



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



---

# Contingut i funció dels miRNAs de l'espermatozoide humà: implicacions reproductives

---

Memòria presentada per Albert Salas-Huetos  
per optar al grau de Doctor per la Universitat Autònoma de Barcelona  
dins el programa del doctorat en Biologia Cel·lular

Autor:

**Albert Salas-Huetos**

Directors:

Dra. Ester Anton Martorell i Dr. Joan Blanco Rodríguez

Bellaterra, 26 de novembre de 2015



Contingut i funció dels miRNAs de l'espermatozoide humà: implicacions reproductives de Albert Salas-Huetos està subjecta a una llicència de [Reconeixement-NoComercial-SenseObraDerivada 4.0 Internacional de Creative Commons](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)





La **Dra. Ester Anton Martorell**, professora agregada del Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia de la Universitat Autònoma de Barcelona,  
i el **Dr. Joan Blanco Rodríguez**, professor agregat del Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia de la Universitat Autònoma de Barcelona,

CERTIFIQUEN:

Que **Albert Salas-Huetos** ha realitzat sota la seva direcció el treball d'investigació que s'exposa en la memòria titulada "Contingut i funció dels miRNAs de l'espermatozoide humà: implicacions reproductives" per optar al grau de **Doctor per la Universitat Autònoma de Barcelona**.

Que aquest treball s'ha dut a terme a la **Unitat de Biologia Cel·lular** del Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia de la Universitat Autònoma de Barcelona, dins el Programa de Doctorat en Biologia Cel·lular.

I perquè així consti signen en següent certificat,

**Dra. Ester Anton Martorell**

**Dr. Joan Blanco Rodríguez**

Bellaterra, 26 de novembre de 2015

El present treball s'ha realitzat amb el finançament dels projectes:

- Generalitat de Catalunya, SGR2014-524
- Merck-Serono, 2011FE16
- Instituto de Salud Carlos III, FIS PS09/00330
- Generalitat de Catalunya, SGR2009-282

L'autor, Albert Salas-Huetos, s'ha beneficiat d'una beca predoctoral per a Personal Investigador en Formació (PIF-UAB 456-01-1/E2010) concedida per la Universitat Autònoma de Barcelona.

Al meu pare, per ser el millor referent,  
a la meva mare, per ser sincera en tot moment,  
a la meva germana, per ensenyar-me que es pot  
viure diferent,  
i al meu germà, per estimar-me i fer-me sentir el seu  
referent.  
En general a la meva família per estar sempre al meu  
costat i fer-me sentir estimat...

... i a l'Anna, per aparèixer en el moment adequat.

“If we knew what it was we were doing, it would not be called research, would it?”

Albert Einstein

“Tot es pot curar amb una mica d'aigua, sabó i un petó...”

La filosofia de l'Esplai



**UAB**

Universitat Autònoma de Barcelona



Departament de Biologia Cel·lular,  
Fisiologia i Immunologia

---

# **Contingut i funció dels miRNAs de l'espermatozoide humà: implicacions reproductives**

---

**Albert Salas-Huetos**

Bellaterra, 26 de novembre de 2015



# Índex

I. Acrònims .....	17
II. Resum .....	21
III. Abstract .....	23
<b>Capítol 1. Introducció .....</b>	<b>25</b>
<b>1.1. Infertilitat masculina .....</b>	<b>27</b>
1.1.1. Anomalies urogenitals .....	27
1.1.2. Anomalies genètiques .....	28
1.1.3. Alteracions del seminograma .....	30
<b>1.2. Transcriptoma .....</b>	<b>32</b>
1.2.1. Els miRNAs .....	32
1.2.1.1. Localització genòmica dels miRNAs .....	33
1.2.1.2. Biogènesi dels miRNAs .....	33
1.2.1.3. Mecanismes d'acció dels miRNAs .....	36
1.2.1.4. Funcions dels miRNAs .....	36
1.2.2. Els miRNAs en la reproducció humana .....	37
1.2.3. Desregulació de miRNAs i infertilitat .....	38
<b>Capítol 2. Hipòtesi i objectius .....</b>	<b>43</b>
<b>2.1. Hipòtesi .....</b>	<b>45</b>
<b>2.2. Objectius .....</b>	<b>45</b>
<b>Capítol 3. Material i mètodes .....</b>	<b>47</b>
<b>3.1. Material biològic .....</b>	<b>49</b>
<b>3.2. Mètodes .....</b>	<b>52</b>
3.2.1. Purificació espermàtica .....	53
3.2.2. Extracció d'RNA .....	54
3.2.4. Quantificació de l'expressió de miRNAs .....	59
3.2.4.1. RT-PCR .....	59
3.2.4.2. Preamplificació .....	60
3.2.4.3. qRT-PCR .....	61

3.2.5.	Anàlisi de dades de qRT-PCR .....	64
3.2.6.	Anàlisi estadística .....	66
3.2.6.1.	Dades provinents d'assajos individuals (Publicació 1) .....	67
3.2.6.2.	Dades provinents d'assajos múltiples en plaques preconfigurades (Publicacions 2 i 3) .....	67
<b>Capítol 4.</b>	<b>Resum resultats .....</b>	<b>73</b>
<b>4.1.</b>	<b>Purificació espermàtica i extracció del transcriptoma d'espermatozoides .....</b>	<b>75</b>
4.1.1.	Purificació espermàtica .....	75
4.1.2.	Extracció d'RNA .....	75
4.1.2.1.	Quantitat i puresa .....	75
4.1.2.2.	Controls de qualitat .....	77
4.1.3.	Validació de la presència de miRNAs en espermatozoides .....	80
<b>4.2.</b>	<b>Perfils d'expressió en individus fèrtils .....</b>	<b>81</b>
4.2.1.	miRNAs presents i absents en individus fèrtils .....	81
4.2.2.	Homogeneïtat de la població fèrtil .....	82
4.2.3.	Anàlisi de l'efecte de les variables edat i seminograma sobre l'expressió de miRNAs de la població fèrtil .....	83
4.2.4.	Predicció de gens diana i ontologia gènica en la població fèrtil .....	83
4.2.5.	Paralles de miRNA estables com a candidats a biomarcadors .....	85
4.2.6.	Selecció de miRNAs normalitzadors i validació com a candidats a normalitzadors .....	86
<b>4.3.</b>	<b>Perfils d'expressió en individus amb astenozoospermia .....</b>	<b>86</b>
4.3.1.	miRNAs presents i absents en individus amb astenozoospermia .....	87
4.3.2.	Homogeneïtat de la població amb astenozoospermia .....	87
4.3.3.	DE-miRNAs en la població amb astenozoospermia .....	88
4.3.4.	Caracterització de regions genòmiques que inclouen els DE-miRNAs de la població amb astenozoospermia .....	88
4.3.5.	Predicció de gens diana i ontologia gènica en la població amb astenozoospermia .....	90
<b>4.4.</b>	<b>Perfils d'expressió en individus amb teratozoospermia .....</b>	<b>91</b>
4.4.1.	miRNAs presents i absents en individus amb teratozoospermia .....	91
4.4.2.	Homogeneïtat de la població amb teratozoospermia .....	92
4.4.3.	DE-miRNAs en la població amb teratozoospermia .....	93
4.4.4.	Caracterització de regions genòmiques que inclouen els DE-miRNAs de la població amb teratozoospermia .....	93
4.4.5.	Predicció de gens diana i ontologia gènica en la població amb teratozoospermia .....	94
<b>4.5.</b>	<b>Perfils d'expressió en individus amb oligozoospermia .....</b>	<b>96</b>

4.5.1.	miRNAs presents i absents en individus amb oligozoospermia .....	97
4.5.2.	Homogeneïtat de la població amb oligozoospermia .....	97
4.5.3.	DE-miRNAs en la població amb oligozoospermia .....	98
4.5.4.	Caracterització de regions genòmiques que inclouen els DE-miRNAs de la població amb oligozoospermia .....	98
4.5.5.	Predicció de gens diana i ontologia gènica en la població amb oligozoospermia .....	99
<b>4.6.</b>	<b>Anàlisi global de les poblacions .....</b>	<b>101</b>
4.6.1.	Semblances dels perfils d'expressió en funció dels miRNAs presents/absents .....	101
4.6.2.	Efecte de les variables edat, seminograma i anomalies cromosòmiques numèriques sobre l'expressió de miRNAs .....	102
4.6.3.	Anàlisi de l'agrupació dels individus en funció de perfils d'expressió de miRNAs .....	103
4.6.4.	Caracterització de regions genòmiques en les que s'inclouen els DE-miRNAs .....	105
4.6.5.	Identificació de gens associats a espermatogènesi i meïosi .....	107
<b>Capítol 5.</b>	<b>Publicacions .....</b>	<b>109</b>
	Publicació I .....	111
	Publicació II .....	119
	Publicació III .....	143
<b>Capítol 6.</b>	<b>Discussió general .....</b>	<b>163</b>
<b>6.1.</b>	<b>Extracció del transcriptoma espermàtic .....</b>	<b>165</b>
6.1.1.	Purificació de la fracció espermàtica .....	165
6.1.2.	Extracció d'RNA .....	166
6.1.3.	Controls de qualitat .....	167
6.1.4.	Validació de la presència de miRNAs en espermatozoides .....	168
<b>6.2.</b>	<b>Normalització de les dades .....</b>	<b>169</b>
<b>6.3.</b>	<b>Expressió de miRNAs en espermatozoides d'individus fèrtils .....</b>	<b>171</b>
6.3.1.	Homogeneïtat de la població fèrtil .....	171
6.3.2.	Característiques generals dels miRNAs espermàtics .....	171
6.3.3.	Parelles de miRNA estables com a candidats a biomarcadors .....	178
<b>6.4.</b>	<b>Perfils d'expressió de miRNAs en individus infèrtils .....</b>	<b>179</b>
6.4.1.	Homogeneïtat de les poblacions infèrtils .....	179
6.4.2.	Variables explicatives dels perfils d'expressió .....	179
6.4.2.1.	Relació amb seminograma .....	180
6.4.2.2.	Relació amb edat .....	181

6.4.2.3.	Relació amb anomalies cromosòmiques numèriques .....	182
6.4.2.4.	Relació amb resultats de TRA .....	183
6.4.3.	Caracterització dels DE-miRNAs .....	183
6.4.3.1.	Localització genòmica dels DE-miRNAs .....	184
6.4.3.2.	Predicció de gens diana dels DE-miRNAs i ontologia gènica .....	184
<b>Capítol 7.</b>	<b>Conclusions</b> .....	<b>187</b>
<b>IV.</b>	<b>Annex</b> .....	<b>191</b>
	<b>IV.1. Material suplementari</b> .....	<b>191</b>
	<b>IV.2. Scripts</b> .....	<b>209</b>
<b>V.</b>	<b>Bibliografia</b> .....	<b>217</b>

# I. Acrònims

<b>3'UTR</b>	<i>3' untranslated region</i> ; regió 3' no traduïda
<b>AGO</b>	<i>Argonaute proteins</i> ; proteïnes argonauta
<b>AP-2</b>	<i>Activator protein-2</i>
<b>AR</b>	<i>Androgen receptor</i> ; gen receptor d'andrògens
<b>AZF</b>	<i>Azoospermia factor</i> ; factor d'azoospermia
<b>CCR</b>	<i>Concordance correlation restricted</i>
<b>CD45/PTPRC</b>	<i>Protein tyrosine phosphatase, receptor type, C</i>
<b>CFTR</b>	<i>Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
<b>Cook's Di</b>	<i>Cook's distance</i> ; distància de Cook
<b>Ct</b>	<i>Cycle threshold</i> ; cicle llidar
<b>DE</b>	Desviació estàndard
<b>DE-miRNAs</b>	<i>Differential expressed miRNAs</i> ; miRNAs diferencialment expressats
<b>CPEB</b>	<i>Cytoplasmic polyadenylation element binding</i>
<b>DRM</b>	<i>Detergent resistant membranes</i> ; membranes resistents a detergents
<b>DGCR8</b>	<i>DiGeorge syndrome critical region gene 8</i>
<b>dNTPs</b>	Desoxiribonucleòtids trifosfat
<b>dTTPs</b>	Desoxitimidina trifosfat
<b>E2F-pRb</b>	<i>Transcription factor 1-retinoblastoma protein</i>
<b>FAM</b>	<i>6-carboxyfluorescein</i>
<b>FDR</b>	<i>Benjamini-Hochberg false-discovery rate</i> ; correcció per falsos descobriments de Benjamini-Hochberg
<b>FIGN</b>	<i>Fidgetin belongs to the superfamily of ATPases associated with diverse cellular activities (AAA-ATPases)</i>
<b>FISH</b>	<i>Fluorescent in situ hybridization</i> ; hibridació <i>in situ</i> fluorescent
<b>GADPH</b>	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
<b>GO</b>	<i>Gene ontology</i> ; ontologia gènica
<b>hnRNPs</b>	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins</i> ; ribonucleoproteïnes nuclears heterogènies
<b>KLF12</b>	<i>Kruppel-like factor 12</i>
<b>Lhx1</b>	<i>LIM homeobox 1</i>

<b>lncRNAs</b>	<i>Long non-coding RNAs</i> ; RNAs no codificants llargs
<b>MCR</b>	<i>Mean-centering restricted</i>
<b>MIQE</b>	<i>Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments</i> ; informació mínima per publicar experiments de qRT-PCR
<b>miRISC</b>	<i>MiRNA-induced silencing complex</i> ; complex funcional de silenciament del miRNA
<b>miRNAs</b>	MicroRNAs
<b>miTG</b>	<i>MiRNA target gene</i>
<b>MLL</b>	<i>Mixed-lineage leukemia</i>
<b>mRNAs</b>	<i>Messenger RNAs</i> ; RNAs missatgers
<b>MYC</b>	<i>V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
<b>ncRNAs</b>	<i>Non-coding RNAs</i> ; RNAs no codificants
<b>NGS</b>	<i>Next generation sequencing</i> ; seqüenciació de nova generació
<b>NOA</b>	<i>Non-obstructive azoospermia</i> ; azoospermia no obstructiva
<b>normCt</b>	<i>Normalized cycle threshold</i> ; cicle llindar normalitzat
<b>OA</b>	<i>Obstructive azoospermia</i> ; azoospermia obstructiva
<b>PASHA</b>	<i>Partner of DROSHA</i>
<b>PCR</b>	<i>Polymerase chain reaction</i> ; reacció en cadena de la polimerasa
<b>piRNAs</b>	Piwi-RNAs
<b>pre-miRNAs</b>	<i>Precursor microRNAs</i> ; miRNAs precursors
<b>pri-miRNAs</b>	<i>Primary microRNAs</i> ; miRNAs primaris
<b>PRM1</b>	<i>Protamine 1</i> ; Protamina 1
<b>PTPRD</b>	<i>Protein tyrosine phosphatase receptor type delta</i>
<b>qRT-PCR</b>	<i>Quantitative real-time polymerase chain reaction</i> ; reacció en cadena de la polimerasa en temps real quantitativa
<b>RIN</b>	<i>RNA integrity number</i>
<b>RNA</b>	<i>Ribonucleic acid</i> ; àcid ribonucleic
<b>RNA Pol II</b>	RNA polimerasa II
<b>RNA Pol III</b>	RNA polimerasa III
<b>RNAseq</b>	<i>RNA sequencing</i> ; seqüenciació d'RNA
<b>rRNAs</b>	<i>Ribosomal RNAs</i> ; RNAs ribosòmics
<b>RT-PCR</b>	<i>Reverse transcription-polymerase chain reaction</i> ; reacció en cadena de la polimerasa amb transcripció inversa
<b>SCL</b>	<i>Somatic cell lysis</i>

<b>SCLB</b>	<i>Somatic cell lysis buffer</i>
<b>SCP</b>	<i>Synaptonemal complex proteins</i>
<b>SD</b>	Sense dades publicades
<b>siRNAs</b>	<i>Small interfering RNA</i> ; RNAs petits d'interferència
<b>sncRNA</b>	<i>Small non-coding RNAs</i> ; RNAs no codificants petits
<b>snoRNAs</b>	<i>Small nucleolar RNAs</i> ; RNAs nucleolars petits
<b>SNP</b>	<i>Single nucleotide polymorphism</i> ; polimorfismes d'un sol nucleòtid
<b>snRNAs</b>	<i>Small nuclear RNAs</i> ; RNAs nuclears petits
<b>TAMRA</b>	<i>Tetramethylrhodamine</i>
<b>TGFB1</b>	<i>Transformin growth factor beta-1</i>
<b>TNRC6B</b>	<i>Trinucleotide repeat-containing 6B</i>
<b>TRA</b>	Tècniques de reproducció assistida
<b>TRBP</b>	<i>Transactivating response RNA-binding protein</i>
<b>tRNAs</b>	<i>Transfer RNAs</i> ; RNAs de transferència
<b>WHO</b>	<i>World Health Organization</i> ; Organització Mundial de la Salut



# II. Resum

Els miRNAs són molècules de 22-24nt implicades en la regulació de l'expressió gènica de nombrosos processos biològics. Alguns autors han identificat perfils d'expressió de miRNAs alterats en diversos casos d'infertilitat masculina i han suggerit que aquests poden estar associats a anomalies dels processos d'espermatogènesi i embriogènesi.

Els objectius d'aquesta tesi van incloure: i) Optimitzar un mètode d'extracció del transcryptoma complet dels espermatozoides humans que inclogui els miRNAs; ii) Caracteritzar els perfils d'expressió de miRNAs en espermatozoides procedents d'individus fèrtils i infèrtils; iii) Avaluar la relació entre els perfils obtinguts i les característiques del seminograma, l'edat, la incidència d'anomalies cromosòmiques numèriques en espermatozoides, i els resultats de les tècniques de reproducció assistida (TRA) dels individus estudiats; iv) Identificar els miRNAs diferencialment expressats (DE-miRNAs) en les poblacions d'individus infèrtils, així com les seves dianes potencials i els gens continguts en les seves unitats de transcripció, per tal de valorar la possible afectació de processos relacionats amb l'espermatogènesi i embriogènesi.

Es van obtenir mostres de semen de 14 individus fèrtils i 34 infèrtils. De tots ells es va recollir informació referent a l'edat i els paràmetres seminals. En els individus infèrtils, també es va obtenir informació en relació a la incidència d'anomalies cromosòmiques numèriques en espermatozoides i de les TRA a què es van sotmetre les parelles. Quatre mostres de semen de pacients fèrtils i quatre de pacients infèrtils es van utilitzar per desenvolupar un protocol d'obtenció d'RNA espermàtic total (inclosos els miRNAs). Aquest es va aplicar sobre les mostres restants: 10 individus fèrtils (població control) i 30 pacients infèrtils amb alteracions pures del seminograma (n=10 astenozoospermia, n=10 teratozoospermia, n=10 oligozoospermia). En tots ells es van analitzar els valors d'expressió de 736 miRNAs per qRT-PCR mitjançant la tecnologia TaqMan®.

La població fèrtil va mostrar perfils d'expressió de miRNAs espermàtics altament homogenis, fet que indica una retenció no aleatòria d'aquestes molècules durant l'espermatogènesi. L'anàlisi d'ontologia gènica dels processos biològics associats a les

dianes predites del miRNAs presents de forma ubiqua en els espermatozoides d'aquests individus va mostrar un enriquiment de funcions rellevants per la fertilitat, com són la diferenciació i desenvolupament cel·lular, la morfogènesi, i l'embriogènesi. La valoració de la similitud dels perfils d'expressió del conjunt de mostres analitzades va mostrar una classificació dels individus en dos grups clarament diferenciats que mostraven una associació amb el seminograma dels pacients. També es van observar miRNAs correlacionats amb motilitat, concentració espermàtica i l'edat dels individus. Per altra banda, es van identificar 57 DE-miRNAs en espermatozoides d'individus infèrtils: 32 DE-miRNAs en la població d'individus amb astenozoospèrmia, 19 DE-miRNAs en la d'individus amb teratozoospèrmia i 18 en la d'individus amb oligozoospèrmia. L'anàlisi de les dianes predites pels DE-miRNAs mitjançant ontologia gènica va mostrar un enriquiment de processos biològics relacionats amb l'embriogènesi i amb les alteracions seminals específiques presents en els individus analitzats.

# III. Abstract

MiRNAs are molecules of 22–24nt that have been shown to play an important role in many biological processes. Some authors have identified altered expression profiles in different cases of male infertility suggesting their participation in the processes of spermatogenesis and embryogenesis.

The objectives of this Thesis were: i) To optimize a method for isolating the total human sperm transcriptome, including miRNAs; ii) To characterize the miRNA expression profile in spermatozoa from human fertile and infertile individuals; iii) To evaluate the relationship between expression profiles and seminal parameters, age, incidence of numerical chromosome abnormalities, and the results of assisted reproductive techniques (ART) of the individuals analyzed; iv) To identify the differentially expressed miRNAs (DE-miRNAs) in each infertile population and their association to spermatogenesis and embryogenesis.

Ejaculated samples from 14 fertile donors and 34 infertile patients were obtained. Information about age and sperm parameters was collected from all individuals. In infertile patients, data about the incidence of sperm numerical chromosome abnormalities and ART outcome were also compiled. Four semen samples from fertile individuals and four from infertile patients were used to optimize a protocol to isolate total sperm RNA (including miRNAs). The optimized protocol was applied on 10 fertile individuals (control population), and 30 infertile patients with pure seminogram alterations (n=10 asthenozoospermic, n=10 teratozoospermic, and n=10 oligozoospermic). The expression levels of 736 miRNAs were analyzed by qRT-PCR using TaqMan® technology.

The fertile population showed a highly homogenous miRNA expression profiles, supporting a non-stochastic retention of these molecules during spermatogenesis. The ontological analysis of the predicted target genes of the ubiquitous miRNAs present in sperm from these individuals showed an enrichment of essential processes for fertility such as cell differentiation and development, morphogenesis, and embryogenesis. In the evaluation of the similarity among miRNA expression profiles, all samples

were distributed in two main clusters. This distribution showed a significant association with the seminogram. Moreover, some miRNAs correlated with individual's age, sperm motility and sperm concentration. Infertile patients presented 57 DE-miRNAs: 32 DE-miRNAs in the asthenozoospermic population, 19 in the teratozoospermic population, and 18 in the oligozoospermic population. The ontological analysis of the predicted target genes of these DE-miRNAs revealed a significant enrichment of biological processes related the specific seminal alterations present in each group of individuals and embryogenesis.

# Capítol 1. Introducció



# Capítol 1. Introducció

## 1.1. Infertilitat masculina

La Organització Mundial de la Salut (*World Health Organization*; WHO) defineix la infertilitat<sup>1</sup> com la incapacitat de concebre després de 12 mesos o més de vida sexual regular i activa, sense protecció i en edat reproductiva (WHO, 2010).

Els problemes de fertilitat afecten al 15% de les parelles dels països desenvolupats (revisat per Evers, 2002). Entre les parelles infèrtils s'estima que un 40-50% dels casos presenten infertilitat d'origen masculí, un 40-50% són deguts a factors femenins, mentre que l'origen mixt és present en el 15-20% de les parelles (Dohle *et al.*, 2005).

Les causes principals de la infertilitat masculina són les anomalies urogenitals, les anomalies genètiques i les alteracions del seminograma.

### 1.1.1. Anomalies urogenitals

Les anomalies urogenitals afecten un 15-30% dels pacients amb infertilitat masculina (Sabanegh, 2011). Els trastorns més freqüents que es poden observar en aquests individus són:

- Criptorquídia: Descens incomplet dels testicles des de l'abdomen fins l'escrot.
- Varicocele: Dilatació de les venes que drenen els testicles amb el conseqüent deteriorament de la funció testicular.
- Traumatismes testiculars: Lesió dels testicles per accions mecàniques externes.
- Infeccions del tracte genitourinari: Infecció bacteriana, fúngica o vírica del tracte genitourinari.
- Obstruccions del tracte genitourinari: Bloqueig del flux de semen.

---

<sup>1</sup> Tot i que alguns autors defensen diferències entre els termes infertilitat i esterilitat (Segen, 2006), aquesta distinció és controvertida (revisat per Gurunath *et al.*, 2011). A més a més, alguns autors també utilitzen el terme de subfertilitat per englobar els dos conceptes. En aquesta Tesi s'utilitzarà el terme infertilitat per fer referència a la reducció de la capacitat reproductiva d'un individu que implica una dificultat per concebre o dur un embaràs a terme.

- Torsió testicular: Torsió del cordó espermàtic amb la conseqüent interrupció del rec sanguini als testicles que pot provocar necrosi.
- Càncer testicular o prostàtic: Trastorn neoplàsic de les cèl·lules del testicle o pròstata que pot provocar una proliferació incontrolada d'aquestes.

### 1.1.2. Anomalies genètiques

La presència d'anomalies genètiques afecta un 15-30% dels individus que consulten per infertilitat (revisat per [Küpker et al., 1999](#); [Ferlin et al., 2007](#)). En la majoria dels casos l'alteració genètica comporta anomalies del seminograma. La infertilitat d'origen genètic es classifica en tres grans blocs: (i) delecions del cromosoma Y, (ii) anomalies cromosòmiques, i (iii) mutacions gèniques.

#### Delecions del cromosoma Y

És la causa genètica més freqüent en individus amb azoospermia o oligozoospermia severa i pot afectar un 5-10% d'aquests pacients. La banda Yq11 conté el factor d'azoospermia (*azoospermia factor*; AZF) que inclou gens crítics pel desenvolupament correcte de l'espermatogènesi. Les delecions d'aquests gens provoquen un bloqueig parcial o total de l'espermatogènesi (revisat per [Vogt, 1998](#); [Navarro-Costa et al., 2010](#)). En aquesta regió s'han identificat tres subregions diferents: AZFa, AZFb, AZFc. La regió més afectada és la AZFc (fins a un 70%) mentre que les delecions que afecten a la resta de regions són minoritàries (revisat per [Navarro-Costa et al., 2010](#)).

#### Anomalies cromosòmiques

El 2-8% dels individus que consulten per infertilitat són portadors d'anomalies cromosòmiques (revisat per [Ferlin et al., 2007](#)) que poden ser numèriques (quan impliquen una variació en el nombre de cromosomes) o estructurals (que comporten una variació de la distribució de segments de DNA en els cromosomes). Les anomalies numèriques més freqüents en pacients infèrtils són les trisomies 47,XXY i 47,XYY (revisat per [Mau-Holzmann, 2005](#)). Les alteracions estructurals més freqüents són les translocacions Robertsonianes i recíproques (revisat per [Mau-Holzmann, 2005](#)).

