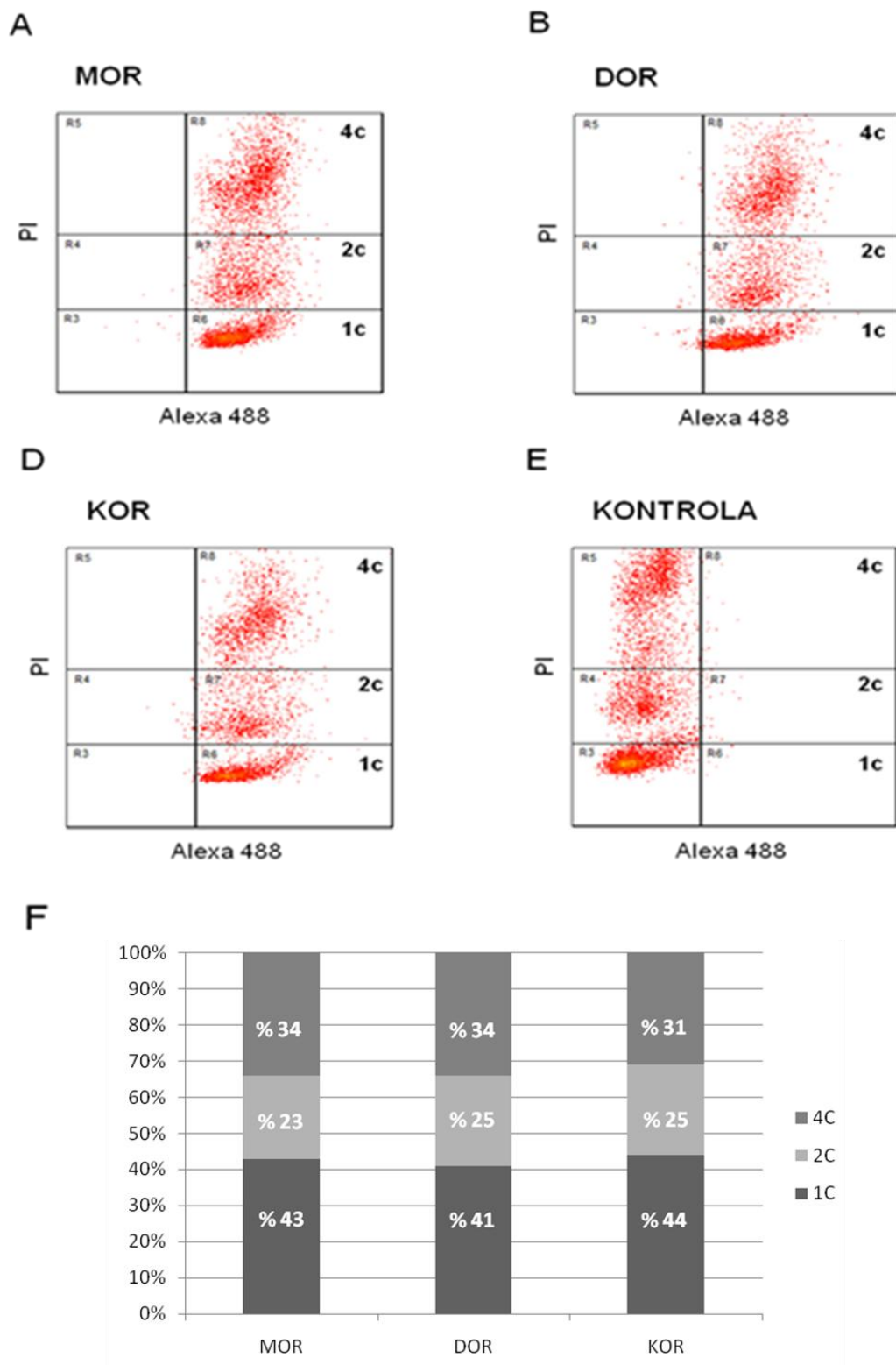
DNA-kopuru haploidea, diploidea eta tetraploidea (*1c*, *2c* eta *4c*, hurrenez hurren) zuten zelula testikularretako opioide-hartzaileak aztertu ziren fluxuzko zitometroan propidio ioduroa (PI) erabiliz. Propidio ioduroa DNA-kateari estekiometrikoki lotzen zaio 1:1 erlazioa mantenduz. Hau dela eta, zelula testikularrak *1c*, *2c* eta *4c* populazio gisa bereizi ahal izan ziren. Behaketen arabera, MOR, DOR eta KOR aipatutako zelula testikularren populazio guztietan aurkitu ziren. Hiru opioide-hartzaileek, populazio bakoitzean, joera bera erakusten zuten (24.irudia).

MOR zelula testikularretako hiru populazioetan behatu zen (24. A irudia). Haploideena zen hiru populazioetan ugariena (% 43). Beste bi populazioen artean, zelula tetraploideena izan zen handiagoa (% 34) diploideena baino (% 23) (24. F irudia).

DOR ere, hiru populazioetan (*1c*, *2c* eta *4c*) antzeman zen (24. B irudia). Kasu honetan ere, haploideena izan zen populazio anitzena (% 41). Ondoren, DNA-kopuru tetraploidedun zelulen populazioak zuen DOR ehuneko handiena (% 34). Zelula diploideen populazioa izan zen guztietan ehuneko txikiena zuena (% 25) (24. F irudia).

Azkenik, KOR ere aztertu zen saguen zelula testikularretako hiru populazioetan. Beste behin ere, opioide-hartzaile honen presentzia baieztatu zen (24. D irudia). Kasu honetan ere zelula haploideen, edo espermatiden, kopurua gainontzeko bi populazioena baino handiagoa zela ikusi zen (% 44). Beste bi populazioen artean, zelula tetraploideetan KOR ugariagoak ziren (% 31) zelula diploideetan baino (% 25) (24. F irudia).

Kontrol gisa erabilitako zelula testikularretan antigorputz poliklonal primario espezifikoekin egin beharreko inkubaketak egiten ez zirenean, antigorputz sekundarioek ez zuten inolako seinalerik igortzen (24 E. irudia).



**24. irudia:** Fluxuzko zitometriaz aztertutako ziklo zelularreko zelula testikularren MOR, DOR eta KOR. Zelulen DNA propidio ioduroarekin (PI) tindatu zen. Kontrol zelulak soilik antigorputz sekundarioarekin tratatu ziren (E). Saguaren IgG-aren kontrako asto-antigorputz sekundarioarekin (Alexa Fluor 488) inkubatutako MOR, DOR eta KOR opioide-hartzaileak (A, B eta D, hurrenez hurren). Opioide-hartzaile bakoitzak zelula testikularretako hiru populazioetan zuen portzentajea ere kalkulatu zen (F).

## 1.4 MOR, DOR eta KOR-en kokapena

### a) Saguen zelula espermatogenikoetako opioide-hartzaileen kokapena

Azterketa immunozitokimikoz MOR, DOR eta KOR-en presentzia zelula espermatogenikoetan baieztatu zen. Analisi honi esker opioide-hartzaile bakoitzak zelula espermatogenikoetan duen kokapen zehatza ere ikusi ahal izan zen.

MOR zelula espermatogenikoen markatzaile espezifikoekin batera behatu zen. Espermatogonien markatzaile espezifikoa den ITG6-arentzat positiboak ziren zeluletan, zegokien antigorputz primario eta sekundarioarekin inkubatzean opioide-hartzailearen immunofluoreszentzia, gehiengo batean, zelulen alde periferikoan ikusten zen (25. A irudia). Espermatozitoen markatzaile espezifiko diren SYCP1 eta SYCP3-arentzat positiboak ziren zelulak ere opioide-hartzaile honekin positiboki markatuta topatu ziren alde periferikoan, hurrenez hurren, 25. B eta 25. D irudiek erakusten duten moduan. ACR-rekin markatutako espermatidetan, ere, MOR-ren presentzia baieztatu zen (25. E irudia) zelulen alderik kanpokoenean. Espermatozoideen alde periferikoan, ere, opioide-hartzaile honen immunofluoreszentzia positiboa ikusten zen (25. F irudia).

DOR-ren kasuan, ere, immunotindaketa positiboa izan zen zelula espermatogenikoetan. ITG6-rekin espezifikoki markatutako espermatogonietan opioide-hartzailea alde periferikoan topatu zen (25. G irudia). Espermatozitoen kasuan, immunoerreakzioa positiboa izan zen bai SYCP1 (25. H irudia) bai eta SYCP3-rekin (25. I irudia). Hauetan ere, markaketa positiboa izan zen zelulen alderik kanpokoenean. ACR-ren immunoerreakzioa positiboa izandako espermatidetan, ere, DOR topatu zen zelula hauen alde periferikoan (25. J irudia). Espermatozoideen kasuan hartzaile honen immunotindaketak alderik kanpokoenean emaitza positiboa erakutsi zuen (25. K irudia).

KOR-ren azterketa immunoiztokimikoak, aurretik aipatutako opioide-hartzaileen antzera, tindaketa positiboa erakusten zuen espermatogonietan (25. L irudia). Espermatozitoen markatzaile espezifiko diren SYCP1 eta SYCP3-ren immunotindaketekin batera opioide-hartzaile hau ere topatzen zen (25. M eta 25. N irudiak, hurrenez hurren). Espermatidetan eta espermatozoideetan ere KOR-ek immunotindaketa positiboa erakutsi zuen (25. O eta P irudiak, hurrenez hurren). Opioide-hartzaile honi zegokion immunodetekzioa zelula espermatogenikoen alde periferikoan topatu zen kasu guztietan.

Zelula espermatogenikoak zegozkien markatzaile espezifikoekin inkubatu ziren. Honela, ikusi ahal izan zen espermatogonien mintz proteina den ITG6 markatzailearen kokapen zehatza periferikoa zela (25. a irudia). Espermatozitoen markatzaile diren SYCP1 (25. b irudia) eta SYCP3-ren immunoerreakzioa (25. d irudia) nukleoan ikus zitekeen. Zelula hauen nukleoko antolaketa kromosomikoa, hurrenez hurren, leptoteno eta pakiteno fasean dauden zelulen ezaugarri bereizgarria da. Azkenik, espezifikoa zen ACR markatzailearen immunoerreakzioa espermatida biribiletako zitoplasman gertatzen zen (25. e irudia).

Opioide-hartzaileen (25. b' irudia), zelula espermatogenikoen (25. d' eta e' irudiak) eta espermatozoideen (25. f' irudia) antigorputz poliklonal primario espezifikoekin egin beharreko inkubaketak egiten ez zirenean, antigorputz sekundarioek ez zuten inolako seinalerik ematen. Bestalde, zelulak untxi-antigorputz poliklonal primarioen IgG ez espezifikoekin inkubatzen zirenean, ez zuten inolako seinalerik ematen (25. a' eta f irudiak) antigorputz sekundario espezifikoekin egin beharreko inkubaketak egiten ez zirenean.

Behin hiru opioide-hartzaileen presentzia zelula espermatogenikoetan behatu zela, hauen fluoreszentiaren kuantifikazioa egin zen. Soilik opioide-hartzaileei zegokien seinaleen kuantifikazioa egiteko, aztergai zen zelularen azalera kontrol gisa hartutako fluoreszentzia gabeko batezbestekoarekin biderkatu eta lortutako emaitza zelularen dentsitatearen balioari

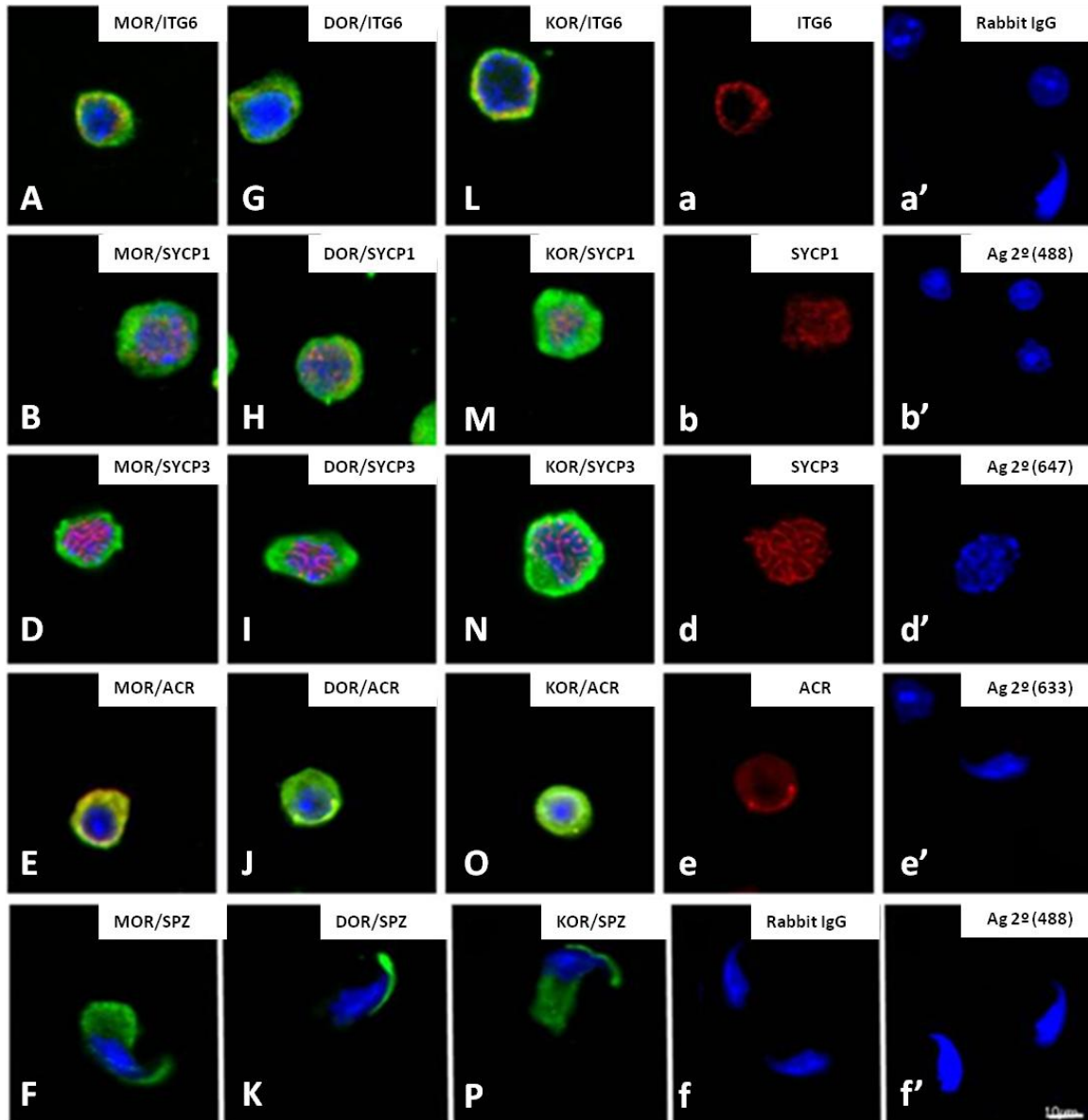
kentzen zitzaion. Azkenik, lortutako balio hori neurtutako zelularen azalerarekin zatitzen zen. Balio hauek azalerako Zuzendutako Zelulen Guztizko Fluoreszentzia edo CTCF/ $\mu\text{m}^2$  (*Corrected Total Cell Fluorescence*) balio gisa eskuratzen ziren (26. irudia).

Zehazki, MOR-k zelula espermatogenikoetan zuen fluoreszentiaren intentsitatea CTCF/ $\mu\text{m}^2$ -ko balioetan neurtu zen. Bertako kuantifikaziotan neurtu zen zelula espermatogenikoetako MOR-ren presentzia oso atzekoa zen. Izan ere, markatzaile espezifiko bakoitzak opioide-hartzaile honekiko erakusten zuen fluoreszentzia maila berdintsu mantentzen zen (26. MOR irudia).

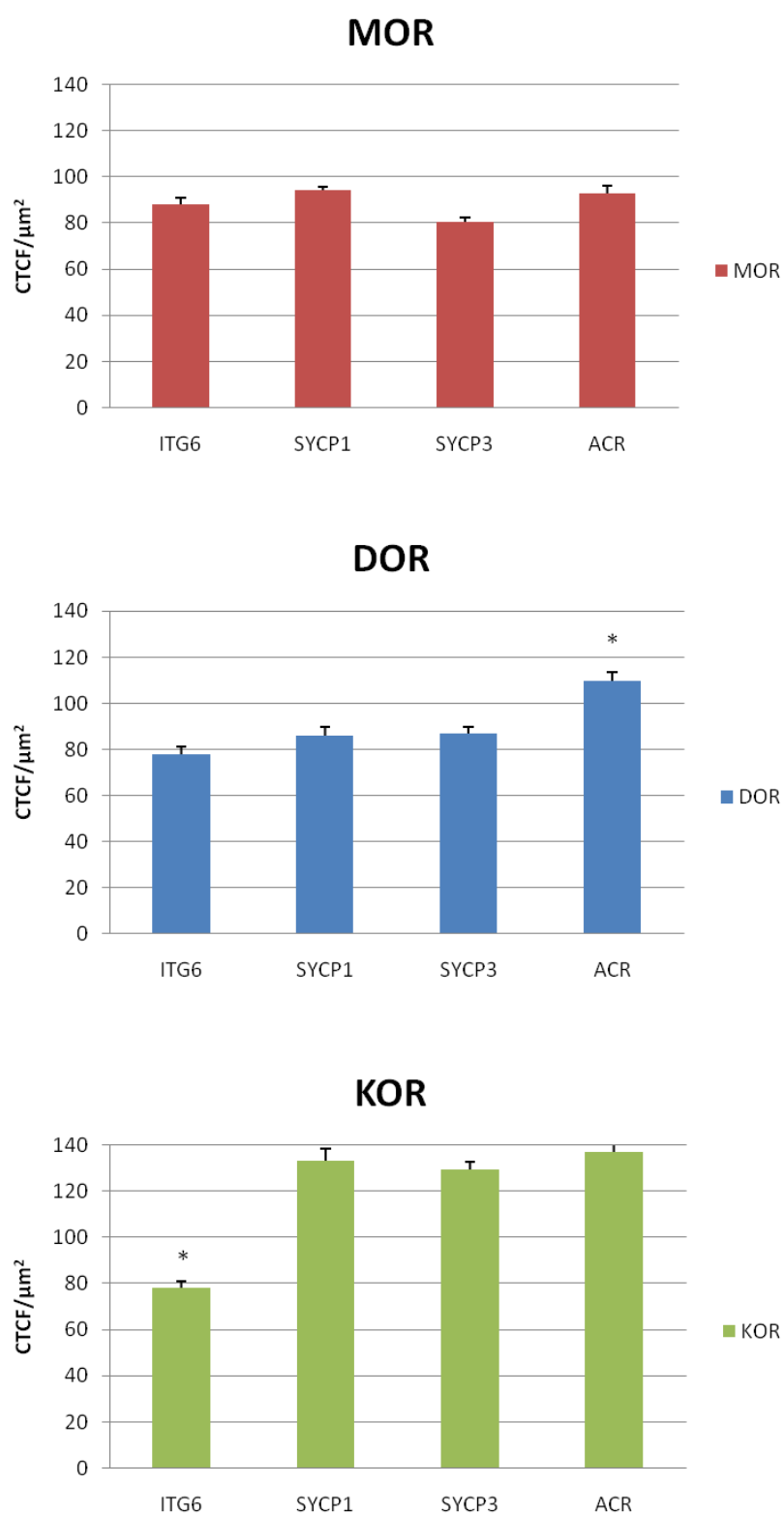
Zelula espermatogenikoetan kuantifikatutako DOR-ren fluoreszentiaren kasuan ITG6, SYCP1 eta SYCP3-ren intentsitate-mailak neurtzerakoan, hauen arteko diferentzia oso txikia zela ikusten zen. Aldiz, ACR-ren fluoreszentzia neurtzerakoan honek, gainontzekoekin konparatuz, adierazgarriki ( $P < 0,05$ ) gora egiten zuela ikus zitekeen (26. DOR irudia).

Azkenik, KOR-ren fluoreszentiaren intentsitatea, ere, kuantifikatu zen. Markatzaile espezifikoek erakutsitako opioide-hartzaile honen fluoreszentzia-maila oso antzekoa neurtu zen ITG6-ren kasuan izan ezik. Kasu honetan, KOR-ren fluoreszentzia intentsitatea adierazgarriki ( $P < 0,05$ ) balio txikiagoa zuen (26. KOR irudia).





**25. irudia:** Saguen zelula espermatogenikoetako opioide-hartzaileen azterketa immunozitokimikoa. Irudi honek alfa-6-integrina (A, G eta L), SYCP1 (B, H eta M), SYCP3 (D, I eta N) eta akrosinaren (E, J eta O) aurkako antigorputzen eta MOR, DOR eta KOR antigorputzen konbinazioa erakusten du. Espermatozoideen kasuan (F, K eta P) soilik MOR, DOR eta KOR aurkako antigorputzen azterketa immunozitokimikoa erakusten da. Lagin guztiak Hoestch 33342 DNA tindatzaile urdinarekin tratatuak izan ziren. Markatzaile espezifikoak laugarren zutabeaz azaltzen dira bakoitzari dagokion zelula espermatogeniko espezifiko adieraziz (a, b, d eta e). Antigorputz primarioaren kontrol negatiboa (Untxi IgG) (a' eta f) eta antigorputz sekundarioen kontrol negatiboak ere (Ag 2 488, Ag 2 633 eta Ag 2 647) (b', d', e' eta f') adierazten dira irudian. Erakusten diren argazkiak adierazgarriak dira; n = 5. Eskala-barra, 10µm.



**26. irudia:** MOR, DOR eta KOR-en fluoreszentsia intentsitateen kuantifikazioa batezbesteko CTCF/ $\mu\text{m}^2$ -ko (*Corrected Total Cell Fluorescence*) balioetan adierazita zelula espermatogenikoen markatzaileen (ITG6, SYCP1, SYCP3 eta ACR) bitartez. Marra bertikalek errore estandarra adierazten dute. Analisi estatistikoa *Student*-en *t* testarekin egin zen. Adierazgarritasunaren muga minimoa  $p < 0,05$ ean ezarri zen (\*). Gutxienez 100 zelulen fluoreszentsia neurtu zen.

**b) Giza testikuludun zehar-ebakietako opioide-hartzaileen kokapena**

Saguen zelula espermatogenikoen kasuan bezala, MOR, DOR eta KOR-en kokapena zehaztu nahi izan zen giza testikuluetakoko tubulu seminiferoetako zehar-ebakietan. Immunohistokimikaren bidez ateratako emaitzen arabera, MOR, DOR eta KOR-en presentzia baieztatu zen gizona zelula testikularretan.

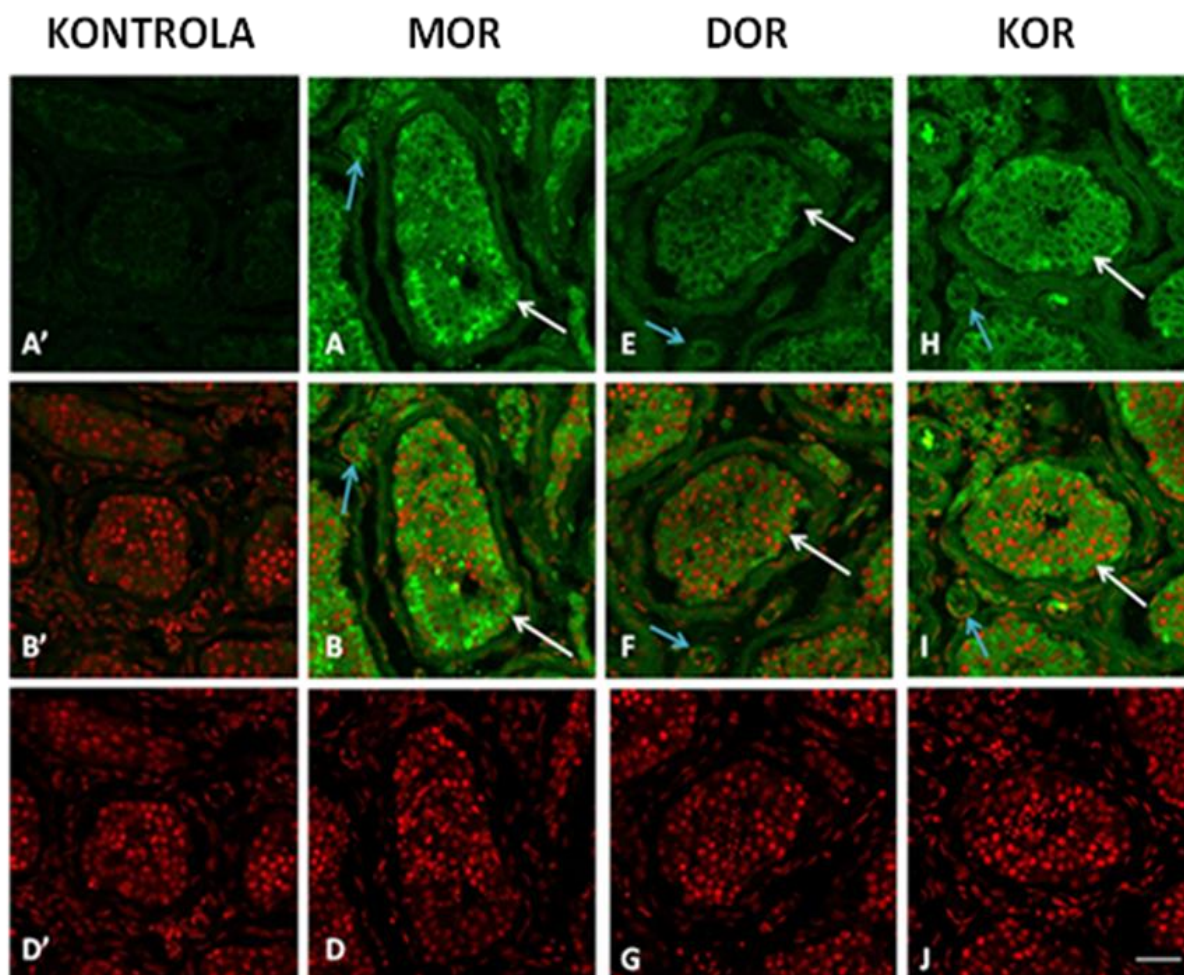
MOR proteina zegokion antigorputz primario eta sekundarioarekin inkubatzerakoan, hau, tubulu seminiferoen barruan zein kanpoan detektatu zen (27. A irudia). Opioide-hartzaile honen kokapena (27. B irudia) bat zetorren propidio ioduroarekin (PI) gorritz tindatutako zelula testikularren nukleoekin (27. D irudia).

DOR-ren immunotindaketan ere, ikus zitekeen opioide-hartzaile hau tubulu seminiferoen barruan eta kanpoan kokatzen zela (27. E irudia). Opioide-hartzaile eta zeluletako nukleoaren tindaketak aztertzean, biak, tubulu seminiferoen barruan zein kanpoan zeudela ikus zitekeen (27. F eta G irudiak).

Azkenik, KOR-ren seinalearen presentzia giza tubulu seminiferoetan ere baieztatu zen (27. H irudia). Aurretik aipatutako bi opioide-hartzaileekin gertatzen zen bezala, hemen ere, kokapen bera erakusten zuen hartzaileak (27. I irudia). KOR-ren kokapenarekin bat etorrira, propidio ioduroak zelula testikularren nukleoa tubulu seminiferoen barruan zein kanpoan baieztatu zen (27. J irudia).

Gezi zuriekin tubulu barruko zelula testikularrak (zelula intratubularrak) seinalatu nahi izan ziren. Aldiz, gezi urdinekin, tubulu kanpoko zelula testikularrak (zelula peritubularrak) nabarmendu nahi izan ziren.

Opioide-hartzaileen antigorputz poliklonal primario espezifikoekin egin beharreko inkubaketak egiten ez zirenean, antigorputz sekundarioek ez zuten inolako seinalerik ematen (27. A', B' eta D' irudiak).



**27. irudia:** Giza tubulu seminiferoetako zehar-ebakietako zelula testikularren opioide-hartzaileen azterketa immunohistokimikoa. Ebaki bakoitzean bi tindatzaile erabili ziren; berde fluoreszentea eta propidio ioduroa (PI). Berdez adierazitako zelulak opioide-hartzaileak dira, aldiz, gorriz daudenak zelulen nukleoak erakusten dituzte. Kontrol negatiboak soilik MOR, DOR eta KOR opioide-hartzaileen antigorputz sekundarioarekin tratatu ziren (A', B' eta D'). Gezi urdinen bitartez zelula peritubularrak adierazi nahi izan ziren. Bestalde, kolore zuriko geziekin zelula intratubularrak erakutsi nahi izan ziren. Esperimendu bakoitza gutxienez 4 bider errepikatu zen antzeko emaitzak eskuratzuz. Eskala-barra, 50  $\mu$ m.



## 2. helburua: $\mu$ , $\sigma$ eta $\kappa$ opioide-hartzaileen funtzionaltasuna espermatogenesisian

Opioide-hartzaileen funtzionaltasuna espermatogenesisian ezagutzeko, prozesu honetan parte hartzen duten zelula testikularrak agonista opioideekin tratatu ziren. Tratamendu hauek bi inkubaketa-denboratan bereizten ziren; laburra eta luzea. Tratamendu laburrean zelulak agonista opioideekin ordubetez inkubatzen ziren. Aldiz, tratamendu luzeko inkubaketetan, agonista opioideak 24 orduz mantentzen ziren zelulekin kontaktuan.

Espermatogenesisia testikulu-tako zelulen artean gertatzen diren prozesu autokrino eta parakrinoek kontrolatzen dute. Hau dela eta, testikulu-tako zelula guztiak hazkuntza-medio berean mantentzea erabaki zen. Aipatutako zelula hauek guztiak fluxuzko zitometroan aztertu ziren propidio ioduroa erabilita. Propidio ioduroak DNA-kateari, 1:1 erlazioa mantenduz, estekiometrikoki lotzeko duen gaitasuna dela eta, zelula testikularren artean hiru zelula populazio behatu ziren: haploideak ( $1c$ ), diploideak ( $2c$ ) eta tetraploideak ( $4c$ ).

### 2.1 MOR-ren funtzionaltasuna espermatogenesisian

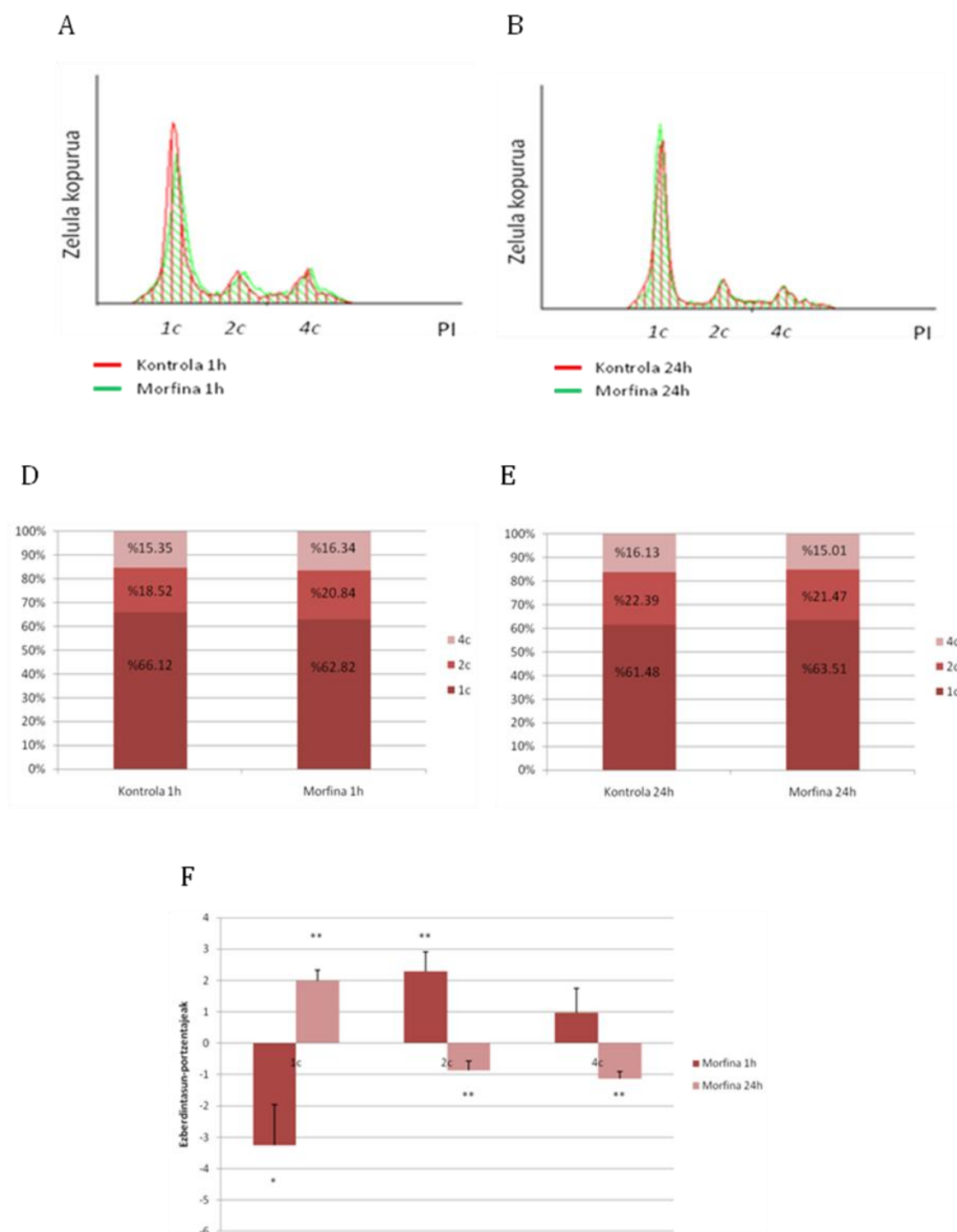
MOR-k saguen espermatogenesisian duen eragina aztertzeko testikulu-tako zelulak morfina agonista opioidearekin ( $10^{-5}$  M) mantendu ziren. Tratamendu hauek inkubaketa-denbora labur edo akutuan (1h) eta luze edo kronikoan (24h) egin ziren.

Oro har, fluxuzko zitometroko datuak hartuta eta bertako emaitza guztiak bateratuz, ezin esan liteke morfina agonista opioideak espermatogenesisia guztiz blokeatzeko gaitasuna duenik (28. irudia). Emaitza hauek inkubaketa-denbora akutu (1h) zein kronikoan (24h) ikusi ziren. Ordubetez morfina-rekin inkubatutako zelula haploideen kopurua kontrolen kopurua baino txikiagoa zen,  $2c$  populazioaren kopurua, berriz, handiagoa (28. A irudia).

Aldiz, inkubaketa-denbora 24 ordukoa zenean soilik *1c* populazioan behatu zen aldaketa tratatutako zelula eta kontrolen artean. Zehazki, morfinaren tratamendu kronikoa pairatu zuten zelula haploideen kopurua handitzen zela ikusi zen (28. B irudia). Fluxuzko zitometroan behatutako datuen arabera, populazio diploide eta tetraploideetan, ez zen aldaketarik antzeman tratatutako zelula eta kontrolen artean.

Hiru populazioen (*1c*, *2c* eta *4c*) arteko aldaketak zehatzago ikusteko, ehunekotan oinarritutako histogramak sortu ziren (28. D eta E irudiak). Zelula haploideen kopuruak, morfinarekin ordubetez inkubatzerakoan %66,12-tik %62,82-ra gutxitu ziren adierazgarriki ( $P<0,05$ ) (28. D eta F irudiak). Zelula diploide eta tetraploideen kasuan, aurkako joera behatu zen. Hau da, morfinarekin ordubetez tratatutako zelulen kopuruak, kontrol ziren zelulen aldean, oso modu adierazgarrian ( $P<0,01$ ) gora egiten zuen %18,52-tik, %20,84-ra (28. D eta F irudia). Azkenik, *4c* populazioak ere joera bera zuela behatu zen. Kasu honetan, kontrolak %15,35 ziren, aldiz, morfinarekin tratatutakoak, %16,34 nahiz eta hauen arteko diferentziak ez zuen inolako adierazgarritasunik erakusten (28. D eta F irudiak).

Bestalde, 24 orduz inkubatutako zeluletan, bestelako aldaketak ikusten ziren. Morfinarekin tratatutako zelula haploideen kopurua (%63,51) zelula kontrolekin alderatuta (%61,48) oso adierazgarriki ( $P<0,01$ ) handitzen zen (28. E eta F irudiak). Populazio diploide eta tetraploideen joera, haploideenaren aldean, kontrakoa izan zen. Morfinarekin inkubatutako zelula diploideak (%21,47) kontrolarekin (%22,39) erkatzerakoan, hauen beherakada, oso adierazgarria zen ( $P<0,01$ ) (28. E eta F irudiak). Zelula tetraploideetan, ere, diploideen joera bera ikusten zen. Hau da, 24 orduz morfinarekin mantendutako zelulen kopurua (%15,01) kontrol gisa neurtutakoena (%16,13) baino txikiagoa zen (28. E irudia). Populazio tetraploideen arteko diferentzia hau oso modu adierazgarrian ( $P<0,01$ ) gertatu zen (28. F irudia).