Els individus portadors d'aquests tipus d'alteracions en el cariotip normalment presenten una reducció en la producció d'espermatozoides així com un augment de gàmetes amb anomalies cromosòmiques numèriques i/o estructurals. Aquests desequilibris

poden donar lloc a avortaments espontanis o al naixement d'individus amb cromosomopaties (revisat per Pellestor *et al.*, 2011; Harton i Tempest, 2012).

### Mutacions gèniques

S'han identificat més d'un centenar de gens relacionats amb la gametogènesi masculina i la funció espermàtica que, en cas de presentar mutacions, produeixen alteracions del seminograma i per tant condicionen la fertilitat dels individus (**Taula 1.1**) (revisat per Matzuk i Lamb, 2008). Entre ells, destaquen per la seva incidència entre la població occidental, el gen regulador de la conductància transmembrana de la fibrosi quística (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*; *CFTR*) i el gen receptor d'andrògens (*androgen receptor*; *AR*).

*CFTR* codifica per una proteïna transmembrana implicada en el transport de clor. En l'epiteli de l'epidídim, aquest canal regula la secreció d'electròlits i d'aigua, i per tant, és essencial per una òptima maduració i transport dels espermatozoides. S'han descrit fins a 1,600 mutacions d'aquest gen que poden causar diferents fenotips. Mutacions severes en homozigosi estan implicades en l'aparició de fibrosi quística (la malaltia d'origen autosòmic recessiu més comú en la raça caucàsica amb una incidència de 1:2,500 nounats). No obstant, mutacions lleus en homozigosi s'associen a una absència congènita de vasos deferents que desencadena una azoospermia obstructiva (*obstructive azoospermia*; OA). El 5.7% dels individus infèrtils presenten mutacions d'aquest gen, percentatge que augmenta fins al 60-70% en pacients amb OA (revisat per Ferlin *et al.*, 2006).

El gen *AR* codifica per un receptor d'andrògens. Els receptors d'andrògens permeten que les cèl·lules puguin respondre de manera adequada a aquestes hormones. Mutacions en aquest gen causen una gran varietat d'alteracions, que conjuntament es coneixen com el síndrome d'insensibilitat als andrògens. Les alteracions poden desencadenar un fenotip molt variable que pot anar des de criptorquídia, hipospàdia, o ginecomàstia, a alteracions dels genitals masculins o infertilitat masculina per un bloqueig meiòtic en l'espermatogènesi. El 2% dels individus infèrtils presenten mutacions d'aquest gen (revisat per Ferlin *et al.*, 2006).

**Taula 1.1.** Mutacions gèniques relacionades amb alteracions seminals (revisat per Matzuk i Lamb, 2008).

Gens	Alteracions seminals
AKAP3; AKAP4C; CATSPER2; DNMT3B; DHAH5; DNAH11; DNAL1; PDYN; GNA12; MTHFR; MT-ND4; PIGA; POLG; PPM1G; PRKAR1A; SHBG; SPAG16; TEKT1; TEKT2; TPN1; TPN2; TXNDC3	Astenozoospermia
AURKC; PRM1; PVRL2; SPATA16; SP1	Teratozoospermia
MT-ATP6; EGF; FASL; H19; MEST; KLHL10; PIGA; PRM1; PRM2; SHBG; SDHA; TSSK4; UBE2B; VASA	Oligozoospermia
APOB; ACSBG2; ART3; ATM; BOULE; BPY2; BRCA2; CDY1; CFTR; CREM; DAZ; DDX25; DDX3Y; DRFFY; ERCC1; ERCC2; FASLG; FHL5; FKBP6; HNRNPC; HSFY1; KLHL10; LAP3; MBOAT1; MEI1; MLH1; MLH3; MTR; NLRP14; PRDM16; RBMX; RBMY1A1; RBMY1F; SPATA16; SYCP1; SYCP3; TAF7L; TGIF2LX; TSPY; TSSK4; UBE2B; USP26; UTP14C; USP9Y; UTY; XPC; XPD; XRCC1; YBX2; ZNF230	Azoospermia
JUND; NALP14	Oligoastenozoospermia
MTRR; IL1B; SABP	Oligoastenoteratozoospermia

### 1.1.3. Alteracions del seminograma

Les alteracions seminals es presenten en un 50-60% dels pacients que consulten per problemes de fertilitat (Dohle *et al.*, 2005). En l'anàlisi del semen o seminograma s'avaluen els següents paràmetres (WHO, 2010):

- Anàlisi macroscòpica del semen: Viscositat, líquefacció, aparença, volum i pH.
- Anàlisi microscòpica dels espermatozoides: Aglutinació, vitalitat, motilitat, morfologia i concentració.

Els pacients es classifiquen comparant els valors obtinguts per a cadascuna d'aquestes variables amb els valors de referència establerts per la WHO (Taula 1.2). Les alteracions de la concentració, motilitat i morfologia espermàtica reben els noms específics d'oligozoospermia, astenozoospermia i teratozoospermia respectivament. Aquestes anomalies es poden presentar de forma única o combinada en el seminograma d'un mateix individu.

**Taula 1.2.** Valors de referència dels principals paràmetres seminals establerts per la WHO (2010).

	Paràmetre seminal	Límit inferior
<b>Examen macroscòpic</b>	Volum	1.5ml
	pH	7.2
<b>Examen microscòpic</b>	Nombre d'espermatozoides per ejaculat	39x10 <sup>6</sup> spz./ejaculat
	Concentració espermàtica	15x10 <sup>6</sup> spz./ml
	Motilitat progressiva (tipus A+B o tipus PR)	32%
	Motilitat total (tipus A+B+C o tipus PR+NP)	40%
	Morfologia espermàtica <sup>a</sup>	4% formes normals

Spz.: Espermatozoides A: Espermatozoides mòbils progressius ràpids, B: Espermatozoides mòbils progressius lents, C: Espermatozoides mòbils no progressius, PR: Espermatozoides mòbils progressius (engloba els tipus A+B), NP: Espermatozoides mòbils no progressius (correspon al tipus C).

<sup>a</sup> El paràmetre de morfologia espermàtica també es pot valorar mitjançant el criteri estricte de Kruger. El límit inferior per aquest paràmetre és de 14% d'espermatozoides amb formes normals (Kruger *et al.*, 1988).

Exceptuant les causes genètiques, on el vincle entre l'aparició d'infertilitat i l'origen causal està clarament establert, tant en el cas de les anomalies urogenitals com de les alteracions seminals, sovint se'n desconeix la causa primària, i per tant se'ls atribueix un origen idiopàtic (Jungwirth *et al.*, 2014). De fet, en un 62.3% dels individus amb oligozoospermia, un 24.2% dels que presenten astenozoospermia, un 2.9% dels teratozoospermics i un 9,5% dels pacients amb azoospermia, la causa primària que origina l'alteració seminal és d'etiologia desconeguda (Pierik *et al.*, 2000). És important remarcar que, malgrat la gran quantitat d'estudis existents sobre infertilitat masculina, la prevalença de la infertilitat masculina d'origen idiopàtic s'ha mantingut més o menys constant al llarg del temps (Jungwirth *et al.*, 2014).

En l'última dècada, diversos estudis s'han dirigit a la identificació de nous indicadors de fertilitat masculina. Concretament s'ha aprofundit en l'avaluació de la càrrega genètica i epigenètica dels espermatozoides mitjançant estratègies d'anàlisi a gran escala (revisat per Lefièvre *et al.*, 2007; Lewis, 2007; Anton i Krawetz, 2012). Aquestes tècniques, anomenades "òmiques", inclouen àrees de coneixement com la genòmica, la proteòmica, la metabolòmica, l'epigenòmica i la transcriptòmica. Les "òmiques", juntament amb els mètodes d'anàlisi bioinformàtica i d'ontologia gènica, s'espera que permetin aprofundir en el coneixement de les molècules implicades en processos

cel·lulars complexes -incloent l'espermatogènesi-, i ofereixin la oportunitat de comprendre els mecanismes moleculars bàsics implicats en la fertilitat masculina.

## 1.2. Transcriptoma

El transcriptoma es defineix com el conjunt de molècules d'RNA presents en una cèl·lula, en un conjunt de cèl·lules, o en un organisme (Lewin, 2007). Aquest inclou molècules codificants o RNAs missatgers (*messenger RNAs*; mRNAs), i molècules no codificants (*non-coding RNAs*; ncRNAs).

Els ncRNA no són traduïts a proteïnes i representen el 96% de les molècules d'RNA de la cèl·lula. Engloben des d'RNAs transcripcionals, que inclouen els RNAs ribosòmics (*ribosomal RNAs*; rRNAs) i els RNAs de transferència (*transfer RNAs*; tRNAs), a RNAs no codificants llargs (*long non-coding RNAs*; lncRNAs) (>200nt), i RNAs no codificants petits (*small non-coding RNAs*; sncRNA) (<200nt). Aquest últim grup inclou els RNAs petits d'interferència (*small interfering RNA*; siRNAs), els RNAs nuclears petits (*small nuclear RNAs*; snRNAs), els RNAs nucleolars petits (*small nucleolar RNAs*; snoRNAs), els piwi-RNAs (piRNAs) i els microRNAs (miRNAs) (Figura 1.1).

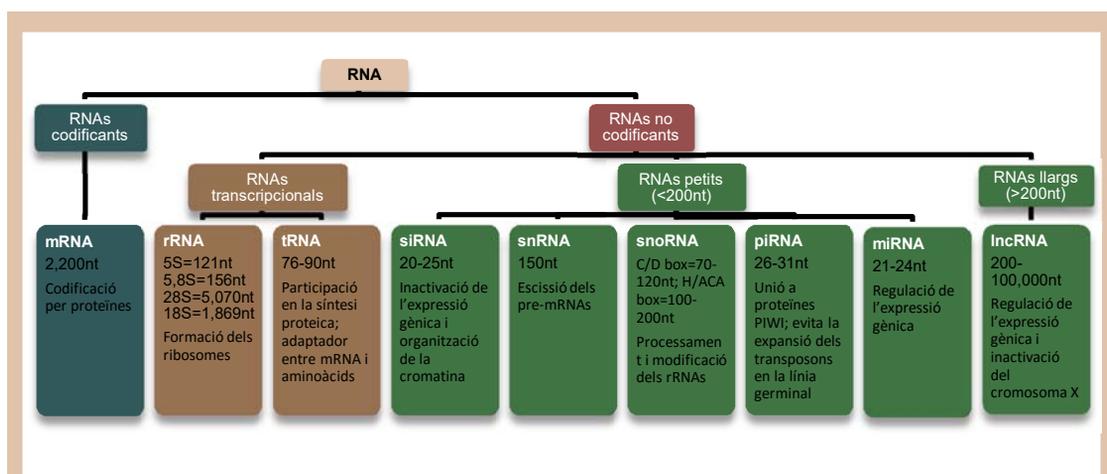


Figura 1.1. Tipus de molècules d'RNA (Adaptat de Buckingham, 2003; Alberts, 2014).

### 1.2.1. Els miRNAs

Els miRNAs són molècules d'RNA monocatenàries de 22-24nt. La seva funció principal consisteix en regular l'expressió gènica mitjançant la formació d'estructures semi-complementàries a les regions 3' no traduïdes dels mRNAs als quals regulen (Ambros, 2001; Boyd, 2008).

El primer miRNA que es va identificar va ser lin-4 en el nematode *Caenorhabditis elegans* (Lee *et al.*, 1993). A partir del seu descobriment es va produir un augment exponencial en la descripció de nous miRNAs, i actualment en humans se'n coneixen 1,881 (miRBase v.21, Juny 2014; [www.mirbase.org](http://www.mirbase.org)). Nombrosos estudis han demostrat que aquestes molècules estan conservades en la majoria d'espècies de metazous i en moltes espècies vegetals (Pasquinelli *et al.*, 2000).

### 1.2.1.1. Localització genòmica dels miRNAs

En humans, els miRNAs estan localitzats al llarg de tots els cromosomes a excepció del cromosoma Y, possiblement degut a que és un cromosoma amb poc contingut gènic i molt heterocromàtic (revisat per Bartel *et al.*, 2004). Aproximadament un 50% dels miRNAs es troben pròxims a altres miRNAs formant clústers<sup>2</sup> (revisat per Finnegan i Pasquinelli, 2013).

Està descrit que aproximadament el 45% dels miRNAs es troben situats en regions intergèniques, mentre que el 55% restant estan situats en regions intragèniques. D'aquests, aproximadament el 80% es localitzen en regions intròniques, el 10-20% en regions exòniques, i el 2-10% en regions 3' no traduïdes (*3' untranslated regions; 3'UTR*) (revisat per Kim *et al.*, 2009). És important tenir en compte que els miRNAs intragènics estan regulats pels promotors del gen hoste, mentre que el control de la transcripció dels miRNAs intergènics es realitza amb un promotor propi (revisat per Bartel *et al.*, 2004).

### 1.2.1.2. Biogènesi dels miRNAs

La via canònica de biogènesi dels miRNAs es pot dividir bàsicament en tres fases: la transcripció, la maduració, i la formació del complex funcional de silenciament del miRNA (*miRNA-induced silencing complex; miRISC*) (Figura 1.2):

<sup>2</sup> Conjunt de miRNAs que es situen pròxims en el genoma. Normalment tenen el mateix promotor i es transcriuen conjuntament.

### Fase 1: Transcripció

Durant aquest fase es produeix la transcripció dels miRNAs primaris (*primary microRNAs*; pri-miRNAs). Aquestes molècules presenten una mida aproximada de 1kb (revisat per Bartel *et al.*, 2004). La transcripció la porta a terme majoritàriament la RNA polimerasa II (RNA Pol II), tot i que la RNA polimerasa III (RNA Pol III) és la responsable de transcriure alguns tipus de miRNAs que es troben en regions repetitives del genoma (en humans, el clúster de miR-19 i els miRNAs hsa-miR-515-1, -517a, -517c i -519a-1) (Borchert *et al.*, 2006).

### Fase 2: Maduració

#### 1. Complex microprocessador:

El pri-miRNA és processa dins el nucli pel complex microprocessador format per l'enzim RNasa de tipus III DROSHA (Filippov *et al.*, 2000), i el cofactor *DiGeorge syndrome critical region gene 8* (DGCR8), també anomenat PASHA (*partner of DROSHA*) (Han *et al.*, 2004). DGCR8 és el factor principal que reconeix l'estructura de pri-miRNA, mentre que DROSHA només interactua amb el substrat de forma transitòria en el moment del processament (Yeom *et al.*, 2006). Existeixen altres proteïnes que s'associen al complex microprocessador, com les helicases i les ribonucleoproteïnes nuclears heterogènies (*heterogeneous nuclear ribonucleoproteins*; hnRNPs), que faciliten el processament dels pri-miRNAs per finalment donar lloc als miRNAs precursors (*precursor microRNAs*; pre-miRNAs).

#### 2. Exportació nuclear:

L'exportació dels pre-miRNAs del nucli al citoplasma es realitza via Exportina-5 (Lund *et al.*, 2004).

#### 3. Processament citoplasmàtic:

Un cop al citoplasma, un altre tipus d'RNasa III anomenada DICER, processa els pre-miRNAs fins a obtenir un dúplex d'RNA de 22-24nt de llargada. Tant DICER com les proteïnes d'unió a la resposta de transactivació de l'RNA (*transactivating response RNA-binding protein*; TRBP) s'hi uneixen i separen les dues cadenes per formar els miRNAs madurs. El miRNA madur pot provenir de la cadena amb lectura 5'-3' (s'anomenarà miRNA -5p), o de la complementària, amb lectura 3'-5' (s'anomenarà miRNA

-3p) tot i que sovint una d'elles es degrada i no resulta en un miRNA madur (majoritàriament la -3p) (**Figura 1.2**).

Fase 3: Formació complex miRISC

El conjunt format per DICER-TRBP facilita el reclutament de les proteïnes argonauta (*argonaute proteins*; AGO), principals components del complex miRISC (*Chendrimada et al., 2005*). Quan aquest complex està format, el miRNA pot reconèixer l'mRNA diana i regular-ne tant la seva estabilitat com la seva traducció.

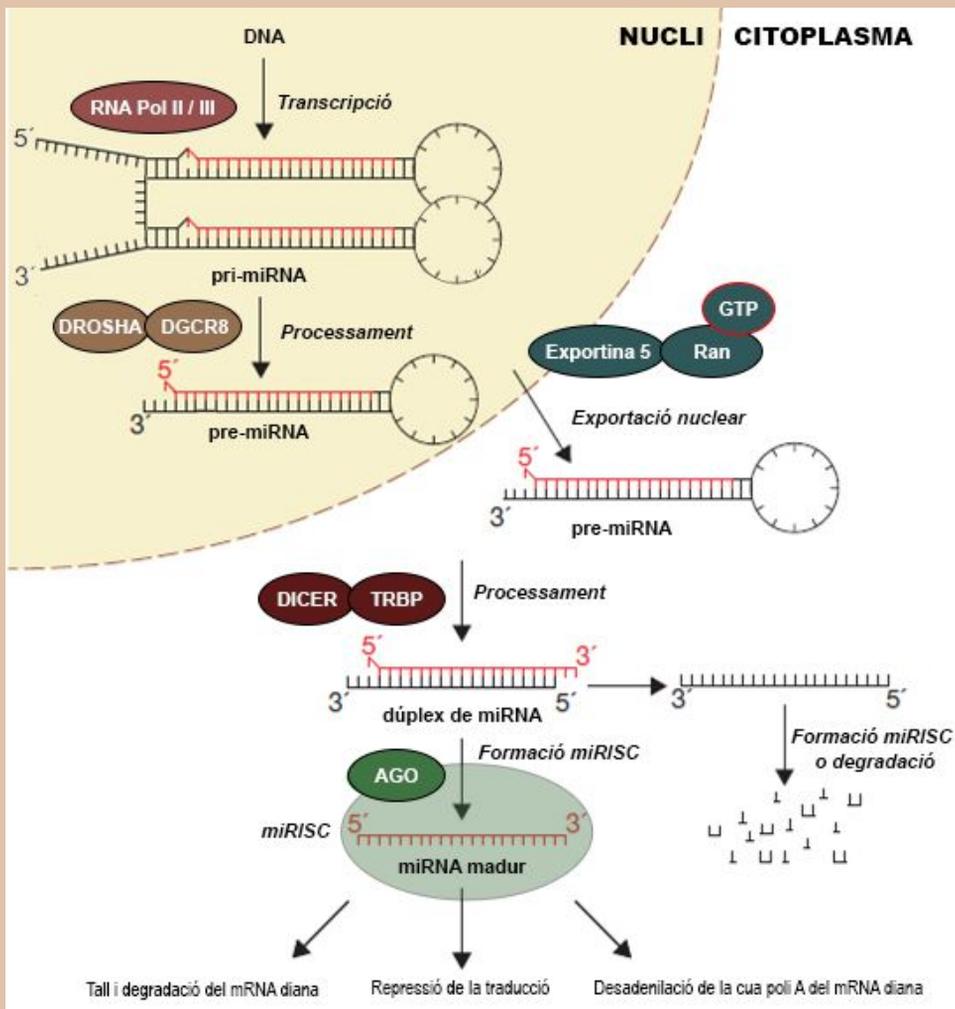


Figura 1.2. Via canònica de biogènesi dels miRNAs (Adaptat de: Winter et al., 2009).

### 1.2.1.3. Mecanismes d'acció dels miRNAs

El miRNA reconeix l'mRNA diana per complementarietat de bases. En espècies vegetals, els miRNAs regulen una sola molècula d'mRNA ja que aquest reconeixement requereix la complementarietat de tots els nucleòtids (Rhoades *et al.*, 2002). Per contra, en espècies animals, els miRNAs reconeixen els seus mRNAs diana de forma semi-complementària (revisat per Pillai, 2005) i per tant poden regular diverses molècules. Tot i aquesta semi-complementarietat, els miRNAs presents en espècies animals contenen una regió de 7nt (entre la posició 2 i 8 de l'extrem 5') anomenada seqüència llavor (*seed sequence*) que requereix complementarietat total (revisat per Tomari i Zamore, 2005).

S'ha descrit que, en espècies animals, el grau de complementarietat entre un miRNA i el seu mRNA diana determina el destí de l'mRNA. En els casos on la complementarietat és molt elevada (només es forma una regió semi-complementària), l'mRNA és escindit i conseqüentment degradat (revisat per Hutvagner i Zamore, 2002; Bartel *et al.*, 2004). Per contra, la presència de més d'una regió semi-complementària pot provocar la desadenilació de la cua poli-A (i per tant la degradació de l'mRNA), o bé la inhibició de la seva traducció (revisat per Bartel *et al.*, 2004). Aquest últim mecanisme es dona per un procés encara desconegut en el qual es preserva l'estabilitat de l'mRNA (Olsen i Ambros, 1999; Seggerson *et al.*, 2002).

### 1.2.1.4. Funcions dels miRNAs

En humans existeixen entre 30,000 i 40,000 gens codificants (Lander *et al.*, 2001) i s'estima que els miRNAs en regulen l'expressió de més del 60% (Friedman *et al.*, 2009). Com a conseqüència, el nombre de funcions en què poden participar els miRNAs és molt significatiu. En aquest sentit, s'ha descrit la participació de miRNAs en processos cel·lulars essencials relacionats amb el cicle cel·lular (Bueno i Malumbres, 2011), la diferenciació cel·lular (Lakshminpathy *et al.*, 2007), el metabolisme (Chen *et al.*, 2012a), la proliferació cel·lular i l'apoptosi (Hwang i Mendell, 2006). En l'última dècada, també s'ha descrit la implicació dels miRNAs en els processos de gametogènesi masculina (Yadav i Kotaja, 2013; Kotaja, 2014), femenina (Toloubeydokhti *et al.*, 2009), i en el desenvolupament embrionari (Alvarez-Garcia i Miska, 2005; Schagdarsurengin *et al.*, 2012; Galliano i Pellicer, 2014).

La desregulació dels miRNAs s'ha relacionat amb nombroses afectacions humanes com alguns tipus de càncer (Esteller, 2011; Chen *et al.*, 2012b), alteracions neurològiques (Abe i Bonini, 2013), anomalies cardiovasculars (Ono *et al.*, 2011; Hynes *et al.*, 2012; Hata, 2013), desordres metabòlics (Rottiers i Naar, 2012), i infertilitat femenina (Ohlsson Teague *et al.*, 2009; Imbar i Eisenberg, 2014) i masculina (Gou *et al.*, 2014; Kotaja, 2014).

## 1.2.2. Els miRNAs en la reproducció humana

La gametogènesi es caracteritza per ser un procés que inclou diverses divisions mitòtiques i meiotiques així com grans canvis morfològics de les cèl·lules participants que condueixen a la diferenciació dels espermatozoides i els oòcits. Aquests esdeveniments es regeixen per l'aparició de perfils específics d'expressió gènica, els quals estan altament controlats per reguladors transcripcionals i post-transcripcionals entre els que hi trobem els miRNAs (Hayashi *et al.*, 2008; Bouhallier *et al.*, 2010).

En cèl·lules testiculars humanes, el primer estudi en caracteritzar els perfils de miRNAs va ser el de Yang i col·laboradors (2013). Mitjançant la tècnica de seqüenciació de nova generació (*next generation sequencing*; NGS), els autors van identificar 775 miRNAs i van relacionar els gens diana predits amb processos biològics rellevants per l'espermatogènesi, com la regulació de la mitosi i la motilitat espermàtica. En models murins s'ha demostrat que determinats miRNAs s'expressen de manera preferencial en espermatogonis indiferenciats (He *et al.*, 2009; Niu *et al.*, 2011; Tong *et al.*, 2012; Huszar i Payne, 2013; Yang *et al.*, 2013b), mentre que d'altres miRNAs ho fan en cèl·lules meiotiques i post-meiotiques (Yu *et al.*, 2005; Björk *et al.*, 2010; Dai *et al.*, 2011; Bao *et al.*, 2012). D'altra banda, alguns estudis han posat de manifest que la presència de DICER -essencial per la biogènesi dels miRNAs (veure apartat 1.2.1.2)- és fonamental per la diferenciació de les cèl·lules de la línia germinal (Maatouk *et al.*, 2008), i la seva absència causa infertilitat (Hayashi *et al.*, 2008; Nagaraja *et al.*, 2008).

Krawetz i col·laboradors (2011), van ser els primers a descriure la càrrega d'RNAs petits (amb mides inferiors a 200 bases) en espermatozoides humans, i ho van fer aplicant la tècnica de seqüenciació d'RNA (RNAseq). Aquest estudi va revelar la presència d'un 7% de miRNAs i un 17% de piRNAs entre els ncRNAs existents. L'anàlisi bioinformàtica va permetre detectar 35 miRNAs presents en els tres individus analitzats, on el hsa-miR-34c va aparèixer com el més abundant. Els autors van suggerir

que la funció principal d'aquest miRNA estava relacionada amb l'adquisició del fenotip espermàtic durant la gametogènesi masculina. Els gens diana predits per aquests miRNAs es van relacionar amb l'espermatogènesi i l'embriogènesi mitjançant la recopilació d'informació bibliogràfica.

D'altra banda, estudis en embrions humans (Lu *et al.*, 2012; Rosenbluth *et al.*, 2013) i de ratolí (Yang *et al.*, 2008) relacionen el contingut de miRNAs amb una progressió correcta de l'embriogènesi. En aquest sentit, s'ha observat que el mmu-miR-34c, present en embrions preimplantacionals de ratolí i a qui s'atribueix un origen exclusivament patern (no s'ha detectat en oòcits), és necessari per a la primera divisió embrionària (Liu *et al.*, 2012b), tot i que un estudi recent qüestiona aquest resultat (Yuan *et al.*, 2015).

En definitiva, durant la fecundació, a més del genoma patern, dels factors activadors de l'oòcit i de desenvolupament embrionari (Sutovsky, 2011; Jenkins i Carrell, 2012; Yanagimachi, 2012), l'espermatozoide també allibera a l'oòcit mRNAs, miRNAs i piRNAs (Miller *et al.*, 1999; Ostermeier *et al.*, 2002; Miller i Ostermeier, 2006). Aquesta funcionalitat associada a la càrrega paterna no genòmica transmesa a l'embrió, podria indicar una retenció no estocàstica d'aquestes molècules (revisat per Krawetz, 2005).

### 1.2.3. Desregulació de miRNAs i infertilitat

La presència de miRNAs en cèl·lules germinals masculines, espermatozoides i embrions, així com les funcions associades a aquestes molècules suggereix que una desregulació dels seus nivells d'expressió pot induir a l'aparició d'alteracions en processos d'espermatogènesi i embriogènesi i per tant, donar lloc a problemes de fertilitat.

#### Teixit testicular

El primer estudi on es van comparar els perfils d'expressió de miRNAs en teixit testicular humà entre individus fèrtils i infèrtils va ser el de Lian i col·laboradors (2009). Aquest treball va identificar 154 miRNAs sub-expressats i 19 sobre-expressats en individus amb azoospermia no obstructiva (*non-obstructive azoospermia*; NOA). Per altra banda, Abu-Halima i col·laboradors (2014a) van comparar els perfils de miRNAs de 16 biòpsies testiculars d'individus fèrtils amb els de 56 biòpsies testiculars de tres

grups de pacients amb azoospèrmia que presentaven diferents alteracions histopatològiques. Mitjançant una anàlisi de microarrays, van detectar 197 miRNAs diferencialment expressats (DE-miRNAs) en els pacients amb l'epiteli seminífer format únicament per cèl·lules de Sertoli, 68 en pacients amb atròfia mixta i 46 en pacients amb bloqueig cel·lular en estadi d'espermatòcit. Després d'analitzar la literatura descrita pels gens regulats pels DE-miRNAs amb major diferència d'expressió, els autors van suggerir que aquests podien tenir un paper essencial en el desenvolupament i/o la regulació de l'espermatogènesi, i que les alteracions de la seva expressió podien contribuir a l'aparició d'aquestes anomalies. En un estudi més recent, [Zhuang i col·laboradors \(2015\)](#) van analitzar, mitjançant microarrays, els perfils de miRNAs i mRNAs en biòpsies testiculars de quatre pacients amb NOA i tres de pacients amb OA que presentaven una espermatogènesi normal. Els resultats van mostrar l'existència de 93 miRNAs i 4,172 mRNAs diferencialment expressats entre ambdues poblacions. Els nivells d'expressió detectats pels hsa-miR-563, -125-3p, -375, -521 i -34c-3p es van trobar correlacionats amb els de les dianes *PLCXD3*, *SLC1A3*, *ITPR1*, *CMYA5*, i *MDFIC* respectivament. L'anàlisi dels processos associats a aquests gens va mostrar que presentaven funcions relacionades amb el fenotip NOA.

### Espermatozoides

Són pocs els grups de recerca que han realitzat estudis dels perfils d'expressió de miRNAs en espermatozoides d'individus infèrtils. [Liu i col·laboradors \(2012a\)](#) varen comparar, mitjançant microarrays, els perfils d'expressió de miRNAs en espermatozoides de 86 individus infèrtils amb anomalies del seminograma i 86 individus control. Van detectar 52 DE-miRNAs i van validar l'expressió dels miRNAs hsa-miR-122, -185, -193b, -297, -373, -574-5p, i -1275 (sobre-expressats en individus infèrtils) i hsa-miR-16, -19b, -23b, -26a, -100, i -512-3p (sub-expressats en individus infèrtils) mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa en temps real quantitativa (*quantitative real-time polymerase chain reaction*; qRT-PCR). Els autors van suggerir que els 52 DE-miRNAs estaven associats amb les anomalies del seminograma dels individus analitzats.

[Abu-Halima i col·laboradors \(2013\)](#) van comparar l'expressió de miRNAs en espermatozoides de 9 individus normozoospèrmics fèrtils amb la de 9 individus amb astenozoospèrmia i 9 amb oligoastenozoospèrmia. Els autors van detectar 50 miRNAs

sobre-expressats i 27 sub-expressats en els espermatozoides dels pacients amb astenozoospermia, així com 42 sobre-expressats i 44 sub-expressats en els individus amb oligoastenozoospermia. De tots ells, van validar mitjançant qRT-PCR els sis que presentaven una major diferència d'expressió (hsa-miR-16, -34b, -34c-5p, -122, -141, i -200a). Els autors van utilitzar la bibliografia existent per identificar les dianes potencials d'aquests miRNAs i relacionar-los amb els processos d'espermatogènesi i embriogènesi.

En una altra publicació del mateix grup, [Abu-Halima i col·laboradors \(2014b\)](#) van proposar cinc dels miRNAs detectats com a més abundants en espermatozoides en el seu estudi anterior ([Abu-Halima \*et al.\*, 2013](#)), com a biomarcadors de les alteracions de fertilitat presents en els individus estudiats (hsa-miR-34b-3p, -34b-5p, -34c-5p, -122, i -429). Mitjançant tècniques de qRT-PCR, els autors van analitzar l'expressió d'aquests miRNAs en una població de 80 individus infèrtils amb paràmetres seminals alterats i 90 controls fèrtils. Van suggerir que aquests miRNAs podrien ser biomarcadors d'infertilitat masculina relacionats amb la presència d'oligozoospermia i oligoastenozoospermia amb una elevada sensibilitat i especificitat (>98% per ambdós paràmetres). En aquest sentit, la recerca de biomarcadors de fertilitat basats en l'anàlisi dels nivells d'expressió del transcriptoma constitueix un dels objectius que ha anat adquirint importància en els darrers anys ([revisat per Anton i Krawetz, 2012](#)). Els treballs publicats han estat majoritàriament dirigits a l'estudi d'mRNAs i fins ara s'han descrit un centenar d'mRNAs candidats en diversos treballs realitzats amb microarrays, qRT-PCR i RNAseq ([revisat per Garrido \*et al.\*, 2013](#)).

Paral·lelament a la recerca de molècules biomarcadores basades en els nivells d'expressió, també s'ha proposat la utilització de parelles de transcrits amb nivells d'expressió relativa correlacionada i estable com a possible eina biomarcadora. [Lalancette i col·laboradors \(2009\)](#) van descriure 30 parelles d'mRNAs que mostraven una expressió relativa estable en 24 mostres de semen en individus fèrtils i van proposar que aquest comportament uniforme podria ser utilitzat com indicador biològic de fertilitat. En un treball més recent, [Lima-Souza i col·laboradors \(2012\)](#) van comparar els nivells d'expressió de sis parelles de transcrits amb expressió relativa estable en espermatozoides procedents de quatre individus fèrtils amb els que presentaven quatre individus infèrtils amb displàsia de la beina fibrosa. Van identificar quatre parelles d'mRNAs on aquesta expressió relativa estable es trencava en els individus infèrtils i els van proposar com a biomarcadors d'infertilitat masculina.

Considerem que, de la mateixa manera que alguns estudis s'han dirigit a la recerca de parelles de molècules de mRNAs amb una expressió relativa estable com a candidats a biomarcadors, també seria interessant realitzar estudis equivalents a nivell de miRNAs.

### Embrions

Fins al moment només *McCallie et al., (2010)* han comparat el perfils d'expressió de miRNAs entre embrions provinents de parelles fèrtils (n=10) i embrions provinents de parelles infèrtils (6 amb factor masculí i 6 amb factor femení). Els resultats van mostrar una sub-expressió de dos miRNAs (hsa-let-7a, i hsa-miR-24) en les parelles amb factor masculí i sis miRNAs (hsa-let-7a, hsa-miR-19a, -19b, -24, -92, i -93) en les que presentaven factor femení. Els autors van relacionar els gens diana predits per aquests DE-miRNAs amb el desenvolupament embrionari i el creixement, manteniment i proliferació cel·lular.



## Capítol 2. Hipòtesi i objectius



# Capítol 2. Hipòtesi i objectius

## 2.1. Hipòtesi

Els espermatozoides procedents d'individus fèrtils i infèrtils presenten una càrrega diferencial de miRNAs que condiciona la fertilitat.

## 2.2. Objectius

### Objectiu principal

Analitzar els perfils d'expressió de miRNAs en espermatozoides humans provinents d'individus fèrtils i infèrtils i les seves implicacions en la fertilitat masculina.

### Objectius parcials

Primer. Optimitzar un mètode d'extracció del transcriptoma complet dels espermatozoides humans que inclogui els miRNAs.

Segon. Caracteritzar els perfils d'expressió de miRNAs en espermatozoides procedents d'individus fèrtils.

Tercer. Caracteritzar els perfils de miRNAs en espermatozoides procedents de diferents poblacions d'individus infèrtils amb alteracions del seminograma.

Quart. Avaluar la relació entre els perfils obtinguts i les característiques del seminograma, l'edat, la incidència d'anomalies cromosòmiques en espermatozoides, i els resultats de les tècniques de reproducció assistida dels individus estudiats.

Cinquè. Identificar els miRNAs diferencialment expressats en les poblacions d'individus infèrtils, així com les seves dianes potencials i els gens continguts en les seves unitats de transcripció, per tal de valorar la possible afectació de processos relacionats amb l'espermatogènesi i embriogènesi.



# Capítol 3. Material i mètodes



# Capítol 3. Material i mètodes

## 3.1. Material biològic

Els diferents estudis inclosos en els treballs que configuren aquesta Tesi s'han realitzat amb mostres de semen procedents de 14 individus fèrtils i 34 individus infèrtils.

Els individus fèrtils presentaven cariotip i seminograma normals i fertilitat provada. En tots els casos l'ejaculat contenia més de  $9 \times 10^7$  espermatozoides amb motilitat progressiva (tipus A+B o PR), més del 4% de formes normals (criteri estricte), i més de  $1 \times 10^7$  espermatozoides/ml amb motilitat progressiva després del test de supervivència post-descongelació. En aquest grup s'hi inclouen quatre individus codificats com C01-04 (inclosos en la Publicació 1) i deu individus codificats com S01-10 (inclosos en la Publicació 2) (**Taula 3.1**).

**Taula 3.1.** Edat i paràmetres seminals dels individus fèrtils analitzats.

Publicació	Codi mostra	Edat (anys) <sup>a</sup>	Paràmetres seminals			
			Seminograma	Concentració (spz/ml)	Motilitat (%PR+%NP)	Morfologia (%FN) <sup>b</sup>
Publicació 1	C01	33(R2)	N	$3.40 \times 10^7$	61	16
	C02	28(R1)	N	$1.20 \times 10^8$	44	>4
	C03	34(R2)	N	$6.00 \times 10^7$	39	6
	C04	24(R1)	N	$4.80 \times 10^7$	51	25
Publicació 2	S01	28(R1)	N	$1.10 \times 10^8$	52	7
	S02	20(R1)	N	$5.93 \times 10^7$	47	7
	S03	22(R1)	N	$8.70 \times 10^7$	50	>4
	S04	25(R1)	N	$5.00 \times 10^7$	59	>4
	S05	30(R2)	N	$6.00 \times 10^7$	31	5
	S06	33(R2)	N	$3.00 \times 10^7$	65	8
	S07	30(R2)	N	$9.50 \times 10^7$	53	18
	S08	29(R1)	N	$3.23 \times 10^7$	56	>4
	S09	24(R1)	N	$1.03 \times 10^8$	44	6
	S10	24(R1)	N	$4.50 \times 10^7$	55	>4

N: Normozoospermia, spz: Espermatozoides, PR: Progressius, NP: No progressius, FN: Formes normals, NA: No avaluat.

<sup>a</sup> R1=rang 19-29 anys; R2=rang 30-39 anys; R3=rang 40-50 anys.

<sup>b</sup> Criteris de morfologia de la WHO (2010); límit inferior <4% formes normals.

Pel que fa als individus infèrtils, aquests van ser classificats com a pacients amb problemes de fertilitat d'origen idiopàtic després de l'examen andrològic i genètic pertinent. En la selecció d'aquests individus es van excloure les parelles amb factors femenins concomitants diagnosticats. Concretament, es van seleccionar quatre individus amb o sense alteracions seminals codificats com P01-P04 (inclosos en la Publicació 1) i 30 individus amb alteracions seminals amb un sol paràmetre alterat (inclosos en la Publicació 3): deu individus amb astenozoospermia pura (A) codificats com a S11-20, deu individus amb teratozoospermia pura (T) codificats com a S21-30, i deu individus amb oligozoospermia pura (O) codificats com a S31-S40 (Taula 3.2).

**Taula 3.2.** Edat, paràmetres seminals, resultat de FISH en espermatozoides, i resultats de l'aplicació de tècniques de reproducció assistida dels individus infèrtils analitzats.

Publicació	Codi mostra	Edat (anys) <sup>a</sup>	Paràmetres seminals			FISH <sup>d</sup>	TRA					
			Seminograma	Concentració (spz/ml)	Motilitat (%PR+%NP)		Morfologia (%FN)	Tècnica	Taxa de fecundació (%)	Taxa d'embri- ons descartats (%)	Taxa d'embaràs (%)	Taxa d'avor- tament (%)
Publicació 1	P01	34(R2)	AT	2.71x10 <sup>7</sup>	40	8 <sup>c</sup>	-	-	-	-	-	
	P02	33(R2)	N	1.21x10 <sup>8</sup>	50	30 <sup>c</sup>	-	-	-	-	-	
	P03	32(R2)	T	4.72x10 <sup>7</sup>	60	10 <sup>c</sup>	-	-	-	-	-	
	P04	38(R2)	N	4.17x10 <sup>7</sup>	45	31 <sup>c</sup>	-	-	-	-	-	
Publicació 3	S11	32(R2)	A	1.26x10 <sup>8</sup>	35	12 <sup>b</sup>	Alterat	ICSI	62.5	40	100	0
	S12	36(R2)	A	9.80x10 <sup>7</sup>	35	10 <sup>b</sup>	Normal	ICSI	0	-	-	-
	S13	31(R2)	A	6.53x10 <sup>7</sup>	40	16 <sup>c</sup>	Normal	ICSI	80	75	0	-
	S14	41(R3)	A	9.94x10 <sup>7</sup>	35	5 <sup>b</sup>	Alterat	ICSI	0	-	-	-
	S15	35(R2)	A	6.03x10 <sup>7</sup>	35	13 <sup>b</sup>	Alterat	ICSI	60	50	0	-
	S16	41(R3)	A	1.04x10 <sup>8</sup>	40	14 <sup>c</sup>	Alterat	ICSI	0	-	-	-
	S17	42(R3)	A	2.23x10 <sup>7</sup>	24	7 <sup>b</sup>	Normal	ICSI	87.5	57.1	100	0
	S18	49(R3)	A	4.30x10 <sup>7</sup>	22	7 <sup>b</sup>	Normal	ICSI	83.3	60	50	0
	S19	44(R3)	A	6.90x10 <sup>7</sup>	31	5 <sup>b</sup>	Alterat	ICSI	73.7	50	50	100
	S20	39(R2)	A	7.80x10 <sup>7</sup>	29	7 <sup>b</sup>	Alterat	ICSI	66.7	12.5	100	0

Publicació 3	S21	33(R2)	T	1.33x10 <sup>8</sup>	73	1 <sup>b</sup>	Normal	ICSI	70.6	33.3	100	33.3
	S22	35(R2)	T	3.80x10 <sup>7</sup>	49	3 <sup>b</sup>	Normal	ICSI	58.3	71.4	100	0
	S23	48(R3)	T	8.50x10 <sup>7</sup>	41	3 <sup>b</sup>	Normal	ICSI	50	0	0	-
	S24	34(R2)	T	6.66x10 <sup>7</sup>	54	3 <sup>b</sup>	Normal	ICSI	58.3	52.4	33.3	0
	S25	36(R2)	T	1.60x10 <sup>8</sup>	46	3 <sup>b</sup>	Normal	ICSI	52.4	54.6	50	0
	S26	42(R3)	T	9.00x10 <sup>7</sup>	56	3 <sup>b</sup>	Normal	ICSI	75	66.7	100	0
	S27	41(R3)	T	2.80x10 <sup>7</sup>	51	2 <sup>b</sup>	Alterat	ICSI	50	71.4	0	-
	S28	35(R2)	T	5.52x10 <sup>7</sup>	45	10 <sup>c</sup>	Alterat	ICSI	66.7	50	0	-
	S29	28(R1)	T	2.12x10 <sup>7</sup>	45	6 <sup>c</sup>	Normal	No TRA	-	-	-	-
	S30	32(R2)	T	4.72x10 <sup>7</sup>	60	10 <sup>c</sup>	Normal	ICSI	50	0	0	-
	S31	37(R2)	O	1.30x10 <sup>7</sup>	43	4 <sup>b</sup>	Alterat	ICSI	46.7	28.6	100	0
	S32	35(R2)	O	1.30x10 <sup>7</sup>	64	5 <sup>b</sup>	Alterat	ICSI	50	0	100	50
	S33	38(R2)	O	1.33x10 <sup>7</sup>	36	4 <sup>b</sup>	Alterat	ICSI	46.3	4	100	50
	S34	50(R3)	O	1.13x10 <sup>7</sup>	54	5 <sup>b</sup>	Alterat	ICSI	0	-	-	-
	S35	43(R3)	O	1.33x10 <sup>7</sup>	43	5 <sup>b</sup>	Alterat	ICSI	90	33.3	50	0
	S36	39(R2)	O	1.10x10 <sup>7</sup>	57	4 <sup>b</sup>	Alterat	No TRA	-	-	-	-
	S37	45(R3)	O	5.30x10 <sup>6</sup>	40	4 <sup>b</sup>	Normal	No TRA	-	-	-	-
	S38	44(R3)	O	7.60x10 <sup>6</sup>	48	5 <sup>b</sup>	Alterat	ICSI	90.5	73.7	66.7	50
	S39	49(R3)	O	7.00x10 <sup>6</sup>	53	4 <sup>b</sup>	Normal	ICSI	85.7	75	100	0
	S40	41(R3)	O	1.50x10 <sup>7</sup>	48	7 <sup>b</sup>	NA	ICSI	100	28.6	50	0

FISH: Hibridació *in situ* fluorescent, TRA: Tècniques de reproducció assistida, ICSI: Injecció intracitoplasmàtica d'espermatozoides, N: Normozoospermia, AT: Astenoteratozoospermia, A: Astenozoospermia, T: Teratozoospermia, O: Oligozoospermia, spz: Espermatozoides, PR: Progressius, NP: No progressius, FN: Formes normals, NA: No avaluat.

<sup>a</sup> R1=rang 19-29 anys; R2=rang 30-39 anys; R3=rang 40-50 anys.

<sup>b</sup> Criteris de morfologia de la WHO (2010); límit inferior <4% formes normals.

<sup>c</sup> Criteris de morfologia estrictes de Kruger (Kruger *et al.*, 1988); límit inferior <14% formes normals.

<sup>d</sup> Resultat de FISH en espermatozoides: Anàlisi de la incidència d'anomalies cromosòmiques numèriques pels cromosomes 13, 18, 21, X i Y.

Les mostres es van obtenir per masturbació després d'un mínim de tres dies d'abstinença i es van recollir en flascons estèrils. La selecció d'individus i recollida de les mostres es va realitzar en col·laboració amb els centres *Instituto Valenciano de Infertilidad* (València), *Hospital Quirón Teknon* (Barcelona), i *Institut Marquès* (Barcelona).

En tots els casos es va recollir informació referent a l'edat i els paràmetres seminals (Taula 3.1 i 3.2). Pels individus S11-S40 també es va obtenir informació referent a la

incidència d'anomalies cromosòmiques numèriques en espermatozoides mitjançant hibridació *in situ* fluorescent (*fluorescent in situ hybridization*; FISH) pels cromosomes 13, 18, 21, X i Y<sup>3</sup> (Taula 3.2). A més, es va recopilar la informació dels resultats de les tècniques de reproducció assistida (TRA) a què es van sotmetre les parelles, que van incloure: nombre d'òcits madurs recuperats, nombre de zigots obtinguts, nombre d'embrions descartats, nombre de transferències realitzades, nombre d'embrions transferits, nombre de gestacions i nombre d'avortaments espontanis. A partir d'aquestes dades es van calcular els paràmetres: taxa de fecundació (zigots obtinguts/òcits madurs recuperats), taxa d'embrions descartats (embrions descartats/zigots obtinguts), taxa d'embaràs (gestacions ocorregudes/transferències realitzades) i taxa d'avortament (avortaments espontanis/gestacions) (Taula 3.2).

Tots els individus inclosos en aquests estudis van expressar la seva voluntat de participar-hi mitjançant la firma del corresponent consentiment informat. L'estudi va ser aprovat per la Comissió d'Ètica en l'Experimentació Animal i Humana de la Universitat Autònoma de Barcelona (Número de Referència 1884).

### 3.2. Mètodes

Els protocols d'extracció d'RNA en espermatozoides humans estan condicionats per tres factors principals: (i) el semen pot presentar cèl·lules somàtiques a més d'espermatozoides, principalment leucòcits i cèl·lules de descamació de l'epiteli dels conductes deferents (Lewis, 2007); (ii) la concentració d'RNA en espermatozoides és molt baixa (50-500fg RNA/espermatozoide; Krawetz, 2005; Goodrich *et al.*, 2013), en relació al contingut d'RNA d'una cèl·lula somàtica (1,000-30,000fg RNA/cèl·lula; Boon *et al.*, 2011; Alberts, 2014); (iii) l'rRNA present en espermatozoides està degradat (Ostermeier *et al.*, 2002) i per tant, no es pot utilitzar la integritat d'aquestes molècules com a indicador de qualitat de l'RNA extret.

Per superar aquestes limitacions, el protocol d'extracció d'RNA espermàtic desenvolupat en aquesta Tesi va incloure una purificació espermàtica que permet eliminar les

---

<sup>3</sup> Les mostres de semen van ser processades i analitzades amb FISH mitjançant el protocol descrit per Sarrate i Anton (2009). Es van utilitzar les sondes del *AneuVysion Multicolor DNA Probe kit* (Abbott Molecular Inc., Des Plaines, IL, USA): CEP18 (D18Z1, Spectrum Aqua), CEPX (DXZ1, Spectrum Green), CEPY (DYZ3, Spectrum Orange), LSI 13 (13q14, Spectrum Green) i LSI 21 (21q22.13-21q22.2, Spectrum Orange). Els resultats obtinguts van ser classificats com a "Normals" o "Alterats" en funció de si s'observaven increments significatius respecte la incidència descrita en població control (dades no publicades).

cèl·lules somàtiques de l'ejaculat, un protocol d'extracció d'RNA que preserva la integritat dels transcrits i descarta la presència de contaminacions de DNA, i diversos controls de qualitat que permeten assegurar la puresa i qualitat de l'RNA obtingut. Aquests passos es descriuen a continuació:

### 3.2.1. Purificació espermàtica

Les mostres de semen van ser sotmeses a una purificació de la fracció espermàtica mitjançant el procediment *somatic cell lysis* (SCL) (Goodrich *et al.*, 2007). Aquest mètode consisteix en lisar les cèl·lules somàtiques presents en l'ejaculat mitjançant la incubació de les mostres en una barreja de detergents (0.1% dodecilsulfat sòdic i 0.5% Tritó X-100) en H<sub>2</sub>O miliQ (*somatic cell lysis buffer*, SCLB). El fet que les membranes dels espermatozoides presentin una concentració proteica més elevada en comparació a les cèl·lules somàtiques, els proporciona un increment de la seva resistència a la lisi amb detergents (Nixon *et al.*, 2009, 2011).

Protocol:

1. Traspasar l'ejaculat a un tub cònic de 15ml.
2. Afegir 1ml de solució SCLB i homogeneïtzar.
3. Afegir SCLB fins ajustar el volum a 13ml, homogeneïtzar la solució, i mantenir-la en fred (gel picat).
4. Transcorreguts 20min, realitzar un recompte cel·lular mitjançant una cambra de Neubauer al microscopi de contrast de fases per tal de valorar la presència de cèl·lules somàtiques i determinar-ne la ràtio respecte a la fracció espermàtica. Per poder prosseguir amb el protocol, es va establir com a ràtio mínima acceptable una relació 1:10,000 entre el nombre de cèl·lules somàtiques i espermatozoides detectats (donat que una cèl·lula somàtica conté entre 100-1,000 vegades més RNA que un espermatozoide, aquesta ràtio mínima permet assegurar que més del 99% de l'RNA recuperat és d'origen espermàtic).
5. Centrifugar la mostra a 1,200g durant 10min per tal de concentrar la fracció espermàtica al fons del tub.
6. En el cas de no haver assolit la proporció establerta, tornar a repetir el protocol a partir del pas 2 tantes vegades com sigui necessari fins assolir la ràtio establerta.

### 3.2.2. Extracció d'RNA

L'extracció d'RNA total es va efectuar mitjançant el mètode TRIzol<sup>®</sup> (Thermo Fisher Scientific). L'optimització d'aquest mètode es va realitzar aplicant diverses modificacions al protocol descrit per Chomczynski i Sacchi (Chomczynski, 1987; Chomczynski i Sacchi, 2006).

Protocol:

1. Lisar els espermatozoides mitjançant l'addició d'1ml de reactiu TRIzol<sup>®</sup> per cada  $5-10 \times 10^6$  d'espermatozoides.
2. Mantenir la mostra a temperatura ambient durant 5min per permetre la dissociació completa dels complexos nucleoproteics.
3. Afegir 0.2ml de cloroform per cada 1ml de TRIzol<sup>®</sup> utilitzat inicialment. Homogeneïtzar i centrifugar la mostra durant 15min a 12,000g i 4°C. Aquest pas permet separar la mostra en tres fases: la fase inferior o orgànica conté majoritàriament lípids i proteïnes, la interfase conté el DNA, i la fase superior o aquosa acumula l'RNA.
4. Recuperar la fase superior en un tub nou i repetir amb ella el pas 3 per tal de millorar-ne la puresa.
5. Recuperar la fase superior i transferir-la a un altre tub, afegir 0.5ml d'isopropanol (2-propanol) fred (4°C) per cada 1ml de reactiu TRIzol<sup>®</sup> utilitzat inicialment, i homogeneïtzar la suspensió.
6. Mantenir-la a -20°C durant 4-5h, o a 4°C durant 12-24h, per tal que l'RNA precipiti al fons del tub.
7. Centrifugar la mostra a 14,000g durant 10min a 4°C.
8. Eliminar el sobrenedant i afegir 1ml d'etanol fred al 75% (diluint en H<sub>2</sub>O miliQ) per cada 1ml de reactiu TRIzol<sup>®</sup> utilitzat inicialment. Centrifugar la mostra a 14,000g durant 4-5min a 4°C.
9. Repetir dues vegades el pas 8 per tal d'assegurar que no queda RNA en suspensió.
10. Eliminar el sobrenedant i deixar assecar el pellet a temperatura ambient (aproximadament 30min).
11. Dissoldre el pellet amb 10µl d'H<sub>2</sub>O lliure d'RNases.