**28. irudia:** MOR-ren funtzionaltasunaren azterketa testikulueta ziklo zelularrean zehar. Fluxuzko zitometroan morfina agonista opioidearekin ordubeteko (**A**) eta 24 ordutako (**B**) inkubaketaren ondoren kontrol (berdez) eta tratatutako (gorriz,  $10^{-5}$  M) zelula testikularren histogramen emaitzak. Eskuratutako histogramen datuak ehunekotan aztertu ziren inkubaketa-denbora labur (**D**) eta luzean (**E**) kontrol eta tratatutako zelulen arteko aldaketak behatzeko. **F**) Morfina agonista opioidearekin tratatutako 1c, 2c eta 4c populazioetako zelulen ezberdintasun-porzentaieak kontrolekiko inkubaketa-denbora labur (1h) eta luzean (24h). Marra bertikalek errore estandarra adierazten dute. Análisi estatistikoa *Student-en t* testarekin egin zen. Adierazgarritasunaren muga minimoa  $p < 0,05$ ean ezarri zen (\*), aldiz,  $p < 0,01$ -eko balioak (\*\*) oso adierazgarritzat hartzen ziren. Zelula haploideak 1c diploideak 2c eta tetraploideak 4c izenpean aurkeztu dira irudian,  $n=6$ .



## 2.2 DOR-ren funtzionaltasuna espermatogenesisian

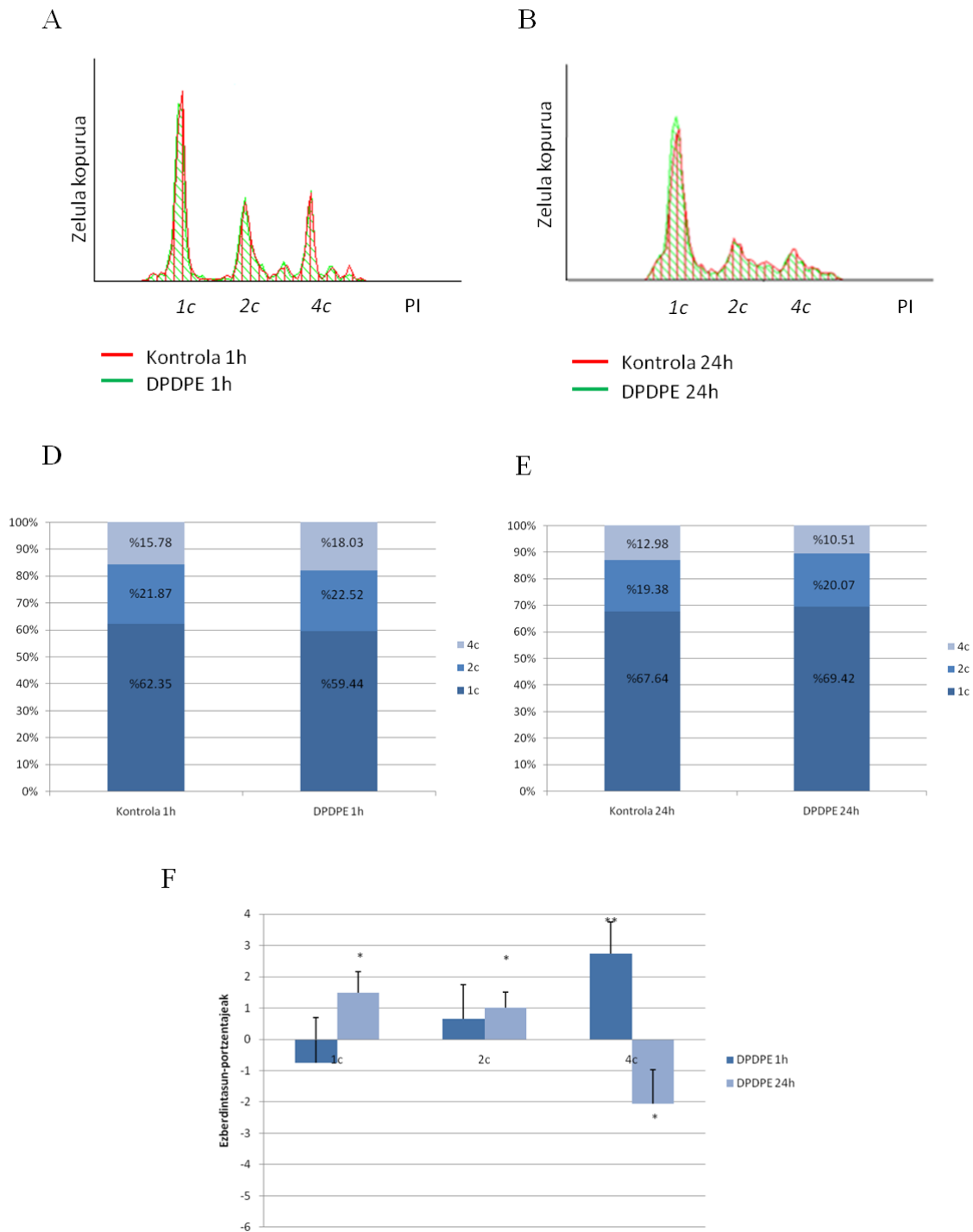
DOR-k saguen espermatogenesisian duen eragina aztertzeko DPDPE agonista opioidea ( $10^{-6}$  M) erabili zen inkubaketa-denbora laburrean (1h) eta luzean (24h) (29. irudia).

Fluxuzko zitometro zelula testikularretako DOR aztertu zen hiru populazioetan (*1c*, *2c* eta *4c*). DPDPE, DOR-ren agonista opioidea, zelula testikularrekin ordubetez inkubatzeko ezin esan liteke aldaketarik behatzen zenik kontrol eta tratatutako populazio haploide eta diploideen kopuruaren artean (29. A irudia). Bestalde, DPDPE-rekin tratatutako populazio tetraploideen kopuruak, kontrolarekiko, gora egiten zuela behatu zen (29. A irudia). Zelula testikularren inkubaketa-denbora luzatzerakoan (24h), ikusten zen tratatutako populazio haploidearen kopuruak, kontrolarekiko, gora egiten zuela. Joera hau populazio diploidearen kasuan ere mantentzen zen. Aldiz, populazio tetraploidearen kasuan DPDPE-rekin tratatutako zelulen kopuruak kontrako joera erakusten zuen. Hau da, tratatutako zelulak kontrolarekin konparatzerakoan hauen kopurua jaisten zen (29. B irudia).

Emaizak hauek ehunekotan aztertu zirenean ikusi zen ordubetez agonista opioidearekin inkubatutako zelula haploideen kopurua (%59,44), kontrolarekin alderatuta (%62,35), jaitsi egiten zela (29. D eta F irudiak). Zelula diploideen populazioa, berriz, %21,87-tik (kontrola) %22,52-ra igotzen zen (29. D eta F irudiak) zelulak DPDPE agonista opioidearekin tratatzen zirenean. Azkenik, ordubetez agonistarekin inkubatutako *4c* populazioa, oso adierazgarriki ( $P<0,01$ ), %15,78-tik (kontrola) %18,03-ra igotzen zen (29. D eta F irudiak).

Zelulak 24 orduz inkubatzekoan, tratatutako zelula eta kontrolen artean ezberdintasun adierazgarriak behatu ziren (29. F irudia). Esate baterako, DPDPE agonistarekin tratatutako zelula haploideen ehunekoak (%69,42) adierazgarriki ( $P<0,05$ ) igotzen zen kontrolen ehunekoarekin alderatuta (%67,64) (29. E irudia). Populazio diploidearen kasuan ere

gorakada adierazgarria ( $P < 0,05$ ) neurtu zen kontrol (% 19,38) eta tratatutako zelulen (% 20,07) artean (30. E eta F irudiak). Azkenik, tratatutako eta tratatu gabeko zelula tetraploideen artean, aurreko bi populazioetan ez bezala, beherakada adierazgarria ( $P < 0,05$ ) behatu zen (29. F irudia). Zehazki, DPDPE-rekin inkubatutako zelulak %10,51 ziren eta kontrolak, berriz, %12,98 (29. E irudia).



**29. irudia:** DOR-ren funtzionaltasunaren azterketa testikulueta ziklo zelularrean zehar. Fluxuzko zitometroan DPDPE agonista opioidearekin ordubeteko (**A**) eta 24 ordutako (**B**) inkubaketaren ondoren kontrol (berdez) eta tratatutako (gorriz,  $10^{-6}$  M) zelula testikularren histogramen emaitzak. Eskuratutako histogramen datuak ehunekoetan aztertu ziren inkubaketa-denbora labur (**D**) eta luzean (**E**) kontrol eta tratatutako zelulen arteko aldaketak behatzeko. **F**) DPDPE agonista opioidearekin tratatutako 1c, 2c eta 4c populazioetako zelulen ezberdintasun-portzentajeak kontrolerako inkubaketa-denbora labur (1h) eta luzean (24h). Marra bertikalek errore estandarra adierazten dute. Análisi estatistikoa *Student-en t* testarekin egin zen. Adierazgarritasunaren muga minimoa  $p < 0,05$ ean ezarri zen (\*), aldiz,  $p < 0,01$ -eko balioak (\*\*) oso adierazgarritzat hartzen ziren. Zelula haploideak 1c diploideak 2c eta tetraploideak 4c izenpean aurkeztu dira irudian,  $n=6$ .

### 2.3 KOR-ren funtzionaltasuna espermatogenesisian

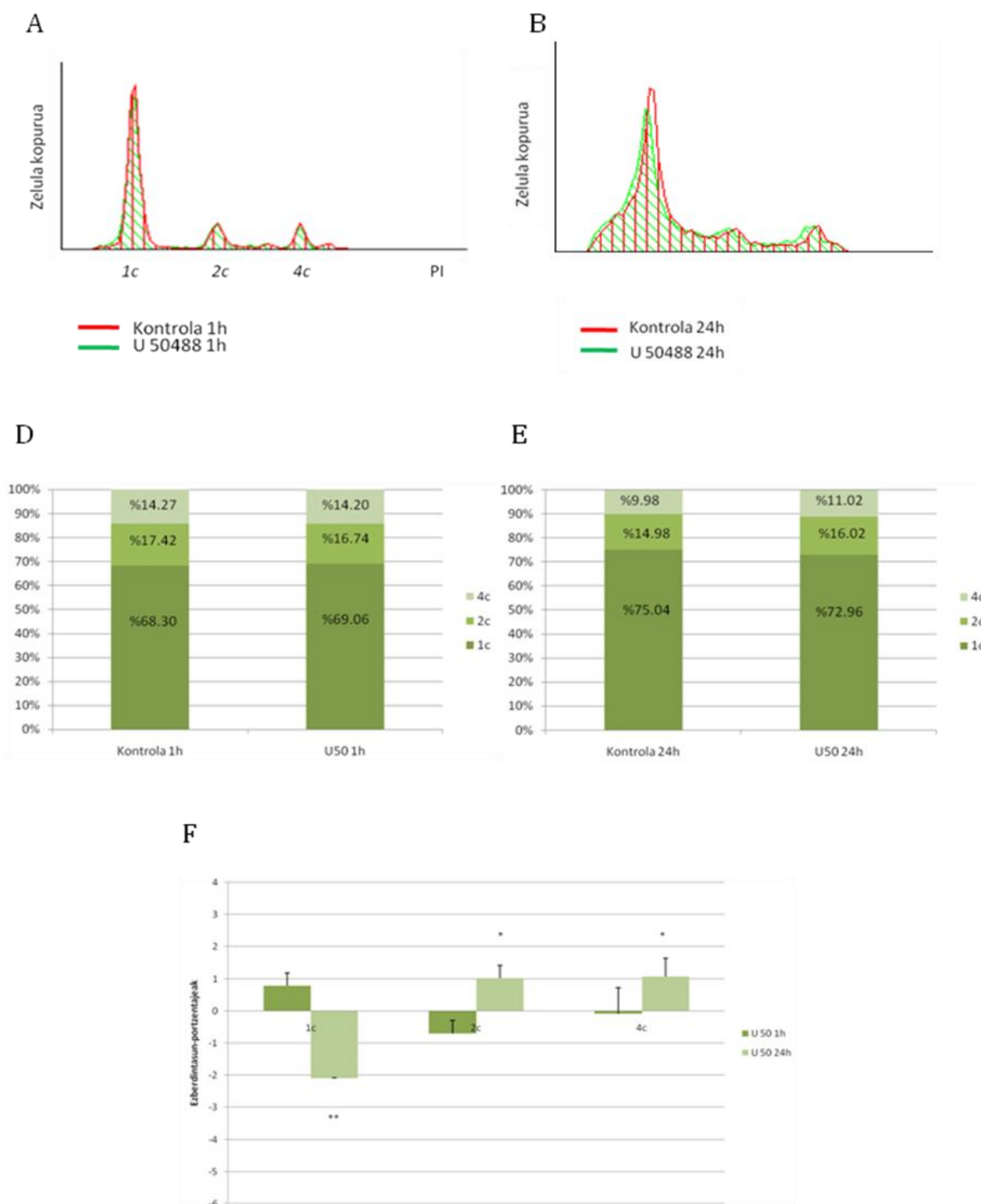
KOR-k saguen espermatogenesisian duen eragina aztertzeko, aurreko kasuetan egindako prozedura berarekin jarraituz, zelulak U50488 agonista opioidearekin tratatu ziren inkubaketa-denbora labur (1h) eta luzean (24h) (30. irudia).

Testikuluetakoko zelulak propidio ioduroarekin tindatu eta zelula populazio ezberdinetan gertatutako aldaketak fluxuzko zitometroan aztertu ziren. Agonista opioidearekin ordubetez inkubatutako zelula haploideen kopurua, tratatutako zelula eta kontrolen artean, berdintsu mantentzen zen. Joera hau populazio diploide zein tetraploideetan mantentzen zen (30. A irudia). Inkubaketa-denbora 24 ordukoa zenean, zelula haploideen kopurua kontrolenarekin konparatuta, jaisten zen. Zelula diploideen kasuan, berriz, kontrako joera gertatzen zen. Zelula tetraploideen populazioari zegokionez, ez zen aldaketarik igartzen tratatutako zelula eta kontrolaren artean (30. B irudia).

Fluxuzko zitometrotik eskuratutako datuak ehunekotan ikertu ziren kontrol eta tratatutako populazioen arteko diferentziak argiago ikusteko asmoz. Zelulak ordubeteko inkubaketa-denboraren ostean, ikusten zen U 50488 agonistarekin tratatutako zelulen kopurua handiagoa izan arren (%69,06), kontrolarekiko (%68,30) zegoen diferentzia ez zela adierazgarria izan (30. D eta F irudiak). Beste bi populazioetan (2c eta 4c), adierazgarria ez izan arren (30. F irudia), tratatutako zelulen kopuruek, kontrolarekiko, behera egiten zuten. Populazio diploideak %17,42-tik (kontrola) %16,74-ra (tratatuak) gutxitzen ziren (30. D irudia). Azkenik, populazio tetraploideak, %14,27-tik (kontrola) %14,20-ra (tratatuak) jaisten ziren (30. D irudia).

Agonista opioidearekin zelulak 24 orduz mantentzerakoan zelula haploideari zegokion populazioak, kontrolarekiko, behera oso adierazgarriki ( $P < 0,01$ ) egiten zuen %75,04-tik

%72,96-ra (30. E eta F irudiak). Aldiz, 2c eta 4c populazioetako zelulen kopuruek gora egin zuten. Populazio diploideen kontrola %14,98-tik tratatutako zelulen %16,02-ra, adierazgarriki ( $P<0,05$ ) igotzen zen (30. E eta F irudiak). Azkenik, populazio tetraploideen kontrola %9,98-tik %11,02-ra (tratatuak) igotzen zen modu adierazgarrian ( $P<0,05$ ) (30. E eta F irudiak).



**30. irudia:** KOR-ren funtzionaltasunaren azterketa testikulueta ziklo zelularrean zehar. Fluxuzko zitometroan U 50488 (U 50) agonista opioidearekin ordubeteko (A) eta 24 ordutako (B) inkubaketaren ondoren kontrol (berdez) eta tratatutako (gorriz,  $10^{-6}$  M) zelula testikularren histogramen emaitzak. Eskuratutako histogramen datuak ehunekotan aztertu ziren inkubaketa-denbora labur (D) eta luzean (E) kontrol eta tratatutako zelulen arteko aldaketak behatzeko. F) U 50 agonista opioidearekin tratatutako 1c, 2c eta 4c populazioetako zelulen ezberdintasun-portzentajeak kontrolekiko inkubaketa-denbora labur (1h) eta luzean (24h). Marra bertikalek errore estandarra adierazten dute. Análisi estatistikoa *Student-en t* testarekin egin zen. Adierazgarritasunaren muga minimoa  $p < 0,05$ ean ezarri zen (\*), aldiz,  $p < 0,01$ -eko balioak (\*\*) oso adierazgarritzat hartzen ziren. Zelula haploideak 1c diploideak 2c eta tetraploideak 4c izenpean aurkeztu dira irudian,  $n=6$ .

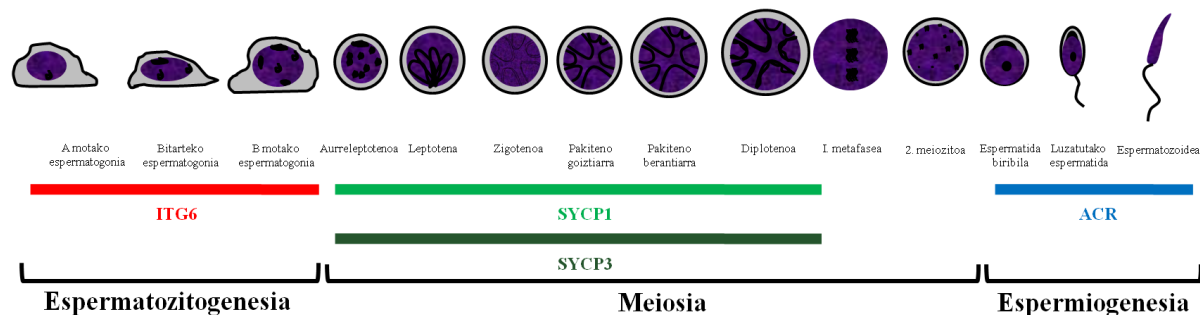
## 2.4 MOR, DOR eta KOR-en geneen adierazpena espermatogenesisian

Helburu honetan opioide-hartzaileek zelula espermatogenikoengan eta, beraz, espermatogenesiarengan duten efektua aztertu nahi izan zen. Honetarako, agonista opioideekin (Morfina, DPDPE eta U 50488) inkubaketa-denbora labur (1h) zein luzez (24h) mantendutako zelula testikularrak erabili ziren. Behin inkubaketa-denborak pasata, markatzaile espezifikoak laguntzaz (ITG6, SYCP1, SYCP3 eta ACR), zelula espermatogenikoen geneen adierazpenak neurtu ziren qRT-PCR bidez.

Espermatogenesisia hozi-zelula espermatogenikoen desberdintze prozesuari deritzo. Prozesu honetan hiru fase zelular bereiz daitezke; espermatozitogenesisia, meiosis eta espermiogenesisia. Fase zelular bakoitzak zelula mota ezberdinak biltzen ditu. Zehazki, espermatozitogenesiko zelulek espermatogoniak, zelula meiotikoek espermatozitoak eta, azkenik, espermiogenesiko zelulek espermatidak biltzen dituzte. Aipatutako zelula mota hauen markatzaile espezifikoak dira, hain zuzen ere, aurretik aipatutako ITG6, SYCP1, SYCP3 eta ACR. Markatzaile espezifiko hauek espermatogenesisian zehar fase ezberdinetan adierazten dira. Hain zuzen ere, markatzaile hauen adierazpen zehatza erabili zen esperimientuetan zelula espermatogenikoak identifikatzeko.

Esate baterako, ITG6, espermatogonien mintzean kokatzen den proteina bat da (Shinohara eta lank., 1999; Phillips eta lank., 2010). Markatzaile honek, beraz, espermatozitogenesi (edo mitosi) fasean dauden espermatogoniak espezifiki identifikatzen lagundu zuen. SYCP1 eta SYCP3, berriz, kromosoma homologoen arteko sinapsian parte hartzen duen konplexu sinptomaleko proteinak dira eta hauen adierazpena lehen zatiketa meiotikoko profasean zehar zabaltzen da (Fraune eta lank., 2012 eta Qiao eta lank., 2012). Hau dela eta, SYCP1 eta SYCP3 proteinak espermatozitoak identifikatzeko erabili ziren. Azkenik, ACR markatzailea akrosoman kokatzen den proteina espezifikoa da (Ohta eta

lank., 2009). Honek, esperimentuetan, espermiogenesiko (edo fase haploideko) espermaticidak identifikatzeko balio izan zuen (31. irudia).



**31. irudia:** Espermatogenesisian zehar heltze prozesuan dauden zelula espermaticoen irudi eskematikoa. Fase bakoitzari dagokion markatzaile espezifikoaren adierazpenen nondik norakoak erakusten dira.

#### 2.4.1 MOR-ren efektua espermatogenesisian

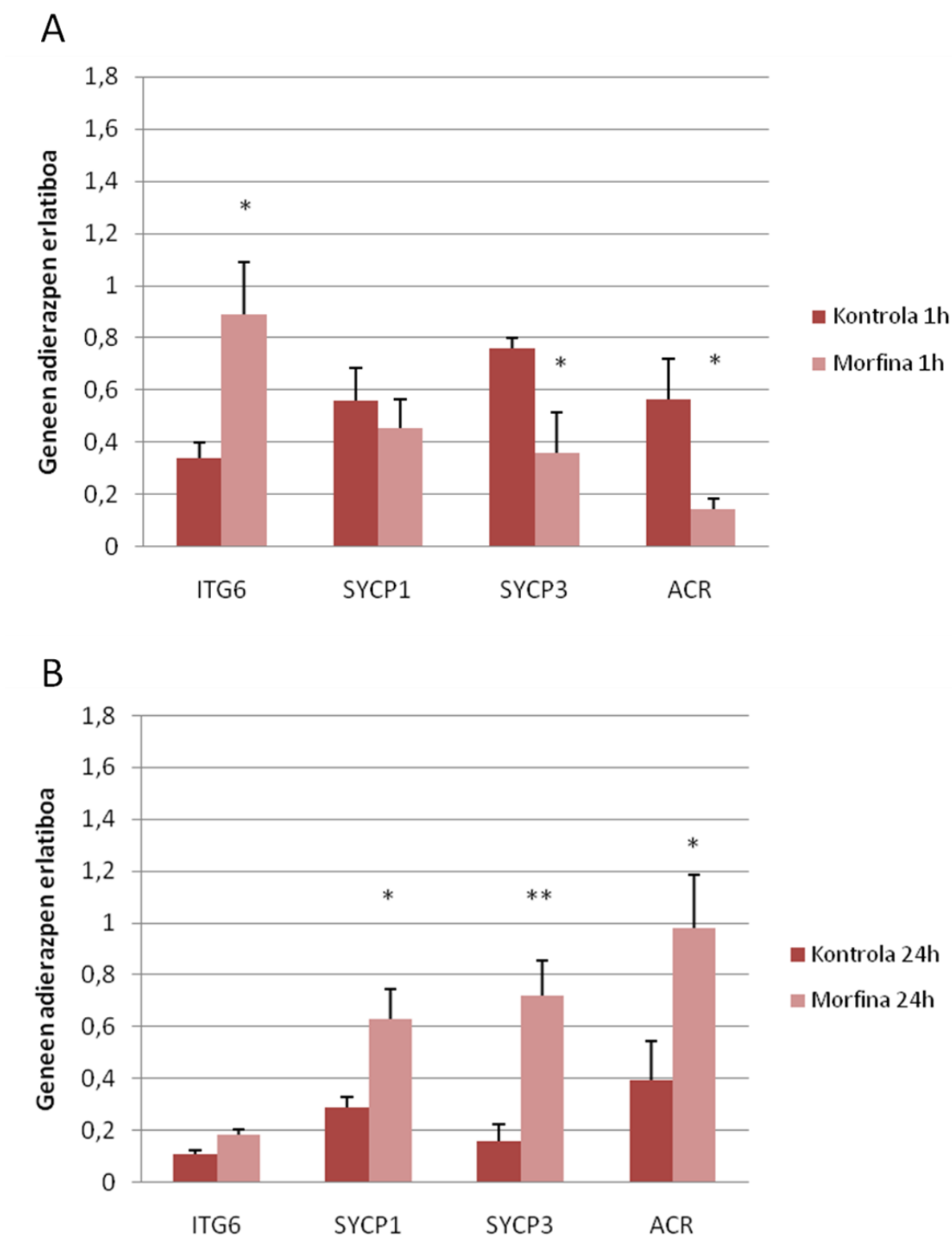
Zelula testikularrak morfinarekin ( $10^{-5}$  M) mantendu ziren tratamendu akutuan (1h) eta kronikoan (24h). Agonista opioidearekin zegokion tratamendua amaitzean, zelula espermatogenikoekiko espezifikoak ziren *primer*-ak erabili ziren qRT-PCR-a gauzatzeko (32. irudia).

Ordubeteko tratamenduaren ondoren behatu zen MOR-k bazuela efektua espermatogenesisian (32. A irudia). Izan ere, zelula espermatogenikoen markatzaile espezifiko diren geneen adierazpen erlatiboa aldatzen zen. Esate baterako, espermatogonien markatzaile espezifikoa den *ITG6* genearen adierazpena, kontrolarekin alderatuta, adierazgarriki ( $P < 0,05$ ) handitzen zela ikusten zen. Opioiderekin hartuta honek meiosian izan zezakeen efektua aztertzeko *SYCP1* eta *SYCP3* geneen adierazpenak aztertu ziren. Kasu honetan, bi geneen adierazpenak euren kontrolenarekin konparatuta, jaisten zirela beha zitekeen. *SYCP3* genearen adierazpena modu adierazgarrian ( $P < 0,05$ ) gertatzen zela ikusi zen. *ACR* genearen tratamendu akutuen adierazpena, ere, aztertu zen. Espermatiden



markatzaile espezifikoa den *ACR*-ak adierazgarriki ( $P<0,05$ ) behera egiten zuen bere adierazpena kontrolarenarekin erkatzerakoan.

Morfinarekin inkubaketa-denbora luzean (24h) MOR-k, ere, espermatogenesisian eragiten zuela ikusi zen (32. B irudia). Kasu honetan, ere, zelula espermatogenikoekiko espezifikoak ziren markatzaileen geneen adierazpenak beraien kontrolekin konparatzean aldaketak igartzen ziren. Morfinarekin tratatutako espermatozitoen markatzaile espezifiko diren *SYCP1* eta *SYCP3*-ren adierazpenek euren kontrolekiko gora egiten zuten. *SYCP1* genearen adierazpenak adierazgarriki ( $P<0,05$ ) gora egiten zuen bitartean, *SYCP3*-ren kasuan, mRNAren igoera oso modu adierazgarrian gertatzen zen ( $P<0,01$ ). Espermatiden markatzaile espezifikoa den *ACR*-ren kasuan bere adierazpenak, kontrolarekiko, adierazgarriki ( $P<0,05$ ) gora egiten zuela behatu zen. Aldiz, morfinaren tratamendu kronikoak *ITG6*-aren adierazpenak, kontrolaren aldean, ez zuen aldaketa adierazgarririk erakusten.



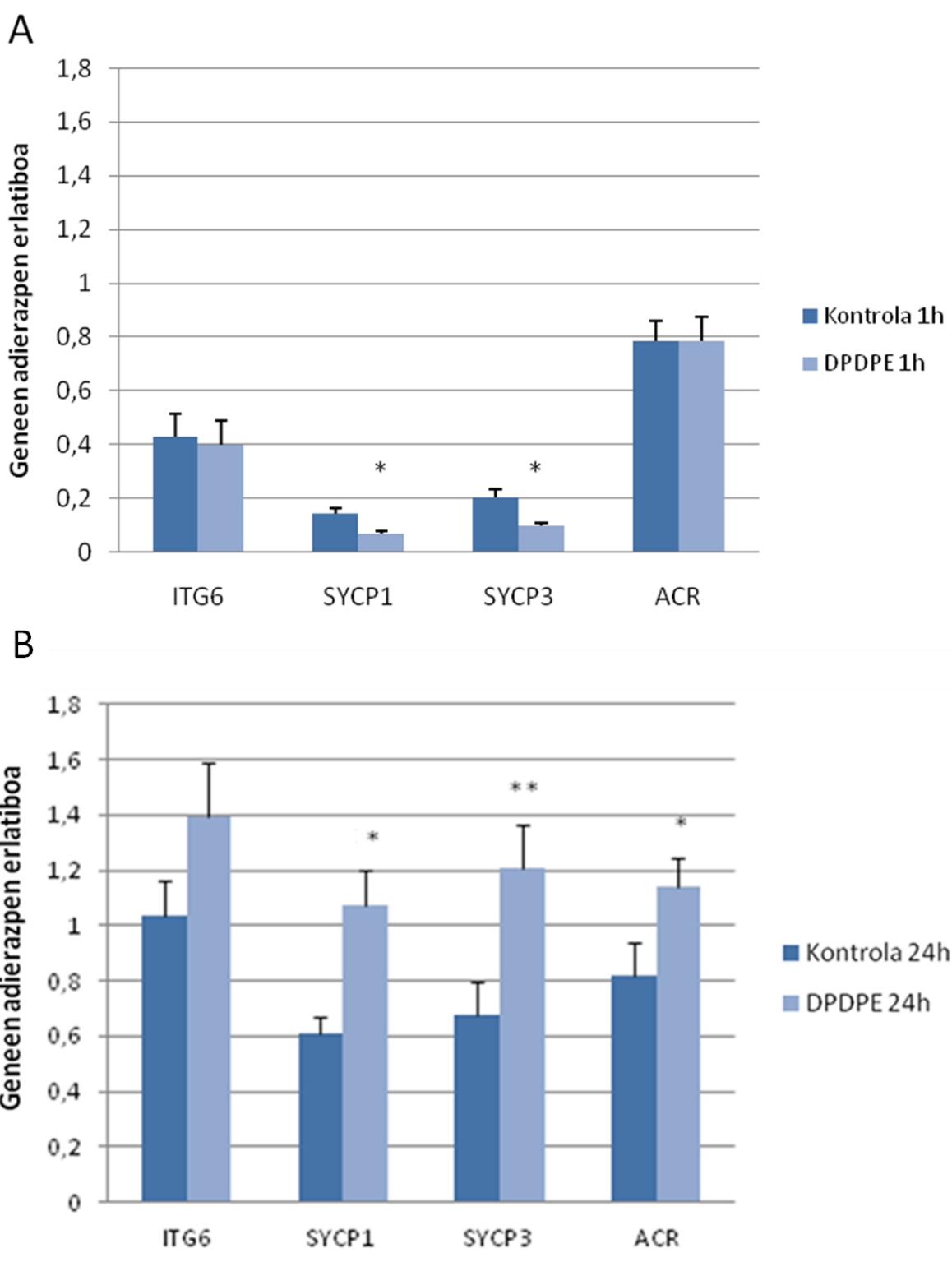
**32. irudia:** Morfinarekin tratatutako zelula espermatogenikoen markatzaileen (*ITG6*, *SYCP1*, *SYCP3* eta *ACR*) geneen adierazpen erlatiboa esposizio denbora labur (**A**) eta luzean (**B**). Datu guztiak beta-aktina genearekin normalizatu ziren. Marra bertikalek errore estandarra adierazten dute. Análisi estatistikoa *Student-en t* testarekin egin zen. Adierazgarritasunaren muga minimoa  $p < 0,05$ ean ezarri zen (\*), aldiz,  $p < 0,01$ -eko balioak (\*\*\*) oso adierazgarritzat hartzen ziren.  $n=6$ .

### 2.4.2 DOR-ren efektua espermatogenesisian

DOR-k espermatogenesisian duen efektua neurtzeko DPDPE agonista opioidea ( $10^{-6}$  M) erabili zen. Agonista hau zelula testikularrekin mantendu zen inkubaketa-denbora labur (1h) eta luzean (24h). Ondoren, zelula espermatogenikoen markatzaile espezifikoak laguntzaz hauen geneen adierazpena neurtu zen qRT-PCR bidez (33. irudia).

MOR-rekin gertatzen zen moduan, DOR-k bazuen zelula espermatogenikoetan nolabaiteko eragina ordubeteko inkubaketak egin ostean (33. A irudia). DPDPE agonista opioideak meiosian izan zezakeen efektua ikertzerakoan, fase honetako zelulen markatzaile espezifikoak geneen adierazpena behatu zen. Bai *SYCP1*, bai eta *SYCP3* geneen adierazpen erlatiboak oso modu adierazgarrian ( $P<0,01$ ) txikitzen ziren euren kontrolekin konparatzerakoan. Aldiz, DPDPE agonista opioidearekin ordubeteko inkubaketa egin ostean, espermatogonien zelulen markatzailea den *ITG6*-ren eta zelula haploideen markatzailea den *ACR*-ren adierazpenetan ez zen diferentzia adierazgarririk antzematen zelula tratatuen eta kontrolen artean.

Inkubaketa-denbora luzearen (24h) osteko geneen adierazpenaren emaitzei zegokienez (33. B irudia), agonista opioidearekin ordubeteko inkubaketan mantendutako zelulen aldean, tratamendu luzeko zelula espermatogenikoetan kontrako efektua ematen zen. Kasu honetan *SYCP1* eta *SYCP3*-ren adierazpenak igotzen zirela ikusi zen. Adierazpen-mailaren igoera hauek, hurrenez hurren, modu adierazgarrian ( $P<0,05$ ) eta oso adierazgarrian ( $P<0,01$ ) handitzen zirela behatu zen. *ACR*-ren adierazpenari dagokionez, honek, igoera adierazgarria ( $P<0,05$ ) pairatzen zuela neurtu zen. Bestalde, *ITG6*-rekin begiztatutako adierazpenen aldaketa ez zen adierazgarria izan.



**33. irudia:** DPDPE-rekin tratatutako zelula espermatogenikoen markatzaileen (*ITG6*, *SYCP1*, *SYCP3* eta *ACR*) geneen adierazpen erlatiboa esposizio denbora labur (**A**) eta luzean (**B**). Datu guztiak beta-aktina genearekin normalizatu ziren. Marra bertikalek errore estandarra adierazten dute. Análisi estatistikoa *Student-en t* testarekin egin zen. Adierazgarritasunaren muga minimoa  $p < 0,05$ ean ezarri zen (\*), aldiz,  $p < 0,01$ -eko balioak (\*\*) oso adierazgarritzat hartzen ziren.  $n=6$ .

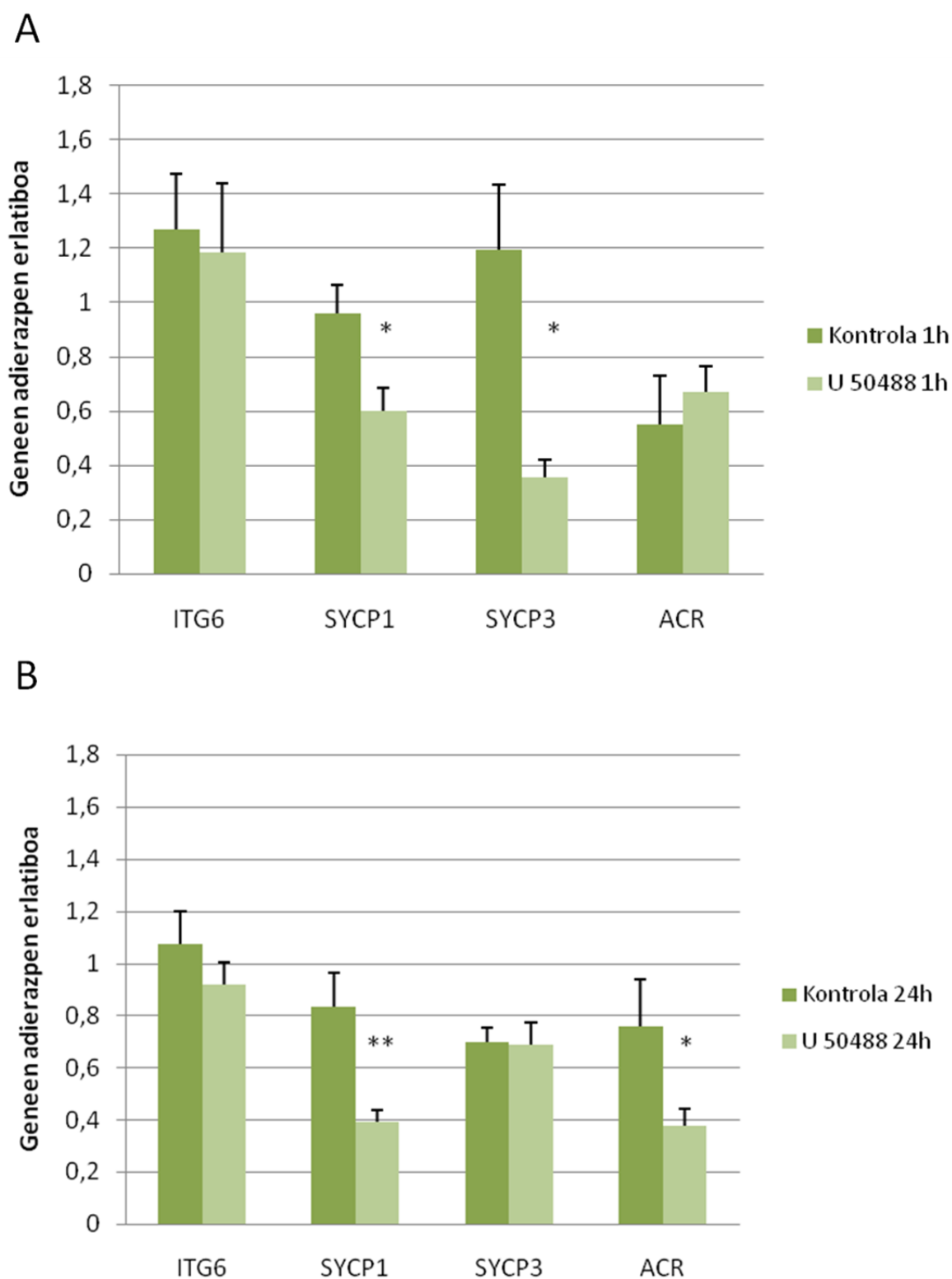
### 2.4.3 KOR-ren efektua espermatogenesisian

KOR-k espermatogenesisian izan dezakeen efektua neurtzeko, zelula testikularrak U 50488 agonista opioidearekin ( $10^{-6}$  M) mantendu ziren. Zelulak agonistarekin inkubaketa-denbora labur (1h) eta luzez (24h) tratatu ziren. Azkenik, markatzaile espezifikoaren laguntzaz, zelula espermatogenikoen geneen adierazpena neurtu zen qRT-PCR bidez (34. irudia).

Ordubeteko tratamenduaren ondoren, aurretik aztertutako opioide-hartzaileen kasuan bezala, KOR-k espermatogenesisian aldaketak eragiten zituela behatu zen (34. A irudia). Opioide-hartzaile honek meiosian izan zezakeen efektua aztertzeko *SYCP1* eta *SYCP3* geneen adierazpenak aztertu ziren. Kasu honetan, bi geneek joera bertsua erakusten zuten. Izan ere, bai *SYCP1* genearen adierazpenak bai eta *SYCP3*-renak ere, adierazgarriki ( $P < 0,05$ ) jaisten ziren kontrolarekin konparatzen zirenean. Espermatiden markatzaile espezifikoa den *ACR* genearen adierazpena ikertzerakoan ikusi zen agonista opioidearekin tratatutako zelulen adierazpena, zelula kontrolen adierazpenaren aldean, gora egiten zuela. Bestalde, espermatogonien markatzaile espezifikoa den *ITG6*-ren genearen adierazpenak tratatutako zeluletan, kontrolaren aldean, behera egiten zuen. Ez *ACR* genearen, ez eta *ITG6* genearen adierazpenetan behatutako aldaketak, ere, ez ziren adierazgarriak izan.

U 50488-rekin inkubaketa-denbora luzean (24h) KOR-k, ere, espermatogenesisian efektua zuela ikusi zen (34. B irudia). Espermatozitoen markatzaile espezifikoa den *SYCP1*-ren adierazpenak bere kontrolarekiko behera egiten zuen oso modu adierazgarrian ( $P < 0,01$ ). Aldiz, *SYCP3*-ren kasuan ez zen inolako aldaketa adierazgarririk igarri kontrol eta tratatutako zelulen artean. Espermatiden markatzaile espezifikoa den *ACR*-ren kasuan bere adierazpenak, kontrolarekiko, adierazgarriki ( $P < 0,05$ ) behera egiten zuela ikusi zen.

Azkenik, ikusi zen agonista opioide honen tratamendu luzeak *ITG6*-aren adierazpenean ez zuela aldaketa adierazgarriker eragiten.



**34. irudia:** U50488-rekin tratatutako zelula espermatogenikoen markatzaileen (*ITG6*, *SYCP1*, *SYCP3* eta *ACR*) geneen adierazpen erlatiboa esposizio denbora labur (A) eta luzean (B). Datu guztiak beta-aktina genearekin normalizatu ziren. Marra bertikalek errore estandarra adierazten dute. Análisi estatistikoa *Student-en t* testarekin egin zen. Adierazgarritasunaren muga minimoa  $p < 0,05$ ean ezarri zen (\*), aldiz,  $p < 0,01$ -eko balioak (\*\*) oso adierazgarritzat hartzen ziren.  $n=6$ .

## 2.5 MOR, DOR eta KOR-en funtzionaltasuna espermatogenesiko meiosian zehar

Aurreko helburuan opioide-hartzaileen adierazpena espermatogenesian zehar aztertu zen. Honen arabera, aldaketa adierazgarrienak meiosi fasearenak ziren markatzaileek (SYCP1 eta SYCP3) erakusten zituzten.

Sarreran aipatu bezala, meiosisia soilik hozi-zelulek pairatzen dute eta zatiketa hauen erregulaziorako beharrezkoak dira, besteak beste, ziklinak. Helburu honetan, zehazki, hiru ziklinek (B3, A1 eta E2) espermatogenesiaren meiosi fasean zenbaterainoko ekarpena duten aztertu nahi izan da. Izan ere, hauek dira espezifikoki arren espermatogenesiko lehen zatiketa meiotikoa erregulatzen duten hiru ziklinak (ikus 3. taula). Hauen gabeziak espermatogenesian eta, beraz, ugalkortasunean eragiten du (Wolgemuth eta Roberts, 2010).

Helburu honetan, beraz, opioide-hartzaileen funtzionaltasuna espermatogenesiaren meiosi fasean aztertu nahi izan zen. Honetarako, agonista opioideekin (Morfina, DPDPE eta U 50488) inkubaketa-denbora labur (1h) zein luzez (24h) mantendutako zelula testikularrak erabili ziren. Behin inkubaketa-denborak pasata zelula meiotikoen geneen adierazpenak neurtu ziren qRT-PCR bidez.

### 2.5.1 MOR-ren funtzionaltasuna espermatogenesiko meiosian zehar

Morfina agonista opioideak espermatogenesiko meiosian zehar duen eragina aztertzekeo zelulak inkubaketa-denbora labur (1h) eta luzez (24h) tratatu ziren. Ondoren, espermatozitoetako *B3*, *A1* eta *E2* ziklinen gene-adierazpena aztertu zen.

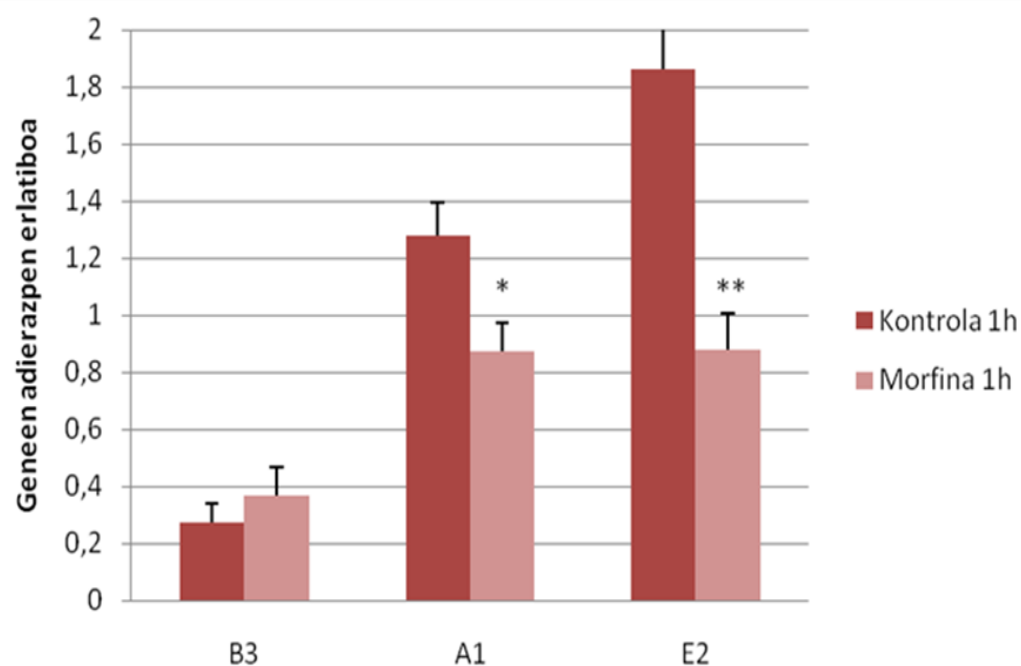
*B3*, *A1* eta *E2* ziklinen presentzia baieztatuta gelditu zen espermatogenesiko meiosi fasean morfinaekin tratatuta zeuden espermatozitoetan. Morfinaekin ordubetez tratatutako zeluletako ziklinen adierazpena kontrolekiko alderatuta ikusten zen jaitsi egiten zela *A1* ziklinaren kasuan modu adierazgarrian ( $P < 0,05$ ) eta *E2* ziklinaren kasuan, berriz, oso modu



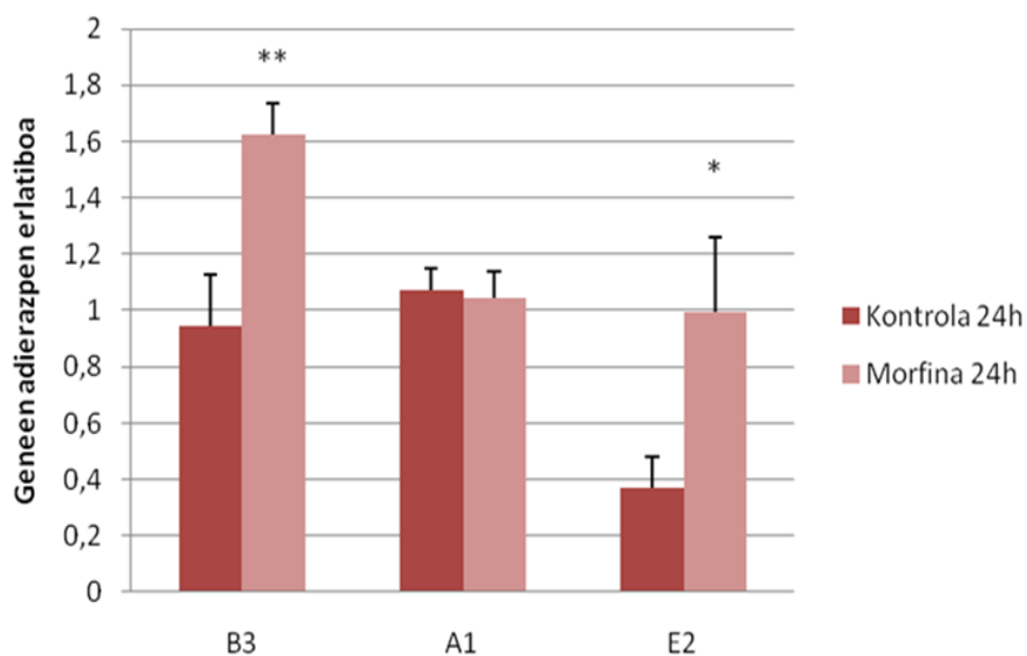
adierazgarrian ( $P < 0,01$ ). *B3* ziklinari dagokionez, ezin esan liteke inolako aldaketa adierazgarririk gertatzen zenik kontrol eta tratatutako zelulen artean (35. A irudia).

Bestetik, opioide agonistarekin tratamendua luzatzen zenean (24h) ziklinen gene-adierazpenetan bestelako joera behatzen zen (35. B irudia). Morfinarekin tratatutako *B3* ziklinaren gene-adierazpenak, kontrolaren aldean, gora egiten zuen oso modu adierazgarrian ( $P < 0,01$ ). *E2* ziklinaren kasuan morfinarekin tratatutako zelulen gene-adierazpenak adierazgarriki gora ( $P < 0,05$ ) egiten zuela behatu zen. Aldiz, *A1* ziklinaren adierazpenak, kontrol eta tratatutako zelulen artean, ez zuen aldaketa adierazgarririk erakusten.

A



B



**35. irudia:** Morfina agonista opioidearekin tratatutako zeluletako *B3*, *A1* eta *E2* ziklinen geneen adierazpen erlatiboa inkubaketa-denbora labur (A) eta luzean (B). Marra bertikalek errore estandarra adierazten dute. Análisi estatistikoa *Student-en t* testarekin egin zen. Adierazgarritasunaren muga minimoa  $p < 0,05$ ean ezarri zen (\*), aldiz,  $p < 0,01$ -eko balioak (\*\*) oso adierazgarritzat hartzen ziren. Datu hauek guztiak beta-aktina genearekin normalizatu ziren,  $n=5$ .

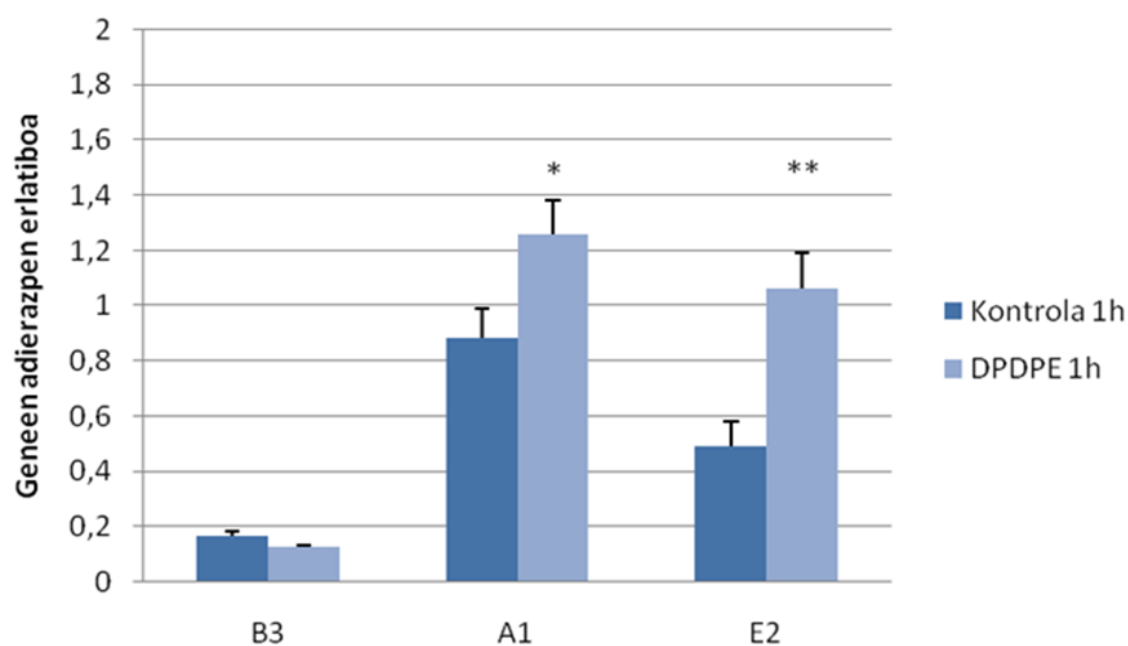
### 2.5.2 DOR-ren funtzionaltasuna espermatogenesiko meiosian zehar

DOR-k espermatogenesiko meiosian zehar duen funtzionaltasuna ezagutzeko espermatozitoetako ziklinen adierazpena aztertu zen inkubaketa-denbora labur (1h) eta luzean (24h).

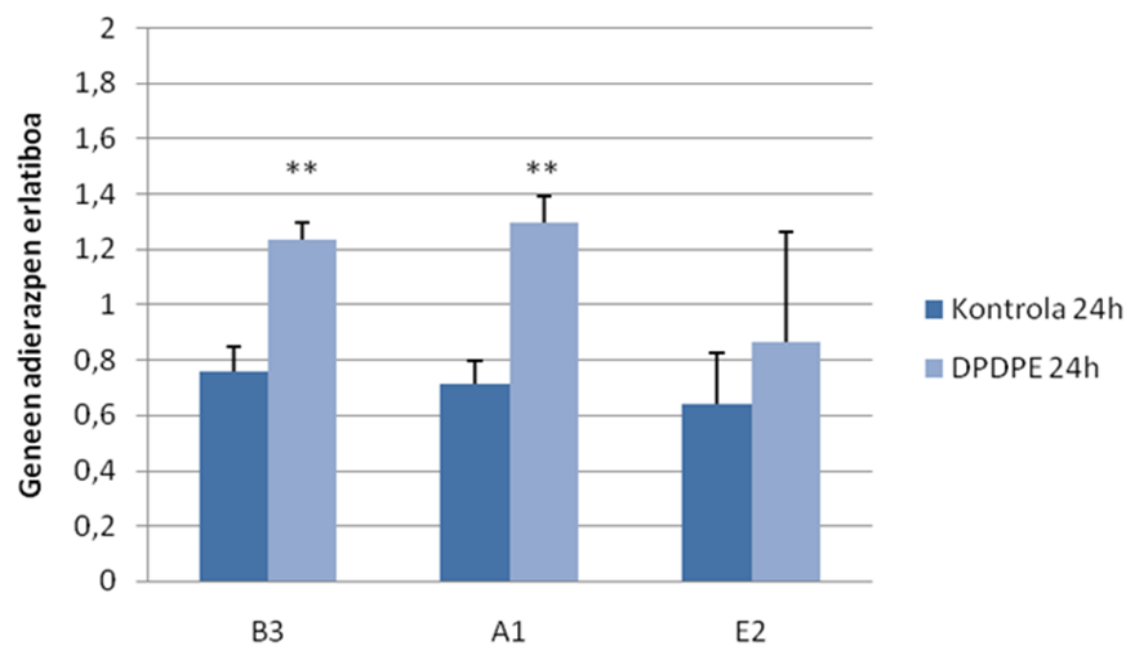
Zelulak DPDPE agonista opioidearekin ordubetez inkubatu eta ziklinen adierazpena aztertzean, euren arteko aldakortasuna beha zitekeen (36. A irudia). Izan ere, *A1* ziklinaren adierazpena handitu egiten zen tratatutako zeluletan kontrolekin konparatzean modu adierazgarrian ( $P<0,05$ ). *E2* ziklinaren kasuan, berriz, adierazpenaren handipen hau oso modu adierazgarrian gertatu zen ( $P<0,01$ ). *B3* ziklinaren kasuan, berriz, ezin esan liteke inolako aldaketa adierazgarririk gertatzen zenik kontrol eta tratatutako zelulen artean.

Zelulak inkubaketa-denbora luzez (24h) mantentzean DPDPE agonista opioidearekin tratatutako hiru ziklinen adierazpenek igotzeko joera zutela ikusi zen (36. B irudia). Igoera hauek oso modu adierazgarrian ( $P<0,01$ ) gertatzen ziren *B3* eta *A1* ziklinen kasuan.

A



B



**36. irudia:** DPDPE agonista opioidearekin tratatutako zeluletako *B3*, *A1* eta *E2* ziklinen geneen adierazpen erlatiboa inkubaketa-denbora labur (A) eta luzean (B). Marra bertikalek errore estandarra adierazten dute. Análisi estatistikoa *Student-en t* testarekin egin zen. Adierazgarritasunaren muga minimoa  $p < 0,05$ ean ezarri zen (\*), aldiz,  $p < 0,01$ -eko balioak (\*\*) oso adierazgarritzat hartzen ziren. Datu hauek guztiak beta-aktina genearekin normalizatu ziren,  $n=5$ .

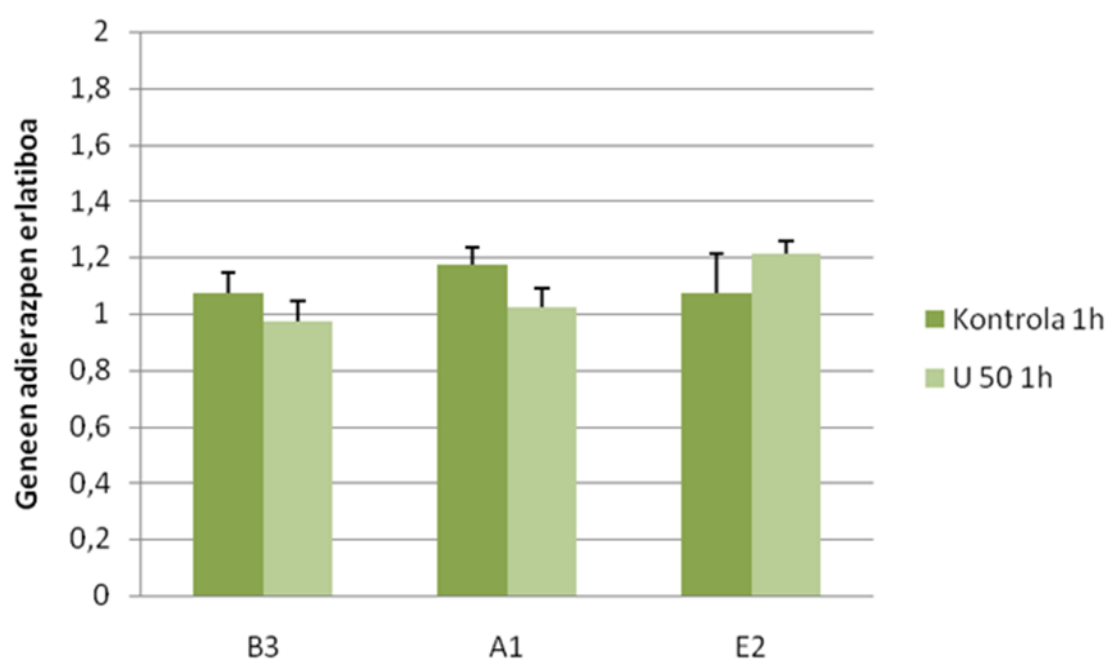
### 2.5.3 KOR-ren funtzionaltasuna espermatogenesiko meiosian zehar

KOR opioide-hartzailearen funtzionaltasuna espermatogenesiko meiosian zehar, ere, ezagutu nahi izan zen. Honetarako *B3*, *A1* eta *E2* ziklinen adierazpenak aztertu ziren inkubaketa-denbora labur (1h) eta luzez (24h) U 50488 agonista opioidearekin.

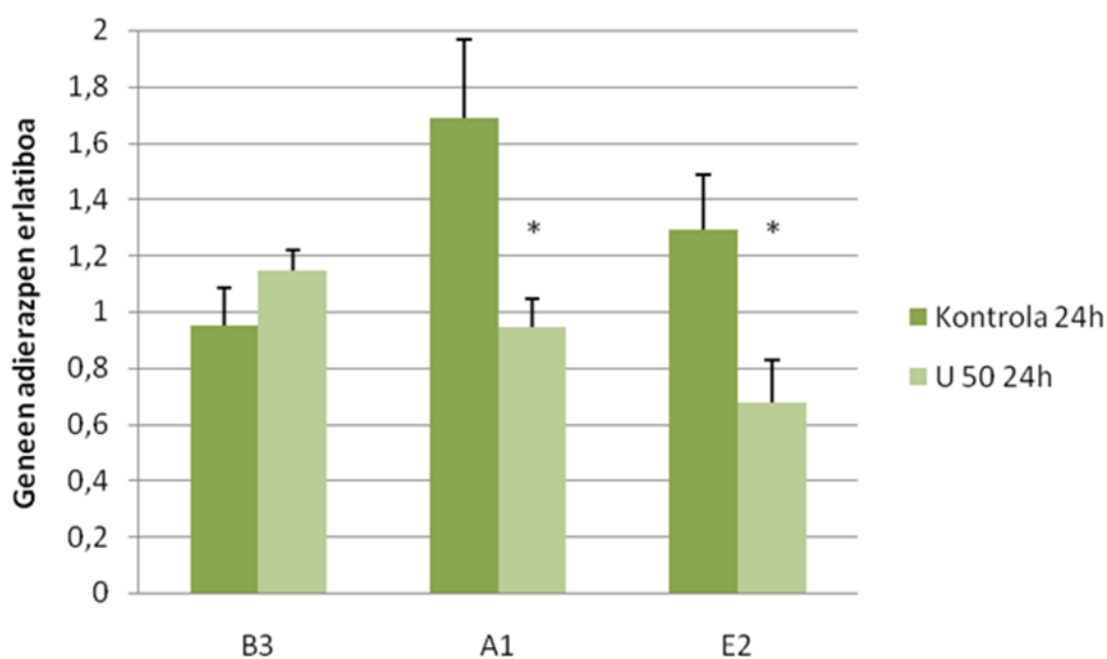
Ordubeteko inkubaketaren ondoren ez zen inolako aldaketa adierazgarririk gertatzen ordubetez inkubatutako kontrol eta tratatutako zelulen adierazpenen artean (37. A irudia).

U 50488 agonista opioidearen tratamendua luzatzen zenean (24h), *A1* eta *E2* ziklinen adierazpenek behera egiten zuten modu adierazgarrian ( $P < 0,05$ ). *B3* ziklinaren kasuan, berriz, ezin esan liteke inolako aldaketa adierazgarririk gertatzen zenik (37. B irudia).

A



B



**37. irudia:** U-50488 (U 50) agonista opioidearekin tratatutako zeluletako *B3*, *A1* eta *E2* ziklinen geneen adierazpen erlatiboa inkubaketa-denbora labur (A) eta luzean (B). Marra bertikalek errore estandarra adierazten dute. Análisi estatistikoa *Student-en t* testarekin egin zen. Adierazgarritasunaren muga minimoa  $p < 0,05$ ean ezarri zen (\*), aldiz,  $p < 0,01$ -eko balioak (\*\*) oso adierazgarritzat hartzen ziren. Datu hauek guztiak beta-aktina genearekin normalizatu ziren,  $n=5$ .



**EZTABAIDA**







Zenbait ikerketek BPO-ak testikuluetakoz zenbait zelula-motatan kokatu dituzte (Tsong eta lank., 1982; Fabbri eta lank., 1988; Soverchia eta lank., 2006). Honek, sistema opioideak funtzio testikularraren erregulazioan parte hartzen duela adierazten du. *Binding* esperimenduetan behatutakoaren arabera hiru opioide-hartzaileak (MOR, DOR eta KOR) arratoien testikuluetan topatu arren, euren kokapena Sertoli zeluletara mugatu zen (Fabbri eta lank., 1985; Zhou eta lank., 1990). Aldiz, Agirregoitiak eta lankideek (2006), aurrenekoz, MOR, DOR eta KOR gizonezkoen mintz espermatikoan topatu zituzten. Espermatozoiden helduak transkribapen eta itzulpen mailan zelula inaktiboak dira eta, beraz, pentsa liteke opioide-hartzaile hauek espermatogenesisian zehar adierazten direla. Hau dela eta, ikerketa-lan honetan, lehen aldiz, MOR, DOR eta KOR hozi-zelula maskulinoetan behatu eta kokatu dira. Honetaz gain, hiru opioide-hartzaile hauek espermatogenesisian zehar betetzen duten funtzioa ere deskribatu da.

Jarraian, eskuratutako emaitzak eztabaidatzen dira. Honetarako, opioide-hartzaile bakoitzaren ezaugarriak banaka aztertzen dira.

## **1. $\mu$ opioide-hartzailearen deskribapena, kokapena eta funtzionaltasuna hozi-zelula maskulinoetan**

### **1.1 MOR hozi-zelula maskulinoetan kokatzen da**

MOR-ren presentzia deskribatzeko, lehenik eta behin, gene eta proteina honen azterketak egin ziren. Honela, *MOR* genea testikuluetakoz tubulu seminiferoetakoz estadioetan deskribatu zen. Espermatogenesiko garapen-maila jakineko hozi-zelulen behin-behineko konbinazio zehatzek osatzen dute estadio bat (Russell eta lank., 1990). Hau dela eta, estadioetako *MOR* genearen behin-behineko adierazpena neurtu zen. Opioide-hartzaile honen geneak

adierazpen aldakorra du epitelio seminiferoan, espermatogenesiko estadiotan zehar (22. irudia). Aldakortasun hau bat dator transkripzio ondorengo mekanismo espezializatuen geneen adierazpenarekin (Kotaja eta Sassone-Corsi, 2007; Nagamori eta Sassone-Corsi, 2008; Meikar eta lank., 2011). Izan ere, IV-VI estadioen artean *MOR* genearen adierazpen-maila baxuena neurtu zen, aldiz, VII-VIII estadioetan altuena. Behaketa honek transkripzioa espermatogenesiaren estadio berantiarretan gertatzearekin bat egiten du. Aipagarria da eIF4B faktore itzultzailea (*eukaryotic initiation factor 4B*) IV-VI estadioen artean inhibituta egotea eta VII-VIII estadioetan, berriz, aktiboki itzultzea (Nagamori eta lank., 2011). Beraz, lortutako emaitzen arabera, esan liteke *MOR*-ren genea, nagusiki, espermatogenesiko estadio berantiarretan adierazten dela jada makineria itzultzailea adierazita dagoenean.

*MOR* genearen adierazpena deskribatu ondoren, estadioetako proteinaren adierazpena aztertu zen (23. irudia). *MOR*-en aurkako antigorputz poliklonala erabiliz, estadioetan sailkatutako tubulu seminiferoetan eta testikuluetan 45 kDa-eko banda antzeman zen. Kontrol positibo gisa garuna erabili zen eta 45 kDa-eko bandaz gain, 60 kDa-eko immunoerreaktibotasuna ere hauteman zen. Neurketa hauek bat datoz beste ikerketek sagu eta arratoien ehun neuronaletan topatutakoarekin. Hauen arabera *MOR* proteinak 40 eta 60 kDa arteko pisu molekularra du (Garzon eta lank., 1995). Proteina honen pisu molekularra, bere glikosilazio maila aldagarria dela eta, zelula-lerro, burmuin-alde eta espeziearen arabera ezberdina da (Huang eta Liu-Chen, 2009). Izan ere, *MOR* proteina ez-glikosilatuek 43 kDa-eko masa molekular teorikora hurbiltzen dira (Huang eta Liu-Chen, 2009). Azken hau bat dator testikulu, estadio eta garunean lortutako 45 kDa-eko bandarekin. Fluxuzko zitometriaren laguntzaz, ere, *MOR* proteinaren presentzia baieztatu zen testikuluetakoz zelula guztietan (24. irudia). Banden intentsitatea dentsitometriaz kuantifikatzerakoan *MOR* proteina, genea ez bezala, espermatogenesiko estadio guztietan antzera adierazten zela ikusi

zen. Hain zuzen ere, gene eta proteinen adierazpenetan ikusitako ezberdintasunek erakusten dute espermatogenesisian transkripzio eta itzulpen prozesuak ez direla aldi berean gertatzen. Honek bat egiten du ugaztunen espermatogenesiko gene eta proteinen erregulazioa aldibereko prozesuak ez direla dioten ikerketekin (Sassone-Corsi eta lank., 2002; Paronetto eta lank., 2009).

MOR, gene zein proteina mailan, espermatogenesiko estadioetan adierazten dela frogatu zen. Estadio bakoitzak hozi-zelula mota bat baino gehiago biltzen ditu eta, beraz, immunofluoreszentzia bikoitza erabili zen proteinak kokatzeko teknika gisa; alabaina, zelula mota eta opioide-hartzaile bakoitzarentzat bi markatzaile espezifiko erabili ziren. Saguetan egindako azterketa immunozitokimikoen bidez MOR-ren presentzia espermatogonia, espermatozito, espermatida eta espermatozoideetan baieztatu zen (25. irudia). Emaidza hauek lehenagotik opioide-hartzaileak arratoien testikuluetan (Fabbri eta lank., 1985) eta giza espermatozoideetan (Agirreagoitia eta lank., 2006) topatu izanarekin bat datoz. Honetaz gain, gizonezkoen testikuluetakoz zehar-ebakien azterketa immunohistokimikoan, MOR proteina ere behatu zen (27. irudia). Kasu honetan, MOR-ren immunotindaketa tubulu seminifero barruko zein kanpoko zeluletan behatu zen. Jakina da tubulu seminifero barruan, hozi-zelulez gain, Sertoli zelula somatikoak ere topatzen direla. Hau dela eta, pentsa liteke tubulu barruko tindaketa immunohistokimikoak hozi-zelulez gain Sertoli zelula somatikoak ere tindatu zituela. Datu hauek bat egiten dute MOR arratoien testikuluetakoz Sertoli zeluletan deskribatu izanarekin (Fabbri eta lank., 1985; Zhou eta lank., 1990). Tubulu kanpoko zelulen markaketari dagokionez, orain arte opioide-hartzailerik deskribatu ez den arren (Fabbri eta lank., 1988; Gupta, 2005), etorkizunean ikerketa gehiago egin beharko lirateke honen inguruko ezagutza areagotzeko.

## 1.2 MOR-k espermatogenesiaren funtzionaltasunean eragiten du

Egun, jakina da sistema opioideak funtzio testikularra kontrolatzeko gaitasuna duela. Sistema honek espermatogenesia, besteak beste, BPO-en bidez erregulatzeko gaitasuna duela adierazi da (Subirán eta lank., 2011). Hain zuzen ere, BPO-ek, Sertoli zelulen jarduera modu autokrinoan inhibitzeko gaitasuna dutela ikusi da. Leydig zeluletan, berriz, peptido opioideek ez dute zelula hauen testosterona ekoizpenean zuzenean eragiteko gaitasunik. Izan ere, Leydig zeluletan ez da opioide-hartzailerik topatu (Fabbri eta lank., 1988; Gupta, 2005). Zehazki,  $\beta$ -endorfina peptido opioidea, MOR zein DOR-ei antzeko afinitatearekin lotzen zaie (Stein eta lank., 1999) eta bai Leydig bai Sertoli zelula somatikoetan ere, *de novo* sintetizatzen da. Aurreko guztia kontuan hartuta, beraz, proposatu da  $\beta$ -endorfinak Leydig zelulek jariatutako testosterona-maila modu parakrinoan erregulatzeko gaitasuna duela (Subirán eta lank., 2011). Honetaz gain, Leydig zeluletan sintetizatutako  $\beta$ -endorfinak, ekintza parakrino baten bidez, Sertoli zelulen funtzionamenduan efektu inhibitzailea sortzen duela ere ikusi da (Gerendai eta lank., 1984; 1991). Dirudienez, peptido hau Sertoli zelulen MOR zein DOR opioide-hartzaileari lotzen zaio ABP ekoizpena inhibituz. ABP-ak zelula espermatogenikoen inguruan testosterona kontzentrazioa altu mantentzen du espermatogenesia modu egokian gertatzen dela ziurtatuz (Kierszenbaum eta Tres, 2012). Beraz,  $\beta$ -endorfinak espermatogenesirako beharrezkoa den testosterona-maila egokia mantentzen lagunduko luke (Subirán eta lank., 2011). Aipatutako BPO honek Sertoli zelulen jardueran duen efektu inhibitzailea dela eta, pentsa liteke hozi-zeluletan topatutako MOR-ren aktibazioak espermatogenesia zuzenean erregulatzeko gaitasuna izan dezakeela. Azken honi dagokionez, beste ikerketa-lanetan frogatu da hartzaile honek zelula neuronalen desberdintze prozesuan eragiten duela (Park eta lank., 2008; Georganta eta lank., 2013; Willner eta lank., 2014).

Zelula ama germinaleatik espermatozoideetara doan desberdintze-prozesua da espermatogenesisia (Sadler, 2004). Prozesu honek aurrera egiteko beharrezkoa da oinarri kimikoa duten komunikazio parakrino eta autokrinoa zeluletan gertatzea. Hau dela eta, testikuluetakoko zelula guztiak, elkarrekin, zegokien agonista opioidearekin inkubatu ziren. Zehazki, MOR-k espermatogenesisian parte hartzen duen jakiteko morfina agonista opioidea erabili zen eta bere eragina ziklo zelularrean neurtu zen inkubaketa-denbora akutu eta kronikoan. Fluxuzko zitometriaz lortutako emaitzen arabera, MOR funtzionalki aktiboa zen saguen hozi-zeluletan, izan ere, inkubaketa-denboraren menpeko erantzuna ikusten zen. Zelula haploideek tratamendu akutuan pairatzen zuten beherakadak adierazten zuen MOR gai zela espermatogenesisia inhibitzeko (28. irudia). Bestalde, inkubaketa-denbora kronikoaren ostean zelula haploideetan kontrako joera behatzen zen. Honek, beraz, MOR-ren espermatogenesisia aktibatze gaitasuna erakusten zuen. Hau, morfinarekin tratatutako arratoien espermatozoideetan ikusitakoarekin bat dator. Arratoiei kronikoki 14 egunez morfina txertatu ostean espermatozoideen kopuruak gora egiten zuela ikusi zen (Cicero eta lank., 2002).