12. Afegir 0.5µl de rDNasa I i 1µl de 10X buffer (LifeTechnologies) per cada 10µl d'RNA obtingut i deixar actuar durant 20min a 37°C. Aquest pas permet eliminar qualsevol traça de DNA que pugui haver quedat a la mostra.
13. Eliminar la rDNasa I mitjançant la repetició dels passos de l'1 a l'11 del protocol (l'enzim quedarà retintut a la fase orgànica i l'RNA a la fase aquosa).
14. Emmagatzemar les mostres a -80°C fins al moment de la seva utilització.

### 3.2.3. Controls de qualitat de l'RNA

Les mostres d'RNA es van sotmetre a diferents controls de qualitat per tal de garantir la seva puresa:

- La concentració de molècules d'RNA i la seva puresa es va determinar mitjançant un espectrofotòmetre UV/visible d'alta sensibilitat (Nanodrop 2000; Thermo Fisher Scientific). Aquest dispositiu permet avaluar àcids nucleics i proteïnes, amb uns límits de detecció per l'RNA compresos entre 2ng/µl i 3,000ng/µl. La puresa es calcula a partir de la ràtio de les lectures espectrofotomètriques a les longituds d'ona de 260nm i 280nm. Si la ràtio 260/280 és propera a 2.0, es considera que l'RNA presenta una puresa òptima (Chomczynski i Sacchi, 2006; Fleige i Pfaffl, 2006).
- L'absència de DNA i l'efectivitat del tractament amb DNasa, es va comprovar mitjançant la tècnica de la reacció en cadena de la polimerasa amb transcripció inversa (*reverse transcription-polymerase chain reaction*; RT-PCR) seguida d'una reacció en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*; PCR) convencional amb encebadors exó-exó pels gens Protamina 1 (*PRM1*), i Gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa (*GADPH*). Els encebadors pel gen *Protein tyrosine phosphatase, receptor type, C* (*CD45* o *PTPRC*) també van permetre excloure la presència d'RNA procedent de leucòcits ja que es tracta d'un marcador específic d'aquestes cèl·lules.

El protocol utilitzat va ser el següent:

1. Preparar la solució d'RT-PCR amb els components necessaris inclosos en el *High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit* (Thermo Fisher Scientific) (volum final de 2µl): 0.4µl de *10xRT Buffer*, 0.16µl de desoxiribonucleòtids trifosfats (dNTPs) amb

- desoxitimidina trifosfat (dTTPs) (100mM), 0.2µl de *Multi-Scribe reverse transcriptase* (50U/µl), 0.4µl de *RT Random primers* (10x), i 0.84µl d'aigua lliure d'RNases (Sigma-Aldrich).
2. Afegir 2µl d'RNA (a una concentració de 5-10ng RNA/µl) en cada tub.
  3. Homogeneïtzar i mantenir les mostres en gel picat durant 5 min.
  4. La reacció de retrotranscripció es va dur a terme en un *Eppendorf Mastercycler ep Gradient S 96* (Eppendorf) amb les següents condicions: 25°C durant 10min, 37°C durant 120min i 85°C durant 5s.
  5. Emmagatzemar el cDNA a -20°C fins al moment de la utilització.
  6. Preparar la solució de PCR amb els components necessaris (volum final de 10.75µl): 2.5µl de *Buffer II*, 2µl de *MgCl<sub>2</sub>*, 2µl de dNTPs, 2µl del encebador *forward*, 2µl del encebador *reverse* i 0.25µl de l'enzim *TaqGold (AmpliTaq Gold® DNA Polymerase with GeneAmp® 10X PCR Gold Buffer*, Thermo Fisher Scientific). Els encebadors es van dissenyar mitjançant el programa *Primer3 v.3.0.0* (<http://primer3.wi.mit.edu>) (Rozen i Skaletsky, 2000) (TIB MOLBIOL) (Taula 3.3).

Taula 3.3. Característiques dels encebadors i dels amplicons de les PCRs per *PRM1*, *GAPDH* i *CD45*.

Gen ( <i>GenBank</i> Accession number)	Seqüència encebador (5'-3')	Temperatura <i>annealing</i> (°C)	Mida cDNA (pb)	Mida DNA (pb)	Localització cromosòmica
<b><i>PRM1</i></b> (NM_002761.2)	For.CAGAGTTCCACCTGCTCACA Rev.GGATGGTGGCATTTC AAGA	62	331	422	Chr16:11,374,707-11,375,129
<b><i>GAPDH</i></b> (NM_002046.5)	For.CGACCACTTTGTCAAGCTCA Rev.AGGGGTCTACATGGCAACTG	64	228	332	Chr12:6,643,571-6,647,541
<b><i>CD45</i> o <i>PTPRC</i></b> (NM_002838.4)	For.CCTTGAACCCGAACATGAGT Rev.ATCTTTGAGGGGGATTCCAG	60	179	3,306	Chr1:198,608,098-198,726,605

Pb: Parells de bases

7. Afegir 13.25µl d'aigua lliure d'RNases (Sigma-Aldrich) i 1µl del cDNA resultant de la RT-PCR.
8. Homogeneïtzar les mostres i mantenir-les 5min en gel picat.

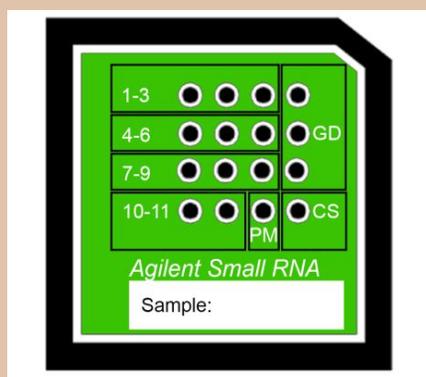
9. La reacció d'amplificació es va dur a terme en un *Eppendorf Mastercycler ep Gradient S 96* (Eppendorf) amb les següents condicions: 94°C durant 10min, 32 cicles de [94°C durant 45s, 62°C (per *PRM1*), 64°C (per *GAPDH*) o 60°C (per *CD45*) durant 45s, i 72°C durant 1min], i finalment 72°C durant 10min.
  10. Els productes d'amplificació es van analitzar mitjançant una electroforesi en un gel al 2% d'agarosa (60ml TBE 1x i 1.2g d'agarosa) marcats amb 3µl de *SYBR Safe DNA Gel Stain* (Thermo Fisher Scientific) i un marcador de pes molecular de 0.1-1kb (Promega). L'electroforesi es va realitzar a 90mV durant 45min i el gel es va visualitzar amb el transil·luminador *E-Box VX2* (Vilber Lourmat).
- La comprovació de la presència d'RNAs de mida petita i la confirmació de l'efectivitat del tractament amb el protocol SCL (absència d'RNA somàtic) es va efectuar mitjançant nanoelectroforesi. Aquest tipus d'anàlisi es realitza amb uns xips comercials que contenen una xarxa de canals gravats en un polímer microfluídic. Mitjançant l'aplicació de camps elèctrics, les mostres marcades amb fluorescència passen pels diversos canals. Seguidament, un detector integra la informació de la quantitat de fluorescència emesa pels diversos fragments, la qual és proporcional a la seva mida, i s'obté un perfil de la composició de la mostra.

Es van utilitzar dos xips nanoelectroforètics diferents: Per una banda, el xip *Agilent Small RNA*, el qual permet detectar i elaborar un perfil electroforètic de tots els fragments d'RNA presents a la mostra amb mides compreses entre els 4 i els 150nt (rang que inclou els miRNAs). Amb aquest xip es pot realitzar una estimació de la presència de molècules amb mides corresponents a miRNAs i la seva proporció relativa en relació al total d'snRNAs. D'altra banda, el xip *Agilent Nano 6000 RNA*, permet detectar fragments d'RNA presents a la mostra amb mides de 25 a 6,000nt. Degut a l'absència d'rRNA íntegre en els espermatozoides (*Ostermeier et al., 2002*), aquest xip permet confirmar la manca de bandes electroforètiques corresponents als rRNAs 18S i 28S i per tant l'absència d'RNA d'origen somàtic en les mostres obtingudes.

- La utilització del xip *Agilent Nano 6000 RNA* en cèl·lules somàtiques també ofereix la possibilitat de determinar la integritat de l'RNA mitjançant el càlcul de l'índex *RNA integrity number* (RIN) (quocient entre els pics d'emissió dels fragments d'rRNA 18S i 28S). Tenint en compte que no és possible obtenir aquest valor en espermatozoides ja que l'rRNA està degradat, es van realitzar controls paral·lels d'integritat a partir d'RNA extret de cèl·lules Jurkat. Valors de RIN propers a 10 indiquen que les mostres presenten una integritat òptima.

El protocol utilitzat en la preparació dels xips va ser el següent:

1. Diluir les mostres d'RNA amb aigua lliure d'RNases fins a obtenir entre 25-50ng d'RNA en 2 $\mu$ l.
2. Afegir 9 $\mu$ l de la barreja del gel colorant (*gel-dye*; GD) i 9 $\mu$ l de la solució tampó (*conditioning solution*; CS) en els pous corresponents (**Figura 3.1**).
3. Desnaturalitzar el marcador de pes molecular i les mostres d'RNA a 70°C durant 2min.
4. Afegir 5 $\mu$ l del marcador de pes molecular en el pou corresponent (**Figura 3.1**).
5. Desnaturalitzar les mostres a 70°C durant 2min i afegir 1 $\mu$ l de cada mostra en cadascun dels pous destinats a aquesta finalitat (fins a 11 mostres) (**Figura 3.1**).



**Figura 3.1.** Representació esquemàtica d'un xip *Agilent Small RNA*. 1-11: Pous on s'afegeixen les mostres, GD: Pous on s'afegeix el gel colorant, PM: Pou on s'afegeix el marcador de pes molecular, CS: Pou on s'afegeix la solució tampó.

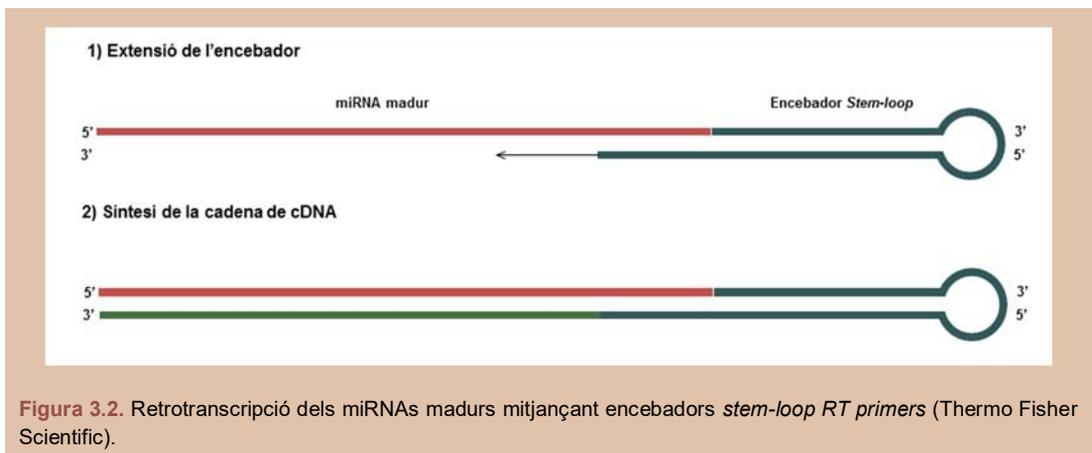
6. Centrifugar els xips a 2400rpm (centrífuga MS3, IKA) durant 1min.
7. Netejar els elèctrodes amb la solució *RNaseZap* (Life Technologies) i carregar els xips a l'aparell *Agilent-2100 Bioanalyzer* (Agilent Technologies) per tal d'elaborar el perfil de composició de la mostra.

La superació de tots els controls de qualitat establerts per totes les mostres d'RNA obtingudes es va considerar un factor imprescindible per tal de prosseguir amb la quantificació dels miRNAs presents a les mostres<sup>4</sup>.

### 3.2.4. Quantificació de l'expressió de miRNAs

#### 3.2.4.1. RT-PCR

Les mostres d'RNA es van sotmetre a una RT-PCR específica per miRNAs utilitzant el *TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription kit* (Thermo Fisher Scientific). Aquest kit conté els encebadors *Megaplex™ RT Human Primer Pool A v.2.0 and B v.3.0* (Thermo Fisher Scientific), anomenats *stem-loop RT primers* (Thermo Fisher Scientific). Aquests s'uneixen als extrems 3' dels miRNAs madurs (diferents dels que presenten les formes de miRNAs immadures) i possibiliten la seva retrotranscripció i amplificació específica (**Figura 3.2**).



<sup>4</sup> En la Publicació 1, les mostres d'RNA només es van sotmetre als controls de qualitat amb l'espectrofotòmetre UV/visible d'alta sensibilitat i PCR amb encebadors de *PRM1*.

Protocol:

1. Preparar la solució de RT-PCR amb els components necessaris (volum final de 7.5µl): 0.8µl de *Megaplex™ RT Human Primer Pool* (10x), 0.2µl de desoxiribonucleòtids trifosfats (dNTPs) amb desoxitimidina trifosfat (dTTPs) (100mM), 1.5µl de *Multi-Scribe reverse transcriptase* (50U/µl), 0.8µl de *RT buffer* (10x), 0.9µl MgCl<sub>2</sub> (25mM), 0.1µl d'inhibidors d'RNases (20U/µl), i 0.2µl d'aigua lliure d'RNases (Sigma-Aldrich).
2. Afegir 3µl d'RNA a una concentració de 15-20ng/µl.
3. Homogeneïtzar i mantenir 5min en gel picat.
4. La reacció de retrotranscripció es va dur a terme en un *Eppendorf Mastercycler ep Gradient S 96* (Eppendorf) amb les següents condicions: 40 cicles a [16°C durant 2min, 42°C durant 1min, i 50°C durant 1s], i finalment 85°C durant 5min.
5. Emmagatzemar les mostres a -20°C fins al moment de prosseguir amb la seva anàlisi.

### 3.2.4.2. Preamplificació

Degut a l'escassa quantitat d'RNA que contenen els espermatozoides, va ser necessari efectuar una preamplificació del cDNA retrotranscrit abans de realitzar la qRT-PCR<sup>5</sup>. La preamplificació requereix la utilització del *TaqMan® PreAmp Master Mix kit* (Thermo Fisher Scientific) que inclou els encebadors específics pels miRNAs a analitzar a cadascuna de les plaques (*Megaplex™ PreAmp Human Primer Pool A v.2.0 and B v.3.0*; Thermo Fisher Scientific).

Protocol:

1. Preparar la solució de preamplificació amb els components necessaris (volum final de 25µl): 12.5µl de *TaqMan® PreAmp Master Mix* (2x), 2.5µl de *Megaplex™ PreAmp Human Primer Pool* (10x), i 7.5µl d'aigua lliure d'RNases (Sigma-Aldrich).
2. Afegir 2.5µl del cDNA obtingut en la RT-PCR.
3. Homogeneïtzar i mantenir 5min en gel picat.

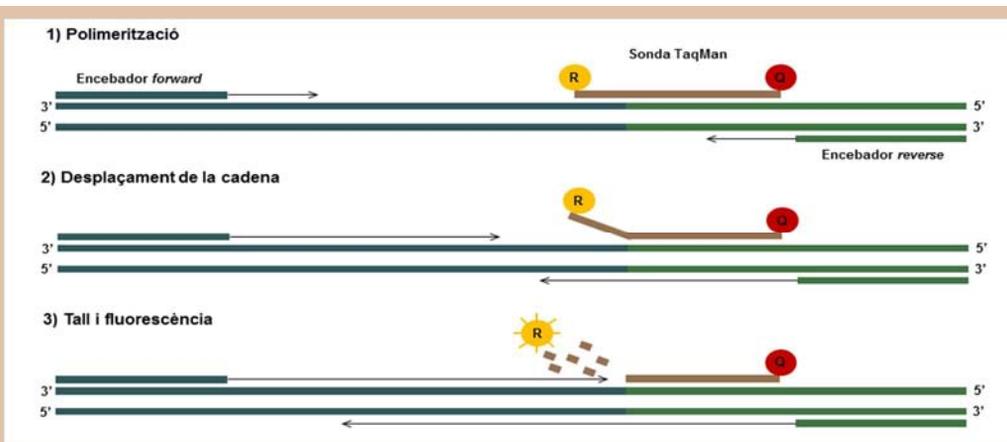
---

<sup>5</sup> Aquest pas va ser necessari únicament en els estudis realitzats a les Publicacions 2 i 3 on es va analitzar un elevat nombre de miRNAs per cada mostra. A la Publicació 1 només es van valorar quatre miRNAs i la quantitat d'RNA extret va ser suficient per analitzar-lo sense requerir aquest pas previ de preamplificació.

4. La reacció de preamplificació es va dur a terme en un *Eppendorf Mastercycler ep Gradient S 96* (Eppendorf) amb les següents condicions: 95°C durant 10min, 55°C durant 2min, 72°C durant 2min, 12 cicles a [95°C durant 15s, i 60°C durant 4min], i finalment 99°C durant 10min.
5. Diluir el cDNA preamplificat amb 75ml al 0.1x TE (10mM Tris, 1mM EDTA) (Thermo Fisher Scientific).
6. Emmagatzemar el cDNA a -20°C fins al moment de prosseguir amb la seva anàlisi.

### 3.2.4.3. qRT-PCR

La quantificació dels miRNAs es va realitzar per qRT-PCR mitjançant la tecnologia TaqMan®. Aquesta combina la utilització de sondes que reconeixen una seqüència interna de cada miRNA així com encebadors *forward* i *reverse* específics de cada miRNA. Les sondes TaqMan® tenen una longitud d'entre 20-26nt i estan marcades amb un fluoròfor a l'extrem 5' (*6-carboxyfluorescein*; FAM) i un inhibidor de fluorescència a l'extrem 3' (*tetramethylrhodamine*; TAMRA). Quan la sonda està intacta, la proximitat d'aquests elements impedeix l'emissió de la fluorescència. En el cas que hi hagi amplificació, l'activitat exonucleasa 5'-3' de la *Taq polymerase* produeix una escissió de la sonda de manera que ambdues molècules queden separades i per tant té lloc l'emissió de fluorescència que pot ser quantificada (a mesura que augmenta el nombre de còpies amplificades, la intensitat de fluorescència també incrementa) (**Figura 3.3**).



**Figura 3.3.** Principi utilitzat en quantificació de l'amplificació mitjançant la tecnologia TaqMan® (Thermo Fisher Scientific). R=*reporter* o fluoròfor, Q=*quencher* o inhibidor de fluorescència.

L'anàlisi de miRNAs amb aquesta tecnologia es pot realitzar de forma individualitzada (assajos únics) o mitjançant la utilització de plaques preconfigurades que permeten l'anàlisi simultània d'un elevat nombre de miRNAs.

El protocol de qRT-PCR desenvolupat a la Publicació 1 va incloure l'anàlisi amb assajos individuals. Concretament es van analitzar els miRNAs hsa-miR-23a, hsa-miR-744, hsa-let-7f i hsa-miR-1<sup>6</sup>. També es va incloure un assaig addicional amb el normalitzador Mamm-U6 (snRNA).

El protocol utilitzat va consistir en:

1. Preparar per triplicat la solució de qRT-PCR (volum final de 20µl): 1.3µl del cDNA obtingut en la RT-PCR, 10µl de la *TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG (2x)* (Thermo Fisher Scientific), 7.7µl d'aigua lliure d'RNases (Sigma-Aldrich), i 1µl de *TaqMan® Small RNA Assay (20x)*.
2. Mantenir les mostres en gel picat fins a la seva anàlisi.
3. Les mostres s'analitzen mitjançant el sistema *7900HT Fast Real-Time PCR System* (Thermo Fisher Scientific) amb les temperatures i temps que s'indiquen a continuació: 50°C durant 2min, 95°C durant 10min, 40 cicles a [95°C durant 15s i 60°C durant 1min].

El protocol de qRT-PCR desenvolupat a les Publicacions 2 i 3 va incloure l'anàlisi amb plaques preconfigurades. Aquestes plaques contenen un total de 768 assajos preestablerts per la casa comercial a partir de la base de dades miRBase v.20 ([www.mirbase.org](http://www.mirbase.org)).

El protocol utilitzat va consistir en:

1. Preparar la solució de qRT-PCR (volum final de 900µl): 9µl del producte de la preamplificació, 450µl del *TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG (2x)* (Thermo Fisher Scientific), i 441µl d'aigua lliure d'RNases (Sigma-Aldrich).
2. Homogeneïtzar i mantenir en gel picat fins a l'anàlisi.
3. Carregar les plaques *TaqMan® Array Human MicroRNA A v.2.0 and B Card Set v3.0* amb 100µl de la solució preparada. Entre els assajos predeterminats, s'hi inclouen tres controls endògens (el snRNA Mamm-U6, i els snoRNAs

---

<sup>6</sup> Els miRNAs van ser escollits en base a les diferències d'expressió descrites en estudis previs (Berezikov *et al.*, 2006; Lian *et al.*, 2009; Krawetz *et al.*, 2011).



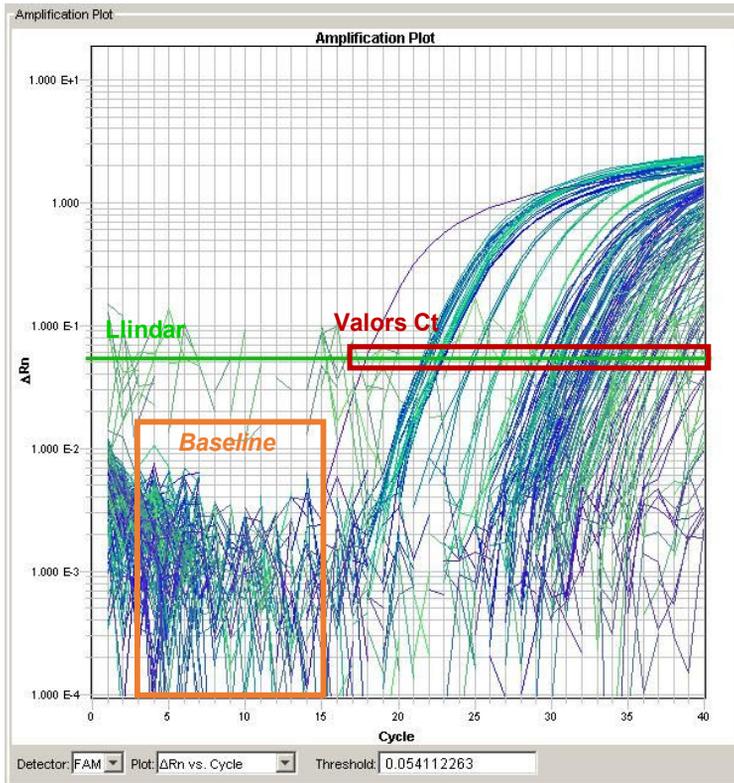
4. L'anàlisi de les plaques es va duu a terme amb el sistema *7900HT Fast Real-Time PCR System* (Thermo Fisher Scientific) amb les temperatures i temps que s'indiquen a continuació: 50°C durant 2min, 95°C durant 10min, 40 cicles de [95°C durant 15s, i 60°C durant 1min].

### 3.2.5. Anàlisi de dades de qRT-PCR

Els resultats de qRT-PCR es van processar mitjançant els programes SDS v.2.3 i RQ Manager v.1.2 (Thermo Fisher Scientific). La quantificació de les mostres s'expressa en relació a l'establiment del valor Ct (*cycle threshold*). Aquest fa referència al nombre de cicles de PCR necessaris per tal que la corba d'amplificació assoleixi una fase exponencial i creui una línia llindar. El valor d'aquest llindar es pot establir de forma manual (l'observador situa el nivell llindar en una posició aproximada que es correspon a la meitat de l'últim terç de la corba d'amplificació), o automàtica (el programa RQ Manager v.1.2 determina aquest valor a partir de multiplicar 10 vegades la desviació estàndard (DE) del valor de fluorescència mitjà obtingut en els cicles 3-15, corresponent al nivell de fluorescència basal) (**Figura 3.5**). En totes les valoracions realitzades, el valor llindar es va establir de forma automàtica per tal d'evitar variacions subjectives.

Així doncs, el valor de Ct representa la mesura relativa de la concentració d'un miRNA. En aquest sentit, els valors de Ct es classifiquen en tres categories: *Determined* o presents ( $15 \geq Ct < 35$ ), *Undetermined* o absents ( $Ct \geq 35$ ), i *Unreliable* o no valorables (absència de Ct o  $Ct < 15$ ).

Donat que la metodologia de qRT-PCR utilitzada es basa en quantificacions relatives, cal normalitzar els valors de Ct per tal d'analitzar eficientment les diferències biològiques i reduir les variacions tècniques que es poden produir durant l'execució experimental. La normalització consisteix en ajustar les dades a partir d'un valor de referència o normalitzador. Un cop normalitzats els valors de Ct, aquests passen a anomenar-se normCt (*normalized cycle threshold*).



**Figura 3.5.** Representació gràfica de les dades de qRT-PCR obtingudes en l'anàlisi de quatre miRNAs (hsa-miR-23a, hsa-miR-744, hsa-let-7f i hsa-miR-1) i el normalitzador snRNA MammU6. Per a cada miRNA es representen els resultats de tres rèpliques sobre vuit mostres diferents. El punt d'intersecció entre el valor llindar i la corba d'amplificació que es doni a partir del cicle 15 (*baseline*) determina el valor Ct.

En funció del tipus d'estudi realitzat, els resultats d'expressió obtinguts es van normalitzar utilitzant tres mètodes diferents:

- Normalització de les dades a partir dels valors d'expressió d'un normalitzador estàndard de referència: Aquest mètode es va utilitzar en el cas de dades provinents d'assajos individuals. Consisteix en seleccionar un transcrit de referència a partir del qual es normalitzen els resultats. En aquest cas es va utilitzar el snRNA Mamm-U6. La fórmula aplicada va ser la següent:

$$[\text{Valor de Ct miRNA} - \text{Valor de Ct Mamm-U6} = \text{Valor de normCt}]$$

- Normalització de les dades a partir del mètode MCR (*mean-centering restricted*) (Wylie *et al.*, 2011): Aquest mètode es va utilitzar en el cas de dades

provinents d'assajos múltiples (en plaques preconfigurades). Consisteix en utilitzar com a valor normalitzador la mitjana d'expressió de tots els valors d'expressió dels miRNAs detectats en cada placa. La fórmula aplicada va ser la següent:

[Valor de Ct miRNA - Mitjana dels valors Ct dels miRNAs detectats en la placa corresponent = Valor de normCt]

- Normalització de les dades a partir dels valors d'expressió de 3 miRNAs: Aquest mètode es va utilitzar de forma addicional en el cas de dades provinents d'assajos múltiples (en plaques preconfigurades) en la població d'individus fèrtils. Consisteix en utilitzar la mitjana d'expressió de 3 miRNAs seleccionats a partir del mètode *concordance correlation restricted* (CCR) (Wylie *et al.*, 2011). Aquest mètode permet establir quins miRNAs presenten una millor correlació amb la mitjana d'expressió de la placa (correlació de Pearson) (veure IV. Annex; IV.2. Scripts). La fórmula aplicada va ser la següent:

[Valor de Ct miRNA - Mitjana dels valors Ct dels tres miRNAs candidats = Valor de normCt]

### 3.2.6. Anàlisi estadística

Les dades obtingudes es van analitzar amb el programa lliure *R statistical computing environment* v.2.14.2 (<http://www.r-project.org>) (R Development Core, 2012) i el paquet estadístic addicional per dades de qRT-PCR *HTqPCR package* v.1.13.1 (<http://www.bioconductor.org>) (Dvinge i Bertone, 2009)<sup>7</sup>. En algunes anàlisis puntuals es van fer servir altres programes: (i) Deducer per *R statistical computing environment* (Fellows, 2012), per realitzar les anàlisis de conglomerats jeràrquics; (ii) *Statistics package for the social sciences* v.20 (IBM SPSS Statistics, Inc.), per analitzar la normalitat de les dades analitzades mitjançant els tests de Kolmogorov-Smirnov i Shapiro-Wilk; (iii) i SAS v.9.0 *statistics* (SAS Institute, Inc.), per calcular el nombre òptim de grups que constitueixen un dendrograma.

Per a la majoria d'anàlisis es van considerar significatius els P-valor<0.05 després d'aplicar la correcció de Bonferroni per comparacions múltiples. Només en l'anàlisi de Wilcoxon utilitzada per determinar l'expressió diferencial dels miRNAs entre individus

<sup>7</sup> Els *scripts* utilitzats en el programa estadístic R es troben detallats en l'apartat IV. Annex; IV.2. Scripts.

fèrtils i infèrtils es va considerar estadísticament significatiu un P-valor $<0.01$  després d'aplicar la correcció per falsos descobriments (*Benjamini-Hochberg false-discovery rate*; FDR) (Benjamini i Hochberg, 1995; Reiner *et al.*, 2003). Aquesta modificació es va realitzar per tal d'obtenir uns resultats més restrictius en la obtenció dels DE-miRNAs.

### 3.2.6.1. Dades provinents d'assajos individuals (Publicació 1)

En relació a les dades provinents d'assajos individuals, es van quantificar els nivells d'expressió de quatre miRNAs entre quatre individus fèrtils (C01-C04) (Taula 3.1) i quatre infèrtils (P01-P04) (Taula 3.2).

A partir de la diferència entre els valors de normCt obtinguts en cadascun dels individus infèrtils respecte la mitjana dels valors de normCt dels individus fèrtils es va calcular l'estadístic *Fold Change* (mesura que descriu el nombre de vegades que canvia l'expressió en comparar dos valors d'expressió): Valors *Fold Change* inferiors a 1 indiquen una disminució de l'expressió, mentre que valors *Fold Change* superiors a 1 indiquen increments d'expressió.

Es van considerar que les diferències d'expressió eren significatives quan el valor de *Fold Change* era inferior o superior a 1 i el valor de normCt es situava fora de l'interval de confiança al 95% de la mitjana d'expressió de les mostres control.

### 3.2.6.2. Dades provinents d'assajos múltiples en plaques preconfigurades (Publicacions 2 i 3)

Per les dades provinents d'assajos múltiples (S01-S40) (Taula 3.1 i Taula 3.2) es van dur a terme les següents anàlisis:

a) Homogeneïtat de les poblacions

Es va analitzar el grau de similitud dels individus que formaven les quatre poblacions analitzades (S01-S10, S11-S20, S21-S30 i S31-S40) tenint en compte les categories de miRNAs presents, absents i no valorables. Es va aplicar una anàlisi de conglomerats jeràrquics utilitzant la distància Euclidiana i el mètode de la Mitjana (el valor mitjà de les distàncies de tots els individus d'un conglomerat s'assigna com la distància entre conglomerats) (Publicacions 2 i 3).

A més, dins de cadascuna de les poblacions analitzades (S01-S10, S11-S20, S21-S30 i S31-S40), es van realitzar correlacions d'Spearman mostra a mostra a partir dels valors normCt dels miRNAs presents en tots els individus (Publicacions 2 i 3).

Per aprofundir en la descripció de la homogeneïtat de la població control S01-S10 (Publicació 2), es van identificar les famílies de miRNAs<sup>8</sup> amb més del 50% dels seus membres presents entre els miRNAs detectats de forma ubíqua en tots els individus analitzats. La classificació dels miRNAs en famílies es va realitzar mitjançant el programa *Tool for Annotations of miRNAs* (TAM v.1.3; <http://cmbi.bjmu.edu.cn/tam>) (Lu *et al.*, 2010).

b) Efecte de les variables edat, seminograma i incidència d'anomalies cromosòmiques numèriques sobre l'expressió de miRNAs

Es va determinar la relació entre els valors d'expressió normalitzats (normCt) de cada miRNA analitzat i els paràmetres edat, seminograma (volum de l'ejaculat, concentració, motilitat i morfologia espermàtica) i incidència d'anomalies cromosòmiques numèriques. L'avaluació de l'existència de correlació entre aquestes variables es va realitzar mitjançant el test d'Spearman després d'eliminar els valors atípics utilitzant el mètode de la distància de Cook (Cook's Di).

Aquesta anàlisi es va realitzar en el grup d'individus fèrtils en particular (població S01-10) (Publicació 2), i de forma conjunta pels individus de les poblacions fèrtil (S01-S10) i infèrtils (S11-S20, S21-S30 i S31-S40) (Publicació 3), exceptuant l'anàlisi del paràmetre d'incidència d'anomalies cromosòmiques numèriques que només es va fer de forma conjunta (S01-S40) (Publicació 3).

c) Parelles de miRNA estables com a candidats a biomarcadors

A partir dels perfils d'expressió obtinguts a la població d'individus S01-10 (Publicació 2) es van cercar parelles de miRNAs amb una expressió relativa estable. Amb aquest objectiu es van realitzar correlacions miRNA-miRNA utilitzant el test d'Spearman. Les parelles de miRNAs obtingudes es van ordenar de més a menys correlacionades després d'ajustar el nivell de significació al 95% amb la correcció de Bonferroni.

---

<sup>8</sup> Conjunt de miRNAs que presenten una seqüència amb un alt grau de similitud i que estan implicats en la regulació de funcions similars.

d) Validació de miRNAs com a candidats a normalitzadors

Per la població d'individus S01-10 (Publicació 2) es va comprovar, mitjançant el test d'Spearman, el grau de correlació de les dades normalitzades (normCt) amb els tres miRNAs seleccionats (obtinguts amb el mètode CCR) i les dades normalitzades amb el mètode MCR.

e) Anàlisi global de les poblacions

- Agrupació dels individus segons els perfils d'expressió de miRNAs

Els perfils d'expressió normalitzats (normCt) dels individus S01-S10, S11-S20, S21-S30 i S31-S40 es van sotmetre a una anàlisi de conglomerats jeràrquics (Publicació 3). Aquestes anàlisis es van realitzar utilitzant el mètode de Ward i tenint en compte la mesura de distància Euclidiana. El nombre òptim de conglomerats que defineixen el dendrograma es va calcular mitjançant el mètode del *cubic clustering criterion*.

Per identificar els factors influents en les agrupacions obtingudes es van realitzar anàlisis bivariants, les quals permeten detectar variables distribuïdes de forma diferencial entre els diversos grups. Es va valorar l'efecte de les variables edat (R1=rang de 20-29 anys, R2=rang de 30-39 anys, i R3=rang de 40-50 anys), seminograma (normozoospermia, astenozoospermia, teratozoospermia o oligozoospermia) i incidència d'anomalies cromosòmiques numèriques en espermatozoides ("Normal" o "Alterada") mitjançant el test de khi-quadrat. D'altra banda, la influència dels resultats de TRA (taxa de fecundació, percentatge d'embrions descartats, taxa d'embaràs i taxa d'avortament) es va valorar mitjançant el test de Mann-Whitney.

- Identificació de DE-miRNAs

Per identificar els DE-miRNAs en cadascuna de les poblacions d'individus infèrtils (S11-S20, S21-S30 i S31-S40), es va comparar la mitjana del valor normCt de cada miRNA amb les mitjanes obtingues en la població d'individus fèrtils (S01-10) utilitzant el test no paramètric de rangs de Wilcoxon (Publicació 3).

- Caracterització de regions genòmiques en les que s'inclouen els DE-miRNAs

De cada DE-miRNA identificat es van recollir les següents característiques:

- i. Localització genòmica: 3'UTR, introns, exons o regions intergèniques (*miRNAMap v2.0 database*: <http://mirna-map.mbc.nctu.edu.tw/index.php>) (Hsu *et al.*, 2008). Les funcions dels gens continguts en les unitats de transcripció dels DE-miRNAs localitzats en regions intròniques es van identificar mitjançant la base de dades *GeneCards v4.0* (<http://genecards.org/>).
- ii. Sentit de la transcripció: *Forward* (lectura 5'-3') o *reverse* (lectura 3'-5') (*Genome Browser database*: <http://genome.ucsc.edu/>, i *miRcode microRNA sites external track*: <http://www.mircode.org/>) (Jeggari *et al.*, 2012).
- iii. Estat de metilació de les regions codificants: Regions metilades (relacionades amb cromatina més compacta empaquetada preferencialment per protamines) i regions no metilades (relacionades amb una cromatina menys compacta empaquetada preferencialment per histones) (Hammoud *et al.*, 2009) (*Genome Browser database*: <http://genome.ucsc.edu/>, i *DNA Methylation external track from Smith Lab*: <http://smithlabre-search.org/software/methbase/>) (Song *et al.*, 2013).

Per valorar si la població de DE-miRNAs presentava diferències significatives d'alguna d'aquestes característiques es va aplicar el test de khi-quadrat. Es van utilitzar com a valors de referència les dades corresponents al conjunt de 736 miRNAs analitzats.

En les anàlisis d'agrupació dels individus segons els perfils d'expressió de miRNAs i la identificació de DE-miRNAs, els valors de  $Ct \geq 35$  es van ajustar mitjançant la fórmula  $[\text{normCt màxima detectada en tots els individus analitzats}] + 1$ . Aquesta transformació es va efectuar amb la intenció de descartar la influència dels valors  $Ct \geq 35$  en les anàlisis, ja que aquests no són indicatius de cap variació biològica (independentment del seu valor absolut, tots reflecteixen per igual una manca d'expressió).

f) Predicció de gens diana i ontologia gènica

La predicció de gens diana es va realitzar pels miRNAs presents i absents en tots els individus de la població S01-10 (Publicació 2) i pels DE-miRNAs identificats en les poblacions d'individus infèrtils (S11-S20, S21-S30 i S31-S40) (Publicació 3). L'avaluació de l'existència de processos biològics enriquits entre aquests gens es va realitzar mitjançant anàlisis d'ontologia gènica (GO).

- Predicció gens diana

Per la població fèrtil (S01-10), els gens diana es van identificar mitjançant el programa *DIANA-microT* v.3.0 (<http://diana.cslab.ece.ntua.gr/microT/>) (Maragkakis *et al.*, 2009a, 2009b). Per tal de determinar les dianes més fiables d'aquests miRNAs, es van seleccionar aquells gens que presentaven un valor de predicció (*miRNA target gene*; miTG) superior a 19 (corresponent al criteri de selecció "estricte"). Aquest valor l'aporta el programa d'anàlisi a partir de la complementarietat de bases existent entre els miRNAs i les possibles seqüències diana, tenint en compte també el grau de conservació entre espècies. D'aquesta manera, com més complementarietat de bases existeixi i més conservada sigui la seqüència, major serà el valor miTG. L'establiment de miTG>19 en aquest tipus de predicció representa un criteri de selecció altament restrictiu el qual garanteix que els gens seleccionats tinguin una elevada probabilitat de ser dianes reals.

Per identificar els gens diana predits dels DE-miRNAs en cada població infèrtil (S11-S20, S21-S30 i S31-S40) es va utilitzar una versió més actualitzada del programa (*DIANA-microT CDS* v.5.0; <http://diana.imis.athena-innovation.gr>) (Reczko *et al.*, 2012; Paraskevopoulou *et al.*, 2013). Aquesta inclou una major sensibilitat respecte la versió anterior (62% vs. 52%) com a resultat de la millora del reconeixement de seqüències en regions 3'UTR, introns i exons entre les possibles dianes. Aquesta versió també contemplava una nova fórmula de càlcul del miTG i per tant, es va haver d'ajustar el valor seleccionat a la versió anterior al seu equivalent corresponent: miTG≥0.8.

- Anàlisi d'ontologia gènica

Es va realitzar una anàlisi de GO per tal d'identificar els processos biològics enriquits a partir dels gens diana identificats. Aquesta es va realitzar

mitjançant la utilització del recurs bioinformàtic online *DAVID Bioinformatics Resources v.6.7* (*Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*: <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) (Huang *et al.*, 2009a, 2009b). Es va seleccionar el genoma total de l'*Homo sapiens* com a valor de referència i es van considerar significatius P-valors < 0.05 després de corregir per Bonferroni.

#### h) Identificació de gens associats a espermatogènesi i meiosi

D'entre les dianes predites pels DE-miRNAs detectats en cada una de les poblacions infèrtils (S11-S20, S21-S30 i S31-S40) (Publicació 3), es van seleccionar els gens amb una funció relacionada amb l'espermatogènesi o la meiosi. L'estratègia de filtrat utilitzada en aquest procés de selecció va consistir en obtenir tots els processos biològics on hi participava alguna de les dianes predites (independentment del P-valor) dels DE-miRNAs. Seguidament, es van seleccionar aquells processos biològics que contenien l'arrel "SPERM" o "MEIO" en el seu descriptiu per cadascuna de les poblacions, i es va obtenir el llistat de gens inclosos en cadascun dels processos seleccionats. Finalment, els gens coincidents entre les llistes de les tres poblacions van determinar al conjunt de gens comuns implicats en els processos d'espermatogènesi o meiosi.

# Capítol 4. Resum resultats



## Capítol 4. Resum resultats

### 4.1. Purificació espermàtica i extracció del transcriptoma d'espermatozoides

#### 4.1.1. Purificació espermàtica

El protocol de purificació espermàtica va permetre eliminar les cèl·lules somàtiques de l'ejaculat. En tots els casos es va assolir la ràtio establerta de menys d'1 cèl·lula per cada 10,000 espermatozoides. La fracció espermàtica recuperada després del tractament va ser, de mitjana, del 70.9% (rang=46.4-88.7%).

#### 4.1.2. Extracció d'RNA

##### 4.1.2.1. Quantitat i puresa

El mètode d'extracció d'RNA va permetre obtenir una mitjana de 1,230ng d'RNA total per mostra (rang=145-9,532) que, en relació al nombre d'espermatozoides utilitzats, representa 81fg d'RNA per espermatozoide (**Taula 4.1**).

El nombre total d'espermatozoides emprats va correlacionar amb la quantitat d'RNA extret ( $P$ -valor<0.001, i  $\rho$ =0.496) (**Figura 4.1**). El grau mitjà de puresa va ser de 1.74 (rang=0.93-1.97).

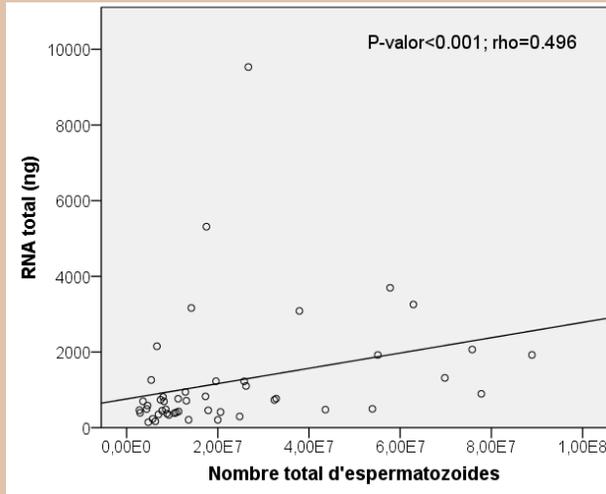
**Taula 4.1.** Dades de l'extracció d'RNA.

Codi mostra	Nombre total d'espermatozoides	RNA total (ng)	RNA(fg)/spz.	Puresa (260/280nm)
C01	9.28x10 <sup>6</sup>	337	36	1.71
C02	6.30x10 <sup>6</sup>	167	26	1.63
C03	4.76x10 <sup>6</sup>	145	30	1.77
C04	5.72x10 <sup>6</sup>	233	41	1.81
P01	1.36x10 <sup>7</sup>	208	15	1.67
P02	6.98x10 <sup>7</sup>	1,316	19	1.72
P03	3.24x10 <sup>7</sup>	734	23	1.75
P04	2.48x10 <sup>7</sup>	296	12	1.73
S01	5.78x10 <sup>7</sup>	3,697	64	1.92
S02	1.96x10 <sup>7</sup>	1,229	63	1.94
S03	1.73x10 <sup>7</sup>	828	48	1.93
S04	8.20x10 <sup>6</sup>	696	85	1.84

## Capítol 4. Resum resultats

S05	7.45x10 <sup>6</sup>	737	99	1.85
S06	1.31x10 <sup>7</sup>	712	54	1.84
S07	1.09x10 <sup>7</sup>	402	37	1.84
S08	1.79x10 <sup>7</sup>	458	26	1.97
S09	1.14x10 <sup>7</sup>	428	38	1.85
S10	8.85x10 <sup>6</sup>	373	42	1.96
S11	2.58x10 <sup>7</sup>	1,225	47	1.83
S12	4.36x10 <sup>7</sup>	477	11	1.79
S13	7.78x10 <sup>7</sup>	895	11	1.77
S14	2.00x10 <sup>7</sup>	207	10	1.62
S15	2.62x10 <sup>7</sup>	1,103	42	1.77
S16	7.58x10 <sup>7</sup>	2,066	27	1.78
S17	6.65x10 <sup>6</sup>	2,152	324	1.80
S18	1.75x10 <sup>7</sup>	5,313	304	1.83
S19	2.95x10 <sup>6</sup>	392	133	1.72
S20	2.67x10 <sup>7</sup>	9,532	357	1.80
S21	5.39x10 <sup>7</sup>	497	9	1.74
S22	1.13x10 <sup>7</sup>	765	68	1.75
S23	6.29x10 <sup>7</sup>	3,256	52	1.84
S24	3.79x10 <sup>7</sup>	3,085	81	1.80
S25	8.89x10 <sup>7</sup>	1,924	22	1.81
S26	5.51x10 <sup>7</sup>	1,923	35	1.75
S27	1.29x10 <sup>7</sup>	944	73	1.75
S28	1.42x10 <sup>7</sup>	3,165	223	1.77
S29	2.06x10 <sup>7</sup>	414	20	1.60
S30	3.28x10 <sup>7</sup>	769	23	1.80
S31	7.00x10 <sup>6</sup>	352	50	1.67
S32	2.80x10 <sup>6</sup>	463	165	1.61
S33	8.00x10 <sup>6</sup>	811	101	1.74
S34	3.60x10 <sup>6</sup>	698	194	1.64
S35	1.05x10 <sup>7</sup>	382	36	1.77
S36	7.80x10 <sup>6</sup>	446	57	1.70
S37	8.60x10 <sup>6</sup>	482	56	1.75
S38	4.40x10 <sup>6</sup>	493	112	1.36
S39	4.60x10 <sup>6</sup>	586	127	0.93
S40	5.40x10 <sup>6</sup>	1,260	350	1.43
Mitjana (rang)	2.32x10 <sup>7</sup> (2.80x10 <sup>6</sup> -8.89x10 <sup>7</sup> )	1,230 (145-9,532)	81 (9-357)	1.74 (0.93-1.97)

Ng: Nanograms, fg: Femtograms, Spz.: Espermatozoides.

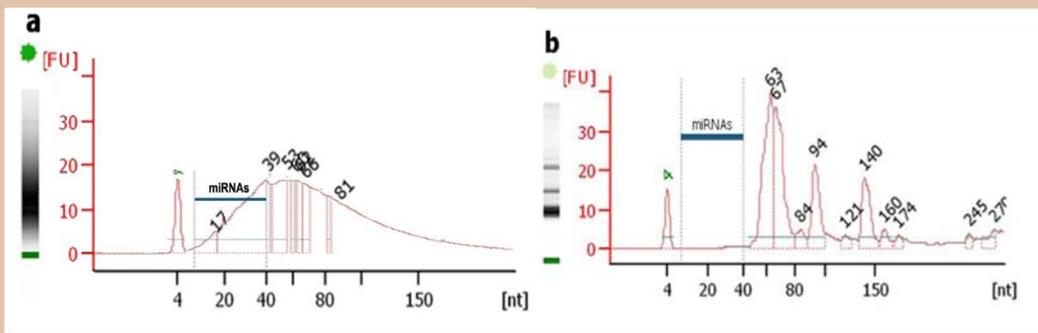


**Figura 4.1.** Diagrama de correlació entre el nombre total d'espermatozoides utilitzats en l'extracció d'RNA i la quantitat total d'RNA obtingut.

### 4.1.2.2. Controls de qualitat

L'anàlisi mitjançant PCR convencional amb encebadors exó-exó de *PRM1* (mostres C01-C04, P01-P04, i S01-S40) i *GAPDH* (mostres S01-S40) va mostrar amplificacions úniques de fragments amb mides de 422b i 332b respectivament, que es corresponien a les mides esperades per les molècules de cDNA. Això va permetre descartar la presència de DNA i confirmar la integritat dels transcrits purificats. Per altra banda, en cap cas es va observar la presència d'amplificació pel transcrit corresponen a *CD45* (mostres S01-S40), per la qual cosa es va poder descartar la presència d'RNA d'origen leucocitari en les mostres d'RNA obtingudes (**Taula 4.2**).

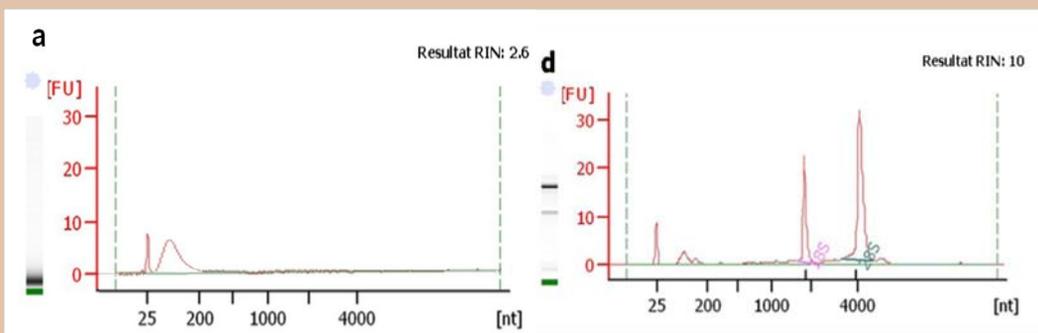
En les mostres d'RNA espermàtic, els resultats dels xips nanoelectroforètics *Agilent Small RNA* van mostrar una concentració d'RNAs petits d'entre 854 i 47,662pg/ $\mu$ l (**Taula 4.2**). Un 23-93% d'aquests (mitjana=55.1%) es van correspondre transcrits amb mides corresponents als miRNAs (22-24nt) (**Figura 4.2a**). Per altra banda, en les cèl·lules Jurkat es van observar fraccions específiques de ncRNAs amb mides corresponents a tRNAs (65nt), pre-miRNAs (90-94nt) i rRNAs (140nt) (**Figura 4.2b** i **Taula 4.2**).



**Figura 4.2.** Exemple de perfils de composició de les mostres de l'RNA mitjançant el xip d'Agilent Small RNA. (a) Mostres d'RNA espermàtic i (b) mostres d'RNA de cèl·lules Jurkat (control somàtic).

FU: Unitats arbitràries de fluorescència, nt: Nucleòtids.

En les mostres d'RNA espermàtic, els xips nanoelectroforètics *Agilent Nano 6000 RNA* van mostrar un pic corresponent a mides aproximades a 100nt i l'absència de pics electroforètics corresponents a les fraccions d'rRNA 18S i 28S (**Figura 4.3a**). En canvi, els gràfics obtinguts amb les cèl·lules Jurkat sí que van mostrar els pics corresponents a les dues subunitats d'rRNA 18S i 28S. A més, tots els valors d'integritat de l'RNA (índex RIN) obtinguts en aquestes cèl·lules van mostrar valors d'entre 9.4-10 (mitjana de 9.67) (**Figura 4.3b** i **Taula 4.2**).



**Figura 4.3.** Exemple de perfils de composició de les mostres de l'RNA mitjançant el xip d'Agilent Nano 6000 RNA. (a) Mostres d'RNA espermàtic i (b) mostres d'RNA de cèl·lules Jurkat (control somàtic).

FU: Unitats arbitràries de fluorescència, nt: Nucleòtids.

**Taula 4.2.** Resultats obtinguts en els controls de qualitat realitzats mitjançant PCR (*PRM1*, *GAPDH* i *CD45*) i nanoelectroforesi (*Agilent Small RNA* i *Agilent Nano 6000 RNA*).