Fluxuzko zitometriaz neurtutako gainontzeko zelula populazioetan (2c eta 4c) ere denbora menpeko aldaketak gertatzen ziren (28. irudia). Hauen kasuan bi zelula populazioek gora egiten zuten tratamendu akutuarekin, aldiz, kronikoarekin beherakada pairatzen zuten. Lehen esan bezala, testikuluetakoko zelula guztiak elkarrekin tratatzen ziren eta, beraz, populazio diploide eta tetraploideetan aldaketak behatu arren, ezin esan liteke aldaketa horiek soilik zelula espermatogenikoetan jazotzen zirenik. Izan ere, naloxona antagonista opioideak Sertoli zelulen populazioetan aldaketak eragiteko gaitasuna duela ikusi da (da Silva Jr eta lank., 2006). Honek, opioide-hartzaileen aktibazioak Sertoli zelulen kopuruan ere eragiten duela adierazten du. Leydig zelulen populazioan, berriz, ez da halako efekturik

behatu (Yilmaz eta lank., 1999; Ghowsi eta lank., 2013). Hau dela eta, pentsa liteke populazio diploide eta tetraploideetan neurtutako aldaketak hozi-zelulek ez ezik, Sertoli zelulek ere jasan ditzaketela.

Morfina agonista opioidearen bitartez MOR-ren parte hartzea aztertu zen ziklo zelularrean eta, honek, zelula haploide, diploide eta tetraploideetan efektu modulatzailea zuela behatu zen. Hozi-zelulekin batera zelula somatikoak inkubatu zirenez, ezin izan zen MOR-ren aktibazioak zelula espermatogenikoengan zuen ekarpen zuzena neurtu. Espermatogenesisian zehar hiru fase zelular bereiz daitezke; espermatozitogenesisia, meiosia eta espermiogenesisia. Fase zelular bakoitzak zelula mota ezberdinak biltzen ditu. Hau dela eta, MOR-k espermatogenesiko fase bakoitzean betetzen duen papera ulertzeko, zelula espermatogenikoen markatzaile espezifikoak erabili ziren. Zehazki, espermatogonien markatzaile espezifikoa den alfa-6 integrina (*ITG6*), espermatozitoen markatzaileak diren konplexu sinaptonemalaren proteina-1 eta -3 (*SYCP1* eta *SYCP3*) eta espermatiden markatzailea den akrosina (*ACR*) erabili ziren.

Espermatogoniek, zatiketa mitotikoak jasaten dituzte eta hauetan gertatutako aldaketak *ITG6* markatzaile espezifikoaren genearen adierazpenarekin neurtu ziren (Shinohara eta lank., 1999; Phillips eta lank., 2010). Tratamendu akutuan morfinak markatzaile espezifiko honen genearen adierazpenean gorakada eragin zuen (32. irudia). Honek bat egiten du tratamendu bereko populazio diploide eta tetraploideetan behatutakoarekin. Beraz, gure emaitzek, tratamendu akutuan MOR-k espermatogonien fase mitotikoan parte hartzeko gaitasuna duela iradokitzen dute. Hain zuzen ere, opioide-hartzaileek zelulen ugartzean duten eragina, lehenagotik, plazaratu izan da (Gaveriaux-Ruff eta Kieffer, 1999; Subirán eta lank., 2011; Feng eta lank., 2012).

MOR-k espermatogenesiko fase mitotikoan parte hartzeko gaitasuna duela ikusi ondoren, morfinak meiosi fasean dauden espermatozitoetan duen eragina neurtu nahi izan zen. Horretarako, lehen zatiketa meiotikoko konplexu sinaptonemala osatzen duten *SYCP1* eta *SYCP3* geneen adierazpena aztertu zen (Fraune eta lank., 2012; Qiao eta lank., 2012). Meiosian zehar zelulek euren DNA kopurua erdira murrizten dute gameto haploideak ekoizteko. Murrizketa honetarako beharrezkoa da kromosomen bi zatiketa meiotiko gertatzea. Lehen zatiketa meiotikoan zehar, kromosoma homologoen arteko lerrokatzea, sinapsia eta gurutzamendua ezinbesteko gertakizunak dira. Hain zuzen ere, kromosoma homologoen arteko sinapsia konplexu sinaptonemalak zuzentzen du (Fraune eta lank., 2012). *SYCP1* eta *SYCP3* proteinek konplexu sinaptonemalaren egitura funtzionala osatzen dute. Konplexu honek, espezifikoki, meiosian parte hartzen du eta bere funtzioa kromosoma homologoen arteko lerrokatze egokia ziurtatzea da (Fraune eta lank., 2012). Sinapsiaz gain, konplexu sinaptonemalak kromatida ez-ahizpen arteko geneen informazio-trukean edo gurutzamenduan, ere, esku hartzen du (Libuda eta lank., 2013; Baudat eta lank., 2013). Aipatutako gene truke hauek, beharrezkoak dira kiasmak (kromosoma homologoen arteko behin-behineko lotura-guneak) sortzeko. Egitura hauei esker kromosoma homologoen banaketa modu egokian gertatzen da lehen zatiketa meiotikoan zehar (Page eta Hawley, 2003).

MOR-k meiosian duen funtzioa ezagutzeko, *SYCP1* eta *SYCP3* geneen adierazpena aztertu zen. Tratamendu akutuan morfinak *SYCP3*-ren jaitsiera oso adierazgarria eragin zuen (32. irudia). Esan liteke, beraz, tratamendu akutuan MOR-k meiosia modulatzeko gaitasuna duela *SYCP3*-ren adierazpena murriztuz. Lehen aipatu bezala, *SYCP1* eta *SYCP3* proteinek konplexu honen oinarritzko egitura osatzen dute eta ezinbestekoak dira gainontzeko proteinek lotu eta egitura funtzional bat eratzeke (Fraune eta lank., 2012). Zehazki,



*SYCP3*-ren gabeziak (*Sycp3*<sup>-/-</sup>) konplexu sinaptonemalaren muntaian eta paketatzean akatsak sortzen dituela behatu da (Baier eta lank., 2007; Yuan eta lank., 2000). Honek guztiak kromosoma homologoen arteko sinapsietan okerrak sortu eta, ondorioz, ugalkortasunean modu negatiboan eragiteko gaitasuna duela ikusi da (Yuan eta lank., 2000). Izan ere, *SYCP3* gabeko sagu arrek antzutasuna pairatzen dute (Yuan eta lank., 2000). Gure emaitzetan neurtutakoaren arabera, beraz, MOR-ren aktibazioak *SYCP3*-ren beherakadan eragin eta konplexu sinaptonemalaren eraketan eta, ondorioz, ugalkortasunean efektu negatiboa duela pentsa liteke.

Tratamendu kronikoari dagokionez, MOR-ren agonista opioideak *SYCP1* eta *SYCP3* geneen adierazpena areagotzen duela behatu zen (32. irudia). Hain zuzen ere, bi gene hauen gain-adierazpenak kromosoma homologoen arteko gurutzamendu eta sinapsi prozesuetan akats larriak sortzeaz gain hondamendi mitotikoa eta tumore zelulen endopoliploidia ugarirekin erlazionatuta dagoela ere ikusi da (Kalejs eta lank., 2006; Hosoya eta lank., 2011). Gurutzamendu eta sinapsi prozesuetan jazotako okerrak direla eta, ugaztunek antzutasuna edota aneuploidia arazoak jasaten dituztela plazaratu da (Fraune eta lank., 2012). Beraz, tratamendu kronikoan, *SYCP1* eta *SYCP3*-ren adierazpen mailak areagotuz, morfinak aneuploidiak sortzeko gaitasuna izan dezakeela pentsa liteke. Honetaz gain, gure emaitzek, ere, proentzefalina (barne-peptido opioide aitzindaria) gain adierazten duten sagu trangenikoek ugalkortasun mugatua (O'Hara eta lank., 1994) izatearen arazoia azaltzen laguntzen dute. Bi tratamenduetako emaitzak kontuan hartuz, iradokitzen dugu MOR-ren aktibazioak, inkubaketa-denboraren menpe, fase meiotikoan dauden espermatozitoengan eragiten duela *SYCP1* eta *SYCP3*-ren erregulazioa modulatz.

Espermatogenesiaren azken faseari espermiogenesisia deritzo. Bertan, DNA kopuru haploidea duten espermaticidek zenbait aldaketa morfologiko pairatzen dituzte

espermatozoide independente bilakatzeko (Kierszenbaum eta Tres, 2012). Tratamendu akutuan morfinak *ACR* markatzaile espezifikoen (Ohta eta lank., 2009) genean beherakada eragiten zuen (32. irudia). Hau, bat zetorren inkubaketa-denbora bereko populazio haploidean behatutakoarekin. Tratamendu kronikoari dagokionez, *ACR* genearen adierazpenean gorakada neurtu zen (32. irudia) eta, honek, ere, bat egiten zuen tratamendu bereko populazio haploidean ikusitakoarekin. Beraz, badirudi morfinak inkubaketa-denboraren menpeko MOR-ren aktibazioan efektu aldakorra sortzen duela zelula haploideen kopurua modulatu. Bestalde, tratamendu kronikoaren ondoren populazio haploideak gora egin arren, ezin pentsa daiteke morfinak positiboki eragiten duenik ugalkortasunean. Izan ere, metadonarekin tratatutako sagu arren hozi-zelulek aberrazio kromosomikoak jasaten zituztela behatu zen (Badr eta lank., 1979). Hain zuzen ere, aberrazio hauek direla eta, hozi-zelulen bideragarritasuna mugatu eta ugalkortasuna murrizten da. Konplexu sinaptonemalean gertatutako akatsak kontuan hartuta eta metadonak aberrazio kromosomikoak sortzeko duen gaitasuna jakinda, iradokitzen dugu morfinak zelula haploideetan aberrazio kromosomikoak sortzeko gaitasuna duela ugalkortasunean negatiboki eraginez. Hau guztia baieztatzeko, etorkizunean, ikerketa gehiago egin beharko lirатеke.

MOR espermatogenesisian parte hartzen duela ikusi da. Honetarako, ezinbestekoa da espermatogenesisiko ziklo zelularra kontrolatzeko makineria zelular berezi bat. Makineria horretan ziklina proteina erregulatzaileek, besteak beste, garrantzia handia dute (Bloom eta Cross, 2007; Satyanarayana eta Kaldis, 2009). Opioid-hartzaileek meiosi fasean zituzten aldaketa adierazgarrienak. Hau dela eta, espermatogenesisiko meiosian parte hartzen duten *A1*, *B3* eta *E2* ziklina geneen adierazpena neurtzea erabaki zen (Sweeney eta lank., 1996; Nguyen eta lank., 2002; Martinerie eta lank., 2014). Ziklina hauek espezifikoki arren espermatogenesisiko lehen zatiketa meiotikoa erregulatzen dute. Zehazki, *A1* ziklinak,

espermatozitoen profase berantiarretik lehen metafaserako trantsizioan laguntzen du (Wolgemuth eta Roberts, 2010). *B3* ziklinak, aldiz, leptoteno eta zigoteno faseen erregulazioan parte hartzen du (Nguyen eta lank., 2002) eta *E2* ziklinak, leptoteno faseetik diploteno faserainoko espermatozitoen erregulazioan laguntzen du. Hauetako bakar baten gabeziak espermatogenesisian eta, ondorioz, arren ugalkortasuna murrizten du (ikus 3. taula) (Wolgemuth eta Roberts, 2010).

MOR-k espermatogenesiko meiosian zehar duen funtzionaltasuna ezagutzeko hozi-zelulak morfina agonista opioidearekin tratatu ziren inkubaketa-denbora labur eta luzez. Honetarako, meiosiaren erregulazioan parte hartzen duten *B3*, *A1* eta *E2* ziklina geneen adierazpena aztertu zen. Morfinarekin ordubetez mantendutako espermatozitoen *A1* eta *E2* ziklinen adierazpenek beherakada jasan zuten (35. irudia). Nickerson eta lankideek (2007) ikusi zuten *A1* ziklina gabeko (*Ccna1*<sup>-/-</sup>) sagu transgenikoek meiosia fase diplotenoan gelditu eta apoptosia pairatzen zutela. Beraz, morfina *A1* ziklina erregulatuz, meiosiranzko sarrera kontrolatuko luke. Honek, hain zuzen ere, bat egingo luke emaitzetan behatutako populazio haploidearen (28. irudia) eta *ACR*-ren adierazpen (32. irudia) beherakadarekin. Aipatu berri den ikerketa-lanean, gainera, ikusi zen sagu transgenikoetan meiosia diploteno fasera arte modu egokian gertatzen zela eta kiasmetan ez zegoela inolako kalterik (Nickerson eta lank., 2007). Beraz, nahiz eta *A1* ziklinak fase meiotikoa erregulatu, konplexu sinaptonemalaren eraketa erregulatzeko gaitasunik ez duela erakutsi zen. Hau dela eta, MOR-k espermatogenesisia bi aldetatik erregulatzeko gaitasuna duela iradokitzen dugu; alde batetik, *A1* ziklinaren adierazpena erregulatuz eta, bestetik, *SYCP3*-rena erregulatuz. *E2* ziklina, berriz, zuzenean konplexu sinaptonemalarekin lotu da. Izan ere, bere gabeziak (*Ccne2*<sup>-/-</sup>) kromosoma homologoen parekatze eta sinapsian akatsak sortzeko gaitasuna duela ikusi da (Martinerie eta lank., 2014). Hau dela eta, *E2* ziklina gabeko sagu transgenikoek

ugalkortasuna murriztua dute (Geng Y. eta lank., 2003; Martinerie eta lank., 2014). Honela, MOR-ren aktibazioak, *E2* ziklinaren bitartez, konplexu sinaptonemaleko proteinen gene adierazpena erregulatzeko gaitasuna duela dirudi. Aldaketa hauek, gainera, haploideak diren espermatiden populazioen beherakadarekin bat datoz. Beraz, tratamendu akutuan MOR-ren aktibazioak meiosis inhibitu eta, ondorioz, populazio haploidea baldintzatzeko gaitasuna duela esan liteke.

Morfinaren tratamendu kronikoari dagokionez, MOR-ren aktibazioak *B3* eta *E2* ziklinen adierazpena areagotzeko gaitasuna duela ikusi da (35. irudia). *B3* ziklinaren mRNA leptotenotik zigotenora adierazten da nagusiki (Nguyen eta lank., 2002; Wolgemuth eta Roberts, 2010; Wolgemuth eta lank., 2013). Ziklo zelularrak aurrera jarrai dezan, *B3* ziklinaren adierazpena zigotenotik pakitenorako trantsizioan murriztea beharrezkoa dela ere ondorioztatu da (Refik-Rogers eta lank., 2006). Gainera, *B3* ziklinak konplexu sinaptonemalaren eraketan eginkizun garrantzitsua izan dezakeela proposatu da (Nguyen eta lank., 2002). Izan ere, konplexu sinaptonemalaren egitura funtzionala leptoteno eta zigoteno faseen artean osatzen da (di Carlo eta lank., 2000; Martinerie eta lank., 2014). Honek, bat egiten du gure emaitzetan behatutakoarekin. Izan ere, MOR-ren aktibazioak *B3* ziklinaren gain-adierazpenean ez ezik, *SYCP1* eta *SYCP3*-ren gain-adierazpenean ere eragiten zuen. Beraz, pentsa liteke MOR-ren akibazioak, *B3* ziklina eta konplexu sinaptonemaleko geneen adierazpenak aldatuz, ziklo espermatogenikoa erregulatzeko gaitasuna duela. *E2* ziklinaren kasuan, tratamendu kronikoan gene honen adierazpenean gorakada adierazgarria neurtu zen. Tratamendu akutuan iradoki bezala, *E2* ziklinaren erregulazio aldaketak konplexu sinaptonemaleko proteinen gene adierazpenean eragin lezake. Hau dela eta, *SYCP1* eta *SYCP3* geneak gain-adierazita zeuden. Lehen aipatu den moduan, konplexu sinaptonemaleko bi proteina hauen geneen gain-adierazpenak kromosoma homologoen

arteko gurutzamendu eta sinapsi prozesuetan akats larriak sortzeaz gain, hondamendi mitotikoa eta tumore zelulen endopoloploidia ugarirekin erlazionatua dagoela ikusi da (Kalejs eta lank., 2006; Hosoya eta lank., 2011). Hain zuzen ere, gurutzamendu eta sinapsi prozesuetan jazotako akatsen ondorioz, ugaztunek antzutasuna edota aneuploidia arazoak dituzte (Fraune eta lank., 2012). Beraz, laburbilduz, esan genezake MOR-ek, *B3* eta *E2* ziklinen bitartez, konplexu sinaptonemaleko proteinen gene adierazpena erregulatzeko gaitasuna duela espermatogenesiaren erregulazioan aldaketak eraginez.

Emaitza hauek guztiak kontuan hartuz esan liteke, batetik, MOR espermatogenesiko faseetan zehar aktibo mantentzen dela eta, bestetik, espermatogenesiko zeluletan inkubaketa-denboraren menpeko efektu modulatzailea duela. Honetaz gain, zelulen meiosia kontrolatuz, ziklinek zein konplexu sinaptonemaleko proteinek ziklo espermatogenikoa erregulatzeko gaitasuna dutela ere ikusi da. Edonola ere, ezin esan liteke morfina espermatogenesia guztiz blokeatzeko gaitasuna duenik. Azken hau bat dator *knockout* saguetan behatutakoarekin. Izan ere, MOR gabeko saguek ez dute guztizko antzutasuna pairatzen (Kieffer eta lank., 1999).

## **2. $\sigma$ opioide-hartzailearen deskribapena, kokapena eta funtzionaltasuna hozi-zelula maskulinoetan**

### **2.1 DOR hozi-zelula maskulinoetan kokatzen da**

Lehenik eta behin, DOR hozi-zeluletan ote zegoen jakiteko, MOR-rekin egin bezala, honen gene eta proteinaren adierazpenak aztertu ziren tubulu seminiferoetan. *DOR* genearen adierazpena estadio guztietan deskribatu zen. Honetaz gain, opioide-hartzaile honen geneak,

ere, adierazpen aldakorra zuen epitelio seminiferoan. Izan ere, IV-VI estadioen artean *DOR* genearen adierazpen-maila baxuena neurtu zen, aldiz, VII-VIII estadioetan altuena (22. irudia). Honek, estadiotan zehar, opioide-hartzaile honen erregulazioa aldakorra dela erakusten du. Aldakortasun honek bat egiten du espermatogenesiko transkripzio ondorengo mekanismo espezializatuen geneen adierazpenarekin (Kotaja eta Sassone-Corsi, 2007; Nagamori eta Sassone-Corsi, 2008; Meikar eta lank., 2011). Hau dela eta, esan liteke *DOR*, *MOR*-ren antzera, nagusiki espermatogenesiko estadio berantiarretan adierazten dela jada makineria itzultzailea adierazita dagoenean.

Behin *DOR* genearen adierazpena deskribatuta, estadioetako proteina honen adierazpena aztertu zen western blot bidez (23. irudia). Testikulueta proteina-erazkinean eta tubulu seminiferoetako XII-III, IV-VI eta VII-VIII estadioetan *DOR*-ren aurkako antigorputz poliklonalak 72 eta 100 kDa-eko bandak agerrarazi zituen. IX-XI estadioen kasuan, aldiz, ez zen banda nabarmenik bereizten. Kontrol positibo gisa erabilitako garunean, 72 eta 100 kDa-eko bandez gain, 36 kDa-eko beste banda bat immunodetektatu zen. *DOR*-rentzat 46 kDa-eko masa molekular teorikoa ondorioztatu den arren, hartzaile honekiko immunoerreaktibotasuna 50 eta 70 kDa artean ere agertu izan da (Christoffers eta lank., 2005). Hala ere, Persson-ek eta lankideek (2005) arratoiaren garunean hiru banda desberdin immunokokatu zituzten 72, 48 eta 36 kDa-ean. Pisu molekularrek erakutsitako diferentziak *DOR* proteina espeziearen eta ehunaren arabera modu ezberdinean adierazten delako izan daitezke (Albrizio eta lank., 2010). Azkenik, 100 kDa-eko bandari dagokionez, proposatu da dimero bat izan daitekeela. Izan ere, G proteinei lotutako hartzaileek dimeroak sortzeko gaitasuna dutela ikusi da (Jordan eta lank., 2001; Agirregoitia eta lank., 2006). Western blot-az gain, fluxuzko zitometriaren bidez, ere, testikulueta zeluletan *DOR* proteinaren presentzia baieztatu zen (24. irudia). Bestalde, dentsitometriaz estadioetako *DOR*

proteinaren adierazpena neurtu zen. Kasu honetan, XII-III, IV-VI eta VII-VIII estadioetan DOR-ren adierazpena antzera mantentzen zela ikusten zen, aldiz, IX-XI estadioen arteko proteinaren adierazpenak behera egiten zuen. DOR proteinaren adierazpenarekin ikusitakoa ez zettorren bat estadio berdinetan behatutako *DOR* genearen adierazpenarekin. Hau da, proteina eta genearen adierazpen-patroiak ezberdinak ziren. Honek, MOR-rekin gertatzen den bezala, DOR-ren gene eta proteinen erregulazioa aldiberekoak ez direla adierazten du (Sassone-Corsi eta lank., 2002; Paronetto eta lank., 2009).

DOR proteinaren kokapena ezagutzeko immunfluoreszentzia bikoitza erabili zen. Honela frogatu zen DOR-ren proteina espermatogenesiko hozi-zeluletan adierazten dela sagu (25. irudia) zein gizonezkoetan (27. irudia). Saguetan, zehazki, DOR-ren presentzia espermatogonia, espermatozito, espermátida eta espermatozoidetan baieztatu zen. Honetaz gain, gizonezkoen kasuan, DOR proteina tubulu barruko zeluletan behatu zen. Honek bat egiten du giza espermatozoidetan (Agirregoitia eta lank., 2006) eta arratoien testikuletako Sertoli zeluletan (Fabbri eta lank., 1985; Zhou eta lank., 1990) DOR proteina topatu izanarekin. Hau dela eta, pentsa liteke giza testikuletako DOR-ren markaketa tubulu barruko hozi-zeluletan ez ezik, Sertoli zeluletan ere egotea. Bestalde, tubulu kanpoko zeluletan ere topatu zen DOR proteina. Tubulu kanpoan oraindik opioide-hartzailerik deskribatu ez den arren (Fabbri eta lank., 1988; Gupta, 2005), interesgarria litzateke etorkizunean azken honen inguruko ikerketa gehiago egitea.

## **2.2 DOR-k espermatogenesiaren funtzionaltasunean eragiten du**

DOR sagu zein gizonezkoen hozi-zeluletan kokatu ondoren, bere aktibazioak espermatogenesisian zehar duen funtzioa zehaztu nahi izan zen. Lehen azaldu bezala, BPO-ak Leydig eta Sertoli zeluletan *de novo* sintetizatzen dira eta Sertoli zelulen jarduera modu autokrino zein parakrinoan inhibitzeko gaitasuna dute (Subirán eta lank., 2011). Hala ere,

peptido opioide honek espermatogenesisian duen ekintza zuzena ez da oraindik deskribatu. Beraz, DOR testikuluetakoz hozi-zeluletan deskribatu ondoren, bere aktibazioak espermatogenesisian nolabaiteko eragina izan zezakeela pentsatzera eramán gintuen. Honetaz gain, DOR-k zelula neuronalen desberdintze prozesuetan ere parte hartzen duela frogatu da (Georganta eta lank., 2013).

DOR-ren funtzionaltasuna aztertzeke MOR-rekin erabilitako metodologia bera jarraitu zen. Hau da, zelula testikular guztiak zegozkien agonista opioidearekin batera inkubatu ziren. Kasu honetan, DPDPE agonista opioidearen bitartez, inkubaketa-denbora ezberdinetan DOR-ren aktibazioak ziklo zelularrean duen parte hartzea neurtu zen (29. irudia). Ordubeteko tratamenduaren ostean zelula haploideetan ez zen aldaketa adierazgarririk behatu. Inkubaketa-denbora luzearekin, berriz, MOR-rekin gertatzen zen moduan, DPDPE-k populazio haploidean gorakada adierazgarria eragin zuen. Beraz, pentsa liteke DOR-k espermatogenesisia modulatzeko gaitasuna duela inkubaketa-denboraren menpe. Datu hauek bat datoz DOR-k lehen aipatutako zelula neuronalen desberdintze prozesuak erregulatzeko gaitasuna duela dioten ikerketekin (Georganta eta lank., 2013).

Gainontzeko zelula populazioetan (2*c* eta 4*c*) ere denbora menpeko aldaketak neurtu ziren. Populazio diploide eta tetraploideek, azken hauek oso adierazgarriki, gora egiten zutela ikusi zen inkubaketa-denbora laburrekin (29. irudia). Aldiz, zelulak tratamendu luzean mantendu ostean efektu ezberdina behatu zen. Izan ere, 2*c* populazioak adierazgarriki gora egiten zuen bitartean 4*c* populazioak beherakada adierazgarria jasan zuen. MOR-rekin azaldu bezala, hemen ere, populazio diploide eta tetraploideetan neurtutako aldaketak ez zituzten soilik zelula espermatogenikoek pairatzen. Arratoien testikuluetakoz Sertoli zeluletan opioide-hartzaileak deskribatzeaz gain (Fabbri eta lank., 1985; Zhou eta lank., 1990), hauen aktibazioak zelula hauetan aldaketak eragiten zituztela ikusi zen (da Silva Jr eta lank., 2006).



Hau dela eta, pentsa liteke *2c* eta *4c* populazioetan neurtutako aldaketak hozi-zelulek ez ezik, Sertoli zelulek ere paira ditzaketela.

DOR-k ziklo espermatojenikoan zehar efektu modulatzailea zuela ikusita, opioide-hartzaile honek bere efektu erregulatzailea zehazki espermatojenesiko zein fasetan erakusten zuen neurtu nahi izan zen. Hau dela eta, espermatojenesiko fase zelular bakoitzerako hozi-zelulen markatzaile espezifikoak erabili ziren. Zehazki *ITG6*, *SYCP1*, *SYCP3* eta *ACR* erabili ziren espermatojenia, espermatozito eta espermatozoiden markatzaile espezifiko gisa.

Espermatozoiden markatzaile espezifikoaren *ITG6* genearen adierazpena neurtu ostean (Shinohara eta lank., 1999; Phillips eta lank., 2010) ikusi zen honek ez zuela inkubaketa-denboraren menpeko aldaketa adierazgarrikerak erakusten (33. irudia). *ITG6*-ren adierazpenean aldaketa adierazgarrikerak ez neurtzeak pentsatzera garamatza populazioetan behatutako DOR-ren efektua zelula somatikoaren eraginaren ondorioz izatea; alabaina, hozi-zelulak eta somatikoak batera inkubatu ziren. Kontuan hartuta Sertoli zelulen populazioak naloxonarekin tratatu ostean aldaketak pairatzeko gai dela, pentsa liteke ziklo zelularreko populazio diploide eta tetraploideetan neurtutako gorabeherak, gehienbat, Sertoli zelulek eragin izana (Fabbri eta lank., 1985; Zhou eta lank., 1990; da Silva Jr eta lank., 2006).

Bestalde, DOR-k espermatojenesiko meiosi fasean eragiten ote zuen jakiteko, espermatozitoen *SYCP1* eta *SYCP3* markatzaile espezifikoaren geneen adierazpena neurtu zen (Fraune eta lank., 2012; Qiao eta lank., 2012). Inkubaketa-denbora laburrean bi geneen adierazpenek behera egiten zuten (33. irudia). Kasu honetan, fase mitotikoarekin ez bezala, bai esan liteke DOR-k meiosis erregulatzeko gaitasuna duela *SYCP1* eta *SYCP3*-ren adierazpenak murriztuz. Hau, opioide-hartzaileak, *SYCP1* eta *SYCP3*-ren adierazpenak erregulatuz gurutzamendu meiotikoan parte hartzen dutela dioten hainbat lanekin bat dator.

Izan ere, *SYCP1* gabeko espermatozitoek (*Sycp1*<sup>-/-</sup>) nekez sortzen dituzte gene trukeak (de Vries eta lank., 2005). Bestalde, konplexu sinaptonemalik gabeko sagu transgenikoetan (*Sycp1*<sup>-/-</sup> eta *Sycp3*<sup>-/-</sup>) ikusi da kiasmak sortzeko gaitasun murriztua dutela (Kouznetsova eta lank., 2011). Hain zuzen ere, *SYCP1* eta *SYCP3*-ren ezak kromosoma homologoen gurutzamendu egokirako beharrezkoak diren harizpi bikoitzeko apurketen (*Double Strand Break-DSB*) konponketa partziala eragiten du, ugalkortasuna larriki murriztuz (Kouznetsova eta lank., 2011). Hau dela eta, pentsa liteke DOR *SYCP1* eta *SYCP3*-ren adierazpena jaitsi eta, ondorioz, gurutzamendu meiotikoak sortzeko gaitasuna murrizten duela ugalkortasuna baldintzatuz. Bestalde, tratamendu kronikoan DOR-ren agonista opioideak *SYCP1* eta *SYCP3* geneen adierazpena areagotzen zuen. Emaitza hauek iradokitzen dute DOR-k, *SYCP1* eta *SYCP3*-ren adierazpenen bitartez, fase meiotikoko kromosoma homologoen banaketan eragin dezakeela. MOR-rekin azaldu bezala, gene hauen gain-adierazpenak kromosoma homologoen arteko gurutzamenduan akatsak sortzeaz gain, hondamendi mitotikoa eta tumore zeluletan endopoliploidia ugari eragiten ditu (Kalejs eta lank., 2006; Hosoya eta lank., 2011). Hain zuzen ere, gurutzamendu eta sinapsi prozesuetan okerrak jasaten dituzten ugaztunek antzutasun edota aneuploidia arazoak dituzte (Fraune eta lank., 2012). Tratamendu kronikoan, beraz, DOR-ren aktibazioak fase meiotikoan dauden espermatozitoengan eragiten du *SYCP1* eta *SYCP3*-ren erregulazioa modulatzuz.

Azkenik, espermiogenezian DOR-k duen eragina jakiteko *ACR* markatzaile espezifikoren genearen adierazpena aztertu zen (33. irudia) (Ohta eta lank., 2009). Tratamendu laburraren ostean espermatiden adierazpenean ez zen aldaketarik neurtu. Bestalde, DPDPE-ren tratamendu luzearekin *ACR*-ren adierazpenak gora egiten zuen. Hau, bat dator ziklo zelularrean populazio haploideak erakutsitako gorakadarekin. Beraz, inkubaketa-denbora luzean DOR-k, espermatiden desberdintze prozesua aktibatuz,

espermiogenesisian efektu modulatzailea duela esan liteke. Honek, gainera, bat egiten du DOR-k desberdintze prozesuetan efektu indartzailea duela dioten ikerketekin. Esate baterako, Georgantak eta lankideek (2013) ikusi zuten zelula neuronalak DOR-ren agonista opioidearekin tratatu ostean hauen desberdintzea areagotzen zela. Narita eta lankideak (2006), ere, ondorio berera heldu ziren DOR-k neurogenesisia eta neurobabesa bezalako prozesuetan duen garrantzia azpimarratuz.

Opioide-hartzaileek, nagusiki, espermatogenesiko meiosi fasean dute euren efektu modulatzailea. Espermatogenesiaren ziklo zelularraren erregulazioan ziklinek parte hartzen dutela jakinda (Wolgemuth eta lank., 2013), hauen geneen adierazpena neurtzea erabaki zen. Zehazki, meiosiaren erregulazioa kontrolatzen duten ziklina espezifikoen (*B3*, *A1* eta *E2*) geneen adierazpena neurtu zen. Lehen esan bezala, hauetako bakar baten gabeziak arren ugalkortasunean eragiten du (Wolgemuth eta Roberts, 2010).

Hozizelulak DPDPE agonista opioidearekin denbora labur eta luzez inkubatu ostean, espermatozitoen meiosisia erregulatzen duten ziklina espezifikoen geneen adierazpena aztertu zen. Zehazki, DOR agonista opioidearen tratamendu laburrekin, *A1* eta *E2* ziklinen adierazpena areagotzen zela behatu zen (36. irudia). Bi ziklina hauek beharrezkoak dira meiosiaren erregulazioan eta euren geneen adierazpen aldaketek ugalkortasunean ondorio larriak sor ditzakete (Liu eta lank., 1998<sub>a,b</sub>; Wolgemuth eta lank., 2013; Martinerie eta lank., 2014). Hau dela eta, badirudi ordubeteko inkubaketa-denboran DOR-k meiosisia erregulatzeko gaitasuna duela ziklinen adierazpena modulatu. Hala ere, pentsa liteke *A1* ziklinak eta konplexu sinaptonemaleko proteinek meiosisia mekanismo ezberdinen bitartez erregulatzeko gaitasuna dutela. Izan ere, ikusi da *A1* ziklinak ez duela konplexu sinaptonemalaren eraketan inolako eraginik (Nickerson eta lank., 2007). *E2* ziklinak, aldiz, lehen zatiketa meiotikoan hain beharrezkoa den konplexu sinaptonemalarekin elkarrekintza

zuzena duela deskribatu da (Martinerie eta lank., 2014). Kasu honetan, ordea, ziklina eta konplexu sinaptonemaleko geneen adierazpenek joera ezberdinak zituzten. Hau dela eta, pentsa liteke *E2* ziklinaren gain-adierazpena konpentsazio mekanismoren batek eragin izana. Dirudienez, ugaztunen ziklo zelularrean zehar, ziklinen arteko konpentsazio mekanismoak gertatzen dira (Satyanarayana eta Kaldis, 2009; Martinerie eta lank., 2014). Honek guztiak pentsatzera garamatza neurtutako *E2* ziklina eta konplexu sinaptonemaleko geneen adierazpenen arteko ezberdintasunak honelako mekanismoengatik izatea. Beraz, lortutako emaitza hauen arabera, esan liteke DOR-k meiosiaren erregulazioan aldaketak sortzen dituela mekanismo ezberdinak aktibatuz. Etorkizunean uste hau egiaztatu ahal izateko beharrezkoa izango da, seinaleztapen sareak eraikiz, bi mekanismo hauek erregulatzen dituzten barne-bideen inguruko ikerketa gehiago egitea.

Inkubaketa-denbora luzeari dagokionez, DOR-ren aktibazioak *B3* eta *A1* geneen gain-adierazpenean, oso adierazgarriki, eragiten zuela ikusi zen (36. irudia). *B3* ziklinak konplexu sinaptonemalaren osatze prozesuan parte hartzen duela proposatu da. Izan ere, *B3* ziklina kromosoma homologoen parekaketan, sinapsian eta harizpi bikoitzeko apurketen konponketa gertatzen deneko faseetan adierazten da (Nguyen eta lank., 2002). Hau, beraz, bat dator konplexu sinaptonemaleko proteinen gene adierazpenean behatutakoarekin (33. irudia). Beraz, pentsa liteke DOR-k *B3* ziklina zein konplexu sinaptonemaleko proteinen geneen adierazpena areagotzeko eta, ondorioz, ugalkortasuna negatiboki baldintzatzeko gaitasuna duela. Hain zuzen ere, ugalkortasunean arazorik ez egoteko *B3* ziklinaren adierazpena zigotenotik pakitenorako trantsizioan murriztea beharrezkoa da (Nguyen eta lank., 2002; Refik-Rogers eta lank., 2006). *A1* ziklinari dagokionez, ikusi da beharrezkoa dela meiosiaren erregulazioan eta bere gene adierazpenaren aldaketek ugalkortasunean arazoak sor ditzakeela (Liu eta lank., 1998<sub>a,b</sub>; Wolgemuth eta lank., 2013). Hau dela eta,

pentasa liteke tratamendu luzean DOR-ren aktibazioak AI ziklinaren gain-adierazpenean eragiten duela meiosiaren erregulazioan aldaketak sortuz. Honek guztiak, gainera, espermatogenesisia baldintzatu eta, ondorioz, ugalkortasunean efektu negatiboa izango luke.

Laburbilduz, badirudi DOR espermatogenesisiko fase ezberdinetan aktibo mantendu arren, nagusiki meiosian duela efektu modulatzailea. Hala ere, ziklina eta konplexu sinaptonemaleko proteinen gene adierazpenetan oinarrituz, DOR-k espermatogenesisia erregulatzeko mekanismo ezberdinak erabiltzen dituela dirudi. Kasu honetan ere, ezin esan daiteke DPDPE-ak espermatogenesisia guztiz blokeatzeko gaitasuna duenik. Honek bat egiten du *knockout* saguetan ikusitakoarekin. Izan ere, DOR gabeko saguek ez dute antzutasun osoa pairatzen (Kieffer eta lank., 1999).

### **3. κ opioide-hartzailearen deskribapena, kokapena eta funtzionaltasuna hozi-zelula maskulinoetan**

#### **3.1 KOR hozi-zelula maskulinoetan kokatzen da**

KOR hozi-zeluletan deskribatu eta kokatzeko aurreko bi hartzaileekin aipatutako prozedura berberak jarraitu ziren. Zehazki, KOR-ren presentzia deskribatzeko estadioetako gene eta proteina honen adierazpenak aztertu ziren qRT-PCR eta western blot bidez. Hemen, ere, saguen tubulu seminiferoetan aztertutako estadio guztietan *KOR* genea deskribatu zen. Gene honek, beste bi geneek bezala, adierazpen aldakorra erakusten zuen espermatogenesisiko zikloan zehar (22. irudia). Zehazki, IV-VI estadioen artean *KOR* genearen adierazpen-maila baxuena neurtu zen, aldiz, VII-VIII estadioetan altuena. Aldakortasun honek bat egiten du espermatogenesisiko transkripzio ondorengo mekanismo

espezializatuen geneen adierazpenarekin (Kotaja eta Sassone-Corsi, 2007; Nagamori eta Sassone-Corsi, 2008; Meikar eta lank., 2011) bai eta itzulpenaren aktibazioarekin ere (Nagamori eta lank., 2011). Hau dela eta, pentsa liteke *KOR* genea, *MOR* eta *DOR* geneen kasuan bezala, nagusiki espermatogenesiko estadio berantiarretan adierazten dela, jada makineria itzultzailea adierazita dagoenean.