Codi mostra	<i>PRM1</i>		<i>GAPDH</i>		<i>CD45</i>		<i>Agilent Small RNA</i>		<i>Agilent Nano 6000 RNA</i>	
	Banda DNA	Banda cDNA	Banda DNA	Banda cDNA	Banda DNA	Banda cDNA	Concentració RNAs petits	% miRNAs	Pic 18S/28S	RIN
C01	No	Sí	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
C02	No	Sí	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
C03	No	Sí	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
C04	No	Sí	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P01	No	Sí	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P02	No	Sí	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P03	No	Sí	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P04	No	Sí	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
S01	No	Sí	No	Sí	No	No	1,660	60	No	NA
S02	No	Sí	No	Sí	No	No	4,533	53	No	NA
S03	No	Sí	No	Sí	No	No	3,202	57	No	NA
S04	No	Sí	No	Sí	No	No	1,165	57	No	NA
S05	No	Sí	No	Sí	No	No	854	53	No	NA
S06	No	Sí	No	Sí	No	No	2,131	70	No	NA
S07	No	Sí	No	Sí	No	No	2,044	64	No	NA
S08	No	Sí	No	Sí	No	No	1,767	68	No	NA
S09	No	Sí	No	Sí	No	No	1320	55	No	NA
S10	No	Sí	No	Sí	No	No	1,741	49	No	NA
S11	No	Sí	No	Sí	No	No	21,435	70	No	NA
S12	No	Sí	No	Sí	No	No	1,666	62	No	NA
S13	No	Sí	No	Sí	No	No	8,337	41	No	NA
S14	No	Sí	No	Sí	No	No	47,662	93	No	NA
S15	No	Sí	No	Sí	No	No	5,645	56	No	NA
S16	No	Sí	No	Sí	No	No	3,853	55	No	NA
S17	No	Sí	No	Sí	No	No	2,074	44	No	NA
S18	No	Sí	No	Sí	No	No	8,802	47	No	NA
S19	No	Sí	No	Sí	No	No	3,092	55	No	NA
S20	No	Sí	No	Sí	No	No	8,816	66	No	NA
S21	No	Sí	No	Sí	No	No	20,360	89	No	NA
S22	No	Sí	No	Sí	No	No	23,952	92	No	NA
S23	No	Sí	No	Sí	No	No	11,729	52	No	NA
S24	No	Sí	No	Sí	No	No	8,847	45	No	NA
S25	No	Sí	No	Sí	No	No	5,101	50	No	NA
S26	No	Sí	No	Sí	No	No	22,776	57	No	NA
S27	No	Sí	No	Sí	No	No	3,993	37	No	NA
S28	No	Sí	No	Sí	No	No	3,944	54	No	NA
S29	No	Sí	No	Sí	No	No	8,695	52	No	NA
S30	No	Sí	No	Sí	No	No	1,681	43	No	NA
S31	No	Sí	No	Sí	No	No	9,763	59	No	NA
S32	No	Sí	No	Sí	No	No	4,391	36	No	NA
S33	No	Sí	No	Sí	No	No	3,383	29	No	NA

S34	No	Sí	No	Sí	No	No	7,167	58	No	NA
S35	No	Sí	No	Sí	No	No	6,653	54	No	NA
S36	No	Sí	No	Sí	No	No	4,626	53	No	NA
S37	No	Sí	No	Sí	No	No	5,005	51	No	NA
S38	No	Sí	No	Sí	No	No	1,817	23	No	NA
S39	No	Sí	No	Sí	No	No	4,963	45	No	NA
S40	No	Sí	No	Sí	No	No	2,163	50	No	NA
Jurkat1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	404	2	Sí	9.9
Jurkat2	NA	NA	NA	NA	NA	NA	327	2	Sí	10
Jurkat3	NA	NA	NA	NA	NA	NA	105	2	Sí	9.4
Jurkat4	NA	NA	NA	NA	NA	NA	173	2	Sí	9.4

NA: No avaluat.

### 4.1.3. Validació de la presència de miRNAs en espermatozoides

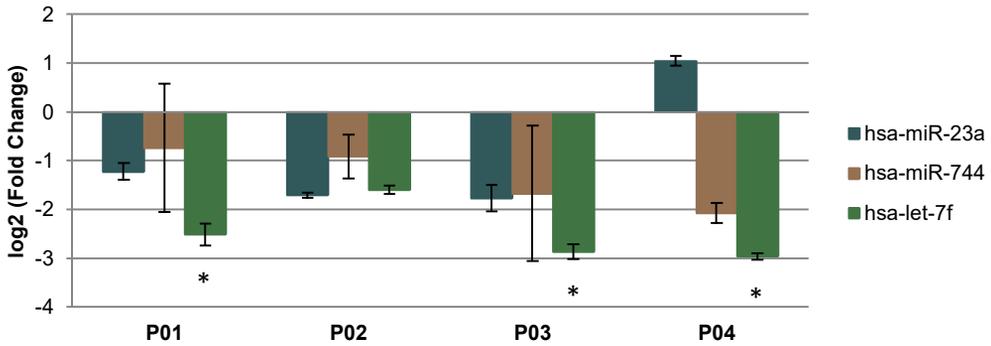
En totes les mostres d'RNA espermàtic procedents dels individus fèrtils (C01-C04) i infèrtils (P01-P04) analitzades mitjançant assajos únics, es van detectar els miRNAs hsa-miR-23a, hsa-miR-744 i hsa-let-7f. Aquests van mostrar nivells d'expressió (mitjana  $Ct \pm$  desviació estàndard; DE) de  $30.21 \pm 0.86$ ,  $33.14 \pm 1.11$  i  $34.33 \pm 1.10$  respectivament (**Taula 4.3**). En canvi, cap de les mostres va presentar amplificació pel hsa-miR-1 (mitjana  $Ct \pm DE = 37.60 \pm 1.05$ ) (**Taula 4.3**). Aquests resultats van permetre confirmar la presència de miRNAs entre els transcrits purificats.

**Taula 4.3.** Valors d'expressió dels quatre miRNAs analitzats en els individus fèrtils (C01-C04) i infèrtils (P01-P04).

	Individus fèrtils	Individus infèrtils			
	mitjana $Ct \pm DE$	Ct P01	Ct P02	Ct P03	Ct P04
<b>hsa-miR-23a</b>	$30.46 \pm 0.87$	29.91	30.73	30.47	28.71
<b>hsa-miR-744</b>	$33.18 \pm 1.34$	32.13	32.64	33.08	34.53
<b>hsa-let-7f</b>	$33.82 \pm 1.15$	34.52	33.94	34.89	36.03
<b>hsa-miR-1</b>	$37.16 \pm 0.88$	38.77	36.94	37.20	39.22

Ct: *Cycle threshold*, DE: Desviació estàndard.

Els miRNAs hsa-miR-23a i hsa-miR-744 van presentar nivells d'expressió equivalents en les mostres d'individus fèrtils i infèrtils. En canvi, hsa-let-7f va mostrar una reducció significativa en tres dels quatre individus infèrtils analitzats (P01, P03 i P04) (**Figura 4.4**).



**Figura 4.4.** Diferències d'expressió dels tres miRNAs detectats en els individus infèrtils respecte a la mitjana dels individus fèrtils. El logaritme de 2 ( $\log_2$ ) del valor *Fold Change* és una transformació que permet expressar-lo en valors positius o negatius, depenent de si hi ha un augment de l'expressió o una disminució respectivament.

\* Diferència d'expressió significativa (la mitjana es situa fora de l'interval de confiança de l'expressió normalitzada en les mostres fèrtils).

## 4.2. Perfils d'expressió en individus fèrtils

### 4.2.1. miRNAs presents i absents en individus fèrtils

En els espermatozoides dels individus fèrtils analitzats amb plaques preconfigurades (S01-S10), es van detectar 221 miRNAs presents de forma ubíqua (**Taula suplementària 1**). Per contra, es van trobar 63 miRNAs absents en tots els individus (**Taula suplementària 2**) i 452 miRNAs presents només en alguns individus.

Pel que fa a les famílies de miRNAs més observades, destaquen les famílies miR-30 i miR-10 per tenir el 100% dels seus membres presents entre els miRNAs expressats en tots els individus. D'altra banda també es va detectar la presència de més del 50% dels membres de les famílies let-7, miR-8, miR-15, miR-17, miR-28, miR-99, miR-188, i miR-743. La família amb més nombre de membres representats entre els miRNAs presents en tots els individus va ser la miR-515, amb 13 miRNAs (**Taula suplementària 1**).

Entre els miRNAs expressats de forma ubíqua en tots aquests individus fèrtils, els 10 miRNAs amb nivells d'expressió mitjans més elevats (normCt més baixa) i els 10 miRNAs amb nivells d'expressió més estables (DE més baixa) es troben recollits a la **Taula 4.4**.

Taula 4.4. Els 10 miRNAs més expressats i més estables en espermatozoides de la població d'individus fèrtils.

Més expressats		Més estables	
miRNA	Mitjana normCt	miRNA	DE normCt
hsa-miR-34b-3p	-7.551	hsa-miR-663b	0.335
hsa-miR-375	-6.134	hsa-miR-564	0.365
hsa-miR-191-5p	-6.024	hsa-miR-744-5p	0.426
hsa-miR-19b-3p	-5.328	hsa-miR-1282	0.438
hsa-miR-200c-3p	-5.309	hsa-miR-935	0.452
hsa-miR-132-3p	-5.138	hsa-let-7d-5p	0.483
hsa-miR-30c-5p	-4.940	hsa-miR-543	0.494
hsa-miR-891a	-4.625	hsa-miR-572	0.511
hsa-miR-30b-5p	-4.421	hsa-miR-1180	0.513
hsa-miR-1233-3p	-4.143	hsa-miR-638	0.528

DE: Desviació estàndard

## 4.2.2. Homogeneïtat de la població fèrtil

El dendrograma obtingut de l'anàlisi de conglomerats jeràrquics basada en el perfil de miRNAs presents, absents i no informatius de cada individu, va mostrar la formació de dos conjunts principals (Figura 4.5). Les diferències entre aquests dos grups es van quantificar en menys d'un 10%.

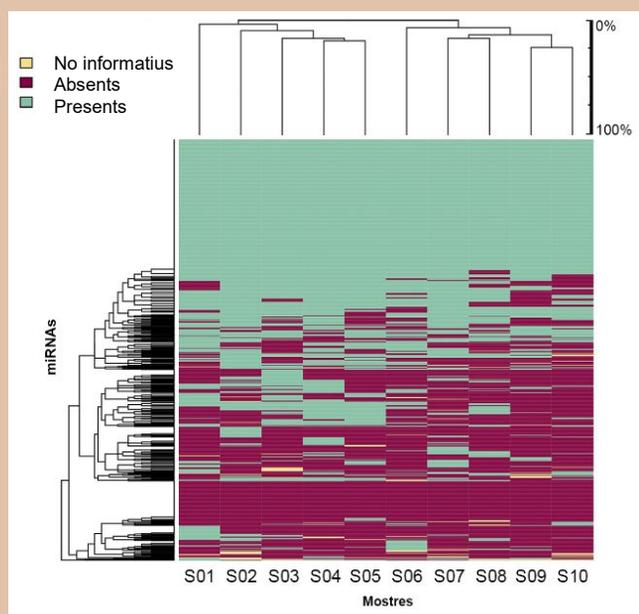


Figura 4.5. Dendrograma de l'anàlisi de conglomerats jeràrquics realitzada amb els valors d'expressió no normalitzats (Ct) dels miRNAs presents, absents i d'expressió variable en els espermatozoides dels individus fèrtils (S01-S10). Les mostres estan representades en les columnes (n=10) i els assajos en les files (n=768).

D'altra banda, totes les correlacions de Spearman realitzades entre els valors normCt dels miRNAs amb expressió ubiqua van resultar estadísticament significatives amb un rang de valors rho de 0.61-0.93 (Figura 4.6).

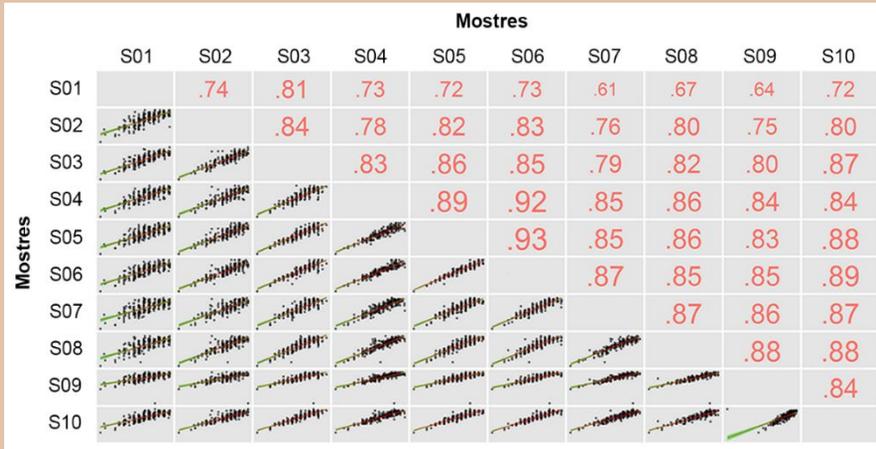


Figura 4.6. Resultats de rho de les correlacions de Spearman realitzades entre els valors de normCt dels miRNAs constantment expressats en la població d'individus fèrtils (S01-S10).

### 4.2.3. Anàlisi de l'efecte de les variables edat i seminograma sobre l'expressió de miRNAs de la població fèrtil

Les correlacions efectuades entre els valors normCt de cadascun dels miRNAs analitzats i les variables edat i paràmetres seminals (volum ejaculat, concentració, motilitat i morfologia espermàtica) no van mostrar cap resultat significatiu.

### 4.2.4. Predicció de gens diana i ontologia gènica en la població fèrtil

L'estudi de les dianes predites pels miRNAs presents en els espermatozoides de tots els individus fèrtils va permetre identificar 2,356 gens. L'anàlisi d'ontologia gènica va mostrar 117 processos biològics enriquits, entre els quals hi havia rutes relacionades amb la diferenciació i el desenvolupament cel·lular, la morfogènesi i l'embriogènesi (Taula 4.5). Per contra, l'anàlisi de les dianes predites pels miRNAs absents en els espermatozoides de tots els individus fèrtils va permetre identificar un total de 597 gens. L'anàlisi d'ontologia gènica va mostrar 18 processos biològics enriquits que no presentaven cap relació amb els processos d'espermatogènesi i/o embriogènesi (Taula 4.5).

**Taula 4.5.** Funcions biològiques enriquides associades als 2,356 gens diana predits pels miRNAs presents en els espermatozoides de tots els individus fèrtils i els 597 gens diana predits pels miRNAs absents en els espermatozoides de tots els individus fèrtils.

Funcions biològiques (GO term)	P-valor Fisher	Correcció Bonferroni
<b>Constantment presents</b>		
Regulation of cell development (GO:0060284)	7.80x10 <sup>-14</sup>	3.10x10 <sup>-10</sup>
Cell fate commitment (GO:0045165)	5.30x10 <sup>-12</sup>	2.10x10 <sup>-8</sup>
Embryonic morphogenesis (GO:0048598)	2.40x10 <sup>-10</sup>	9.60x10 <sup>-7</sup>
Cell morphogenesis (GO:0000902)	2.70x10 <sup>-10</sup>	1.10x10 <sup>-6</sup>
Cell projection organization (GO:0030030)	3.20x10 <sup>-10</sup>	1.30x10 <sup>-6</sup>
Positive regulation of developmental process (GO:0051094)	3.70x10 <sup>-10</sup>	1.50x10 <sup>-6</sup>
Cell morphogenesis involved in differentiation (GO:0000904)	5.50x10 <sup>-10</sup>	2.20x10 <sup>-6</sup>
Cell projection morphogenesis (GO:0048858)	6.70x10 <sup>-10</sup>	2.70x10 <sup>-6</sup>
Cellular component morphogenesis (GO:0032989)	9.10x10 <sup>-10</sup>	3.60x10 <sup>-6</sup>
Cell part morphogenesis (GO:0032990)	2.00x10 <sup>-9</sup>	7.80x10 <sup>-6</sup>
Regulation of cell motion (GO:0051270)	3.70x10 <sup>-9</sup>	1.50x10 <sup>-5</sup>
Negative regulation of cell differentiation (GO:0045596)	6.50x10 <sup>-9</sup>	2.60x10 <sup>-5</sup>
Positive regulation of cell differentiation (GO:0045597)	1.10x10 <sup>-8</sup>	4.30x10 <sup>-5</sup>
Chordate embryonic development (GO:0043009)	1.10x10 <sup>-8</sup>	4.30x10 <sup>-5</sup>
Regulation of cell migration (GO:0030334)	1.30x10 <sup>-8</sup>	5.00x10 <sup>-5</sup>
Embryonic development ending in birth or egg hatching (GO:0009792)	1.70x10 <sup>-8</sup>	6.60x10 <sup>-5</sup>
Chromatin modification (GO:0016568)	1.70x10 <sup>-8</sup>	6.70x10 <sup>-5</sup>
Embryonic organ development (GO:0048568)	2.40x10 <sup>-8</sup>	9.50x10 <sup>-5</sup>
Cell motion (GO:0006928)	1.00x10 <sup>-7</sup>	4.20x10 <sup>-4</sup>
Regulation of cell morphogenesis (GO:0022604)	1.40x10 <sup>-7</sup>	5.50x10 <sup>-4</sup>
Regulation of cell proliferation (GO:0042127)	1.80x10 <sup>-7</sup>	7.10x10 <sup>-4</sup>
Tissue morphogenesis (GO:0048729)	3.10x10 <sup>-7</sup>	1.20x10 <sup>-3</sup>
Regulation of locomotion (GO:0040012)	4.00x10 <sup>-7</sup>	1.60x10 <sup>-3</sup>
Regulation of cell morphogenesis involved in differentiation (GO:0010769)	7.30x10 <sup>-7</sup>	2.90x10 <sup>-3</sup>
Positive regulation of cell motion (GO:0051272)	4.60x10 <sup>-6</sup>	1.80x10 <sup>-2</sup>
Regulation of cell projection organization (GO:0031344)	5.30x10 <sup>-6</sup>	2.10x10 <sup>-2</sup>
In utero embryonic development (GO:0001701)	5.80x10 <sup>-6</sup>	2.30x10 <sup>-2</sup>
Chromatin organization (GO:0006325)	7.30x10 <sup>-6</sup>	2.90x10 <sup>-2</sup>
<b>Constantment absents</b>		
Transcription (GO:0006351)	3.00x10 <sup>-11</sup>	6.50x10 <sup>-8</sup>
Regulation of transcription from RNA Pol II promoter (GO:0006357)	3.60x10 <sup>-8</sup>	7.90x10 <sup>-5</sup>
Transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling (GO:0007169)	5.30x10 <sup>-8</sup>	1.20x10 <sup>-4</sup>
Regulation of transcription (GO:0006355)	1.50x10 <sup>-7</sup>	3.30x10 <sup>-4</sup>
Positive regulation of transcription, DNA dependent (GO:0045893)	2.00x10 <sup>-7</sup>	4.40x10 <sup>-4</sup>
Positive regulation of RNA metabolic process (GO:0051254)	2.50x10 <sup>-7</sup>	5.50x10 <sup>-4</sup>
Positive regulation of gene expression (GO:0010628)	6.30x10 <sup>-7</sup>	1.40x10 <sup>-3</sup>
Positive regulation of transcription from RNA Pol II promoter (GO:0045944)	1.00x10 <sup>-6</sup>	2.20x10 <sup>-3</sup>
Positive regulation of transcription (GO:0045893)	1.90x10 <sup>-6</sup>	4.20x10 <sup>-3</sup>
Eye development (GO:0001654)	4.70x10 <sup>-6</sup>	1.00x10 <sup>-2</sup>
Positive regulation of macromolecule biosynthetic process (GO:0010557)	5.40x10 <sup>-6</sup>	1.20x10 <sup>-2</sup>
Camera-type eye development (GO:0043010)	7.50x10 <sup>-6</sup>	1.60x10 <sup>-2</sup>
Positive regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process (GO:0045935)	9.30x10 <sup>-6</sup>	2.00x10 <sup>-2</sup>
Positive regulation of biosynthetic process (GO:0009891)	1.10x10 <sup>-5</sup>	2.40x10 <sup>-2</sup>
Enzyme linked receptor protein signalling (GO:0007167)	1.40x10 <sup>-5</sup>	3.10x10 <sup>-2</sup>
Positive regulation of cellular biosynthetic process (GO:0031328)	1.70x10 <sup>-5</sup>	3.70x10 <sup>-2</sup>
Positive regulation of nitrogen compound metabolic process (GO:0051173)	2.00x10 <sup>-5</sup>	4.20x10 <sup>-2</sup>
Transmission of nerve impulse (GO:0019226)	2.20x10 <sup>-5</sup>	4.70x10 <sup>-2</sup>

### 4.2.5. Parelles de miRNA estables com a candidats a biomarcadors

L'avaluació de la presència de parelles de miRNAs amb un nivell d'expressió relativa estable va permetre identificar 48 parelles amb correlacions significatives i elevats coeficients de correlació de rho ( $\geq 0.915$  o  $\leq -0.915$ ) (Taula 4.6).

Taula 4.6. Parelles de miRNA amb expressió relativa estable en la població d'individus fèrtils (S01-S10).

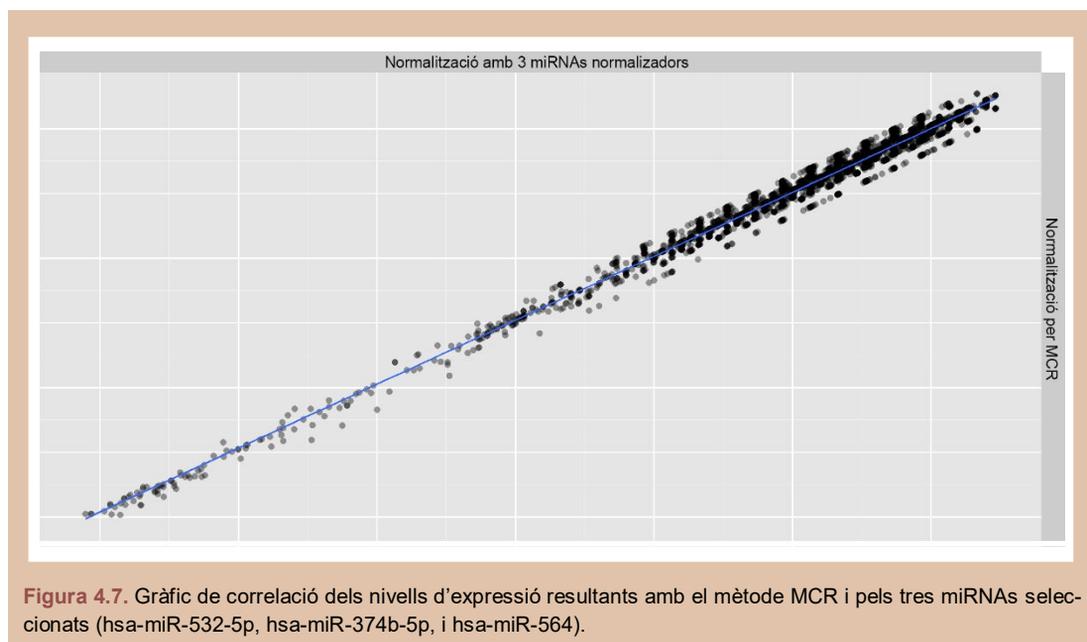
miRNA 1	miRNA 2	Valor rho	P-valor
hsa-miR-20a-5p	hsa-miR-106a-5p	0.988	9.31x10 <sup>-8</sup>
hsa-miR-152	hsa-miR-218-5p	0.988	9.31x10 <sup>-8</sup>
hsa-miR-512-3p	hsa-miR-517a-3p	0.988	9.31x10 <sup>-8</sup>
hsa-miR-942	hsa-miR-1208	0.988	9.31x10 <sup>-8</sup>
hsa-miR-197-3p	hsa-miR-1291	-0.976	1.47x10 <sup>-6</sup>
hsa-miR-30c-5p	hsa-miR-616-5p	0.976	1.47x10 <sup>-6</sup>
hsa-miR-10a-5p	hsa-miR-519a-3p	-0.964	7.32x10 <sup>-6</sup>
hsa-miR-10a-5p	hsa-miR-628-3p	-0.964	7.32x10 <sup>-6</sup>
hsa-miR-92a-3p	hsa-miR-636	0.964	7.32x10 <sup>-6</sup>
hsa-miR-100-5p	hsa-miR-125b-5p	0.964	7.32x10 <sup>-6</sup>
hsa-miR-29a-3p	hsa-miR-625-5p	-0.952	2.28x10 <sup>-5</sup>
hsa-miR-148a-3p	hsa-miR-150-5p	-0.952	2.28x10 <sup>-5</sup>
hsa-miR-346	hsa-miR-132-5p	-0.952	2.28x10 <sup>-5</sup>
hsa-miR-17-5p	hsa-miR-19b-3p	0.952	2.28x10 <sup>-5</sup>
hsa-miR-140-5p	hsa-miR-22-5p	0.952	2.28x10 <sup>-5</sup>
hsa-miR-375	hsa-miR-423-5p	0.952	2.28x10 <sup>-5</sup>
hsa-miR-30a-3p	hsa-miR-30e-3p	0.952	2.28x10 <sup>-5</sup>
hsa-miR-190b	hsa-miR-151a-5p	0.952	2.28x10 <sup>-5</sup>
hsa-let-7c	hsa-miR-92a-3p	0.939	5.48x10 <sup>-5</sup>
hsa-let-7d-5p	hsa-miR-92a-3p	0.939	5.48x10 <sup>-5</sup>
hsa-miR-25-3p	hsa-miR-296-5p	0.939	5.48x10 <sup>-5</sup>
hsa-miR-99a-5p	hsa-miR-100-5p	0.939	5.48x10 <sup>-5</sup>
hsa-miR-125a-3p	hsa-miR-371-3p	0.939	5.48x10 <sup>-5</sup>
hsa-miR-192-5p	hsa-miR-628-3p	0.939	5.48x10 <sup>-5</sup>
hsa-miR-324-3p	hsa-miR-622	0.939	5.48x10 <sup>-5</sup>
hsa-miR-519a-3p	hsa-miR-628-3p	0.939	5.48x10 <sup>-5</sup>
hsa-miR-519d	hsa-miR-190b	-0.927	1.12x10 <sup>-4</sup>
hsa-miR-20a-5p	hsa-miR-20b-5p	0.927	1.12x10 <sup>-4</sup>
hsa-miR-92a-3p	hsa-miR-125b-5p	0.927	1.12x10 <sup>-4</sup>
hsa-miR-130a-3p	hsa-miR-184	0.927	1.12x10 <sup>-4</sup>
hsa-miR-139-5p	hsa-miR-1260a	0.927	1.12x10 <sup>-4</sup>
hsa-miR-146b-5p	hsa-miR-517c-3p	0.927	1.12x10 <sup>-4</sup>
hsa-miR-149-5p	hsa-miR-224-5p	0.927	1.12x10 <sup>-4</sup>
hsa-miR-296-5p	hsa-miR-328	0.927	1.12x10 <sup>-4</sup>
hsa-miR-375	hsa-miR-149-3p	0.927	1.12x10 <sup>-4</sup>
hsa-miR-30a-5p	hsa-miR-30d-5p	0.927	1.12x10 <sup>-4</sup>
hsa-miR-34b-3p	hsa-miR-93-3p	0.927	1.12x10 <sup>-4</sup>
hsa-miR-1282	hsa-miR-1285-3p	0.927	1.12x10 <sup>-4</sup>
hsa-miR-25-3p	hsa-miR-186-5p	-0.915	2.04x10 <sup>-4</sup>

hsa-miR-149-5p	hsa-miR-190b	-0.915	$2.04 \times 10^{-4}$
hsa-miR-21-5p	hsa-miR-148a-3p	0.915	$2.04 \times 10^{-4}$
hsa-miR-99b-5p	hsa-miR-125b-5p	0.915	$2.04 \times 10^{-4}$
hsa-miR-99b-5p	hsa-miR-193a-5p	0.915	$2.04 \times 10^{-4}$
hsa-miR-200b-3p	hsa-miR-491-5p	0.915	$2.04 \times 10^{-4}$
hsa-miR-224-5p	hsa-miR-519d	0.915	$2.04 \times 10^{-4}$
hsa-miR-361-5p	hsa-miR-491-5p	0.915	$2.04 \times 10^{-4}$
hsa-miR-517a-3p	hsa-miR-517c-3p	0.915	$2.04 \times 10^{-4}$
hsa-miR-30a-5p	hsa-miR-622	0.915	$2.04 \times 10^{-4}$

#### 4.2.6. Selecció de miRNAs normalitzadors i validació com a candidats a normalitzadors

Segons el mètode CCR, els tres miRNAs amb nivells d'expressió més fortament correlacionats amb la mitjana d'expressió de cada placa van ser els hsa-miR-532-5p i hsa-miR-374b-5p (placa A), i hsa-miR-564 (placa B).