*KOR* proteina, ere, estadio guztietan deskribatu zen. Tubulu seminiferoetako zein testikulueta *KOR*-ren immunoerreaktibotasunak 48 kDa inguruko banda erakutsi zuen (23. irudia). Garunean, ere, 48 kDa-eko masa molekularra duen banda bakarra ikus zitekeen. *KOR*-ren 43 kDa-eko masa molekular teorikoarekin bat etorri arren, lan guztietan 55-65 kDa arteko bandak topatu izan dira. Hau, itzulpen ondoko aldaketen ondorioz gertatzen dela proposatu izan da (Arvidsson eta lank., 1995). Fluxuzko zitometriaren laguntzaz, ere, *KOR* proteinaren presentzia baieztatu zen testikulueta zelula guztietan (24. irudia). *MOR* eta *DOR*-ren proteinekin bezala, *KOR*-ren banden intentsitatea dentsitometriaz kuantifikatu zen (23. irudia). Bertan *KOR* proteinak, geneak ez bezala, espermatogenesiko estadio guztietan antzeko adierazpena zuela ikusi zen. Kasu honetan ere esan liteke gene eta proteinen adierazpenen artean ezberdintasunak daudela transkripzio eta itzulpen prozesuen erregulazioa aldiberekoa ez dela adieraziz (Sassone-Corsi eta lank., 2002; Paronetto eta lank., 2009).

*KOR* gene eta proteinaren adierazpena deskribatu ondoren, immunofluoreszentzia bikoitzaren bitartez, proteina honen kokapena espermatogenesiko hozi-zeluletan adierazten dela frogatu zen (25. irudia). Saguetan, *KOR* proteina espermatogonia, espermatozito, espermatozoida eta espermatozoidetan topatu zen. Emaiza hauek lehenagotik opioide-hartzaileak arratoien testikulueta (Fabbri eta lank., 1985) eta giza espermatozoidetan topatu izanarekin (Agirregoitia eta lank., 2006) bat datoz. Bestalde, gizonezkoen tubulu

seminiferoen zehar-ebakietan ere KOR proteinaren presentzia baieztatu zen (27. irudia). MOR eta DOR-rekin gertatzen zen bezala, gizonezkoen zehar-ebakietan, KOR proteina hozi-zeluletan ez ezik tubulu barruko eta kanpoko bestelako zeluletan ere topatu zen. Kontuan hartuta tubulu seminifero barruan, hozi-zelulez gain, Sertoli zelulak ere topatzen direla pentsa liteke tubulu barruko tindaketa immunohistokimikoak zelula somatiko hauek ere tindatu zituela. Azken honek, bat egiten du lehenago KOR arratoien testikuluetakoa Sertoli zeluletan topatu izanarekin (Fabbri eta lank., 1985; Zhou eta lank., 1990). Tubulu kanpoko zelulen markaketaren inguruan, beharrezkoa izango da etorkizunean honi dagozkion ikerketa gehiago egitea.

### **3.2 KOR-k espermatogenesiaren funtzionaltasunean eragiten du**

Lehen helburuan lortutako emaitzekin KOR sagu zein giza hozi-zeluletan dagoela frogatu zen. Honen ostean, beraz, opioide-hartzaile honen aktibazioak espermatogenesisian duen eragina aztertu nahi izan zen. KOR-ren kasuan, behatu da dinorfinak direla lotzen zaizkion peptido opioideak (Stein eta lank., 1999). Peptido hauen adierazpena, nagusiki, Sertoli zeluletan deskribatu da eta, dirudienez, euren jarduera biologikoa Sertoli zeluletan askatzen dute modu autokrinoan (Douglass eta lank., 1987). Dinorfinek Sertoli zelulen jardueran eragiten dutela jakin arren, hauek espermatogenesisian betetzen duten funtzioa ez da ezagutzen. Izan ere, KOR-k hozi-zeluletan duen adierazpen-maila, oraindik, ez da ezagutzen. Beraz, opioide-hartzaile hau testikuluetakoa hozi-zeluletan deskribatu ostean bere aktibazioak espermatogenesisian nolabaiteko eragina izango zuela pentsatu genuen. MOR eta DOR-ren antzera KOR zelulen desberdintze prozesuetan, zehazki zelula neuronal eta endotelialean, parte hartzen duela deskribatu da (Park eta lank., 2008; Hahn eta lank., 2010; Yamamizu eta lank., 2011).

Beste opioide-hartzaileetan erabilitako metodologia berari jarraituz, KOR-k ziklo zelularrean duen parte hartzea neurtzeko, zelula testikularrak U50488 agonista opioidearekin inkubatu ziren denbora ezberdinetan (30. irudia). Kasu honetan, U50488-rekin inkubaketa-denbora luzez mantendutako populazio haploideak behera egiten zuen, aldiz, tratamendu laburrean, ez zen aldaketa nabarmenik neurtu. Populazio diploide eta tetraploideei dagokienez, hauek gora egiten zuten. U50488-ren inkubaketa-denbora laburrean, aldiz, ez zen aldaketa adierazgarririk neurtu. Hau dela eta, pentsa liteke tratamendu luzean KOR-k gaitasuna duela espermatogenesisia modulatzeko. Azken behaketa honek bat egiten du bibliografian topatutakoarekin. Izan ere, zelula neuronalen desberdintze prozesuan KOR-k efektu aktibatzailea duela ondorioztatu izan da (Park eta lank., 2008).

Tratamendu luzean zehar 2c eta 4c populazioen gorakada neurtu arren, ezin esan liteke aldaketak soilik zelula espermatogenikoek jasaten zituztenik; alabaina, hozi-zelulekin batera zatiketa mitotikoak pairatzen dituzten zelula somatikoak ere inkubatzen ziren. Honekin bat etorrira, naloxona antagonista opioidearekin tratatutako Sertoli zelulen populazioak aldaketak jasotzen dituela ikusi da (da Silva Jr eta lank., 2006). Beraz, pentsa liteke populazio diploide eta tetraploideetan neurtutako aldaketak hozi-zelulez gain, Sertoli zelulek ere paira ditzaketela.

Tratamendu luzearen ostean KOR-ren aktibazioak ziklo zelularrean efektu modulatzaila zuela behatu zen. Populazio diploide eta tetraploideetan hozi-zelulez gain mitotikoki zatitzen diren zelula somatikoak zeudenez, ezinezkoa zen zehazki KOR-ek populazio horietan zuen eragina zehaztea. Hori dela eta, hozi-zelulen markatzaile espezifikoek geneen adierazpenak neurtzea erabaki zen (34. irudia). Espermatogonien markatzaile espezifiko gisa *ITG6*, espermatozitoena *SYCP1* eta *SYCP3* eta, azkenik, espermatidena *ACR* erabili ziren. Esan



bezala, gene hauen adierazpenak zelula testikularrak U50488 agonista opioidearekin inkubaketa-denbora labur eta luzez mantendu ostean neurtu ziren.

KOR-ren aktibazioak espermatogenesiko fase mitotikoan edo espermiogenesisian duen efektua aztertzeko *ITG6* markatzaile espezifikoaren gene adierazpena neurtu zen (Shinohara eta lank., 1999; Phillips eta lank., 2010). Kasu honetan, DOR-rekin bezala, ez inkubaketa-denbora labur ez eta luzean ere, ez zen aldaketarik behatu (34. irudia). Bi tratamenduetan aldaketarik neurtu ez izanak adierazten du KOR-ren aktibazioak ez duela espermatogenesiko fase mitotikoan inolako efekturik. Opioide-hartzaileen aktibazioak Sertoli zelulen populazioan aldaketak eragiteko gaitasuna dutela ikusi da (da Silva Jr eta lank., 2006). Hau dela eta, ziklo zelularreko tratamendu luzean populazio diploide eta tetraploideetan neurtutako aldaketak zatiketa mitotikoak pairatzen dituzten Sertoli zelulei dagokiela pentsa liteke.

Espermatogenesiko meiosi fasean KOR-ren aktibazioak eraginik ote zuen ezagutzeko *SYCP1* eta *SYCP3* geneen adierazpenak neurtu ziren (Fraune eta lank., 2012 eta Qiao eta lank., 2012). U50488 agonistarekin mantendutako inkubaketa-denbora laburrean bi geneen adierazpenek behera egiten zuten (34. irudia). Tratamendu luzeari dagokionez, KOR-ren agonista opioidearen bidez *SYCP1* genearen adierazpenak behera egiten zuela behatu zen. Kasu honetan, beraz, bai esan liteke KOR-k meiosia modulatzeko gaitasuna duela *SYCP1* eta *SYCP3*-ren adierazpenak murriztuz. DOR-rekin azaldu bezala, KOR-k *SYCP1* eta *SYCP3*-ren adierazpenak erregulatuz gurutzamendu meiotikoan parte hartzen duela dioten hainbat lanekin bat dator (de Vries eta lank., 2005; Kouznetsova eta lank., 2011). Konplexu sinaptonemalean sortutako arazoak direla eta, kromosoma homologoen arteko gurutzamenduak eta honetarako beharrezkoak diren harizpi bikoitzeko apurketen konponketak ez dira behar bezala gertatzen (de Vries eta lank., 2005; Kouznetsova eta lank.,

2011). Honek guztiak, gurutzamendu meiotikoak sortzeko gaitasunaz gain, ugalkortasuna ere, baldintzatuko luke. Beraz, bi tratamenduak kontuan hartuz, pentsa liteke KOR-ren aktibazioak fase meiotikoan dauden espermatozitoengan eragiten duela *SYCP1* eta *SYCP3*-ren erregulazioa modulatz.

Espermiogenesisian KOR-k duen eragina aztertzeko *ACR* markatzaile espezifikoaren gene adierazpena neurtu zen (Ohta eta lank., 2009). U50488-ren inkubaketa-denbora luzearen ostean, *ACR*-ren genearen adierazpenak behera egiten zuen (34. irudia). Hau, bat dator ziklo zelularreko populazio haploidearen beherakadarekin (30. irudia). Pentsa liteke, beraz, KOR-ren aktibazioak zelula haploideen desberdintze prozesuan efektu inhibitzailea duela. Honek, bat egingo luke bibliografian behatutakoarekin. Izan ere, zelula endotelial zein neuronalen desberdintzean KOR-k efektu inhibitzailea zuela ikusi zen zelula hauetako desberdintze prozesuan opioide-hartzaile honen parte hartzea frogatuz (Yamamizu eta lank., 2011, Hahn eta lank., 2010).

KOR-ren aktibazioaren ondorioz, nagusiki, fase meiotikoan behatu ziren aldaketa adierazgarrienak. Hau dela eta, espermatogenesiko meiosis erregulatzen duten *B3*, *A1* eta *E2* ziklina geneen adierazpena neurtzea erabaki zen (Sweeney eta lank., 1996; Nguyen eta lank., 2002; Martinerie eta lank., 2014). KOR-ren funtzionaltasuna meiosian aztertzeko hozi-zelulak U50488 agonista opioidearekin mantendu ziren inkubaketa-denbora labur zein luzez (37. irudia). Tratamendu laburrean ziklinen gene adierazpenetan ez zen aldaketarik neurtu. Honek, tratamendu laburrean, KOR-ren aktibazioak ziklinen erregulazioan eraginik ez duela pentsatzera garamatza. Bestalde, espermatozitoen markatzaile espezifikoaren gene adierazpenetan aldaketak neurtu izanak KOR-k, tratamendu laburrean, meiosis erregulatzeko ziklinen bidezkoa ez den bestelako mekanismoren bat aktibatzen duela adieraz lezake. Etorkizunean beharrezkoa izango da, seinaleztapen sareak eraikiz, opioide-

hartzaileek zeluletan erabiltzen dituzten bestelako mekanismo erregulatzaileen inguruko ikerketa sakonagoak egitea.

Tratamendu luzearen ondoren, *A1* eta *E2* ziklina geneen adierazpenen beherakada neurtu zen (37. irudia). Denbora luzean, beraz, badirudi KOR-ek meiosis erregulatzeko gaitasuna duela ziklinen adierazpena erregulatuz. Bestalde, lehen azaldu bezala, *A1* ziklinak jasandako erregulazio aldaketak ez du inolako kalterik eragiten konplexu sinaptonemalean (Liu eta lank., 1998<sub>a,b</sub>; Nickerson eta lank., 2007). Honek, *A1* ziklina eta konplexu sinaptonemaleko proteinek meiosis mekanismo ezberdinen bidez erregulatzeko duten gaitasunaren ustea indartzen du. Bestalde, Nickerson eta lankideek (2007) ikusi zuten *A1* ziklina gabeko (*Ccna1*<sup>-/-</sup>) sagu transgenikoek meiosis fase diplotenoan gelditu eta apoptosia pairatzen zutela. Hau dela eta, gure emaitzetan populazio haploidean (30. irudia) eta *ACR*-ren adierazpenean (34. irudia) beherakada ikusten genuen. *E2* ziklinaren kasuan, berriz, honen eta konplexu sinaptonemalaren arteko elkarrekintza bai plazaratu da (Martinerie eta lank., 2014). Hain zuzen ere, *E2* ziklinaren adierazpenak, bat egiten du konplexu sinaptonemaleko proteinen geneen adierazpenarekin (34. irudia). Hau dela eta, KOR-ren aktibazioak *E2* ziklinaren bitartez, konplexu sinaptonemaleko proteinen gene adierazpena erregulatzeko gaitasuna duela dirudi. Aldaketa hauek, ere, bat datoz haploideak diren espermatiden populazioen (30. irudia) zein *ACR*-ren adierazpen (34. irudia) beherakadarekin. Beraz, tratamendu luzean KOR-ren aktibazioak meiosis inhibitu eta, ondorioz, populazio haploidea baldintzatzeko gaitasuna duela esan liteke.

Emaitza hauek guztiak kontuan hartuta, esan daiteke KOR espermatogenesisian aktibo dagoela eta efektu modulatzailea, gehienbat, meiosian duela. Hala ere, ziklina zein konplexu sinaptonemaleko gene adierazpenetan oinarrituz, KOR-k espermatogenesisia erregulatzeko mekanismo ezberdinak erabiltzen dituela dirudi. Bestalde, ezin esan liteke U50488 agonista

opioideak espermatogenesisia guztiz blokeatzeko gaitasuna duenik. Izan ere, KOR gabeko (*knockout*) saguek ez dute antzutasun osoa pairatzen (Kieffer eta lank., 1999).

## **IKUSPEGI APLIKATUA**

80. hamarkadatik duela gutxira arte opioideek ugaltze-prozesuan duten eginkizunaren inguruko ikerketak alboratuak izan dira. Hau dela eta, sistema opioideak ugalkortasunean jokatzeko duen papera bere osotasunean ulertzea, oraindik ere, oso zaila gertatzen da. Ikerketa-lan honek, lehen aldiz, MOR, DOR eta KOR-ren presentzia erakutsi du sagu zein gizonezkoen hozi-zeluletan. Honetaz gain, hiru opioide-hartzaile hauen aktibazioak ziklo espermatogenikoan efektu modulatzailea duela, ere, ikusi da. Emaitza hauek opioide-hartzaileek espermatogenesisian duten jarduera erakusteaz gain, sistema opioideak ugalkortasunean duen ekarpena ulertzen lagun dezake. Tesi hau, beraz, ugalkortasun eza dagoeneko kasuen ulermena areagotzeko urrats bat gehiago litzateke. Jarraian, ikerketa honetan lortutako emaitzak abiapuntutzat hartuz, hemendik aurrera jorratu litezkeen lan-lerroak aztertzen dira.

Etorkizunean, opioide-hartzaileek ugalkortasunean eta, batez ere, espermatogenesisian duten garrantzia aztertzen jarraitzea interesgarria litzateke. Alde batetik, opioide-hartzaileek euren funtzioa gauzatzeko zeluletan erabiltzen dituzten barne-bideak argitzen ahaleginduko ginateke seinaleztapen sare bat eraikiz. Honela, morfina, heroina edota metadona bezalako droga opioideek, besteak beste, giza ugalkortasunean sor ditzaketen efektuak ezagutu ahal izango dira. Esate baterako, opiaceoak aisialdi-droga moduan kontsumitzen dutenen ugalkortasun-egoera neur liteke. Era berean, opiaceoen erabilera klinikoak ugalkortasunean ekar ditzakeen aldaketak, ere, iker litezke. Bestalde, eskuratutako emaitza horiek guztiak ikerketa klinikoetara egokitzen saiatuko ginateke. Honela, sistema opioideak laguntza bidezko ugalketan duen garrantzia aztertuko litzateke teknika hauek hobetzeko asmoz.

Adibidez, zelula espermatikoen opioide-hartzaile mota bakoitzaren kopurua neur liteke eta ugalkortasun ezarekin nolabaiteko korrelazioak eraiki litezke. Hau dela eta, ugalkortasun eza dagoeneko kasuetan zelula espermatiko akasdunak detektatu ahal izango dira teknikaren arrakasta handitzea ahalbidetuz.

# ONDORIOAK





1.  $\mu$ ,  $\sigma$  eta  $\kappa$  opioide-hartzaileak sagu zein gizonezkoen hozi-zeluletan daude.

- Opioide-hartzaileen (MOR, DOR eta KOR) geneak saguen espermatogenesisian zehar adierazten dira eta hauen adierazpena estadioen arabera aldatzen da.
- Opioide-hartzaileen (MOR, DOR eta KOR) proteinak, ere, saguen espermatogenesisian adierazten dira eta hauen adierazpena estadio guztietan berdin mantentzen da.
- Hiru opioide-hartzaileak saguen espermatida, espermatogonia, espermatozito eta espermatozoideen alde periferikoan kokatzen dira. Giza testikuluetakoko zelula espermatogenikoetan ere baieztatu da MOR, DOR eta KOR-ren presentzia.

2.  $\mu$ ,  $\sigma$  eta  $\kappa$  opioide-hartzaileek saguen ziklo espermatogenikoan efektu modulatzailea dute.

- Opioide-hartzaileen (MOR, DOR eta KOR) aktibazioak zelula haploideen desberdintze prozesuan inkubaketa-denboraren menpeko efektu modulatzailea dute.
- Hiru opioide-hartzaileek espermatogenesiko fase meiotikoa modulatzeko gaitasuna dute konplexu sinaptonemalean erregulazio aldaketak sorraraziz.
- MOR-ren aktibazioak, gainontzeko opioide-hartzaileek ez bezala, saguen espermatogenesiko fase mitotikoan efektu modulatzailea du espermatogonien ugaritze fasean erregulazio aldaketak eraginez.
- MOR, DOR eta KOR-ren aktibazioak inkubaketa-denboraren menpeko ziklinen erregulazioan aldaketak eragiteko eta zelulen meiosiranzko sarrera kontrolatzeko gaitasuna dute.





# **BIBLIOGRAFIA**





- Agirregoitia, E., Valdivia, A., Carracedo, A., Casis, L., Gil, J., Subirán, N., et al. (2006). Expression and localization of delta-, kappa-, and mu-opioid receptors in human spermatozoa and implications for sperm motility. *J Clin Endocr Metab*, 91, 4969-4975.
- Akil, H., Mayer, D., & Liebeskind, J. (1976). Antagonism of stimulation-produced analgesia by naloxone, a narcotic antagonist. *Science*, 191(4230), 961-962.
- Albrizio, M., Guaricci, A. C., Maritato, F., Sciorsci, R. L., Mari, G., Calamita, G., et al. (2005). Expression and subcellular localization of the mu-opioid receptor in equine spermatozoa: Evidence for its functional role. *Reproduction*, 129, 39-49.
- Albrizio, M., Lacalandra, G. M., Micera, E., Guaricci, A. C., Nicassio, M., & Zarrilli, A. (2010). Delta opioid receptor on equine sperm cells: Subcellular localization and involvement in sperm motility analyzed by computer assisted sperm analyzer (CASA). *Reproductive Biology and Endocrinology : RB&E*, 8, 78-7827-8-78.
- Al-Hasani, R. & Bruchas, M. R. (2011). Molecular mechanisms of opioid receptor-dependent signaling and behavior. *Anesthesiology*. 115(6): 1363-1381.
- Aloisi AM, Ceccarelli I, Fiorenzi P, Maddalena M, Rossi A, Tomei V, et al. (2010). Aromatase and 5-alpha reductase gene expression: modulation by pain and morphine treatment in male rats. *Mol Pain*. 6:69.
- Amann, R. P. (2008). The cycle of the seminiferous epithelium in humans: A need to revisit? *Journal of Andrology*, 29(5), 469-487.
- Arvidsson U., Riedl M., Chakrabarti S., Vulchanova L., Lee J. H., Nakano A. H., Lin X. Q., Loh H. H., Law P. Y., Wessendorf M. W., Elde R. (1995). The Kappa-Opioid Receptor Is Primarily Postsynaptic - Combined Immunohistochemical Localization of the Receptor and Endogenous Opioids. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92(11):5062-5066.
- Audhya, T., Hollander, C. S., Schlesinger, D. H., & Hutchinson, B. (1989). Structural characterization and localization of corticotropin-releasing factor in testis. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 995(1), 10-16.
- Badr, F. M., Rabouh, S. A. & Badr, R. S. (1979). On the mutagenicity of nethadone hydrochloride. Induced dominant lethal mutation and spermatocyte chromosomal aberrations in treated males. *Mutation Research*, 68; 235-249.
- Baier, A., Alsheimer, M., & Benavente, R. (2007). Synaptonemal complex protein SYCP3: Conserved polymerization properties among vertebrates. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1774(5), 595-602.
- Bartkova, J., Lukas, J., Strauss, M. & Bartek, J. (1998). Cyclin D3: requirement for G1/S transition and high abundance in quiescent tissues suggest a dual role in proliferation and differentiation. *Oncogene* 17, 1027-1037.

- Baudat, F., Imai, Y., & de Massy, B. (2013). Meiotic recombination in mammals: Localization and regulation. *Nature Reviews Genetics*, 14(11), 794-806.
- Benda, C. (1887). Untersuchungen über den Bau des functionierenden Samenkanälchens einigier Säugethiere und Folgerungen für die Spermatogenese dieser Wirbelthierklasse. *Arch. Mikroskop. Anat. Entwicklungsmech.* 30:49-110.
- Beumer, T. L., Roepers-Gajadien, H. L., Gademan, I. S., Kal, H. B., & de Rooij, D. G. (2000). Involvement of the D-type cyclins in germ cell proliferation and differentiation in the mouse. *Biology of Reproduction*, 63(6), 1893-1898.
- Blank, M. S. & Roberts, D. L. (1982). Antagonist of gonadotropin-releasing hormone blocks naloxoneinduced elevations in serum luteinizing hormone. *Neuroendocrinology*. Nov;35(5):309-12
- Bloom, J. & Cross, F. R. (2007). Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 149-160.
- Blow, J. J. & Dutta, A. (2005). Preventing re-replication of chromosomal DNA. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 476-486.
- Bodnar, R. J. (2014). Endogenous opiates and behavior: 2013. *Peptides*, 62(0), 67-136.
- Brandeis, M. & Hunt, T. (1996). The proteolysis of mitotic cyclins in mammalian cells persists from the end of mitosis until the onset of S phase. *EMBO J* 15: 5280-5289.
- Brandeis, M., Rosewell, I., Carrington, M., Crompton, T., Jacobs, M. A., Kirk, J., Gannon, J. & Hunt T. (1998). Cyclin B2-null mice develop normally and are fertile whereas cyclin B1-null mice die in utero. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 4344-4349.
- Brown, H. H. (1885). On spermatogenesis in the rat. *Q. J. Microsc. Sci.* 25: 343-370.
- Butour, J. L., Moisan, C., Mazarguil, H., Mollereau, C. & Meunier, J. C. (1997). Recognition and activation of the opioid receptor-like ORL 1 receptor by nociceptin, nociceptin analogs and opioids. *Eur J Pharmacol.* Feb 19;321(1):97-103.
- Cesselin, F. (1995). Opioid and anti-opioid peptides. *Fundam Clin Pharmacol.* 9(5):409-33. Review
- Chan, J. S. C., Chiu, T. T., & Wong, Y. H. (1995). Activation of type II adenylyl cyclase by the cloned  $\mu$ -opioid receptor: Coupling to multiple G proteins. *Journal of Neurochemistry*, 65(6), 2682-2689.
- Chapman, D. L., & Wolgemuth, D. J. (1992). Identification of a mouse B-type cyclin which exhibits developmentally regulated expression in the germ line. *Molecular Reproduction and Development*, 33(3), 259-269.

- Chen, C. C., Chang, C., Krieger, D. T., & Bardin, C. W. (1986). Expression and regulation of proopiomelanocortin-like gene in the ovary and placenta: Comparison with the testis. *Endocrinology*, *118*(6), 2382-2389.
- Chen Y., Mestek A., Liu J. & Yu L. (1993). Molecular cloning of a rat kappa opioid receptor reveals sequence similarities to the mu and delta opioid receptors. *Biochem J.* Nov 1;295 (Pt 3):625-8.
- Chen, S. & Liu, Y. (2015). Regulation of spermatogonial stem cell self-renewal and spermatocyte meiosis by sertoli cell signaling. *Reproduction*, *149*(4), R159-R167.
- Christoffers, K. H., Li, H., & Howells, R. D. (2005). Purification and mass spectrometric analysis of the delta opioid receptor. *Mol Brain Res*, *136*, 54-64.
- Cicero, T. J., Schainker, B. A., & Meyer, E. R. (1979). Endogenous opioids participate in the regulation of the hypothalamic-pituitary-luteinizing hormone axis and testosterone's negative feedback control of luteinizing hormone. *Endocrinology*, *104*(5), 1286-1291.
- Cicero, T., Nock, B. & Meyer, E. R. (2002). Gender-linked differences in the expression of physical dependence in the rat. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* *72*; 691-697.
- Claude P. A., Wotta D. R., Zhang X. H., Prather P. L., McGinn T. M., Erickson L. J., Loh H. H. & Law P. Y. (1996). Mutation of a conserved serine in TM4 of opioid receptors confers full agonistic properties to classical antagonists. *Proc Natl Acad Sci USA* *93*(12):5715-5719.
- Collard, M. W., Day, R., Akil, H., Uhler, M. D., & Douglass, J. O. (1990). Sertoli cells are the primary site of prodynorphin gene expression in rat testis: Regulation of mRNA and secreted peptide levels by cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate analogs in cultured cells. *Molecular Endocrinology*, *4*(10), 1488-1496.
- Comb, M., Seeburg, P. H., Adelman, J., Eiden, L. & Herbert, E. (1982). Primary structure of the human Metand Leu-enkephalin precursor and its mRNA. *Nature*. Feb 25;295(5851):663-6.
- Cosentino M. J., Cockett A. T. (1986): Structure and function of the epididymis. *Urol Res*, *14*(5):229-240.
- Coviello A. D., Matsumoto A. M., Bremner W. J., Herbst K. L., Amory J. K., Anawalt B. D., Sutton P. R., Wright W. W., Brown T. R., Yan X., Zirkin B. R., Jarow J. P. (2005). Low-dose human chorionic gonadotropin maintains intratesticular testosterone in normal men with testosterone-induced gonadotropin suppression. *J Clin Endocrinol Metab* *90*:2595-2602
- Curtis, G. M. (1918). The morphology of the mammalian seminiferous tubule. *Am. J. Anat.* *24*:339-394.
- da Silva Jr, V. A., Vieira, A. C. S., Pinto, C., de Paula, T. A. R., Palma, M., Amorim, M.J.A.A.L., Amorim Jr, A. A., Manhaes-de-Castro, R. (2006). Neonatal treatment with

- naloxone increases the population of Sertoli cells and sperm production in adult rats. *Reprod. Nutr. Dev.* 46; 157-166.
- Debuse, M. (1998). Lo esencial en sistema endocrino y aparato reproductor. S.A. Elsevier España.
- de Gandarias JM, Irazusta J, Gil J, Fernández D, Casis L. (1993). Brain soluble and membrane-bound Tyr-aminopeptidase activities during the stages of estrous and proestrous in the female rat. *Brain Res. Aug 20;620(1):146-8.*
- de Gandarias JM, Irazusta J, Fernández D, Gallego M, Silió M, Casis L. (1996). Membrane-bound tyrosine aminopeptidase activities in the rat brain throughout the estrous cycle. *Life Sci.* 59(13):1097-101.
- de Vries, F. A., de Boer, E., van den Bosch, M., Baarends, W. M., Ooms, M., Yuan, L., et al. (2005). Mouse Sycp1 functions in synaptonemal complex assembly, meiotic recombination, and XY body formation. *Genes & Development*, 19(11), 1376-1389.
- Delitala, G., Grossman, A. & Besser, G. M. (1981). Changes in pituitary hormone levels induced by metenkephalin in man--the role of dopamine. *Life Sci.* Oct 12;29(15):1537-44
- di Carlo, A., Travia, G. & De Felici, M. (2000). The meiotic specific synaptonemal complex protein SCP3 is expressed by female and male primordial germ cells of the mouse embryo. *Int. J. Dev. Biol.* 44: 241-244.
- Dierich, A., Sairam, M. R., Monaco, L., Fimia, G. M., Gansmuller, A., LeMeur, M. & Sassone-Corsi, P. (1998). Impairing follicle-stimulating hormone (FSH) signaling in vivo: targeted disruption of the FSH receptor leads to aberrant gametogenesis and hormonal imbalance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Nov 10;95(23):13612-7
- Douglass, J., Cox, B., Quinn, B., Civelli, O., & Herbert, E. (1987). Expression of the prodynorphin gene in male and female mammalian reproductive tissues. *Endocrinology*, 120(2), 707-713.
- Dudeck W. R. & Fix J. D. (2004): High-Yield (Embryology) 3. argitalpena. *Lippincott Williams & Wilkins argitaletxea*, Philadelphia.
- Duesberg, J. (1908). La spermatognésèse chez le rat. *Arch. J. Zellforsch.* 2:137-180.
- Eblen, A., Bao, S., Lei, Z. M., Nakajima, S. T., & Rao, C. V. (2001). The presence of functional luteinizing Hormone/Chorionic gonadotropin receptors in human sperm. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 86(6), 2643-2648.
- Ebner, V. von (1871). Untersuchungen über den Bau der Samenkanälchen und die Entwicklung der Spermatozoiden bei den Säugethieren und beim Menschen. *Leipzig.*
- Ebner, V. von (1888). Zur Spermatogenese bei den Säugethieren. *Arch. Mikroskop. Anat. Entwicklungsmech.* 31:236-292.

- Elde, R., Arvidsson, U., Riedl, M., Vulchanova, L., Lee, J., Dado, R., Nakano, A., Chakrabarti, S., Zhang, X., Loh, H. H., Law, P. Y., Hökfelt, T. & Wessendorf, M. (1995). Distribution of neuropeptide receptors. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 757(1), 390-404.
- El-Haggag, S., El-Ashmawy, S., Attia, A., Mostafa, T., Farid Roaiah, F. F., Fayez, A., Ghazi, S., Zohdy, W. & Roshdy, N. (2006). Beta-endorphin in serum and seminal plasma in infertile men. *Asian Journal of Andrology*. Nov 709-712.
- Eskeland, N. L., Lugo, D. I., Pintar, J. E., & Schachter, B. S. (1989). Stimulation of  $\beta$ -endorphin secretion by corticotropin-releasing factor in primary rat leydig cell cultures. *Endocrinology*, 124(6), 2914-2919.
- Eto, K., Shiotsuki, M., Sakai, T., & Abe, S. (2012). Nociceptin is upregulated by FSH signaling in sertoli cells in murine testes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 421(4), 678-683.
- Eto, K., Shiotsuki, M., & Abe, S. (2013). Nociceptin induces Rec8 phosphorylation and meiosis in postnatal murine testes. *Endocrinology*, 154(8), 2891-2899.
- Fabbri, A., Tsai-Morris, C., Luna, S., Fraioli, F., & Dufau, M. L. (1985). Opiate receptors are present in the rat testis. identification and localization in sertoli cells. *Endocrinology*, 117(6), 2544-2546. doi:10.1210/endo-117-6-2544
- Fabbri, A., Jannini, E. A., Gnessi, L., Ulisse, S., Moretti, C., & Isidori, A. (1986). Neuroendocrine control of male reproductive function. the opioid system as a model of control at multiple sites. *J Steroid Biochem*, 32, 145-50.
- Fabbri, A., Knox, G., Buczko, E., & Dufau, M. L. (1988).  $\beta$ -Endorphin production by the fetal leydig cell: Regulation and implications for paracrine control of sertoli cell function. *Endocrinology*, 122(2), 749-755.
- Fabbri, A., Jannini, E. A., Gnessi, L., Ulisse, S., Moretti, C. & Isidori, A. (1989). Neuroendocrine control of male reproductive function. The opioid system as a model of control at multiple sites. *J Steroid Biochem*. Jan;32(1B):145-50
- Feng, Y., He, X., Yang, Y., Chao, D., Lazarus, L. H., & Xia, Y. (2012). Current research on opioid receptor function. *Current Drug Targets*, 13(2), 230-246.
- Fernandez D., Valdivia A., Irazusta J., Ochoa C., Casis L. (2002). Peptidase activities in human semen. *Peptides* 23: 461-8.
- Florez J. (1998). Farmacología humana, 3. argitalpena, *Masson argitaletxea*. Barcelona.
- Foresta, C., Tramarin, A., Scandellari, C. & Arslan, P. (1985). Effects of a met-enkephalin analogue on motility, O<sub>2</sub> consumption, and ATP content of human spermatozoa. *Arch Androl*. 14(2-3):247-52.



- Foresta, C., Caretto, A., Indino, M., Betterle, C., & Scandellari, C. (1986). Localization of met-enkephalin on human spermatozoa and evidence for its physiological role. *Arch Androl*, 17, 19-24.
- Fraioli, F., Panerai, A. E., Santoro, C., Fabbri, A., Santoro, F. & Isidori, A. (1982). Control of gonadotropin secretion in man: role of opioid peptides. *Horm Metab Res*. Jun;14(6):312-6
- Fraioli, F., Fabbri, A., Gnessi, L., Silvestroni, L., Moretti, C., Redi, F. & Isidori, A. (1984). Beta-endorphin, Met-enkephalin, and calcitonin in human semen: evidence for a possible role in human sperm motility. *Ann N Y Acad Sci* 438:365-70.
- Fraioli, F., Moretti, C., Bonifacio, V., Isidori, A. & Dufau, M. (1985). Naloxone increases bioactive LH in man: evidence for selective release of early LH pool. *J Endocrinol Invest*. Dec;8(6):513-7
- Fraune, J., Schramm, S., Alsheimer, M., & Benavente, R. (2012). The mammalian synaptonemal complex: Protein components, assembly and role in meiotic recombination. *Experimental Cell Research*, 318(12), 1340-1346.
- Freeman, R. S., Estus, S. & Johnson Jr, E. M. (1994). Analysis of cell cycle-related gene expression in postmitotic neurons: selective induction of Cyclin D1 during programmed cell death. *Neuron* 12, 343-355.
- Fujisawa M., Kanzaki M., Okada H., Arakawa S., Kamidono S. (1996). Metenkephalin in seminal plasma of infertile men. *Int J Urol*, 3(4):297-300.
- Fukuda, K., Shoda, T., Morikawa, H., Kato, S., & Mori, K. (1997). Activation of mitogen-activated protein kinase by the nociceptin receptor expressed in chinese hamster ovary cells. *FEBS Letters*, 412(2), 290-294.
- Fürst, C. (1887). Über die Entwicklung der Samenkörperchen bei den Beutelthieren. *Arch. Mikr. Anat. Entwicklungsmech.* 30:336.
- Garrett, J. E., & Douglass, J. O. (1989). Human chorionic gonadotropin regulates expression of the proenkephalin gene in adult rat leydig cells. *Molecular Endocrinology*, 3(12), 2093-2100.
- Garzon, J., Juarros, J. L., Castro, M. A. & Sanchez-Blazquez, P. (1995). Antibodies to the cloned mu-opioid receptor detect various molecular weight forms in areas of mouse brain. *Molecular Pharmacology* vol. 47 no. 4 738-744.
- Gaveriaux-Ruff C. & Kieffer BL. (1999). Opioid receptors: gene structure and function. Opioids in pain Control: Basic and Clinical Aspects. *Cambridge University Press*. pp.1-20
- Geng Y., Yu Q., Sicinska E., Das M., Schneider J. E., Bhattacharya S., Rideout W. M., Bronson R. T., Gardner H. & Sicinski P. (2003). Cyclin E ablation in the mouse. *Cell*. 22; 114(4): 431-43.

- Georganta, E., Tsoutsis, L., Gaitanou, M. & Georgoussi, Z. (2013).  $\sigma$ -opioid receptor activation leads to neurite outgrowth and neuronal differentiation via a STAT5B-Gai/o pathway. *Journal of Neurochemistry*, 127: 329-341.
- Gerendai I, Shaha C, Thau R, Bardin CW. (1984) Do testicular opiates regulate Leydig cell function? *Endocrinology*. 115:1645-7.
- Gerendai, I., Shaha, C., Gunsalus, G. L., & Bardin, C. W. (1986). The effects of opioid receptor antagonists suggest that testicular opiates regulate sertoli and leydig cell function in the neonatal rat. *Endocrinology*, 118(5), 2039-2044.
- Gerendai I. (1991) Modulation of testicular functions by testicular opioid peptides [review]. *J. Physiol. Pharmacol.* 42:427-37.
- Gilbert S. F. (2000). *Developmental biology*, 6. argitalpena. *Sunderland (MA): Sinauer Associates*.
- Gintzler, A. R., Adapa, I. D., Toll, L., Medina, V. M. & Wang, L. (1997). Modulation of enkephalin release by nociceptin (orphanin FQ). *Eur J Pharmacol.* Apr 23;325(1):29-34.
- Goldberg, I. E., Rossi, G. C., Letchworth, S. R., Mathis, J. P., Ryan-Moro, J., Leventhal, L., Su, W., Emmel, D., Bolan, E. A. & Pasternak, G. W. (1998). Pharmacological characterization of endomorphin-1 and endomorphin-2 in mouse brain. *J Pharmacol Exp Ther* 286(2):1007-1013.
- Goldstein A., Lowney L.I. & Pal B.K. (1971): Stereospecific and nonspecific interactions of the morphine congener levorphanol in subcellular fractions of mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Aug;68(8):1742-7.
- Goldstein A., Tachibana S., Lowney L.I., Hunkapiller M. & Hood L. (1979): Dynorphin-(1-13), an extraordinarily potent opioid peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Dec;76(12):6666-70.
- Ghowsi, M., Yousofvand, N. & Pourmotabbed, A. (2013). Effects of morphine dependency and its abstinence on serum concentrations of sex hormones and reproductive system in male rats. *Journal of Kermanshah University of Medical Sciences*. 17(1): 8-15
- Gupta, G. S. (2005): *Proteomics of Spermatogenesis*. Springer argitalpetxea, New York.
- Guyton A.C., Hall J. E. (2011): *Tratado de fisiología médica*, 12. argitalpena. *McGraw-Hill interamericana argitalpetxea*, Madril.
- Hahn, J. W., Jagway, S., Kim, E., Rendell, V. R., He, J., Ezerskiy, L. A., Wesselschmidt, R., Coscia, C. J. & Belcheva, M. M. (2010). Mu and kappa opioids modulate mouse embryonic stem cell derived neural progenitor differentiation via MAP kinases. *J Neurochem*. March; 112 (6): 1431-1441.

- Hansson, V., Reusch, E., Trygstad, O., Torgersen, O., Ritzen, E. M. & French, F. S. (1973). FSH stimulation of testicular androgen binding protein. *Nat New Biol.* Nov 14;246(150):56-8.
- Heckert, L. L. & Griswold, M. D. (2002). The expression of the follicle-stimulating hormone receptor in spermatogenesis. *Recent Prog Horm Res.* 57:129-48. Review
- Hescheler, J., Rosenthal, W., Trautwein, W. & Schultz, G. (1987). The GTP-binding protein, Go, regulates neuronal calcium channels. *Nature.* Jan 29-Feb 4;325(6103):445-7.
- Hess R. A. & Renato de Franca L. (2008): Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. *Adv Exp Med Biol.* 636:1-15.
- Hosoya, N., Okajima, M., Kinomura, A., Fujii, Y., Hiyama, T., Sun, J., et al. (2011). Synaptonemal complex protein SYCP3 impairs mitotic recombination by interfering with BRCA2. *EMBO Reports*, 13(1), 44-51.
- Huang, P. & Liu-Chen, L. (2009). Detecting the mu opioid receptor in brain following SDS-PAGE with multiple approaches. *Front Biosci (Elite Ed).* ; 1: 220-227.
- Huang, H. F. S., Pogach, L. M., Nathan, E., Giglio, W., & Seebode, J. J. (1991). Synergistic effects of follicle-stimulating hormone and testosterone on the maintenance of spermiogenesis in hypophysectomized rats: Relationship with the androgen-binding protein status. *Endocrinology*, 128(6), 3152-3161.
- Hughes J., Smith T.W., Kosterlitz H.W., Fothergill L.A., Morgan B.A. & Morris H.R. (1975): Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature.* Dec 18;258(5536):577-80
- Hughes, J. (1983). Biogenesis, release and inactivation of enkephalins and dynorphins. *Br Med Bull.* Jan;39(1):17-24. Review
- Irazusta, J., Valdivia, A., Fernández, D., Agirregoitia, E., Ochoa, C. & Casis, L. (2004). Enkephalin-degrading enzymes in normal and subfertile human semen. *J. Androl.* 25(5): 733-9.
- Jacobs, H. W., Knoblich, J. A. & Lehner, C. F. (1998). Drosophila cyclin B3 is required for female fertility and is dispensable for mitosis like cyclin B. *Genes Dev* 12, 3741-3751.
- Jequier A. M., Crich J. (1986): Semen analysis: a practical guide. *Blackwell Scientific publications*, Oxford.
- Johnson, L., Mckenzie, K. S., & Snell, J. R. (1996). Partial wave in human seminiferous tubules appears to be a random occurrence. *Tissue and Cell*, 28(2), 127-136.
- Jordan B. A., & Devi L. A. (1998). Molecular mechanisms of opioid receptor signal transduction. *Br J Anaesth.* Jul;81(1):12-9. Review

- Jordan, B. A., Trapaidze, N., Gomes, I., Nivarthi, R. & Devi, L.A. (2001). Oligomerization of opioid receptors with  $\beta_2$ -adrenergic receptors: A role in trafficking and mitogen-activated protein kinase activation. *PNAS*, vol.98, no.1:343-348.
- Kakidani, H., Furutani, Y., Takahashi, H., Noda, M., Morimoto, Y., Hirose, T., Asai, M., Inayama, S., Nakanishi, S. & Numa, S. (1982). Cloning and sequence analysis of cDNA for porcine beta-neoendorphin/dynorphin precursor. *Nature*. Jul 15;298(5871):245-9
- Kalejs M., Ivanov A., Plakhins G., Cragg M.S., Emzinsh D., Illidge T.M., Erenpreisa J. (2006). Upregulation of meiosis-specific genes in lymphoma cell lines following genotoxic insult and induction of mitotic catastrophe. *BMC Cancer* Jan 9;6:6.
- Kato, J., Matsushime, H., Hiebert, S. W., Ewen, M E. & Sherr, C. J. (1993). Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase CDK4. *Genes Dev* 7, 331-342.
- Kew, D., & Kilpatrick, D. L. (1989). Expression and regulation of the proenkephalin gene in rat sertoli cells. *Molecular Endocrinology*, 3(1), 179-184.
- Kew, D., Muffly, K. E., & Kilpatrick, D. L. (1990). Proenkephalin product are stored in the sperm acrosome and may function in fertilization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87, 9143-9147.
- Kieffer B.L. (1999). Opioids: first lessons from knockout mice. *Trends Pharmacol Sci*. Jan;20(1):19-26.
- Kierszenbaum A. L., Tres L. L. (2012): Histología y biología celular. Introducción a la anatomía patológica, 3. argitalpena, *Elsevier Saunders* argitaletxea, Barcelona.
- Kilpatrick, D. L. & Millette, C. F. (1986). Expression of proenkephalin messenger RNA by mouse spermatogenic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jul;83(14):5015-8.
- Kilpatrick, D. L., Borland, K., & Jin, D. F. (1987). Differential expression of opioid peptide genes by testicular germ cells and somatic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(16), 5695-5699.
- Kilpatrick, D. L., Zinn, S. A., Fitzgerald, M., Higuchi, H., Sabol, S. L. & Meyerhardt, J. (1990). Transcription of the rat and mouse proenkephalin genes is initiated at distinct sites in spermatogenic and somatic cells. *Mol Cell Biol*. Jul;10(7):3717-26.
- Kotaja, N., Kimmins, S., Brancorsini, S., Hentsch, D., Vonesch, J. L., Davidson, I., et al. (2004). Preparation, isolation and characterization of stage-specific spermatogenic cells for cellular and molecular analysis. *Nature Methods*, 1(3), 249-254.
- Kotaja, N. & Sassone-Corsi P. (2007). The chromatoid body: a germ-cell-specific RNA-processing centre. *Molecular Cell Biology*, Vol. 8, 85-90.
- Kouznetsova A., Benavente R., Pastink A., Höög C. (2011). Meiosis in mice without a synaptonemal complex. *PLoS One* 6(12):e28255.

- Kozar K., Ciemerych M. A., Rebel V. I., Shigematsu H., Zagozdzon A., Sicinska E., Geng Y., Yu Q., Bhattacharya S., Bronson R.T., Akashi K. & Sicinski P. (2004). Mouse development and cell proliferation in the absence of D-cyclins. *Cell* 118(4): 477-91.
- Law, B. K., Waltner-Law, M. E., Entingh, A. J., Chytil, A., Aakre, M. E., Nørgaard, P., et al. (2000). Salicylate-induced growth arrest is associated with inhibition of p70s6k and down-regulation of c-myc, cyclin D1, cyclin A, and proliferating cell nuclear antigen. *Journal of Biological Chemistry*, 275(49), 38261-38267.
- Lenhossek, M. von (1898). Untersuchungen über Spermatogenese. *Arch. Mikroskop. Anat. Entwicklungsmech.* 51:215-318.
- Leslie, F. M. (1987). Methods used for the study of opioid receptors. *Pharmacological Reviews*, 39(3), 197-249.
- Lei Z. M. & Rao C.V. (2001): Neural actions of luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin. *Semin Reprod Med* 19(1):103-9. Review
- Lemaire S., Magnan J. & Regoli D. (1978). Rat Vas-Deferens - Specific Bioassay for Endogenous Opioid Peptides. *Brit J Pharmacol.* 64(3):327-329.
- Li, C. H., Lemaire, S., Yamashiro, D., & Doneen, B. A. (1976). The synthesis and opiate activity of  $\beta$ -endorphin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 71(1), 19-25.
- Libuda D.E., Uzawa S., Meyer B.J., Villeneuve A.M. (2013). Meiotic chromosome structures constrain and respond to designation of crossover sites. *Nature*. Oct 31;502(7473):703-6.
- Liu, D., Matzuk, M. M., Sung, K. W., Guo, Q., Wang, P. & Wolgemuth, D. J. (1998<sub>a</sub>). Cyclin A1 is required for meiosis in the male mouse. *Nat Genet* 20, 377-380.
- Liu, D., Lucibello, F. C., Engeland, K. & Muller, R. (1998<sub>b</sub>). A new model of cell cycle-regulated transcription: repression of the cyclin A promoter by CDF-1 and anti-repression by E2F. *Oncogene* 16, 2957-2963.
- Lord J.A., Waterfield A.A., Hughes J. & Kosterlitz H.W. (1977): Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors. *Nature*. Jun 9;267(5611):495-9
- Lou, L., Zhang, Z., Ma, L., & Pei, G. (1998). Nociceptin/Orphanin FQ activates mitogen-activated protein kinase in chinese hamster ovary cells expressing opioid receptor-like receptor. *Journal of Neurochemistry*, 70(3), 1316-1322.
- Malumbres, M. & Barbacid, M. (2005). Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem Sci* 30: 630-641.
- Mansour A., Fox C. A., Thompson R. C., Akil H. & Watson S. J.(1994). Mu-Opioid Receptor Messenger-Rna Expression in the Rat Cns - Comparison to Mu-Receptor Binding. *Brain Research* 643(1-2):245-265.

- Margioris, A. N., Liotta, A. S., Vaudry, H., Wayne Bardin, C., & Krieger, D. T. (1983). Characterization of immunoreactive proopiomelanocortin-related peptides in rat testes. *Endocrinology*, *113*(2), 663-671.
- Mari, G., Rizzato, G., Iacono, E., Merlo, B., Minoia, R. & Belluzzi, S. (2005). Effects of beta-endorphin and naloxone on motility of cooled equine spermatozoa. *Anim Reprod Sci*. Oct;89(14):223-5.
- Martinerie, L., Manterola, M., Chung, S. S., Panigrahi, S. K., Weisbach, M., Vasileva, A., et al. (2014). Mammalian E-type cyclins control chromosome pairing, telomere stability and CDK2 localization in male meiosis. *PLoS Genetics*, *10*(2), e1004165.
- Meachem, S. J., Ruwanpura, S. M., Ziolkowski, J., Ague, J. M., Skinner, M. K. & Loveland, K. L. (2005). Developmentally distinct in vivo effects of FSH on proliferation and apoptosis during testis maturation. *Journal of Endocrinology*, 186:429-46.
- Mehta, N. D., Don, J., Zinn, S. A., Millette, C., Wolgemuth, D. J., & Kilpatrick, D. L. (1994). Proenkephalin gene expression in testicular interstitial cells is down-regulated coincident with the appearance of pachytene spermatocytes. *Endocrinology*, *135*(4), 1543-1550.
- Meikar, O., Da Ros, M., Korhonen, H. & Kotaja, N. (2011). Chromatoid body and small RNAs in male germ cells. *Reproduction*, 142:195-209.
- Merkouris, M., Dragatsis, I., Megaritis, G., Konidakis, G., Zioudrou, C., Milligan, G., et al. (1996). Identification of the critical domains of the delta-opioid receptor involved in G protein coupling using site-specific synthetic peptides. *Molecular Pharmacology*, *50*(4), 985-993.
- Molenaar, R., Rommerts, F. F., van der Molen, H. J. (1984). Characteristics of Leydig cells and macrophages from developing testicular cells. *Ann N Y Acad Sci*. 438:618-21.
- Mollereau C., Parmentier M., Mailleux P., Butour J. L., Moisand C., Chalon P., Caput D., Vassart G. & Meunier J. C.(1994). ORL1, a novel member of the opioid receptor family. Cloning, functional expression and localization. *FEBS Lett*. Mar 14;341(1):33-8.
- Mollereau, C., Simons, M. J., Soularue, P., Liners, F., Vassart, G., Meunier, J. C. & Parmentier, M. (1996). Structure, tissue distribution, and chromosomal localization of the prepronociceptin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Aug 6;93(16):8666-70.
- Mollereau, C., & Mouldous, L. (2000). Tissue distribution of the opioid receptor-like (ORL1) receptor. *Peptides*, *21*(7), 907-917.
- Möröy, T., & Geisen, C. (2004). Cyclin E. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *36*(8), 1424-1439.
- Mullany, L. K., White, P., Hanse, E. A., Nelsen, C. J., Goggin, M. M., Mullany, J. E., Antilla, C. K., Greenbaum, L. E., Kaestner, K. H. & Albrecht, J. H. (2008). Distinct

- proliferative and transcriptional effects of the D-type cyclins in vivo. *Cell Cycle* 7: 2215-2224.
- Murphy, M., Stinnakre, M. G., Senamaud-Beaufort, C., Winston, N. J., Sweeney, C., Kubelka, M., Carrington, M., Brechot, C. & Sobczak-Thepot, J. (1997). Delayed early embryonic lethality following disruption of the murine cyclin A2 gene. *Nature Genetics* 15, 83-86.
- Nagamori, I. & Sassone-Corsi, P. (2008). The chromatoid body of male germ cells. *Cell Cycle* 7:22, 3503-3508.
- Nagamori, I., Cruickshank, V. A., & Sassone-Corsi, P. (2011). Regulation of an RNA granule during spermatogenesis: Acetylation of MVH in the chromatoid body of germ cells. *Journal of Cell Science*, 124(Pt 24), 4346-4355.
- Nakanishi, S., Inoue, A., Kita, T., Nakamura, M., Chang, A. C., Cohen, S. N. & Numa, S. (1979). Nucleotide sequence of cloned cDNA for bovine corticotropin-beta-lipotropin precursor. *Nature*. Mar 29;278(5703):423-7
- Narita, M., Kuzumaki, N., Miyatake, M., Sato, F., Wachi, H., Seyama, Y. & Suzuki, T. (2006). Role of delta-opioid receptor function in neurogenesis and neuroprotection. *J. Neurochem.* 97 (5): 1494-505.
- New, D. C. & Wong, Y. H. (2002). The ORL1 receptor: molecular pharmacology and signalling mechanisms. *Neurosignals*. Jul-Aug;11(4):197-212. Review.
- Nguyen, T. B., Manova, K., Capodiceci, P., Lindon, C., Bottega, S., Wang, X. Y., et al. (2002). Characterization and expression of mammalian cyclin b3, a prepachytene meiotic cyclin. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(44), 41960-41969.
- Nickerson, H. D., Joshi, A., & Wolgemuth, D. J. (2007). Cyclin A1-deficient mice lack histone H3 serine 10 phosphorylation and exhibit altered aurora B dynamics in late prophase of male meiosis. *Developmental Biology*, 306(2), 725-735.
- North, R. A., Williams, J. T., Surprenant, A. & Christie, M. J. (1987). Mu and delta receptors belong to a family of receptors that are coupled to potassium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Aug;84(15):5487-91.
- O'Hara, B. F., Donovan, D. M., Lindberg, I., Brannock, M. T., Ricker, D. D., Moffatt, C. A., Klaunberg, B. A., Schindler, C., Chang, T. S., Nelson, R. J., et al. (1994). Proenkephalin transgenic mice: a short promoter confers high testis expression and reduced fertility. *Mol Reprod Dev*. Jul;38(3):275-84
- Ohta, H., Sakaide, Y., & Wakayama, T. (2009). Functional analysis of male mouse haploid germ cells of various differentiation stages: Early and late round spermatids are functionally equivalent in producing progeny. *Biology of Reproduction*, 80(3), 511-517.
- Orth, J. M. (1986). Fsh-induced sertoli cell proliferation in the developing rat is modified by  $\beta$ -endorphin produced in the testis. *Endocrinology*, 119(4), 1876-1878.

- Page, S. L. & Hawley, R. S. (2003). Chromosome choreography: the meiotic ballet. *Science* 301, 785–789.
- Pan Y. X., Xu J. & Pasternak G. W. (1996). Cloning and expression of a cDNA encoding a mouse brain orphanin FQ/nociceptin precursor. *Biochem J.* Apr 1;315 ( Pt 1):11-3.
- Park, S. W., He, Y., Ha, S. G., Loh, H. H. & Wei, L. (2008). Epigenetic regulation of kappa opioid receptor gene in neuronal differentiation. *Neuroscience*. February, 19; 151 (4): 1034-1041.
- Paronetto, M. P., Messina, V., Bianchi, E., Barchi, M., Vogel, G., Moretti, C., Palombi, F., Stefanini, M., Geremia, R., Richard, S. & Sette, C. (2009). *J. Cell Biol.* Vol. 185 No. 2 235-249.
- Peckys, D., & Landwehrmeyer, G. B. (1999). Expression of mu, kappa, and delta opioid receptor messenger RNA in the human CNS: A 33P in situ hybridization study. *Neuroscience*, 88(4), 1093-1135.
- Perey, B., Clermont, Y. & Leblond, C. P. (1961). The wave of the seminiferous epithelium in the rat. *Am. J. Anat.* 108:47-78
- Persson, A. I., Thorlin, T., & Eriksson, P. S. (2005). Comparison of immunoblotted delta opioid receptor proteins expressed in adult rat brain and their regulation by growth hormone. *Neurosci Res*, 52, 1-9.
- Pert C.B. & Snyder S.H. (1973): Opiate receptor: demonstration in nervous tissue. *Science*. Mar 9;179(77):1011-4.
- Phillips, B. T., Gassei, K., & Orwig, K. E. (2010). Spermatogonial stem cell regulation and spermatogenesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 365(1546), 1663-1678.
- Picatoste F., Sarri E. & Claro E. (1996). Proteínas G y sistema adenilil ciclasa. Monografías de Neurociencias (7): Receptores para Neurotransmisores .*Ediciones en Neurociencias*, J.A. Garcia– Sevilla Ed. Barcelona.
- Pilapil, C., Welner, S., Magnan, J., Gauthier, S., & Quirion, R. (1987). Autoradiographic distribution of multiple classes of opioid receptor binding sites in human forebrain. *Brain Research Bulletin*, 19(5), 611-615.
- Pintar, J. E., Schachter, B. S., Herman, A. B., Durgerian, S. & Krieger, T. (1984). Characterization and localization of proopiomelanocortin messenger RNA in the adult rat testis. *Science*. Aug 10;225(4662):632-4.
- Pol, O., Valle, L., & Puig, M. M. (2001). Antisense oligodeoxynucleotides to  $\mu$ - and  $\delta$ -opioid receptor mRNA block the enhanced effects of opioids during intestinal inflammation. *European Journal of Pharmacology*, 428(1), 127-136.



- Qiao, H., Chen, J. K., Reynolds, A., Hoog, C., Paddy, M., & Hunter, N. (2012). Interplay between synaptonemal complex, homologous recombination, and centromeres during mammalian meiosis. *PLoS Genetics*, 8(6).
- Rannikki, A. S., Zhang, F., & Huhtaniemi, I. T. (1995). Ontogeny of follicle-stimulating hormone receptor gene expression in the rat testis and ovary. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 107(2), 199-208.
- Ravnik, S. E., Rhee, K. & Wolgemuth, D. J. (1995). Distinct patterns of expression of the D-type cyclins during testicular development in the mouse. *Dev Genet* 16: 171-178.
- Ravnik, S. E., & Wolgemuth, D. J. (1999). Regulation of meiosis during mammalian spermatogenesis: The A-type cyclins and their associated cyclin-dependent kinases are differentially expressed in the germ-cell lineage. *Developmental Biology*, 207(2), 408-418.
- Refik-Rogers, J., Manova, K., & Koff, A. (2006). Misexpression of cyclin B3 leads to aberrant spermatogenesis. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 5(17), 1966-1973.
- Regaud, C. (1901). Étude sur la structure des tubes séminifères et sur la spermatogénèse chez les mammifères. *Arch. d'Anat. Microskop.* 4:101-156.
- Rey, R. A., Musse, M., Venara, M. & Chemes, H. E. (2009). Ontogeny of the androgen receptor expression in the fetal and postnatal testis: its relevance on Sertoli cell maturation and the onset of adult spermatogenesis. *Microsc Res Tech* 72:787-95.
- Ritzén, E. M., Hagenäs, L., Hansson, V., Weddington, S. C., French, F. S., & Nayfeh, S. N. (1976). Androgen binding and transport in testis and epididymis. *Vitamins & Hormones*, 33(0), 283-295.
- Rivière, P. J. (2004). Peripheral kappa-opioid agonists for visceral pain. *British Journal of Pharmacology*, 141(8), 1331-1334.
- Rhoades R. A., Tanner G. A. (1997): Fisiología médica. *Masson argitaletxea*, Barcelona.
- Russell L. D., Ettlin R. A., Sinha Hikim A. P. & Clegg E. D. (1990). *International Journal of Andrology*. Volume 16, issue 1, page 83, February
- Sadler T. W. (2004): Langman. Embriología médica, 9. argitalpena. *Panamericana argitaletxea*, Madrid.
- Salazar, G., Joshi, A., Liu, D., Wei, H., Persson, J. L., & Wolgemuth, D. J. (2005). Induction of apoptosis involving multiple pathways is a primary response to cyclin A1-deficiency in male meiosis. *Developmental Dynamics*, 234(1), 114-123.
- Sassone-Corsi, P. (2002). Unique chromatin remodeling and transcriptional regulation in spermatogenesis. *Science*. 296:2176–2178.

- Sastry, B. V., Janson, V. E., Owens, L. K. & Tayeb, O. S. (1982). Enkephalin- and substance P-like immunoreactivities of mammalian sperm and accessory sex glands. *Biochem Pharmacol.* Nov 1;31(21):3519-22
- Sastry, B. V. R., Janson, V. E., & Owens, L. K. (1991). Significance of substance P and enkephalin peptide systems in the male genital tract. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 632(1), 339-353.
- Satyanarayana, A. & Kaldis, P. (2009). Mammalian cell-cycle regulation: several Cdks, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms. *Oncogene* 28: 2925-2939.
- Schlatt, S. & Ehmcke, J. (2014). Regulation of spermatogenesis: An evolutionary biologist's perspective. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 29:2-16.
- Sharma S. K., Klee W. A. & Nirenberg M. (1977). Opiate-dependent modulation of adenylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Aug;74(8):3365-9
- Sharp, B., & Pekary, A. E. (1981).  $\beta$ -endorphin<sub>61-91</sub> and other  $\beta$ -endorphin-immunoreactive peptides in human semen. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 52(3), 586-588.
- Sharp, B. M., Gekker, G., Li, M. D., Chao, C. C., & Peterson, P. K. (1998).  $\delta$ -Opioid suppression of human immunodeficiency virus-1 expression in T cells (jurkat). *Biochemical Pharmacology*, 56(3), 289-292.
- Sher P. M., Almirez R. G. & Smith G. C. (1982). Studies of the direct effects of certain drugs of abuse on testosterone production by isolated Leydig cells. *J. Androl.* 3:35.
- Shinohara K., Yanagisawa A., Kagota Y., Gomi A., Nemoto K., Moriya E., Furusawa E., Furuya K. & Tersawa K. (1999). Physiological changes in Pachinko players; beta-endorphin, catecholamines, immune system substances and heart rate. *Appl. Human Sci.* 18:37-42.
- Sicinska E., Aifantis I., Le Cam L., Swat W., Borowski C., Yu Q., Ferrando A. A., Levin S. D., Geng Y., von Boehmer H. & Sicinski P. (2003). Requirement for cyclin D3 in lymphocyte development and T cell leukemias. *Cancer Cell.* 4(6): 451-61.
- Sicinski P., Donaher J. L., Parker S. B., Li T., Fazeli A., Gardner H., Haslam S. Z., Bronson R. T., Elledge S. J. & Weinberg R. A. (1995). Cyclin D1 provides a link between development and oncogenesis in the retina and breast. *Cell* 82(4):621-30.
- Sicinski, P., Donaher, J. L., Geng, Y., Parker, S. B., Gardner, H., Park, M. Y., Robker, R. L., Richards, J. S., McGinnis, L. K., Biggers, J. D., Eppig, J. J., Bronson, R. T., Elledge, S. J. & Weinberg R. A. (1996). Cyclin D2 is an FSH-responsive gene involved in gonadal cell proliferation and oncogenesis. *Nature* 5; 384(6608): 470-4.
- Silber S. J. (2010): Sperm retrieval for azoospermia and intracytoplasmic sperm injection success rates- A personal overview. *Human Fertility. Dec;* 13(4):247-256.

- Simon E.J. (1973): In search of the opiate receptor. *Am J Med Sci. Sep*;266(3):160-8. Review
- Simoni, M., Gromoll, J., & Nieschlag, E. (1997). The follicle-stimulating hormone receptor: Biochemistry, molecular biology, physiology, and pathophysiology. *Endocrine Reviews*, 18(6), 739-773.
- Simonin, F., Befort, K., Gavériaux-Ruff, C., Matthes, H., Nappey, V., Lannes, B., et al. (1994). The human delta-opioid receptor: Genomic organization, cDNA cloning, functional expression, and distribution in human brain. *Molecular Pharmacology*, 46(6), 1015-1021.
- Sirinathsinghji, D. J., Whittington, P. E., Audsley, A. & Fraser, H. M. (1983). beta-Endorphin regulates lordosis in female rats by modulating LH-RH release. *Nature*
- Smith, L. B. & Walker, W. H. (2014). The regulation of spermatogenesis by androgens. *Semin Cell Dev Biol* 30:2-13
- Sobotta/Hammersen (1982): Histología-Atlas en color de citología, histología y anatomía microscópica, 2. argitalpena. *Salvat argitaletxea*, Barcelona.
- Soverchia L., Mosconi G., Ruggeri B., Ballarini P., Catone G., Degl'Innocenti S., Nabissi M. & Polzonetti-Magni A.M. (2006). Proopiomelanocortin gene expression and beta-endorphin localization in the pituitary, testis, and epididymis of stallion. *Mol Reprod Dev* 73(1):1-8
- Sriraman V., Anbalagan M., Rao A. J. (2005). Hormonal regulation of Leydig cell proliferation and differentiation in rodent testis: A dynamic interplay between gonadotrophins and testicular factors. *Reprod Biomed Online* 11:507–518
- St. George, V. la von. (1878). Über die Genese der Samenkörper. *Archiv mikroskop. Anat. Entwicklungsmech.* 15:621-314.
- Stein C. (1999). Opioids in pain control. Basic and clinical aspects. Cambridge, United Kingdom: *Cambridge University Press*.
- Subirán, N., Agirregoitia, E., Valdivia, A., Ochoa, C., Casis, L. & Irazusta, J. (2008). Expression of enkephalin-degrading enzymes in human semen and implications for sperm motility. *Fertil Steril.* May;89(5 Suppl):1571-7.
- Subirán, N., Casis, L., & Irazusta, J. (2011). Regulation of male fertility by the opioid system. *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)*, 17(7-8), 846-853.
- Subirán N., Candenás L., Pinto F.M., Cejudo-Roman A., Agirregoitia E., Irazusta J. (2012). Autocrine regulation of human sperm motility by the met-enkephalin opioid peptide. *Fertil Steril* 98(3):617-625.

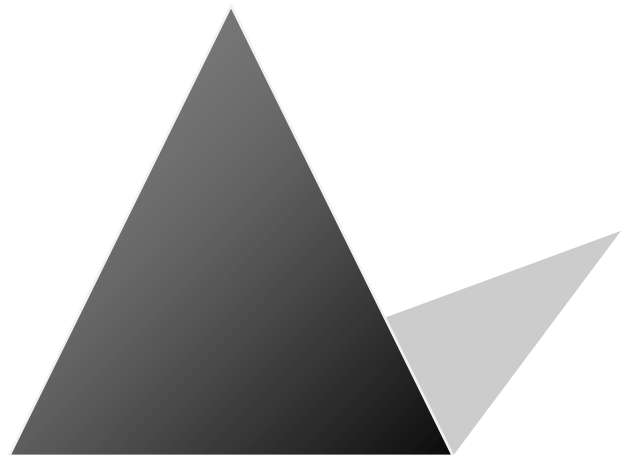
- Surprenant, A., Shen, K. Z., North, R.A. & Tatsumi, H. (1990). Inhibition of calcium currents by noradrenaline, somatostatin and opioids in guinea-pig submucosal neurones. *J Physiol.* Dec;431:585-608.
- Sweeney, C., Murphy, M., Kubelka, M., Ravnik, S. E., Hawkins, C. F., Wolgemuth, D. J., et al. (1996). A distinct cyclin A is expressed in germ cells in the mouse. *Development*, 122(1), 53-64.
- Tapanainen, J. S., Aittomäki, K., Min, J., Vaskivuo, T. & Huhtaniemi, I. T. (1997). Men homozygous for an inactivating mutation of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor gene present variable suppression of spermatogenesis and fertility. *Nat Genet.* Feb;15(2):205-6.
- Terenius L. (1973): Characteristics of the "receptor" for narcotic analgesics in synaptic plasma membrane fraction from rat brain. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)*. 33(5):377-84.
- Tsong, S. D., Phillips, D., Halmi, N., Liotta, A. S., Margioris, A., Bardin, C. W., et al. (1982). Acth zvnd b-endorphin-related peptides are present in multiple sites in the reproductive tract of the male rat. *Endocrinology*, 110(6), 2204-2206.
- Tsu, R. C., Chan, J. S. C., & Wong, Y. H. (1995). Regulation of multiple effectors by the cloned  $\mu$ -opioid receptor: Stimulation of phospholipase C and type II adenylyl cyclase. *Journal of Neurochemistry*, 64(6), 2700-2707.
- Turner, A. J. (1986). Processing and metabolism of neuropeptides. *Essays Biochem.* 22:69-119. Review
- Ulisse, S., Fabbri, A., & Dufau, M. L. (1989). Corticotropin-releasing factor receptors and actions in rat leydig cells. *Journal of Biological Chemistry*, 264(4), 2156-2163.
- Urizar, I., Estomba, H., Muñoa, I., Matorras, R., Esposito, A., Candenas, L., Pinto, F. M., Valdivia, A., Irazusta, J. & Subirán, N. (2014). The Opioid Peptide Beta-endorphin Enhances the Progesterone-induced Acrosome Reaction. *Andrology*. (article in press)
- Utleg, A. G., Yi, E. C., Xie, T., Shannon, P., White, J. T., Goodlett, D. R., et al. (2003). Proteomic analysis of human prostasomes. *The Prostate*, 56(2), 150-161.
- van der Meer, T., Chan, W. I., Palazon, L. S., Nieduszynski, C., Murphy, M., Sobczak-Thépot, J., et al. (2004). Cyclin A1 protein shows haplo-insufficiency for normal fertility in male mice. *Reproduction*, 127(4), 503-511.
- Vega, R. (2005). Opioides: neurobiología, usos médicos y adicción. *Elementos: Ciencia y cultura*. Oct-Dic, año/vol. 12, núm 060.
- Wakabayashi, Y., Nakada, T., Murata, K., Onkura, S., Mogi, K., Navarro, V. M., et al. (2010). Neurokinin B and dynorphin A in kisspeptin neurons of the arcuate nucleus participate in generation of periodic oscillation of neural activity driving pulsatile gonadotropin-releasing hormone secretion in the goat. *J Neurosci.* 30:3124-32.

- Waldeyer, W. (1906). Die Geschlechtzellen. Handb. vergl. u. expt. *Entwicklungslehre der Wirbeltiere*. 1:86-476.
- Weinbauer G. F., Luetjens C. M., Simoni M. & Nieschlag E. (2010): *Andrology*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Wick M. J., Minnerath S. R., Lin X., Elde R., Law P. Y. & Loh H. H. (1994). Isolation of a novel cDNA encoding a putative membrane receptor with high homology to the cloned mu, delta, and kappa opioid receptors. *Brain Res Mol Brain Res*. Nov;27(1):37-44
- Wilkes, M. M. & Yen, S. S. (1981). Augmentation by naloxone of efflux of LRF from superfused medial basal hypothalamus. *Life Sci*. May 21;28(21):2355-9.
- Willner, D., Cohen-Yeshurum, A., Avidan, A., Ozersky, V. Shohami, E. & Leker, R. R. (2014). Short term morphine exposure *in vitro* alters proliferation and differentiation of neural progenitor cells and promotes apoptosis via mu receptors. *Plos one* Vol. 9, issue 7.
- Wittert, G., Hope, P., & Pyle, D. (1996). Tissue distribution of opioid receptor gene expression in the rat. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 218(3), 877-881.
- Wolgemuth, D. J. (2008). Function of cyclins in regulating the mitotic and meiotic cell cycles in male germ cells. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 7(22), 3509-3513.
- Wolgemuth, D. J., & Roberts, S. S. (2010). Regulating mitosis and meiosis in the male germ line: Critical functions for cyclins. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 365(1546), 1653-1662.
- Wolgemuth, D. J. (2011). Function of the A-type cyclins during gametogenesis and early embryogenesis. *Results and Problems in Cell Differentiation*, 53, 391-413.
- Wolgemuth, D. J., Manterola, M., & Vasileva, A. (2013). Role of cyclins in controlling progression of mammalian spermatogenesis. *The International Journal of Developmental Biology*, 57(2-4), 159-168.
- Yamamizu, K., Furuta, S., Katayama, S., Narita, M., Kuzumaki, N., Imai, S., Nagase, H., Suzuki, T., Narita, M. & Yamashita, J. K. (2011). The  $\kappa$  opioid system regulates endothelial cell differentiation and pathfinding in vascular development. *Blood*, 21 July. Vol. 118, no. 3.
- Yilmaz, B., Konar, V., Kutlus, S., Sandal, S., Canpolat, S., Gezen, M. R., & Kelestimur, H. (1999). Influence of chronic morphine exposure on serum lh, fsh, testosterone levels, and body and testicular weights in the developing male rat *Systems Biology in Reproductive Medicine* 43:3 , 189-196
- Yoshikawa, K., Maruyama, K., Aizawa, T. & Yamamoto, A. (1989). A new species of enkephalin precursor mRNA with a distinct 5'-untranslated region in haploid germ cells. *FEBS Lett*. Mar 27;246(1-2):193-6.

- Yuan L., Liu J.G., Zhao J., Brundell E., Daneholt B., Hoog C. (2000). The murine SCP3 gene is required for synaptonemal complex assembly, chromosome synapsis, and male fertility, *Mol. Cell* 5 73–83.
- Zhang, Q., Wang, X., & Wolgemuth, D. J. (1999). Developmentally regulated expression of cyclin D3 and its potential in vivo interacting proteins during murine gametogenesis. *Endocrinology*, 140(6), 2790-2800.
- Zhou, Z., Xiao, B., Zhang, G., & Zhuang, L. (1990). A study of the effect of B-EP and naloxone on the function of the hypothalamo-pituitary-testicular axis of the rat. *Journal of Andrology*, 11(3), 233-239.
- Zwijsen, R. M., Buckle, R. S., Hijmans, E. M., Loomans, C. J. & Bernards, R. (1998). Ligand-independent recruitment of steroid receptor coactivators to estrogen receptor by cyclin D1. *Genes Dev* 12, 3488-3498.



**ERANSKINAK**







**DOKTORE-TESI HONETATIK ERATORRITAKO ARTIKULUA**

Estomba H., Muñoa I, Gianzo, M., Urizar, I., Casis, L., Irazusta, J. & Subirán, N. (2015).