La normalització de les dades amb aquests tres miRNAs va mostrar una elevada correlació amb les dades normalitzades amb el mètode MCR (P-valor<0.001 i rho=0.977) (**Figura 4.7**).



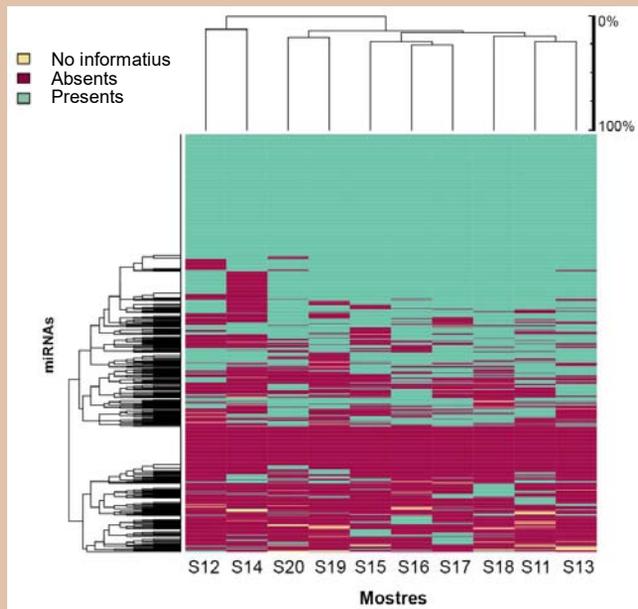
### 4.3. Perfils d'expressió en individus amb astenozoospermia

### 4.3.1. miRNAs presents i absents en individus amb astenozoospermia

En els espermatozoides dels individus amb astenozoospermia analitzats amb plaques preconfigurades (S11-S20) es van detectar 210 miRNAs presents de forma ubiqüa (**Taula suplementària 3**). Per contra, 69 miRNAs no es van identificar en cap individu (**Taula suplementària 4**) i 457 ho van fer de forma variable. Un 71% de miRNAs presents de forma ubiqüa en aquesta població va coincidir amb els miRNAs detectats en tots els individus de la població fèrtil. Per altra banda, el 51% de miRNAs absents en tots els individus d'aquesta població també eren absents en tots els individus de la població fèrtil.

### 4.3.2. Homogeneïtat de la població amb astenozoospermia

El dendrograma obtingut de l'anàlisi de conglomerats jeràrquics basada en el perfil de miRNAs presents, absents i no informatius de cada individu, va mostrar la formació de dos conjunts principals (**Figura 4.8**). Les diferències entre aquests dos grups es van quantificar en menys d'un 25%.



**Figura 4.8.** Dendrograma de l'anàlisi de conglomerats jeràrquics realitzada amb els valors d'expressió no normalitzats (Ct) dels miRNAs presents, absents i d'expressió variable en els espermatozoides dels individus amb astenozoospermia (S11-S20). Les mostres estan representades en les columnes (n=10) i els assajos en les files (n=768).

Totes les correlacions de Spearman realitzades entre els valors de normCt dels miRNAs amb expressió ubiqua van resultar estadísticament significatives amb un rang de valor rho de 0.63-0.89 (Figura 4.9).

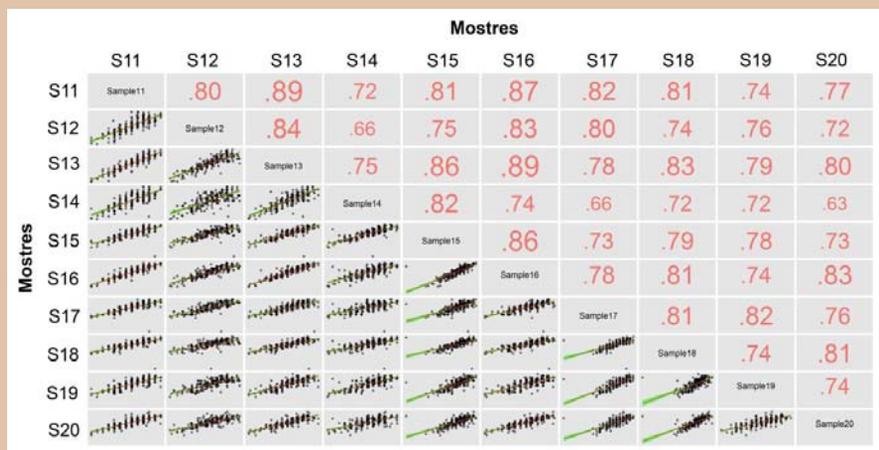


Figura 4.9. Resultats de rho de les correlacions de Spearman realitzades entre els valors de normCt dels miRNAs presents de forma ubiqua en la població d'individus amb astenozoospermia (S11-S20).

### 4.3.3. DE-miRNAs en la població amb astenozoospermia

La comparació dels nivells d'expressió de cada miRNA en les mostres d'aquesta població (S11-S20) respecte les dades dels individus fèrtils (S01-S10) va permetre identificar un total de 32 DE-miRNAs, dels quals 26 van mostrar sobre-expressió i 6 sub-expressió (Taula 4.7).

### 4.3.4. Caracterització de regions genòmiques que inclouen els DE-miRNAs de la població amb astenozoospermia

Es va detectar un 7.41% de DE-miRNAs localitzats en regions 3'UTR, un 62.96% en regions intròniques, un 3.70% en regions exòniques, mentre que el 25.93% restant ho va fer en regions intergèniques (Taula 4.7). Pel que fa al sentit de la transcripció, es va trobar un 62.50% de DE-miRNAs que presentaven un sentit de la transcripció *forward* i un 37.50% amb sentit *reverse* (Taula 4.7). Per altra banda, un 28.13% de DE-miRNAs estaven localitzats en regions genòmiques no metilades (preferentment empaquetada amb histones: baix grau de compactació) i un 71.87% en posicions

metilades (preferentment empaquetades per protamines: elevat grau de compactació) (Taula 4.7).

**Taula 4.7.** DE-miRNAs en la població d'individus amb astenozoospermia. Inclou informació de la localització genòmica, el sentit de la transcripció i l'estat de metilació de les regions codificants pels DE-miRNAs.

DE-miRNAs	Valor Delta <sup>a</sup>	P-valor ajustat amb FDR	Localització genòmica <sup>b</sup>	Sentit transcripció <sup>c</sup>	Metilació (regió relacionada amb Protamines/Histones) <sup>d</sup>
hsa-miR-342-3p	<b>-3.16</b>	0.0068	Intrònic	<i>Forward</i>	Sí (Protamina)
hsa-miR-520h	<b>-2.84</b>	0.0065	Intergènic	<i>Forward</i>	No (Histona)
hsa-miR-629-3p	<b>-1.94</b>	0.0070	Intrònic	<i>Reverse</i>	Sí (Protamina)
hsa-miR-942	<b>-1.76</b>	0.0083	ND	<i>Forward</i>	Sí (Protamina)
hsa-miR-184	<b>-1.74</b>	0.0069	Intergènic	<i>Forward</i>	Sí (Protamina)
hsa-miR-34b-3p	<b>-1.45</b>	0.0086	Intergènic	<i>Forward</i>	Sí (Protamina)
hsa-miR-615-5p	<b>5.85</b>	0.0076	Intrònic	<i>Forward</i>	Sí (Protamina)
hsa-miR-548c-5p	<b>5.73</b>	0.0089	Intrònic	<i>Forward</i>	Sí (Protamina)
hsa-miR-143-3p	<b>5.18</b>	0.0091	Intergènic	<i>Forward</i>	Sí (Protamina)
hsa-miR-548d-5p	<b>5.17</b>	0.0081	Intrònic	<i>Reverse</i>	No (Histona)
hsa-miR-616-3p	<b>4.31</b>	0.0084	Intrònic	<i>Reverse</i>	No (Histona)
hsa-miR-548b-5p	<b>4.26</b>	0.0088	Intrònic	<i>Reverse</i>	Sí (Protamina)
hsa-miR-520d-3p	<b>4.07</b>	0.0078	Intergènic	<i>Forward</i>	Sí (Protamina)
hsa-miR-591	<b>3.71</b>	0.0074	Intrònic	<i>Reverse</i>	No (Histona)
hsa-miR-605	<b>3.61</b>	0.0074	Intrònic	<i>Forward</i>	No (Histona)
hsa-miR-27a-5p	<b>3.47</b>	0.0070	Intergènic	<i>Reverse</i>	Sí (Protamina)
hsa-miR-1303	<b>3.34</b>	0.0064	ND	<i>Forward</i>	Sí (Protamina)
hsa-miR-770-5p	<b>3.26</b>	0.0078	Intrònic	<i>Forward</i>	Sí (Protamina)
hsa-miR-370	<b>3.13</b>	0.0088	Intrònic	<i>Forward</i>	Sí (Protamina)
hsa-miR-604	<b>3.10</b>	0.0078	Intrònic	<i>Reverse</i>	Sí (Protamina)
hsa-miR-939-5p	<b>3.07</b>	0.0078	ND	<i>Reverse</i>	Sí (Protamina)
hsa-miR-432-3p	<b>2.73</b>	0.0077	Intergènic	<i>Forward</i>	Sí (Protamina)
hsa-miR-1275	<b>2.63</b>	0.0058	ND	<i>Reverse</i>	No (Histona)
hsa-miR-19b-1-5p	<b>2.57</b>	0.0076	Intrònic/3'UTR	<i>Forward</i>	No (Histona)
hsa-miR-1254	<b>2.24</b>	0.0072	ND	<i>Forward</i>	No (Histona)
hsa-miR-212-3p	<b>2.22</b>	0.0081	Intergènic	<i>Reverse</i>	Sí (Protamina)
hsa-miR-636	<b>2.13</b>	0.0080	3'UTR/Intrònic/ Exònic	<i>Reverse</i>	Sí (Protamina)
hsa-miR-572	<b>1.96</b>	0.0071	Intergènic	<i>Forward</i>	Sí (Protamina)
hsa-miR-1255b-5p	<b>1.84</b>	0.0071	ND	<i>Forward</i>	Sí (Protamina)
hsa-miR-324-3p	<b>1.50</b>	0.0087	Intrònic	<i>Reverse</i>	Sí (Protamina)
hsa-miR-638	<b>1.36</b>	0.0064	Intrònic	<i>Forward</i>	Sí (Protamina)
hsa-miR-491-5p	<b>1.27</b>	0.0093	Intrònic	<i>Forward</i>	No (Histona)

FDR: Correcció per falsos descobriments

<sup>a</sup>. Valor Delta=Diferència entre els valors d'expressió de la població control i la població infèrtil (els valors positius indiquen sobre-expressió, mentre que els negatius indiquen sub-expressió).

<sup>b</sup>. Informació obtinguda de la base de dades *miRNome* 2.0.

<sup>c</sup>. Informació obtinguda de la base de dades *Genome Browser* i *miRcode microRNA external track*.

<sup>d</sup>. Informació obtinguda de la base de dades *Genome Browser* i *DNA Methylation external track* (Smith Lab).

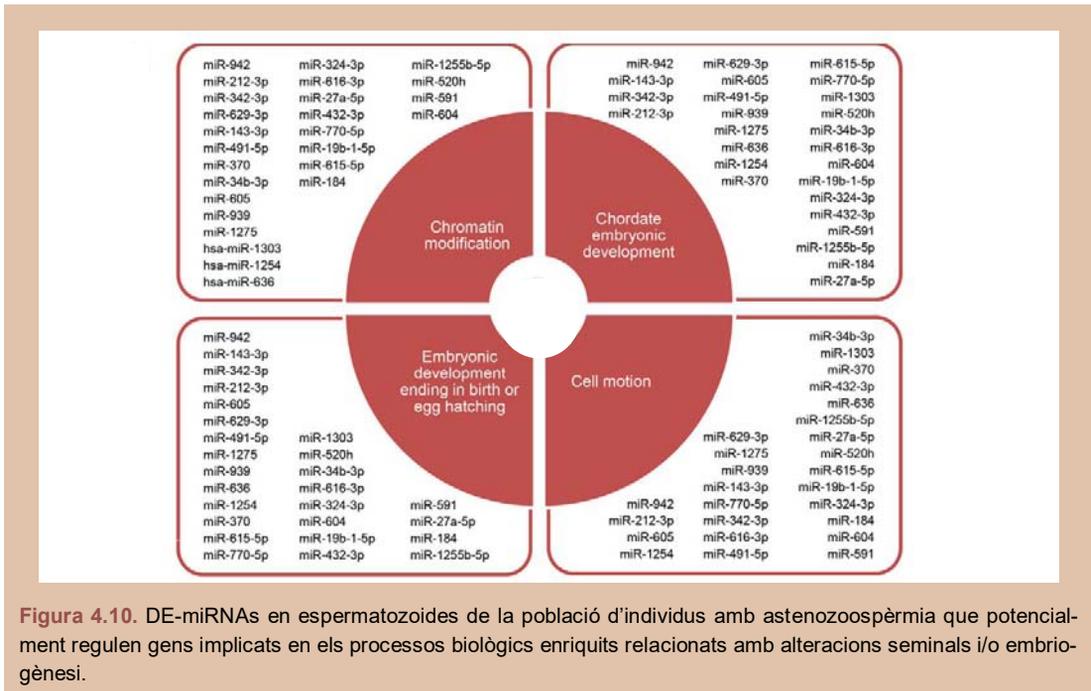
### 4.3.5. Predicció de gens diana i ontologia gènica en la població amb astenozoospermia

L'estudi de les dianes predites pels DE-miRNAs va permetre identificar 5,822 gens. L'anàlisi d'ontologia gènica d'aquestes dianes va mostrar 33 processos biològics enriquits, entre els quals hi destaquen rutes directament relacionades amb les alteracions seminals presents en els individus analitzats i amb l'embriogènesi: *chromatin modification*, *chordate embryonic development*, *embryonic development ending in birth or egg hatching*, i *cell motion* (Taula 4.8).

**Taula 4.8.** Funcions biològiques enriquides associades als 5,822 gens predits pels DE-miRNAs en la població d'individus amb astenozoospermia. Nota: Els processos biològics directament relacionats amb les alteracions seminals presents en els individus analitzats i/o amb l'embriogènesi s'indiquen amb negreta.

Funcions biològiques (GO term)	P-valor Fisher	Correcció Bonferroni
Regulation of transcription (GO:0006355)	4.40x10 <sup>-24</sup>	2.30x10 <sup>-20</sup>
Transcription (GO:0006351)	5.70x10 <sup>-23</sup>	3.00x10 <sup>-19</sup>
Regulation of RNA metabolic process (GO:0051252)	4.90x10 <sup>-15</sup>	2.60x10 <sup>-11</sup>
Regulation of transcription, DNA-dependent (GO:0006355)	3.90x10 <sup>-14</sup>	2.10x10 <sup>-10</sup>
Negative regulation of macromolecule metabolic process (GO:0010605)	4.10x10 <sup>-13</sup>	2.20x10 <sup>-9</sup>
Negative regulation of macromolecule biosynthetic process (GO:0010558)	8.00x10 <sup>-13</sup>	4.20x10 <sup>-9</sup>
Negative regulation of gene expression (GO:0010629)	1.20x10 <sup>-12</sup>	6.20x10 <sup>-9</sup>
Negative regulation of transcription (GO:0045892)	3.80x10 <sup>-12</sup>	2.00x10 <sup>-8</sup>
Negative regulation of biosynthetic process (GO:0009890)	6.20x10 <sup>-12</sup>	3.30x10 <sup>-8</sup>
Negative regulation of cellular biosynthetic process (GO:0031327)	9.80x10 <sup>-12</sup>	5.20x10 <sup>-8</sup>
Regulation of transcription from RNA Pol II promoter (GO:0006357)	1.60x10 <sup>-11</sup>	8.60x10 <sup>-8</sup>
Negative regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process (GO:0045934)	9.30x10 <sup>-11</sup>	4.90x10 <sup>-7</sup>
Negative regulation of nitrogen compound metabolic process (GO:0051172)	2.20x10 <sup>-10</sup>	1.20x10 <sup>-6</sup>
Negative regulation of RNA metabolic process (GO:0051253)	8.00x10 <sup>-10</sup>	4.20x10 <sup>-6</sup>
Positive regulation of transcription, DNA-dependent (GO:0045893)	1.50x10 <sup>-9</sup>	8.10x10 <sup>-6</sup>
Positive regulation of RNA metabolic process (GO:0051254)	1.90x10 <sup>-9</sup>	1.00x10 <sup>-5</sup>
Negative regulation of transcription, DNA-dependent (GO:0045892)	2.70x10 <sup>-9</sup>	1.40x10 <sup>-5</sup>
Positive regulation of gene expression (GO:0010628)	8.30x10 <sup>-9</sup>	4.40x10 <sup>-5</sup>
Positive regulation of transcription (GO:0045893)	9.00x10 <sup>-9</sup>	4.80x10 <sup>-5</sup>
Positive regulation of nitrogen compound metabolic process (GO:0051173)	1.70x10 <sup>-8</sup>	9.10x10 <sup>-5</sup>
Positive regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process (GO:0045935)	1.90x10 <sup>-8</sup>	1.00x10 <sup>-4</sup>
Positive regulation of macromolecule metabolic process (GO:0010604)	3.00x10 <sup>-8</sup>	1.60x10 <sup>-4</sup>
Positive regulation of transcription from RNA Pol II promoter (GO:0045944)	1.40x10 <sup>-7</sup>	7.50x10 <sup>-4</sup>
<b>Chromatin modification (GO:0016568)</b>	1.90x10 <sup>-7</sup>	1.00x10 <sup>-3</sup>
Positive regulation of macromolecule biosynthetic process (GO:0010557)	2.00x10 <sup>-7</sup>	1.10x10 <sup>-3</sup>
Positive regulation of cellular biosynthetic process (GO:0031328)	2.40x10 <sup>-7</sup>	1.30x10 <sup>-3</sup>
<b>Chordate embryonic development (GO:0043009)</b>	2.40x10 <sup>-7</sup>	1.30x10 <sup>-3</sup>
Positive regulation of biosynthetic process (GO:0009891)	2.80x10 <sup>-7</sup>	1.50x10 <sup>-3</sup>
<b>Embryonic development ending in birth or egg hatching (GO:0009792)</b>	4.50x10 <sup>-7</sup>	2.40x10 <sup>-3</sup>
Negative regulation of transcription from RNA Pol II promoter (GO:0000122)	7.60x10 <sup>-7</sup>	4.00x10 <sup>-3</sup>
Intracellular transport (GO:0046907)	1.70x10 <sup>-6</sup>	9.00x10 <sup>-3</sup>
<b>Cell motion (GO:0006928)</b>	2.80x10 <sup>-6</sup>	1.50x10 <sup>-2</sup>
Enzyme linked receptor protein signaling (GO:0007167)	6.40x10 <sup>-6</sup>	3.30x10 <sup>-2</sup>

Els DE-miRNAs implicats en la regulació dels gens que participen en els cadascun dels processos biològics significativament enriquits relacionats amb les alteracions seminals presents en els individus analitzats i/o amb l'embriogènesi es mostren en la **Figura 4.10**.



## 4.4. Perfils d'expressió en individus amb teratozoospèrmia

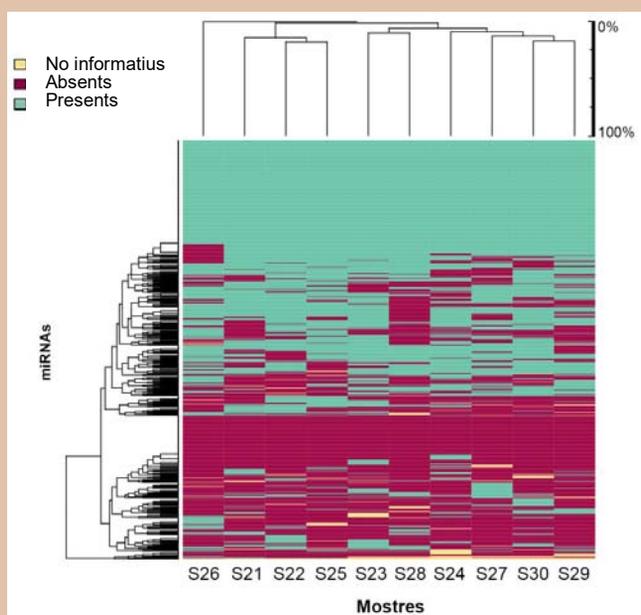
### 4.4.1. miRNAs presents i absents en individus amb teratozoospèrmia

En els espermatozoides dels individus amb teratozoospèrmia analitzats mitjançant plaques preconfigurades (S21-S30) es van detectar 179 miRNAs presents de forma ubiqua (**Taula suplementària 5**). Per contra, 70 miRNAs no es van identificar en cap individu (**Taula suplementària 6**) i 487 ho van fer de forma variable. Un 65% de miRNAs presents de forma ubiqua en aquesta població va coincidir amb els miRNAs detectats en tots els individus de la població fèrtil. Per altra banda, el 30% de miRNAs

absents en tots els individus d'aquesta població ho va fer amb els miRNAs absents en tots els individus de la població fèrtil.

#### 4.4.2. Homogeneïtat de la població amb teratozoospermia

El dendrograma obtingut de l'anàlisi de conglomerats jeràrquics basada en el perfil de miRNAs presents, absents i no informatius de cada individu, va mostrar la formació de dos conjunts principals (**Figura 4.11**). Les diferències entre aquests dos grups es van quantificar en menys d'un 10%.



**Figura 4.11.** Dendrograma de l'anàlisi de conglomerats jeràrquics realitzada amb els valors d'expressió no normalitzats (Ct) dels miRNAs presents, absents i d'expressió variable en els espermatozoides dels individus amb teratozoospermia (S21-S30). Les mostres estan representades en les columnes (n=10) i els assajos en les files (n=768).

Totes les correlacions de Spearman realitzades entre els valors de normCt dels miRNAs amb expressió ubiqua van resultar significatives amb un rang de valor rho de 0.58-0.88 (**Figura 4.12**).



Figura 4.12. Resultats de rho de les correlacions de Spearman realitzades entre els valors de normCt dels miRNAs presents de forma ubiqua en la població d'individus amb teratozoospermia (S21-S30).

#### 4.4.3. DE-miRNAs en la població amb teratozoospermia

La comparació dels nivells d'expressió de cada miRNA en les mostres d'aquesta població respecte les dades control (S1-S10) va permetre identificar un total de 19 DE-miRNAs, dels quals 11 van mostrar una sobre-expressió i 8 sub-expressió (Taula 4.9).

#### 4.4.4. Caracterització de regions genòmiques que inclouen els DE-miRNAs de la població amb teratozoospermia

Es va detectar un 6.25% de DE-miRNAs localitzats en regions 3'UTR, un 50% en regions intròniques, mentre que el 43.75% restant ho va fer en regions intergèniques (Taula 4.9). Pel que fa al sentit de la transcripció, es va trobar un 42.11% de DE-miRNAs que presentaven un sentit de la transcripció *forward* i un 57.89% amb sentit *reverse* (Taula 4.9). Per altra banda, un 31.58% de DE-miRNAs estaven localitzats en regions genòmiques no metilades, i un 68.42% en posicions metilades (Taula 4.9).

**Taula 4.9.** DE-miRNAs en la població d'individus amb teratozoospèrmi. Inclou informació de la localització genòmica, el sentit de la transcripció i l'estat de metilació de les regions codificants pels DE-miRNAs.

DE-miRNAs	Valor Delta <sup>a</sup>	P-valor ajustat amb FDR	Localització genòmica <sup>b</sup>	Sentit transcripció <sup>c</sup>	Metilació (regió relacionada amb Protamines/Histones) <sup>d</sup>
hsa-miR-151-5p	<b>-7.50</b>	0.0078	Intrònic	<i>Reverse</i>	Sí (Protamina)
hsa-miR-935	<b>-5.63</b>	0.0046	ND	<i>Forward</i>	Sí (Protamina)
hsa-miR-125a-3p	<b>-5.56</b>	0.0078	Intergènic	<i>Forward</i>	Sí (Protamina)
hsa-miR-130b-5p	<b>-4.21</b>	0.0087	Intergènic	<i>Forward</i>	Sí (Protamina)
hsa-miR-191-3p	<b>-4.19</b>	0.0078	Intrònic	<i>Reverse</i>	Sí (Protamina)
hsa-miR-132-5p	<b>-4.14</b>	0.0050	Intergènic	<i>Reverse</i>	Sí (Protamina)
hsa-miR-320b	<b>-3.33</b>	0.0045	ND	<i>Forward</i>	No (Histona)
hsa-miR-195-5p	<b>-2.79</b>	0.0049	Intrònic	<i>Reverse</i>	Sí (Protamina)
hsa-miR-101-5p	<b>26.60</b>	0.0045	Intergènic	<i>Reverse</i>	No (Histona)
hsa-miR-1305	<b>24.62</b>	0.0039	ND	<i>Forward</i>	No (Histona)
hsa-miR-32-3p	<b>19.89</b>	0.0052	Intrònic	<i>Reverse</i>	Sí (Protamina)
hsa-miR-16-1-3p	<b>6.25</b>	0.0098	Intrònic	<i>Reverse</i>	Sí (Protamina)
hsa-miR-198	<b>5.95</b>	0.0041	3'UTR	<i>Reverse</i>	No (Histona)
hsa-miR-509-5p	<b>5.22</b>	0.0078	Intergènic	<i>Reverse</i>	Sí (Protamina)
hsa-miR-616-3p	<b>5.09</b>	0.0037	Intrònic	<i>Reverse</i>	No (Histona)
hsa-miR-34a-5p	<b>4.70</b>	0.0097	Intergènic	<i>Reverse</i>	Sí (Protamina)
hsa-miR-770-5p	<b>3.76</b>	0.0062	Intrònic	<i>Forward</i>	Sí (Protamina)
hsa-miR-605	<b>3.57</b>	0.0097	Intrònic	<i>Forward</i>	No (Histona)
hsa-miR-380-5p	<b>3.44</b>	0.0081	Intergènic	<i>Forward</i>	Sí (Protamina)

FDR: Correcció per falsos descobriments

<sup>a</sup>. Valor Delta=Diferència entre els valors d'expressió de la població control i la població infèril (els valors positius indiquen una sobre-expressió en la població infèril, mentre que els negatius indiquen una sub-expressió).