Expression and localization of opioid receptors in male germ cells and the implication for mouse spermatogenesis. *PLoS One*.



# PLOS ONE

## Expression and localization of opioid receptors in male germ cells and the implication for mouse spermatogenesis.

--Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	PONE-D-15-45607
<b>Article Type:</b>	Research Article
<b>Full Title:</b>	Expression and localization of opioid receptors in male germ cells and the implication for mouse spermatogenesis.
<b>Short Title:</b>	Opioids and spermatogenesis
<b>Corresponding Author:</b>	Nerea Subiran University of the Basque Country UPV/EHU Leioa. Bizkaia, SPAIN
<b>Keywords:</b>	opioid receptors, meiosis, spermatogenesis, fertility, reproduction.
<b>Abstract:</b>	The presence of endogenous opioid peptides in different testicular cell types has been extensively characterized and provides evidence for the participation of the opioid system in the regulation of testicular function. However, the exact role of the opioid system during the spermatogenesis has remained controversial since the presence of the mu-, delta- and kappa-opioid receptors in spermatogenic cells was yet to be demonstrated. Through a combination of quantitative real-time PCR, immunofluorescence, immunohistochemistry and flow cytometry approaches, we report for the first time the presence of active mu-, delta- and kappa-opioid receptors in mouse male germ cells. They show an exposition time-dependent response to opioid agonist, hence suggesting their active involvement in spermatogenesis. Our results contribute to understand the role of the opioid receptors in the spermatogenesis and could help to develop new strategies to employ the opioid system as a biochemical tool for the diagnosis and treatment of male infertility.
<b>Order of Authors:</b>	Haizea Estomba Iraia Muñoa Marta Gianzo Itziar Urizar Luis Casis Jon Irazusta Nerea Subiran
<b>Opposed Reviewers:</b>	
<b>Additional Information:</b>	
<b>Question</b>	<b>Response</b>
<b>Financial Disclosure</b>  Please describe all sources of funding that have supported your work. A complete funding statement should do the following:  Include <b>grant numbers and the URLs</b> of any funder's website. Use the full name, not acronyms, of funding institutions, and use initials to identify authors who received the funding. <b>Describe the role</b> of any sponsors or	Please note that this work was supported by grants from the Basque Government and Merck Serono. Itziar Urizar was supported by a fellowship from the Gangoti Barrera Foundation. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. This does not alter our adherence to PLOS ONE policies on sharing data and materials.

<p>fundere in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. If they had no role in any of the above, include this sentence at the end of your statement: "<i>The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.</i>"</p> <p>If the study was <b>unfunded</b>, provide a statement that clearly indicates this, for example: "<i>The author(s) received no specific funding for this work.</i>"</p> <p>* typeset</p>	
<p><b>Competing Interests</b></p> <p>You are responsible for recognizing and disclosing on behalf of all authors any competing interest that could be perceived to bias their work, acknowledging all financial support and any other relevant financial or non-financial competing interests.</p> <p>Do any authors of this manuscript have competing interests (as described in the <a href="#">PLOS Policy on Declaration and Evaluation of Competing Interests</a>)?</p> <p><b>If yes</b>, please provide details about any and all competing interests in the box below. Your response should begin with this statement: <i>I have read the journal's policy and the authors of this manuscript have the following competing interests:</i></p> <p><b>If no</b> authors have any competing interests to declare, please enter this statement in the box: "<i>The authors have declared that no competing interests exist.</i>"</p> <p>* typeset</p>	<p>The authors have no conflicts of interest to declare.</p>
<p><b>Ethics Statement</b></p> <p>You must provide an ethics statement if your study involved human participants, specimens or tissue samples, or</p>	<p>Experiments were conducted in compliance with the Spanish legislation for the use of animals for experimental purposes and approved by Ethics Committee for Animal Experimentation (CEEA) of the University of the Basque Country.</p>

vertebrate animals, embryos or tissues. All information entered here should **also be included in the Methods section** of your manuscript. Please write "N/A" if your study does not require an ethics statement.

**Human Subject Research (involved human participants and/or tissue)**

All research involving human participants must have been approved by the authors' Institutional Review Board (IRB) or an equivalent committee, and all clinical investigation must have been conducted according to the principles expressed in the [Declaration of Helsinki](#). Informed consent, written or oral, should also have been obtained from the participants. If no consent was given, the reason must be explained (e.g. the data were analyzed anonymously) and reported. The form of consent (written/oral), or reason for lack of consent, should be indicated in the Methods section of your manuscript.

Please enter the name of the IRB or Ethics Committee that approved this study in the space below. Include the approval number and/or a statement indicating approval of this research.

**Animal Research (involved vertebrate animals, embryos or tissues)**

All animal work must have been conducted according to relevant national and international guidelines. If your study involved non-human primates, you must provide details regarding animal welfare and steps taken to ameliorate suffering; this is in accordance with the recommendations of the Weatherall report, "[The use of non-human primates in research](#)." The relevant guidelines followed and the committee that approved the study should be identified in the ethics statement.

If anesthesia, euthanasia or any kind of animal sacrifice is part of the study, please include briefly in your statement which substances and/or methods were applied.

Please enter the name of your Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) or other relevant ethics board, and indicate whether they approved this research or granted a formal waiver of ethical approval. Also include an approval number if one was obtained.

#### Field Permit

Please indicate the name of the institution or the relevant body that granted permission.

#### Data Availability

PLOS journals require authors to make all data underlying the findings described in their manuscript fully available, without restriction and from the time of publication, with only rare exceptions to address legal and ethical concerns (see the [PLOS Data Policy](#) and [FAQ](#) for further details). When submitting a manuscript, authors must provide a Data Availability Statement that describes where the data underlying their manuscript can be found.

Your answers to the following constitute your statement about data availability and will be included with the article in the event of publication. **Please note that simply stating 'data available on request from the author' is not acceptable. If, however, your data are only available upon request from the author(s), you must answer "No" to the first question below, and explain your exceptional situation in the text box provided.**

Do the authors confirm that all data underlying the findings described in their manuscript are fully available without restriction?

Please describe where your data may be found, writing in full sentences. **Your answers should be entered into the box below and will be published in the form you provide them, if your manuscript is accepted.** If you are copying our sample text below, please ensure you replace any instances of **XXX** with the appropriate details.

If your data are all contained within the paper and/or Supporting Information files, please state this in your answer below.

Yes - all data are fully available without restriction

All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

<p>For example, "All relevant data are within the paper and its Supporting Information files."</p> <p>If your data are held or will be held in a public repository, include URLs, accession numbers or DOIs. For example, "All XXX files are available from the XXX database (accession number(s) XXX, XXX)." If this information will only be available after acceptance, please indicate this by ticking the box below. If neither of these applies but you are able to provide details of access elsewhere, with or without limitations, please do so in the box below. For example:</p> <p>"Data are available from the XXX Institutional Data Access / Ethics Committee for researchers who meet the criteria for access to confidential data."</p> <p>"Data are from the XXX study whose authors may be contacted at XXX."</p> <p>* typeset</p>	
Additional data availability information:	Tick here if your circumstances are not covered by the questions above and you need the journal's help to make your data available.



October 16th 2015

Dear Editor in-chef,

Please find enclosed the manuscript entitled **Expression and localization of opioid receptors in male germ cells and the implication for mice spermatogenesis** by Haizea Estomba; Iraia Muñoa; Marta Gianzo; Itziar Urizar; Luis Casis; Jon Irazusta; Nerea Subirán for publication in **PLOS One** with the referent number **PONE-D-15-00345R3**

The present study demonstrates for the first time that male germ cells express active MOR, DOR and KOR and describe its function as a modulator of mice spermatogenesis. These results contribute to resolve several long-standing issues concerning the role of opioid receptors in spermatogenesis and open up novel avenues of research of the opioid system as a biochemical tool for the diagnosis and treatment of male infertility.

Please note that this work was supported by grants from the Basque Government and Merck Serono. Itziar Urizar was supported by a fellowship from the Gangoti Barrera Foundation. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. This does not alter our adherence to PLOS ONE policies on sharing data and materials.

Please find accompanying this letter the manuscript and we hope that the paper will be suitable for publication in **PLOS One** and look forward to hearing from you in due course.

Yours sincerely,

Nerea Subirán  
Department of Physiology  
Faculty of Medicine and Dentistry, University of the Basque Country  
P.O. box 699-Bilbao, Spain.  
Telephone: +34 94 601 5673

Fax: +34 94 601 5662  
E-mail: [nerea.subiran@ehu.es](mailto:nerea.subiran@ehu.es)

1 **Expression and localization of opioid receptors in male germ cells and the**  
2 **implication for mouse spermatogenesis.**

3 Haizea Estomba<sup>¶</sup>, Iraia Muñoa<sup>¶</sup>, Marta Gianzo, Itziar Urizar, Luis Casis, Jon Irazusta  
4 and Nerea Subirán\*.

5 *Department of Physiology Faculty of Medicine and Dentistry, University of the Basque*  
6 *Country, Leioa, Bizkaia, Spain*

7

8 **\*Corresponding author**

9 Nerea Subirán. Department of Physiology, Faculty of Medicine and Dentistry, University of the  
10 Basque Country

11 E-mail: nerea.subiran@ehu.es

12 Telephone: +34 94 601 5673

13 Fax: +34 94 601 5662

14

15 **Footnote**

16 <sup>¶</sup>H.E. and I.M. made an equal contribution to this work  
17

18

19 **Acknowledgements**

20 This work was supported by grants from the Basque Government and Merck Serono.

21 Itziar Urizar was supported by a fellowship from the Gangoti Barrera Foundation.

22

23

24

25

26

27

## 28 **Abstract**

29 The presence of endogenous opioid peptides in different testicular cell types has been  
30 extensively characterized and provides evidence for the participation of the opioid  
31 system in the regulation of testicular function. However, the exact role of the opioid  
32 system during the spermatogenesis has remained controversial since the presence of  
33 the mu-, delta- and kappa-opioid receptors in spermatogenic cells was yet to be  
34 demonstrated. Through a combination of quantitative real-time PCR,  
35 immunofluorescence, immunohistochemistry and flow cytometry approaches, we report  
36 for the first time the presence of active mu-, delta- and kappa-opioid receptors in  
37 mouse male germ cells. They show an exposition time-dependent response to opioid  
38 agonist, hence suggesting their active involvement in spermatogenesis. Our results  
39 contribute to understand the role of the opioid receptors in the spermatogenesis and  
40 could help to develop new strategies to employ the opioid system as a biochemical tool  
41 for the diagnosis and treatment of male infertility.

42

43 *Keywords* opioid receptors, meiosis, spermatogenesis, fertility, reproduction.

## 44 Introduction

45 Over 80 million people worldwide experience infertility and over one-third of infertility  
46 cases are due to male factors. Male infertility often reflects faults in spermatogenesis  
47 but little is known about the underlying causes, mostly because mechanisms and  
48 pathways involved in spermatogenesis remain unknown.

49 The most well-known physiological effect associated with endogenous opioid peptides  
50 (EOPs) is their efficacy in pain reduction or analgesia, although their effect on a variety  
51 of other physiological functions has become apparent in recent years [1]. In particular,  
52 evidence of the widespread presence of EOPs and receptors in different organs and  
53 tissues of the male reproductive system indicates that EOPs likely participate in the  
54 regulation of male reproductive function [2]. EOPs are involved in cell communication  
55 and exert their action through G-protein-coupled opioid receptors. There are three  
56 principal types of opioid receptors: the mu-opioid (MOR), delta-opioid (DOR) and  
57 kappa-opioid (KOR) receptors [3]. Later, the orphanin 1 (ORL1) receptor (also known  
58 as the nociceptin receptor) was discovered and found to have high homology with  
59 opioid receptors [4].

60 Previously, our group described the presence of MOR, DOR and KOR and the other  
61 components of the opioid system in human sperm cells and that they seemed  
62 functionally involved in control of human sperm motility [5-9]. However, the presence of  
63 MOR, DOR and KOR in male germ cells and their roles during spermatogenesis  
64 remain unknown.

65 Spermatogenesis is a highly coordinated developmental process characterized by  
66 mitotic, meiotic and haploid differentiation phases. Spermatogenesis is initiated in the  
67 basal compartment of the seminiferous epithelium by spermatogonial stem cells that  
68 proliferate and differentiate into type A1 spermatogonia. Type A1 spermatogonia  
69 undergo a series of synchronized mitotic divisions, giving rise to type B spermatogonia,  
70 which enter the meiotic phase of spermatogenesis as primary spermatocytes [10].

71 Meiosis is characterized by two consecutive cell divisions, following a single DNA  
72 duplication, and by genetic exchange (crossing-over) between homologous  
73 chromosomes, which results in four round haploid spermatids [11]. EOPs are present  
74 in different cells of the male gonads and likely intervene in the mechanisms that  
75 regulate spermatogenesis. Opioid protein precursors are expressed differentially in  
76 somatic and germ cells of the testes, indicating that EOPs may regulate testicular  
77 function locally by *de novo* synthesis. Moreover, Leydig cells also synthesize EOPs in  
78 the mouse, and these opioid peptides may be involved in control of spermatogenesis  
79 by inhibiting the function of Sertoli cells in a paracrine manner. Fabbri et al. [12]  
80 reported the presence of the three types of opioid receptors - MOR, DOR and KOR - in  
81 the rat testis using binding studies. However, subsequent higher resolution localization  
82 studies found that these receptors were exclusively expressed by Sertoli cells. Only  
83 ORL1 have been described in spermatogenic cells [13]. The presence of these  
84 receptors in mature spermatozoa [5] suggests that opioid receptors may be expressed  
85 at some point during spermatogenesis since mature spermatozoa are transcriptionally  
86 and translationally inactive cells. Because the effect of opioid receptors on  
87 spermatogenic cells remains unknown, the aim of this study was to characterize the  
88 expression and distribution of the three types of opioid receptors in male germ cells  
89 and analyse their role during spermatogenesis.

90

## 91 **Materials and Methods**

### 92 **Isolation of stage-specific Spermatogenic and Mouse**

#### 93 **Testis Cells.**

94 Experiments were conducted in compliance with the Spanish legislation for the use of  
95 animals for experimental purposes and approved by Ethics Committee for Animal  
96 Experimentation (CEEAA) of the University of the Basque Country.

97 Two-month-old Swiss male mice (n=120) were euthanized through cervical dislocation.  
98 The obtained testes were decapsulated in phosphate buffer saline (PBS) to obtain the  
99 seminiferous tubules. We used the transillumination-assisted microdissection technique  
100 to obtain the stage-specific segments of seminiferous tubules [14]. We used different  
101 stages of the seminiferous epithelium dissected out under transillumination to analyze  
102 the gene expression of opioid receptors in male germ cells and isolated total testis cells  
103 for immunocytochemistry, functional experiments, and FACS analyses. To isolate total  
104 cells, testis were decapsulated and dissociated in 2 mg mL<sup>-1</sup> of collagenase for 15 min,  
105 followed by 0.25% trypsin/1 mM EDTA digestion for 10 min at 37 °C in KREBS medium  
106 supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS). Finally, the cells were filtered with  
107 nylon of 41-µm pore size nylon (Millipore, Germany)

108

## 109 **Culture media and treatments**

110 Isolated testis cells were resuspended and cultured on Roswell Park Memorial Institute  
111 1640 medium containing 10% knockout serum replacement (KSR) from Gibco  
112 (Invitrogen, California USA), penicillin/streptomycin (50 U/mL) and 200 mM L-  
113 glutamine. Except for KSR, the reagents were purchased from Sigma-Aldrich (St.  
114 Louis, MO).The spermatogenic cells were treated with selective opioid receptors  
115 agonists for short- (1 h) and long-term exposure (24 h). We used the MOR selective  
116 agonist morphine (10<sup>-5</sup> M, Alcaliber S.A., Madrid, Spain), DOR selective agonist [d-  
117 Pen<sup>2</sup>,d-Pen<sup>5</sup>]-enkephalin (DPDPE) (10<sup>-6</sup> M, Sigma-Aldrich) and KOR selective agonist  
118 U-50488 (10<sup>-6</sup> M, Sigma-Aldrich).

119

## 120 **qRT-PCR analysis**

121 Total RNA was extracted with Nucleo Spin RNAII Kit (Macherey-Nagel, Germany)  
122 according to the manufacturer's instructions. Concentrations of RNA were determined

123 by measuring absorbance at 260 nm, and purity was assessed by the 260/280 nm  
 124 absorbance ratio. For synthesis of first-strand cDNA, we mixed the RNA with random  
 125 hexamers, dNTP and SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) in a total  
 126 volume of 20  $\mu$ L. The cDNA samples were added to a 20- $\mu$ L reaction mixture  
 127 containing the specific primers (Table 1) for each spermatogenesis cell marker and  
 128 Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, California, USA). The  
 129 reaction profile was 40 cycles of denaturation at 95  $^{\circ}$ C for 15 s, and annealing and  
 130 extension at 60  $^{\circ}$ C for 1 min for qRT-PCR (Abiprism 7000 Sequence Detection  
 131 System). Quantification of gene expression was calculated from the standard curves of  
 132 each gene using the same RNA sample per triplicates. Data were normalized with  
 133 beta-actin (*Actb*) as a housekeeping gene. In order to identify the most stable reference  
 134 genes, we analyzed changes in expression of TATA binding protein (*Tbp*),  
 135 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*Gapdh*) and beta-actin (*Actb*) gene  
 136 expression by geNorm software. According to the calculated geNorm M value (M) *Actb*  
 137 was the most stable reference gene in our system. Moreover, *Actb* was previously  
 138 used as a housekeeping gene in these cells [15].

139

140 **Table 1 Useful primer used**

Gene	Primers (forward/reverse)	Significance
<i>Mor</i> NM_001039652.1	5'-TGTCGGAGAACTGAGAGCAA-3' 5'-CCTGAACTGTGGAAGGAAGC-3'	Opioid receptor
<i>Dor</i> NM_013622.3	5'-TGTAAGAGGGCTGGGAATG-3' 5'-TTGGTTTGAGGGTTGTTTT-3'	Opioid receptor
KOR NM_001204371.1	5'-TGACTTGGGAAGGGAGGTC-3' 5'-AAGCACTGGGAGAGCAGGTA-3'	Opioid receptor
<i>Itg6</i> NM_008397.3	5'-GCTTCCTCGTTTGGCTATGA-3' 5'-AATCGGCTTCACACTACTCCA-3'	Spermatogonia germ cell marker
<i>Sycp1</i> NM_011516.2	5'-GCTTTTGGGAGAGGTTGAGA-3' 5'-CGCTGATGACTGTTCTTGCT-3'	Spermatocyte germ cell marker
<i>Sycp3</i> NM_011517.2	5'-ATCTGGGAAGCCACCTTTG-3' 5'-AGCCTTTTCATCAGCAACATC-3'	Spermatocyte germ cell marker
<i>Acr</i> NM_016845.2	5'-CAGGAGCAAGAAGAGCAGGA-3' 5'-GAGTGAAGAAGGACGGGTTG-3'	Spermatid germ cell marker
<i>Actb</i> NM_007393.3	5'-GGGCTATGCTCTCCCTCAC-3' 5'-CACGCACGATTTCCCTCT-3'	Control

141



## 142 **Immunofluorescence**

143 For the immunofluorescence staining, isolated testis cells were fixed with 4%  
144 paraformaldehyde in PBS and permeabilized with Triton X-100 0.5% in PBS. Cells  
145 were blocked in 10% fetal bovine serum (FBS) and then primary antibodies were  
146 added. The first antibodies were Rabbit anti-Mu Opioid Receptor (1:1000, Millipore),  
147 Rabbit anti-Delta Opioid Receptor (1:1000, Millipore) and Rabbit anti-Kappa Opioid  
148 Receptor antibodies (1:1000, Millipore) for the opioid receptors; and Mouse anti- ITG6  
149 (1:1000, Abcam, Cambridge, UK), Goat anti-SYCP1 (1:700, NovateinBio), Mouse anti-  
150 SYCP3 (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, California USA) and Goat anti-Acrosin  
151 antibodies (1:500, Santa Cruz Biotechnology) for each spermatogenic cell marker.  
152 Alexa Fluor 488 Donkey anti-Rabbit IgG (1:1000, Molecular Probes, Eugene, OR),  
153 Alexa Fluor 647 Donkey anti-Mouse IgG (1:1000, Molecular Probes) and Alexa Fluor  
154 633 Donkey anti-Goat IgG (1:500, Invitrogen) were the second antibodies. Negative  
155 controls were performed with the rabbit immunoglobulin fraction, omitting the primary  
156 antibody before secondary antibody addition. Finally, the sperm cells were examined  
157 by confocal microscopy (Olympus Fluoview FV500, Tokyo, Japan). Nuclei were stained  
158 with Hoechst 33342 at  $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$  and slides were assembled with Fluoromount G  
159 (Molecular Probes) and examined by confocal microscopy (Olympus Fluoview FV500).  
160 Corrected total cell fluorescence (CTCF) per area was measured by ImageJ software  
161 using the following equation:  $\text{CTCF} / \mu\text{m}^2 = [\text{Integrated density} - (\text{Area of selected cell} \times$   
162  $\text{Mean fluorescence of background readings})] / \text{Area of selected cell}$ . We measured the  
163 green fluorescence of at least 100 cells.

164

## 165 **Immunohistochemistry**

166 Swiss male mice were anaesthetized with 3-aminobenzoic acid ethyl ester (MS-222),  
167 perfused with Bouin's solution, and the testes were removed and immersed in the

168 same fixative for 12 h. The samples were routinely processed, embedded in paraffin  
169 and 5  $\mu\text{m}$ -thick sections were obtained. Antigen retrieval was carried out in citrate  
170 buffer (10 mM, pH = 6) for 30 minutes at 98°C in microwave oven. Endogenous  
171 peroxidase activity was blocked by incubating the slides in 3% hydrogen peroxide in  
172 PBS for 30 min. Samples were permeabilized with Triton X-100 0.1% in PBS (TBS) for  
173 10 min. Cells were blocked in 10% normal goat serum and bovine serum albumin  
174 (1mg/ml) for 30 min and the primary antibodies, Rabbit anti-Mu Opioid Receptor  
175 (1:100, Millipore), Rabbit anti-Delta Opioid Receptor (1:100, Millipore) and Rabbit anti-  
176 Kappa Opioid Receptor antibodies (1:100, Millipore), were applied for overnight at 4 °C  
177 in the same blocking medium. A subsequent reaction was performed with biotinylated  
178 secondary antibody. Complex of avidin-biotin peroxidase was formed for 1h and  
179 positive cells were visualized using 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride plus  
180 (DAB+) as a chromogen. Counterstaining was performed with hematoxylin. Negative  
181 controls were performed omitting the primary antibody before secondary antibody  
182 addition. Digital slides were acquired with a MIRAX SCAN (Zeiss) and images captured  
183 with the Cell Software.

184

## 185 **Cell cycle analysis by flow cytometry**

186 Isolated testis cells were fixed in 70% ethanol at 4 °C for 1 h and resuspended and  
187 incubated in staining solution (PBS with 0.2 mg mL<sup>-1</sup> RNase A and 0.02 mg mL<sup>-1</sup>  
188 propidium iodide) at 4 °C for 1 h. Because lymphocytes are non-mitotic cells, we used  
189 them as a control to identify the 2c DNA-containing cell population. Fluorescence data  
190 from at least 100,000 events were collected in the FL2 sensor (Gallios™, Becton  
191 Dickinson, San Jose, CA, USA). To quantify the effects of different treatments on  
192 haploid cells we measured the integrated area of the peaks corresponding to 1c DNA-  
193 containing cells. Histograms were analyzed using Summit v4.3 software. All

194 experiments were repeated six times using biological replicates from six different  
195 animals, with three technical replicates from each isolation experiment.

196

## 197 **Statistics**

198 Statistical analysis was performed using Student's t-test and analysis of variance  
199 (ANOVA) followed by a post hoc analysis using the Bonferroni test. These procedures  
200 were undertaken using GraphPad PRISM (version 5.0) program. Differences were  
201 considered significant for  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  and  $p < 0.001$  respectively.

202

## 203 **Results and Discussion**

204 Numerous studies have demonstrated the presence of EOPs in different testicular cell  
205 types [16-18], providing evidence that the opioid system is important in the regulation of  
206 testicular function. Previously, binding studies have shown that the three types of  
207 opioid receptors – MOR, DOR and KOR – are exclusively expressed by Sertoli cells  
208 [12]. The present study demonstrates for the first time that active MOR, DOR and KOR  
209 are present in male germ cells and may regulate the coordination and orchestration of  
210 the proliferation and differentiation cellular events that take place at several points  
211 along the spermatogenesis.

212

## 213 **Expression and localization of opioid receptors in male** 214 **germ cells**

215 The expression of opioid receptors is developmentally regulated during  
216 spermatogenesis and is consistent with spermatogenesis being characterized by highly  
217 specialized mechanisms of gene expression that operate at transcriptional and post-  
218 transcriptional levels [14]. To clarify the function of opioid receptors in germ cells, we

219 first examined the gene expression of receptors in different stages of the seminiferous  
220 epithelium using qRT-PCR in Swiss adult mouse testis. qRT-PCR analysis showed that  
221 *Mor*, *Dor* and *Kor* were expressed in different stages (Fig. 1) with a similar expression  
222 pattern to that for the 12-stage sperm development in mouse [19]. At stages IV–VI,  
223 expression of the three receptors steeply dropped compared with stages XII–III ( $P <$   
224 0.001). During stages VII–IX, however, the respective expressions of *Mor* (3.5-fold),  
225 *Dor* (3-fold) and *Kor* (11-fold) ( $P < 0.001$ ) increased compared to stages IV–VI. These  
226 observations fit the scenario in which transcription occurs at later stages of  
227 spermatogenesis. Interestingly, the translational factor eukaryotic initiation factor 4B  
228 (eIF4B) is inhibited at stages IV–VI and actively translated at stages VII–IX [20]. Thus,  
229 our data suggest that opioid receptors may be mainly expressed at later stages of  
230 spermatogenesis, when the translational machinery is already expressed.

231 In agreement with previous data [12], testis cells expressed the opioid receptors.  
232 However, different stages of the seminiferous epithelium contained distinct groups of  
233 spermatogonia, spermatocytes and spermatids at various points of development. To  
234 determine which male germ cell receptors were expressed, we examined their  
235 expression and localization by double immunofluorescence using specific germ cell  
236 markers. We used 6- $\alpha$ -integrin (ITG6), synaptonemal complex proteins SYCP1 and  
237 SYCP3, and acrosin (ACR) as cell markers of spermatogonia [21], spermatocytes [22]  
238 and spermatids [23], respectively. The double indirect immunofluorescence revealed  
239 that all male germ cells expressed the three opioid receptors (Fig. 2A). There was  
240 strong staining for the receptors in peripheral regions of all cells, confirming their  
241 membrane localization. The three opioid receptors were present in spermatogonia – we  
242 observed MOR-, DOR- and KOR-positive cells that co-expressed ITG6 in the  
243 peripheral regions (ITG6 is a membrane protein). Cell morphology also confirmed the  
244 nature of the cell [21]. Moreover, spermatocytes also expressed opioid receptors.  
245 There was strong immunostaining of MOR, DOR and KOR in SYCP1- and SYCP3-  
246 positive cells that correspond to spermatocytes. Immunoreactivity of SYCP1 and

247 SYCP3 was detected in the nucleus of cells that showing the chromosome spreading  
248 from leptotene- and pachytene-stage spermatocytes, respectively [24]. Spermatids also  
249 expressed opioid receptors. Finally, the presence of MOR, DOR and KOR in haploid  
250 cells was confirmed by ACR. In round spermatids, ACR-positive cells were co-stained  
251 with MOR, DOR and KOR (Fig. 2A). ACR was localized in the cytoplasm of round  
252 spermatids as we expected [23]. We also detected a strong immunostaining of opioid  
253 receptors' in mouse spermatozoa. (Supplementary Figure 1). According to CTCF/ $\mu\text{m}^2$   
254 measurements, MOR expression did not change during spermatogenesis (Fig. 2B). We  
255 did not observe any differences in the MOR fluorescence intensity between ITG6,  
256 SYPC1; SYPC3 and ACR positive cells. DOR fluorescence intensity, however,  
257 increased in ACR positive ( $p < 0.05$ ) cells compared to ITG6, SYCP1 and SYCP3-  
258 positive cells respected. There was also an increase in KOR fluorescence intensity in  
259 SYCP1, SYCP3 and ACR positive cells compared to ITG6-positive cells ( $p < 0.05$ ).

260 To verify the presence of opioid receptors in spermatogenic cells we carried out  
261 immunohistochemistry analyses to identify cells in their histological context (Fig. 3).  
262 Immunoreactivity of the three opioid receptors had been detected on testis sections  
263 confirming the presence of these receptors in male germ cells. MOR, DOR and KOR  
264 proteins were localized not only in different male germ cells (spermatogonia,  
265 spermatocytes spermatids and spermatozoa), but also in Sertoli cells as has been  
266 described before [12].

267 Thus, immunofluorescence and immunohistochemistry analyses indicated the presence  
268 of MOR, DOR and KOR in different cell types at different stages of the spermatogenic  
269 cells. These findings suggest a central role of the opioid system in regulation of  
270 spermatogenesis.

271

272 **Figure 1. Expression of opioid receptors in mouse spermatogenic cells.**

273 Developmental gene expression of *Mor*, *Dor* and *Kor* at stages XII–III, IV–VI, VII–IX  
274 and X–XI of seminiferous tubules according to qRT-PCR. Data were normalized with

275 beta-actin (*Actb*) as a housekeeping gene and presented as relative expression mean  
276  $\pm$  SEM of six experiments.

277

278 **Figure 2. Localization of opioid receptors in mouse spermatogenic cells.** Co-  
279 immunofluorescence analysis of MOR, DOR and KOR with male germ cell markers; with  
280 6- $\alpha$ -integrin (ITG6), synaptonemal complex proteins SYCP1 and SYCP3, and  
281 acrosin (ACR) as cell markers of spermatogonia, spermatocytes and spermatids,  
282 respectively (A). Nucleus were stained with Hoescht 33258. Negative controls were  
283 treated with preimmune rabbit serum and secondary antibody alone. Representative  
284 photomicrographs are shown; n = 5. Scale bar: 10  $\mu$ m.

285 Intensity fluorescence for MOR, DOR and KOR was measured using Corrected total  
286 cell fluorescence per area (B).  $CTCF/\mu m^2 = [Integrated\ density - (Area\ of\ selected\ cell$   
287  $\times Mean\ fluorescence\ of\ background\ readings)] / Area\ of\ selected\ cell$ . Only green  
288 fluorescence was measured for at least 100 cells.

289 **Figure 3. Histological localization of opioid receptors in mouse testis.**

290 Immunohistochemical expression of MOR (A), DOR (B) and KOR (C) in representative  
291 mouse testis. Opioid receptors are wide expressed along mouse testis. 1:  
292 Spermatogonia; 2: Spermatocytes; 3: Round spermatids; 4: Spermatozoa 5; Sertoli cells.  
293 Counterstaining was performed with hematoxylin. Negative controls were performed  
294 omitting the primary antibody before secondary antibody addition. n = 3. Scale bar: 100  
295  $\mu$ m.

296

297 Spermatogenesis is a series of processes, involving the proliferation of spermatogonia,  
298 the meiosis processes and the differentiation of developing germ cells (spermatids) into  
299 sperm. To investigate whether the opioid receptors were related to spermatogenesis,  
300 we analyzed the effect of opioid receptor agonists on the spermatogenic cell cycle and  
301 on expression of sperm germ-cell markers for different time exposures. Because

302 spermatogenesis is controlled by paracrine and autocrine processes that take place  
303 between different cells types present in the testicles, we decided to culture all the testis  
304 cells. We have demonstrated for the first time that MOR, DOR and KOR were present  
305 in mice male germ cells and can be involved in the spermatogenesis regulation.

306

307 A proliferative effect of opioid receptors was previously reported [1,3]. Indeed, it has  
308 been suggested that opioid receptors can stimulate some proliferative processes such  
309 as neurogenesis or adrenal regeneration [25-27] and inhibit the growth of immature  
310 adrenals or macrophage proliferation in the peripheral nervous system [28, 29]. Thus,  
311 we described for the first time the role of opioid receptors in sperm cell differentiation.  
312 Our data suggest that opioid receptors were functionally active, with the response  
313 being time-exposure dependent.

314

## 315 **The effect of MOR-agonist morphine on** 316 **spermatogenesis**

317 To determine the role of opioid receptors in mouse spermatogenesis we studied the  
318 changes in the spermatogenic cycle by flow cytometry. Due to the presence of somatic  
319 cells, we measured only the on the percentage of haploid cells to evaluate the direct  
320 effect of opioid receptors on spermatogenesis. Specifically, to determine the role of  
321 MOR in mouse spermatogenesis we treated the testis cell with the morphine (a MOR  
322 agonist) and studied the changes in the population of 1c, DNA-containing cells  
323 exposed to acute (1 h) and chronic (24 h) morphine treatment. Morphine did not  
324 completely block the spermatogenesis processes but both treatments modified the  
325 haploid cell population. Flow cytometer analyses showed that the acute morphine  
326 treatment caused a decrease in the population of 1c DNA-containing cells (Fig. 4A).  
327 Measuring the integrated area corresponding to peaks of haploid cells showed that the

328 percentage of 1c DNA-containing cells decreased by 5% in treated samples ( $P < 0.05$ )  
329 compared to controls (Fig. 4C). However, chronic morphine treatment increased the  
330 haploid cell population by approximately 5% ( $P < 0.05$ ) (Fig. 4B and C).

331 To determine whether MOR was involved in different phases of spermatogenesis, we  
332 analyzed the expression of *Itg6*, the synaptonemal complex proteins *Sycp1* and *Sycp3*,  
333 and *Acr*. The relative expression of *Itg6* increased ( $P < 0.05$ ) after 1 h of morphine  
334 treatment (Fig. 4D); however, *Sycp3* mRNA levels decreased ( $P < 0.05$ ) with acute  
335 morphine treatment and there was no effect on *Sycp1* levels. Finally, we also observed  
336 a decrease in *Acr* expression ( $P < 0.05$ ), the spermatid cell marker, consistent with  
337 acute morphine treatment causing a decrease in haploid cells. To understand the  
338 increase in haploid cells induced by morphine for long-term exposure; we also  
339 analyzed the expression of spermatogenic cell markers after 24 h of incubation. The  
340 chronic opioid treatment led to an increase not only in *Acr* mRNA levels ( $P < 0.05$ ), but  
341 also in *Sycp1* ( $P < 0.05$ ) and *Sycp3* ( $P < 0.01$ ) levels (Fig. 4E) – confirming the  
342 increase in percentage of haploid cells measured by flow cytometry, Long-term  
343 exposure to morphine did not affect *Itg6* expression.

344

345 **Figure 4. Effect of selective MOR-agonist morphine on spermatogenesis.** Flow  
346 cytometry histogram of spermatogenesis cell cycle measured by propidium iodide in  
347 control (green) and morphine-treated samples (red:  $10^{-5}$  M) for short- (A) and long-term  
348 exposure (B). Representative plot from six experiments. R5 represents the haploid cell  
349 population. Percentage difference between treatment and control of the integrated area  
350 of the haploid cell population for the different times presented as relative expression  
351 mean  $\pm$  SEM of six experiments (C). Relative gene expression of germ cell markers  
352 *Itg6*, *Sycp1*, *Sycp3* and *Acr* for short- (D) and long-term exposure (E) with morphine.  
353 Data were normalized with beta-actin (*Actb*) as a housekeeping gene and presented as  
354 relative expression mean  $\pm$  SEM of six experiments.



355

## 356 **The effect of DOR-agonist DPDPE on spermatogenesis**

357 To determine the role of DOR in mouse spermatogenesis, we used the DOR-agonist  
358 DPDPE for short- (1 h) and long-term exposure (24 h). We analyzed its effect on the  
359 1c, DNA-containing cell populations and the expression of cell markers'. Flow  
360 cytometer analyses showed that DPDPE did not cause any effect in the 1c DNA-  
361 containing cell population after 1 h of treatment (Fig. 5A, 5C). However, there was an  
362 approximately 5% increase in haploid cells with long-term exposure (Fig. 5B and 5C;  $P$   
363  $< 0.05$ ). These findings suggest that DOR receptor was also active in spermatogenic  
364 cells.

365 Analyzing the expression of cell markers, our results showed that DOR was mainly  
366 involved in the meiosis phase. The relative expression of *Scpy1* and *Scpy3* ( $P < 0.05$ )  
367 decreased after 1 h of DPDPE treatment (Fig. 5D). However, there were no differences  
368 in spermatogonia marker *Itg6* nor in haploid cell marker *Acr* mRNA levels for short-term  
369 exposure (Fig. 5A and C). On the other hand, DPDPE had an active effect on  
370 spermatogenesis at long-term exposure (Fig. 5E). In fact, there was an increase in  
371 expression of *Sycp1* ( $P < 0.05$ ) and *Sycp3* ( $P < 0.01$ ), followed by an increase in *Acr*  
372 mRNA levels ( $P < 0.05$ ) after 24 h of DPDPE incubation. These data confirmed the  
373 increased in the haploid cell population induced by DPDPE for long-term exposure.

374

375 **Figure 5. Effect of selective DOR-agonist DPDPE on spermatogenesis.** Flow  
376 cytometry histogram of spermatogenesis cell cycle measured by propidium iodide in  
377 control (green) and DPDPE-treated samples (red:  $10^{-6}$  M) for short- (A) and long-term  
378 exposure (B). Representative plot from six experiments. R5 represents the haploid cell  
379 population. Percentage difference between treatment and control of the integrated area  
380 of the haploid cell population for the different times presented as relative expression  
381 mean  $\pm$  SEM of six experiments (C). Relative gene expression of germ cell markers

382 *Itg6*, *Sycp1*, *Sycp3* and *Acr* for short- (D) and long-term exposure (E) with DPDPE.  
383 Data were normalized with beta-actin (*Actb*) as a housekeeping gene and presented as  
384 relative expression mean  $\pm$  SEM of six experiments.

385

## 386 **The effect of KOR-agonist U50488 on spermatogenesis**

387 To determine the role of KOR in mouse spermatogenesis, we carried out the same  
388 experimental design using U50488 as KOR the agonist for short- (1 h) and long-term  
389 exposure (24 h). Although there were no differences in the 1c, DNA-containing cell  
390 populations after 1 h of U50488 treatment (Fig. 6A), KOR also active in spermatogenic  
391 cells similarly to the other receptors. Unexpectedly, U50488 caused an approximately  
392 5% decrease in haploid cell numbers with long-term exposure (Fig. 6B and 6C;  $P <$   
393 0.05). Expression of cell markers showed that KOR was also involved in the meiosis  
394 phase. The expression of *Sycp1* and *Sycp3* decreased ( $P < 0.05$ ) after 1 h of U50488  
395 treatment but there were no differences in mRNA levels of haploid cell marker *Acr* (Fig.  
396 6D). With long-term exposure, however, U50488 led to a decrease in *Sycp1* ( $P < 0.01$ )  
397 and *Acr* ( $P < 0.05$ ) expression, confirming the flow cytometry results (Fig. 6E). The  
398 expression of *Itg6* did not change.

399

400 **Figure 6. Effect of selective KOR-agonist U50488 on spermatogenesis.** Flow  
401 cytometry histogram of spermatogenesis cell cycle measured by propidium iodide in  
402 control (green) and U50488-treated samples (red:  $10^{-6}$  M) for short- (A) and long-term  
403 exposure (B). Representative plot from six experiments. R5 represents the haploid cell  
404 population. Percentage difference between treatment and control of the integrated area  
405 of the haploid cell population for the different times presented as relative expression  
406 mean  $\pm$  SEM of six experiments (C). Relative gene expression of germ cell markers  
407 *Itg6*, *Sycp1*, *Sycp3* and *Acr* for short- (D) and long-term exposure (E) with U50488.

408 Data were normalized with beta-actin (*ACTB*) as a housekeeping gene and presented  
409 as relative expression mean  $\pm$  SEM of six experiments.

410

411 In summary, opioid receptors acted as modulators of spermatogenesis because none  
412 of the agonists completely blocked spermatogenesis. This is also consistent with MOR,  
413 DOR and KOR knockout mice are not completely infertile [30]. For short-term  
414 exposure, the decrease of haploid cells observed after 1 h suggests that MOR  
415 selective agonist inhibited the spermatogenic processes, and the decrease of *Acr*  
416 expression after agonist treatment also confirmed the inhibitory effect of this receptor  
417 on spermatogenesis. However, we observed the opposite effect for long-term  
418 exposure. Not only MOR but also DOR selective agonists promoted *Acr* (cell marker of  
419 spermatids) expression and the haploid cell differentiation suggesting an activator role  
420 of both receptors on spermatogenesis. Similarly to other receptors [13,15], the  
421 activation of compensatory mechanisms can explain the opposite effect of MOR and  
422 DOR with long exposure times . However, further analyses will be needed in this  
423 regard. KOR was also involved in cell proliferation but in this case, the selective  
424 agonist, U50488, produced only a decrease in the haploid cell population and in *Acr*  
425 expression with long-term exposure. This suggests that KOR had an inhibitory effect on  
426 spermatogenesis as it has been described for this receptor in other processes [29].

427

428 Our results also suggest that the three opioid receptors can be involved in meiosis of  
429 mice spermatogenesis by modifying the expression of the synaptonemal complex  
430 proteins SYCP1 and SYCP3. During the first meiotic division, alignment, synapsis and  
431 meiotic recombination are the most crucial events ensuring their proper segregation.  
432 Synapsis is mediated by the synaptonemal complex, a meiosis-specific structure that  
433 assembles between aligned homologous chromosomes, where SYCP1 and SYCP3  
434 proteins act as a structural framework for recruitment of further protein components  
435 [22]. MOR and DOR activation may produce defects in synapsis with short-term

436 exposure by down-regulation of *Sycp3* expression, and *Sycp1* and *Sycp3* expression,  
437 respectively. SYCP1 and SYCP3 knockout mice are infertile [31]. On the one hand,  
438 SYCP1 knockout mice are unable to assemble synaptonemal complex and the  
439 homologous chromosomes fail to synapse [32] and, on the other hand, SYCP3 is  
440 essential for the synaptonemal complex assembly and for accurate meiotic  
441 chromosome compaction [33,34]. The activation of KOR also causes down-regulation  
442 of *Sycp1* with long-term exposure, suggesting that KOR may also inhibit synapsis.  
443 We also observed that long-term exposure to selective MOR and DOR agonists  
444 caused an increase in *Sycp1* and *Sycp3* gene expression (Figs. 4D and 5D). The up-  
445 regulation of both, *Sycp1* and *Sycp3*, is also related to defects in homologous  
446 recombination and appears to be associated with the induction of mitotic catastrophe  
447 and the generation of endopolyploid tumour cells [35,36]. Thus, our results suggest that  
448 the three opioid receptors were negatively involved in meiosis of mice spermatogenesis  
449 by modifying *Sycp1* and *Sycp3* expression, since defective synapses and meiotic  
450 recombination have severe consequences for meiosis progression that can lead to  
451 infertility or aneuploidy in mammals [22].

## 452 **Conclusions**

453 The present study demonstrated for the first time that male germ cells expressed active  
454 MOR, DOR and KOR in mouse. The main conclusions are following:

- 455 1. Active mu-opioid, delta-opioid and kappa-opioid receptors were present in male  
456 germ cells in mouse testes.
- 457 2. The opioid receptors mu-opioid, delta-opioid and kappa-opioid are involved in  
458 the regulation of mouse spermatogenesis.
- 459 3. The three opioid receptors seemed to be involved in the regulation of male  
460 meiosis in mouse modifying the gene expression of synaptonemal complex  
461 proteins

462 Our results contribute to resolving several longstanding issues concerning the role of  
463 opioid receptors in spermatogenesis. These include how morphine may reduce fertility  
464 in rats [37], how methadone administration can produce spermatocyte chromosomal  
465 aberrations in mouse [38] and how transgenic mouse that overexpress pro-enkephalin  
466 (an endogenous opioid peptide protein precursor) in the testes have impaired fertility,  
467 morphologically abnormal testicles and low sperm motility [39]. These finds open up  
468 novel avenues of research of the opioid system as a biochemical tool for the diagnosis  
469 and treatment of male infertility.

470

## 471 **Acknowledgements**

472 This work was supported by grants from the Basque Government and Merck Serono.  
473 Itziar Urizar was supported by a fellowship from the Gangoti Barrera Foundation. The  
474 authors thank Scriptoria Communications (London, UK) for improving the English in  
475 this paper.

476

## 477 **Conflict of interest**

478 The authors have no conflicts of interest to declare.

479

## 480 **Author's contribution**

481 H.E., I.M, M.G and I.U. carried out and analyzed the experiments; L.C. and J.I.  
482 provided conceptual support and N.S. designed the study, analyzed the experiments  
483 and wrote the manuscript.

484

485

## 486 **References**

- 487 1 Feng Y, He X, Yang Y, Chao D, Lazarus LH, Xia Y (2012) Current research on opioid  
488 receptor function. *Curr Drug Targets*. Feb;13(2):230-46.
- 489 2 Subiran N, Casis L, Irazusta J. (2011) Regulation of Male Fertility by the Opioid  
490 System. *Mol Med*. 17(7-8):846-53.
- 491 3 Gaveriaux-Ruff C, and Kieffer BL. (1999) Opioid receptors: gene structure and  
492 function. *Opioids in Pain Control: Basic and Clinical Aspects*. Cambridge University  
493 Press.
- 494 4. Mollereau C, et al Parmentier M, Mailleux P, Butour JL, Moisand C, Chalon P, Caput  
495 D, Vassart G, Meunier JC. (1994) ORL1, a novel member of the opioid receptor family:  
496 cloning, functional expression and localization. *FEBS Lett*. 341:33–8.
- 497 5 Fernandez D, Valdivia A, Irazusta J, Ochoa C, Casis L. (2002) Peptidase activities in  
498 human semen. *Peptides*. 23: 461-8.
- 499 6 Irazusta J, Valdivia A, Fernández D, Agirregoitia E, Ochoa C, Casis L. (2004)  
500 Enkephalin-degrading enzymes in normal and subfertile human semen. *J*  
501 *Androl*.25(5):733-9
- 502 7 Agirregoitia E, Valdivia A, Carracedo A, Casis L, Gil J, Subiran N, Ochoa C, Irazusta  
503 J. (2006) Expression and localization of delta-, kappa-, and mu-opioid receptors in  
504 human spermatozoa and implications for sperm motility. *J Clin Endocrinol Metab*. 91:  
505 4969-75.
- 506 8 Subiran N, Agirregoitia E, Valdivia A, Ochoa C, Casis L, Irazusta J. (2008)  
507 Expression of enkephalin-degrading enzymes in human semen and implications for  
508 sperm motility. *Fertil Steril*. 89: 1571-7.
- 509 9 Subirán N, Candenás L, Pinto FM, Cejudo-Roman A, Agirregoitia E, Irazusta J.  
510 (2012) Autocrine regulation of human sperm motility by the met-enkephalin opioid  
511 peptide. *Fertil Steril*. 98(3):617-625.

- 512 10 de Rooij DG (2001) Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells.  
513 *Reproduction*. 121:347–354.
- 514 11 Roeder GS (1997) Meiotic chromosomes: It takes two to tango. *Genes Dev*.  
515 11:2600–2621.
- 516 12 Fabbri A, Tsai-Morris CH, Luna S, Fraioli F, Dufau ML. Opiate receptors are present  
517 in the rat testis. Identification and localization in Sertoli cells. *Endocrinology*. 1985.  
518 117(6):2544-6
- 519 13 Eto K, Shiotsuki M, Abe S. (2013) Nociceptin induces Rec8 phosphorylation and  
520 meiosis in postnatal murine testes. *Endocrinology*. Aug;154(8):2891-9.
- 521 14 Kotaja N, Kimmins S, Brancorsini S, Hentsch D, Vonesch JL, Davidson I, Parvinen  
522 M, Sassone-Corsi P. (2004) Preparation, isolation and characterization of stage-  
523 specific spermatogenic cells for cellular and molecular analysis. *Nat Methods*.  
524 Dec;1(3):249-54.
- 525 15 Grimaldi P, Orlando P, Di Siena S, Lolicato F, Petrosino S, Bisogno T, Geremia R,  
526 De Petrocellis L, Di Marzo V. (2009) The endocannabinoid system and pivotal role of  
527 the CB2 receptor in mouse spermatogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jul  
528 7;106(27):11131-6.
- 529 16 Tsong SD, Phillips D, Halmi N, Liotta AS, Margioris A, Bardin CW, Krieger DT.  
530 (1982) ACTH and beta-endorphin-related peptides are present in multiple sites in the  
531 reproductive tract of the male rat. *Endocrinology*. 110(6):2204-6
- 532 17 Fabbri A, Knox G, Buczko E, Dufau ML. (1988) Beta-endorphin production by the  
533 fetal Leydig cell: regulation and implications for paracrine control of Sertoli cell function.  
534 *Endocrinology*. 122(2):749-55
- 535 18 Soverchia L, Mosconi G, Ruggeri B, Ballarini P, Catone G, Degl'Innocenti S, Nabissi  
536 M, Polzonetti-Magni AM. (2006) Proopiomelanocortin gene expression and beta-  
537 endorphin localization in the pituitary, testis, and epididymis of stallion. *Mol Reprod*  
538 *Dev*. 73(1):1-8



- 539 19 Russell, L. D. (1990) *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis*,  
540 Clearwater, FL: Cache River Press pp. 119-161.,
- 541 20 Nagamori I, Cruickshank VA, Sassone-Corsi P. (2011) Regulation of an RNA  
542 granule during spermatogenesis: acetylation of MVH in the chromatoid body of germ  
543 cells. *J Cell Sci.* Dec 15;124:4346-55
- 544 21 Phillips BT, Gassei K, Orwig KE. (2010) Spermatogonial stem cell regulation and  
545 spermatogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* May 27;365(1546):1663-78
- 546 22 Fraune J, Schramm S, Alsheimer M, Benavente R. (2012) The mammalian  
547 synaptonemal complex: protein components, assembly and role in meiotic  
548 recombination. *Exp Cell Res.* Jul 15;318(12):1340-6.
- 549 23 Sato T, Katagiri K, Gohbara A, Inoue K, Ogonuki N, Ogura A, Kubota Y, Ogawa T.  
550 (2011) In vitro production of functional sperm in cultured neonatal mouse testes.  
551 *Nature.* Mar 24;471(7339):504-7
- 552 24. Qiao H, Chen JK, Reynolds A, Höög C, Paddy M, Hunter N. (2012) Interplay  
553 between synaptonemal complex, homologous recombination, and centromeres during  
554 mammalian meiosis. *PLoS Genet.* Jun;8(6):e1002790.
- 555 25 Narita M, Kuzumaki N, Miyatake M, et al. (2006). Role of delta-opioid receptor  
556 function in neurogenesis and neuroprotection. *J Neurochem.* 97(5):1494–505.
- 557 26 Kim E, Clark AL, Kiss A, Hahn JW, Wesselschmidt R, Coscia CJ, Belcheva MM.  
558 (2006) Mu- and kappa-opioids induce the differentiation of embryonic stem cells to  
559 neural progenitors. *J Biol Chem.* Nov 3;281(44):33749-60.
- 560 27 Hayward NJ, McKnight AT, Woodruff GN. (1993). Neuroprotective effect of the  
561 kappa-agonist enadoline (CI-977) in rat models of focal cerebral ischaemia. *Eur J*  
562 *Neurosc.* 5(7):961–7.
- 563 28 Malendowicz LK, Rebuffat P, Tortorella C, Nussdorfer GG, Ziolkowska A, Hochol A.  
564 (2005) Effects of met-enkephalin on cell proliferation in different models of  
565 adrenocortical-cell growth. *Int J Mol Med.* 15(5):841–5

- 566 29 Aita M1, Byers MR, Chavkin C, Xu M. (2010) Trigeminal injury causes kappa opioid-  
567 dependent allodynic, glial and immune cell responses in mice. *Mol Pain*. Jan 29;6:8.
- 568 30 Kieffer BL. (1999) Opioids: first lessons from knockout mice. *Trends Pharmacol Sci*.  
569 Jan;20(1):19-26.
- 570 31 Kouznetsova A, Benavente R, Pastink A, Höög C. (2011) Meiosis in mice without a  
571 synaptonemal complex. *PLoS One*. 6(12):e28255.
- 572 32 de Vries FA, de Boer E, van den Bosch M, Baarends WM, Ooms M, Yuan L, Liu JG,  
573 van Zeeland AA, Heyting C, Pastink A. (2005) Mouse Sycp1 functions in synaptonemal  
574 complex assembly, meiotic recombination, and XY body formation. *Genes Dev*. Jun  
575 1;19(11):1376-89.
- 576 33 Yuan L, Liu JG, Zhao J, Brundell E, Daneholt B, Hoog C. (2000) The murine SCP3  
577 gene is required for synaptonemal complex assembly, chromosome synapsis, and  
578 male fertility. *Mol. Cell* 5 73–83.
- 579 34 Baudat F, Imai Y, de Massy B. (2013) Meiotic recombination in mammals:  
580 localization and regulation. *Nat Rev Genet*. Nov;14(11):794-806.
- 581 35 Kalejs M, Ivanov A, Plakhins G, Cragg MS, Emzinsh D, Illidge TM, Erenpreisa J.  
582 (2006) Upregulation of meiosis-specific genes in lymphoma cell lines following  
583 genotoxic insult and induction of mitotic catastrophe. *BMC Cancer*. Jan 9;6:6.
- 584 36 Hosoya N, Okajima M, Kinomura A, Fujii Y, Hiyama T, Sun J, Tashiro S, Miyagawa  
585 K. (2011) Synaptonemal complex protein SYCP3 impairs mitotic recombination by  
586 interfering with BRCA2. *EMBO Rep*..Dec 23;13(1):44-51
- 587 37 Cicero TJ, Davis LA, LaRegina MC, Meyer ER, Schlegel MS. (2002) Chronic opiate  
588 exposure in the male rat adversely affects fertility. *Pharmacol Biochem Behav*.  
589 May;72(1-2):157-63.
- 590 38 Badr FM, Rabouh SA, Badr RS. (1979) On the mutagenicity of methadone  
591 hydrochloride. Induced dominant lethal mutation and spermatocyte chromosomal  
592 aberrations in treated males. *Mutat Res*. Nov;68(3):235-49.

593 39 O'Hara BF, Donovan DM, Lindberg I, Brannock MT, Ricker DD, Moffatt CA,  
594 Klaunberg BA, Schindler C, Chang TS, Nelson RJ, et al. (1994) Proenkephalin  
595 transgenic mice: a short promoter confers high testis expression and reduced fertility.  
596 Mol Reprod Dev 38(3):275-84

597

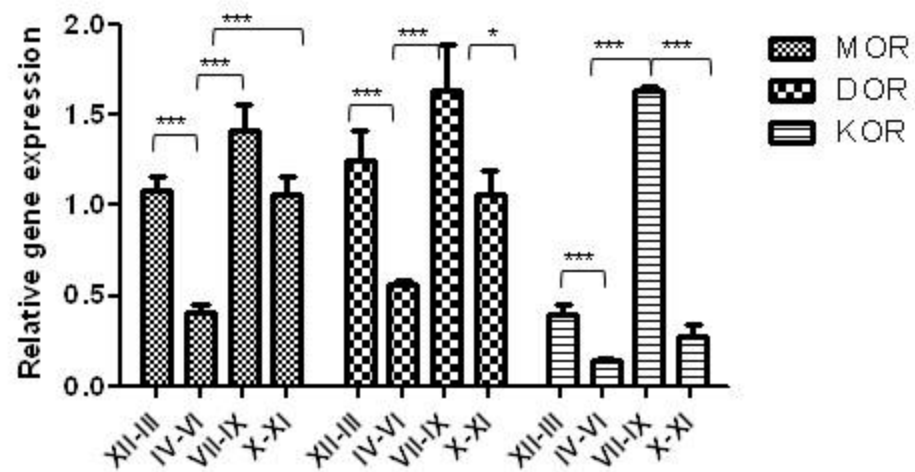
598

#### 599 SUPPORTING INFORMATION

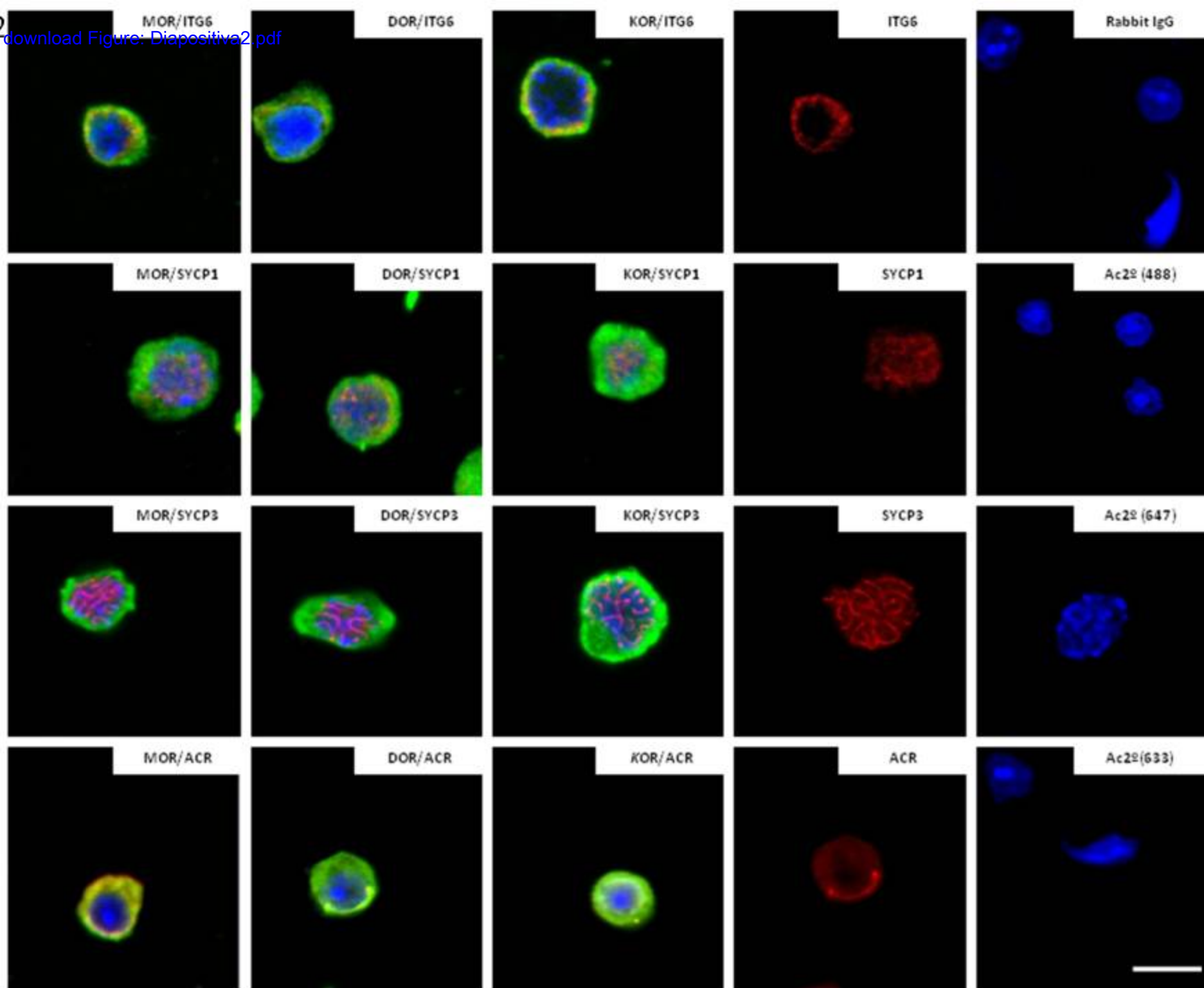
600 Figure S1. Localization of opioid receptors in mouse spermatozoa. Immunofluorescence  
601 analysis of MOR (A), DOR (B) and KOR (D) with male germ cell markers. Negative  
602 controls were treated with preimmune rabbit serum (D) and secondary antibody alone  
603 (E). Nucleus were stained with Hoescht 33258. Representative photomicrographs are  
604 shown; n = 5.

605

Figure 1  
[Click here to download Figure: Diapositiva1.pdf](#)



A



B

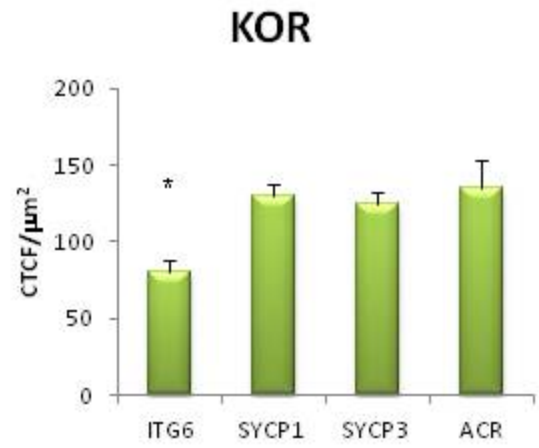
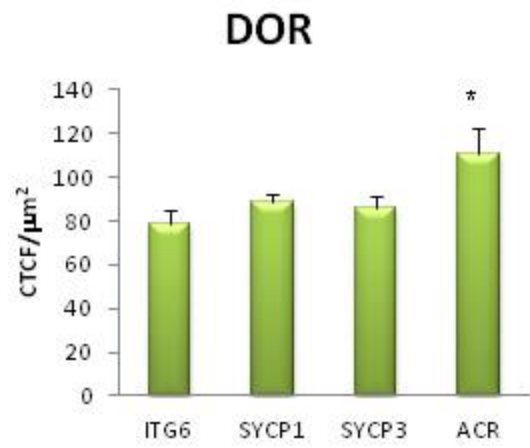
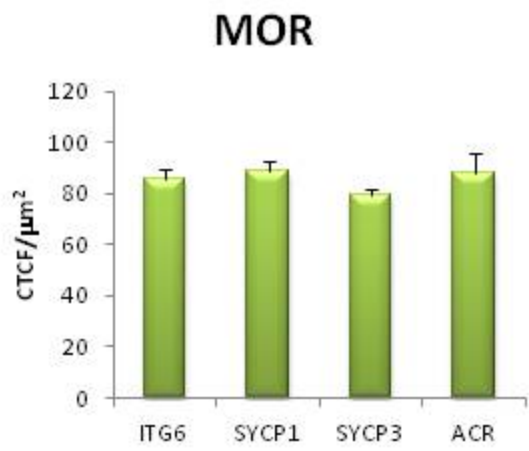


Figure 3

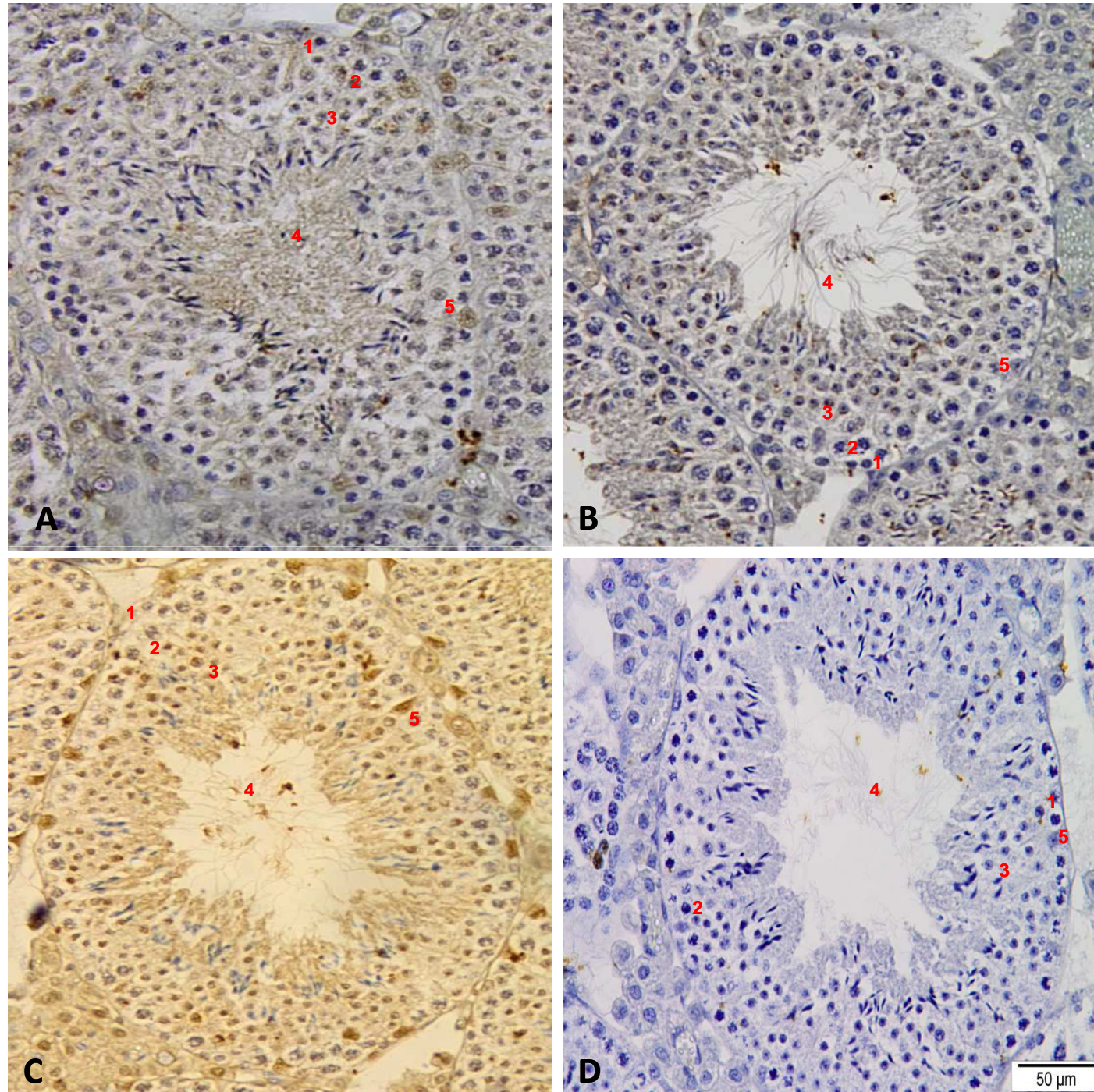


Figure 4  
[Click here to download Figure: Diapositiva5.pdf](#)

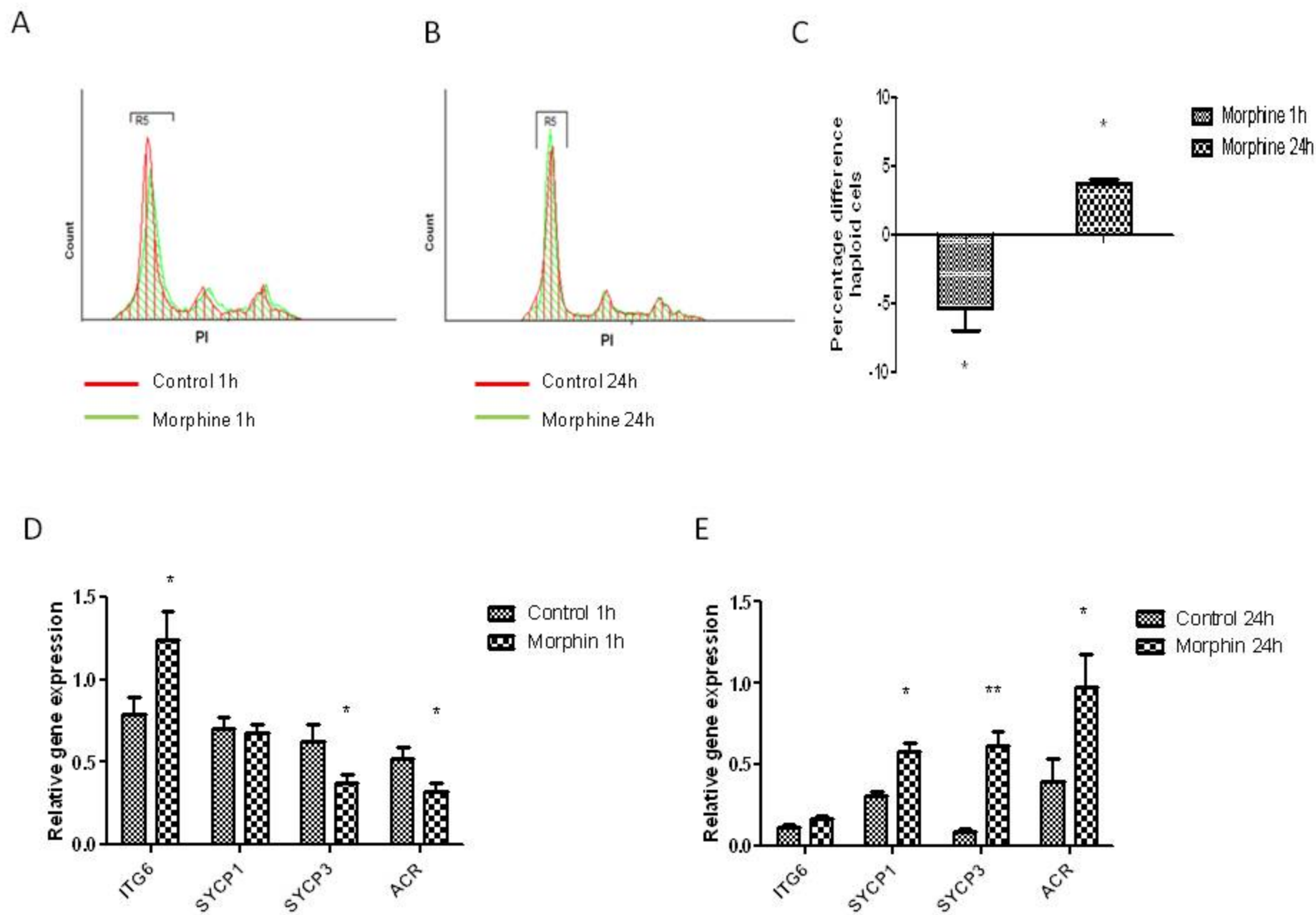




Figure 5  
Click here to download Figure: Diapositiva6.pdf

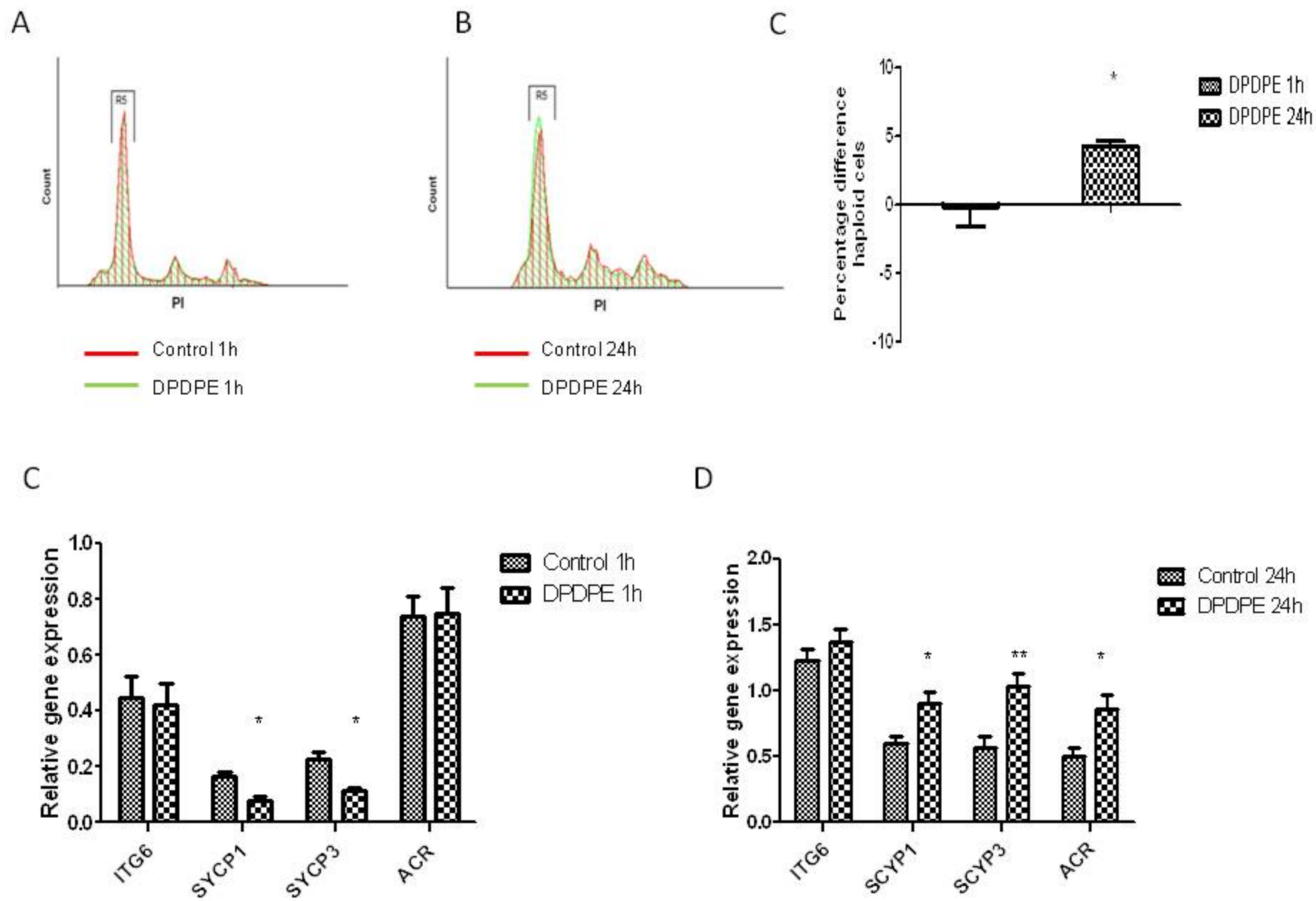


Figure 6  
Click here to download Figure: Diapositiva7.pdf