<sup>b</sup>. Informació obtinguda de la base de dades *miRNome 2.0*.

<sup>c</sup>. Informació obtinguda de la base de dades *Genome Browser* i *miRcode microRNA external track*.

<sup>d</sup>. Informació obtinguda de la base de dades *Genome Browser* i *DNA Methylation external track* (Smith Lab).

#### 4.4.5. Predicció de gens diana i ontologia gènica en la població amb teratozoospèrmi

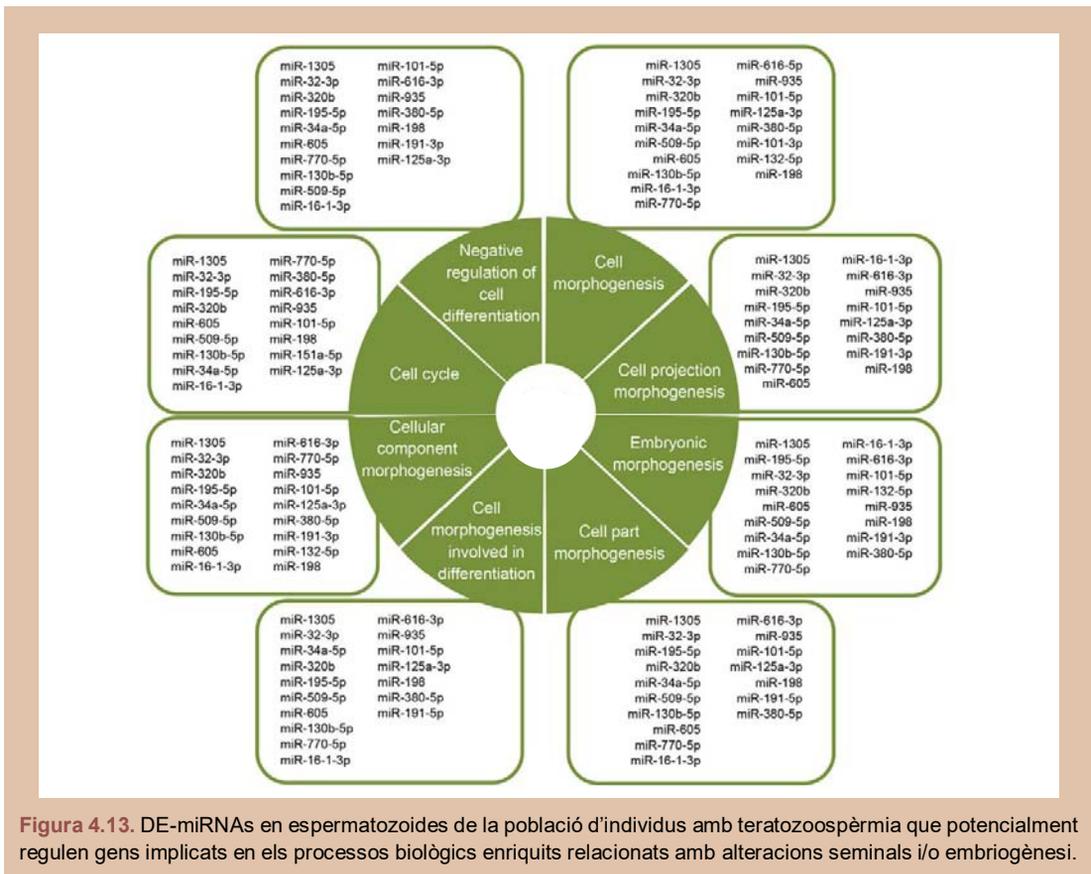
L'estudi de les dianes predites pels DE-miRNAs va permetre identificar 5,511 gens. Les anàlisis d'ontologia gènica van mostrar 53 processos enriquits, entre els quals hi destaquen rutes relacionades directament amb les alteracions seminals presents en els individus analitzats i amb l'embriogènesi: *cell cycle*, *negative regulation of cell differentiation*, *cell morphogenesis*, *cell projection morphogenesis*, *cellular component morphogenesis*, *cell morphogenesis involved in differentiation*, *cell part morphogenesis*, i *embryonic morphogenesis* (Taula 4.10).

**Taula 4.10.** Funcions biològiques enriquides associades als 5,511 gens predits pels DE-miRNAs en la població d'individus amb teratozoospermia. Nota: Els processos biològics directament relacionats amb les alteracions sexuals presents en els individus analitzats i/o amb l'embriogènesi s'indiquen amb negreta.

Funcions biològiques (GO term)	P-valor Fisher	Correcció Bonferroni
Regulation of transcription (GO:0006355)	6.10x10 <sup>-15</sup>	3.20x10 <sup>-11</sup>
Transcription (GO:0006351)	8.00x10 <sup>-14</sup>	4.10x10 <sup>-10</sup>
Proteolysis involved in cellular protein catabolic process (GO:0051603)	6.90x10 <sup>-11</sup>	3.60x10 <sup>-7</sup>
Cellular protein catabolic process (GO:0044257)	1.20x10 <sup>-10</sup>	6.40x10 <sup>-7</sup>
Modification-dependent macromolecule catabolic process (GO:0043632)	2.50x10 <sup>-10</sup>	1.30x10 <sup>-6</sup>
Modification-dependent protein catabolic process (GO:0019941)	2.50x10 <sup>-10</sup>	1.30x10 <sup>-6</sup>
Protein catabolic process (GO:0030163)	4.60x10 <sup>-10</sup>	2.40x10 <sup>-6</sup>
Regulation of RNA metabolic process (GO:0051252)	5.40x10 <sup>-10</sup>	2.80x10 <sup>-6</sup>
Regulation of transcription, DNA-dependent (GO:0006355)	2.60x10 <sup>-9</sup>	1.40x10 <sup>-5</sup>
Negative regulation of gene expression (GO:0010629)	3.10x10 <sup>-9</sup>	1.60x10 <sup>-5</sup>
Phosphate metabolic process (GO:0006796)	2.50x10 <sup>-8</sup>	1.30x10 <sup>-4</sup>
Phosphorus metabolic process (GO:0006793)	2.50x10 <sup>-8</sup>	1.30x10 <sup>-4</sup>
Negative regulation of transcription (GO:0045892)	2.80x10 <sup>-8</sup>	1.40x10 <sup>-4</sup>
Positive regulation of nitrogen compound metabolic process (GO:0051173)	3.00x10 <sup>-8</sup>	1.60x10 <sup>-4</sup>
Cellular macromolecule catabolic process (GO:0044265)	3.50x10 <sup>-8</sup>	1.80x10 <sup>-4</sup>
Positive regulation of gene expression (GO:0010628)	3.60x10 <sup>-8</sup>	1.90x10 <sup>-4</sup>
Positive regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process (GO:0045935)	3.80x10 <sup>-8</sup>	2.00x10 <sup>-4</sup>
Enzyme linked receptor protein signaling (GO:0007167)	5.80x10 <sup>-8</sup>	3.00x10 <sup>-4</sup>
Positive regulation of transcription (GO:0045893)	7.20x10 <sup>-8</sup>	3.70x10 <sup>-4</sup>
Positive regulation of biosynthetic process (GO:0009891)	9.50x10 <sup>-8</sup>	4.90x10 <sup>-4</sup>
Positive regulation of macromolecule biosynthetic process (GO:0010557)	1.40x10 <sup>-7</sup>	7.00x10 <sup>-4</sup>
Positive regulation of cellular biosynthetic process (GO:0031328)	1.40x10 <sup>-7</sup>	7.00x10 <sup>-4</sup>
Protein amino acid phosphorylation (GO:0006468)	1.50x10 <sup>-7</sup>	7.70x10 <sup>-4</sup>
Negative regulation of macromolecule biosynthetic process (GO:0010558)	3.80x10 <sup>-7</sup>	2.00x10 <sup>-3</sup>
Macromolecule catabolic process (GO:0009057)	4.30x10 <sup>-7</sup>	2.20x10 <sup>-3</sup>
Positive regulation of macromolecule metabolic process (GO:0010604)	4.40x10 <sup>-7</sup>	2.30x10 <sup>-3</sup>
Negative regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process (GO:0045934)	5.00x10 <sup>-7</sup>	2.60x10 <sup>-3</sup>
<b>Cell cycle (GO:0007049)</b>	5.10x10 <sup>-7</sup>	2.60x10 <sup>-3</sup>
Negative regulation of nitrogen compound metabolic process (GO:0051172)	5.80x10 <sup>-7</sup>	3.00x10 <sup>-3</sup>
Neuron projection morphogenesis (GO:0048812)	8.30x10 <sup>-7</sup>	4.30x10 <sup>-3</sup>
<b>Negative regulation of cell differentiation (GO:0045596)</b>	8.70x10 <sup>-7</sup>	4.50x10 <sup>-3</sup>
<b>Cell morphogenesis (GO:0000902)</b>	9.60x10 <sup>-7</sup>	5.00x10 <sup>-3</sup>
Positive regulation of RNA metabolic process (GO:0051254)	1.20x10 <sup>-6</sup>	6.30x10 <sup>-3</sup>
Negative regulation of cellular biosynthetic process (GO:0031327)	1.20x10 <sup>-6</sup>	6.30x10 <sup>-3</sup>
Positive regulation of transcription, DNA-dependent (GO:0045893)	1.70x10 <sup>-6</sup>	8.70x10 <sup>-3</sup>
Protein modification by small protein conjugation or removal (GO:0070647)	1.70x10 <sup>-6</sup>	9.00x10 <sup>-3</sup>
Negative regulation of biosynthetic process (GO:0009890)	1.80x10 <sup>-6</sup>	9.30x10 <sup>-3</sup>
Regulation of transcription from RNA Pol II promoter (GO:0006357)	2.00x10 <sup>-6</sup>	1.00x10 <sup>-2</sup>
Heart development (GO:0007507)	2.70x10 <sup>-6</sup>	1.40x10 <sup>-2</sup>
Axonogenesis (GO:0007409)	3.20x10 <sup>-6</sup>	1.70x10 <sup>-2</sup>
<b>Cell projection morphogenesis (GO:0048858)</b>	3.60x10 <sup>-6</sup>	1.80x10 <sup>-2</sup>
<b>Cellular component morphogenesis (GO:0032989)</b>	3.90x10 <sup>-6</sup>	2.00x10 <sup>-2</sup>
Intracellular transport (GO:0046907)	4.00x10 <sup>-6</sup>	2.00x10 <sup>-2</sup>
Tube development (GO:0035295)	4.50x10 <sup>-6</sup>	2.30x10 <sup>-2</sup>
Negative regulation of macromolecule metabolic process (GO:0010605)	4.60x10 <sup>-6</sup>	2.40x10 <sup>-2</sup>

<b>Cell morphogenesis involved in differentiation (GO:0000904)</b>	5.40x10 <sup>-6</sup>	2.80x10 <sup>-2</sup>
Transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling (GO:0007169)	5.70x10 <sup>-6</sup>	2.90x10 <sup>-2</sup>
<b>Cell part morphogenesis (GO:0032990)</b>	5.80x10 <sup>-6</sup>	2.90x10 <sup>-2</sup>
<b>Embryonic morphogenesis (GO:0048598)</b>	6.80x10 <sup>-6</sup>	3.50x10 <sup>-2</sup>
Phosphorylation (GO:0016310)	8.70x10 <sup>-6</sup>	4.40x10 <sup>-2</sup>
Appendage development (GO:0048736)	8.90x10 <sup>-6</sup>	4.50x10 <sup>-2</sup>
Limb development (GO:0060173)	8.90x10 <sup>-6</sup>	4.50x10 <sup>-2</sup>
Pattern specification process (GO:0007389)	9.00x10 <sup>-6</sup>	4.60x10 <sup>-2</sup>

Els DE-miRNAs implicats en la regulació dels gens que participen en els processos biològics enriquits relacionats directament amb les alteracions seminals presents en els individus analitzats i/o amb l'embriogènesi es mostren en la **Figura 4.13**.



**Figura 4.13.** DE-miRNAs en espermatozoides de la població d'individus amb teratozoospermia que potencialment regulen gens implicats en els processos biològics enriquits relacionats amb alteracions seminals i/o embriogènesi.

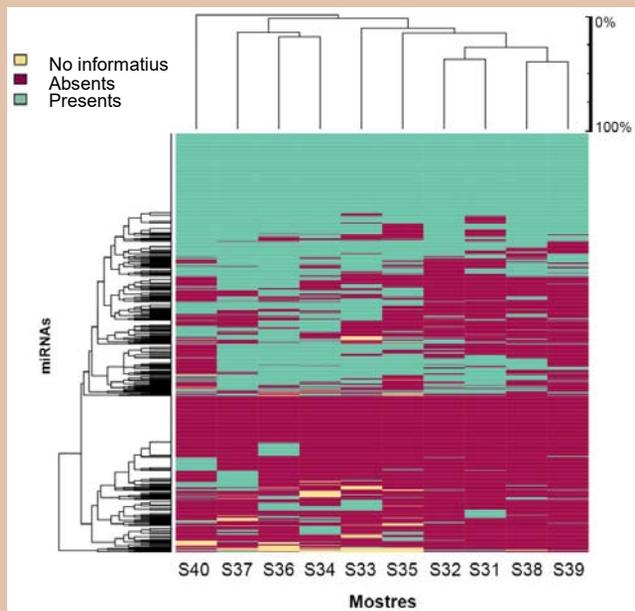
## 4.5. Perfils d'expressió en individus amb oligozoospermia

### 4.5.1. miRNAs presents i absents en individus amb oligozoospermia

En els espermatozoides dels individus amb oligozoospermia analitzats amb plaques preconfigurades (S31-S40), es van detectar 131 miRNAs presents de forma ubiqua (**Taula suplementària 7**). Per contra, 81 miRNAs no es van identificar en cap individu (**Taula suplementària 8**) i 524 ho van fer de forma variable. Un 54% de miRNAs presents de forma ubiqua en aquesta població va coincidir amb els miRNAs detectats en tots els individus de la població fèrtil. Per altra banda, el 46% de miRNAs absents en tots els individus d'aquesta població ho va fer amb els miRNAs absents en tots els individus de la població fèrtil.

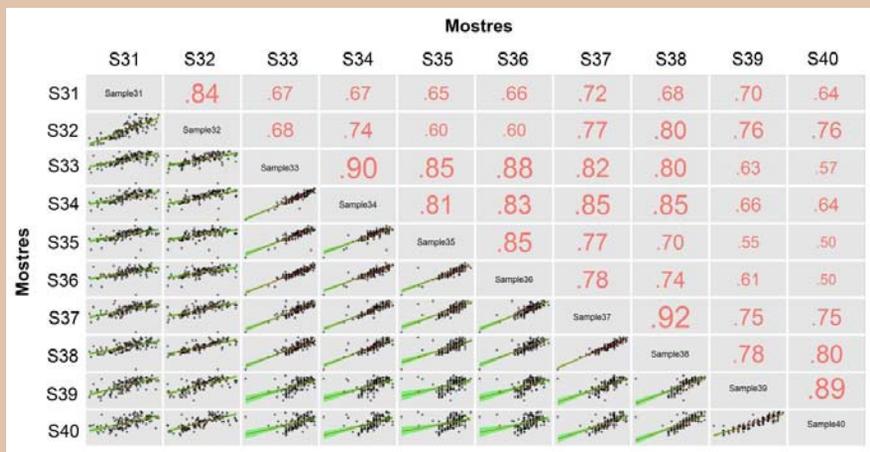
### 4.5.2. Homogeneïtat de la població amb oligozoospermia

El dendrograma obtingut de l'anàlisi de conglomerats jeràrquics basada en el perfil de miRNAs presents, absents i no informatius de cada individu, va mostrar la formació de dos conjunts principals (**Figura 4.14**). Les diferències entre aquests dos grups es van quantificar en un 20%.



**Figura 4.14.** Dendrograma de l'anàlisi de conglomerats jeràrquics realitzada amb els valors d'expressió no normalitzats (Ct) dels miRNAs presents, absents i d'expressió variable en els espermatozoides dels individus amb oligozoospermia (S31-S40). Les mostres estan representades en les columnes (n=10) i els assajos en les files (n=768).

Totes les correlacions de Spearman realitzades entre els valors de normCt dels miRNAs amb expressió ubiqua van resultar significatives amb un rang de valor rho de 0.50-0.92 (**Figura 4.15**).



**Figura 4.15.** Resultats de rho de les correlacions de Spearman realitzades entre els valors de normCt dels miRNAs presents de forma ubiqua en la població d'individus amb oligozoospèrmia (S31-S40).

### 4.5.3. DE-miRNAs en la població amb oligozoospèrmia

La comparació dels nivells d'expressió de cada miRNA en les mostres d'aquesta població respecte les dades control (S1-S10) va permetre identificar un total de 18 DE-miRNAs, dels quals 3 van mostrar sobre-expressió i 15 sub-expressió (**Taula 4.11**).

### 4.5.4. Caracterització de regions genòmiques que inclouen els DE-miRNAs de la població amb oligozoospèrmia

Un 62.50% dels DE-miRNA es va localitzar en regions intròniques, mentre que el 37.50% restant ho va fer en regions intergèniques (**Taula 4.11**). Pel que fa al sentit de la transcripció, es va trobar un 50% de DE-miRNAs que presentaven un sentit de la transcripció *forward* i un 50% amb sentit *reverse* (**Taula 4.11**). Per altra banda, un 22.22% de DE-miRNAs estaven localitzats en regions genòmiques no metilades, i un 77.78% en posicions en regions genòmiques metilades (**Taula 4.11**).

**Taula 4.11.** DE-miRNAs en espermatozoides de la població d'individus amb oligozoospermia. Inclou informació de la localització genòmica, el sentit de la transcripció i l'estat de metilació de les regions codificants pels DE-miRNAs.

DE-miRNAs	Valor Delta <sup>a</sup>	P-valor ajustat amb FDR	Localització genòmica <sup>b</sup>	Sentit transcripció <sup>c</sup>	Metilació (regió relacionada amb Protamines/Histones) <sup>d</sup>
hsa-miR-935	-8.02	0.0078	ND	Forward	Sí (Protamina)
hsa-miR-30d-3p	-6.91	0.0049	Intergènic	Reverse	Sí (Protamina)
hsa-miR-125a-3p	-5.19	0.0053	Intergènic	Forward	Sí (Protamina)
hsa-miR-9-3p	-5.06	0.0062	Intrònic	Reverse	Sí (Protamina)
			Intergènic	Reverse	Sí (Protamina)
hsa-miR-151-5p	-4.66	0.0052	Intrònic	Reverse	Sí (Protamina)
hsa-miR-195-5p	-4.60	0.0064	Intrònic	Reverse	Sí (Protamina)
hsa-miR-132-5p	-4.17	0.0045	Intergènic	Reverse	Sí (Protamina)
hsa-miR-335-5p	-3.99	0.0056	Intrònic	Forward	No (Histona)
hsa-miR-34b-3p	-3.66	0.0050	Intergènic	Forward	Sí (Protamina)
hsa-miR-15b-5p	-3.35	0.0078	Intrònic	Forward	Sí (Protamina)
hsa-miR-320b	-2.91	0.0065	ND	Forward	No (Histona)
			ND	Reverse	No (Histona)
hsa-miR-139-5p	-2.85	0.0078	Intrònic	Reverse	Sí (Protamina)
hsa-miR-517a-3p	-2.54	0.0076	Intergènic	Forward	Sí (Protamina)
hsa-miR-28-5p	-2.08	0.0078	Intrònic	Forward	No (Histona)
hsa-miR-1180	-1.71	0.0061	ND	Reverse	Sí (Protamina)
hsa-miR-483-5p	2.68	0.0098	Intrònic	Reverse	Sí (Protamina)
hsa-miR-491-5p	1.93	0.0041	Intrònic	Forward	No (Histona)
hsa-miR-324-3p	1.40	0.0057	Intrònic	Reverse	Sí (Protamina)

FDR: Correcció per falsos descobriments

<sup>a</sup>. Valor Delta=Diferència entre els valors d'expressió de la població control i la població infèrtil (els valors positius indiquen una sobre-expressió en la població infèrtil, mentre que els negatius indiquen una sub-expressió).

<sup>b</sup>. Informació obtinguda de la base de dades *miRNAMap* 2.0.

<sup>c</sup>. Informació obtinguda de la base de dades *Genome Browser* i *miRcode microRNA external track*.

<sup>d</sup>. Informació obtinguda de la base de dades *Genome Browser* i *DNA Methylation external track* (Smith Lab).

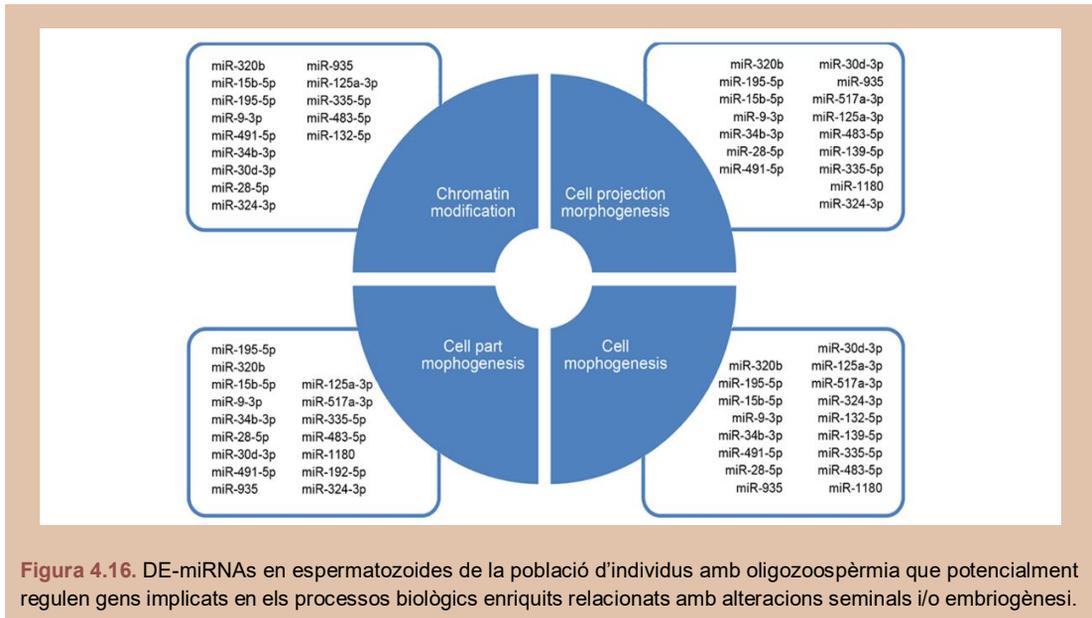
### 4.5.5. Predicció de gens diana i ontologia gènica en la població amb oligozoospermia

L'estudi de les dianes predites pels DE-miRNAs va permetre identificar 3,155 gens. Les anàlisis d'ontologia gènica van mostrar 40 processos enriquits, entre els quals hi destaquen rutes relacionades directament amb les alteracions seminals presents en els individus analitzats i amb l'embriogènesi: *chromatin modification*, *cell projection morphogenesis*, *cell part morphogenesis*, i *cell morphogenesis* (Taula 4.12).

**Taula 4.12.** Funcions biològiques enriquides associades als 3,155 gens predits pels DE-miRNAs en la població d'individus amb oligozoospermia. Nota: Els processos biològics directament relacionats amb les alteracions seminals presents en els individus analitzats i/o amb l'embrionària s'indiquen amb negreta.

Funcions biològiques (GO term)	P-valor Fisher	Correcció Bonferroni
Regulation of transcription (GO:0006355)	2.10x10 <sup>-11</sup>	9.30x10 <sup>-8</sup>
Modification-dependent protein catabolic process (GO:0019941)	2.20x10 <sup>-11</sup>	9.70x10 <sup>-8</sup>
Modification-dependent macromolecule catabolic process (GO:0043632)	2.20x10 <sup>-11</sup>	9.70x10 <sup>-8</sup>
Proteolysis involved in cellular protein catabolic process (GO:0051603)	3.10x10 <sup>-11</sup>	1.40x10 <sup>-7</sup>
Cellular protein catabolic process (GO:0044257)	4.70x10 <sup>-11</sup>	2.00x10 <sup>-7</sup>
Positive regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process (GO:0045935)	1.20x10 <sup>-10</sup>	5.10x10 <sup>-7</sup>
Protein catabolic process (GO:0030163)	1.70x10 <sup>-10</sup>	7.20x10 <sup>-7</sup>
Positive regulation of nitrogen compound metabolic process (GO:0051173)	2.40x10 <sup>-10</sup>	1.00x10 <sup>-6</sup>
Positive regulation of transcription (GO:0045893)	3.00x10 <sup>-10</sup>	1.30x10 <sup>-6</sup>
Positive regulation of gene expression (GO:0010628)	4.30x10 <sup>-10</sup>	1.90x10 <sup>-6</sup>
Positive regulation of macromolecule metabolic process (GO:0010604)	4.70x10 <sup>-10</sup>	2.00x10 <sup>-6</sup>
Positive regulation of macromolecule biosynthetic process (GO:0010557)	1.50x10 <sup>-9</sup>	6.60x10 <sup>-6</sup>
Cellular macromolecule catabolic process (GO:0044265)	1.00x10 <sup>-8</sup>	4.30x10 <sup>-5</sup>
Positive regulation of biosynthetic process (GO:0009891)	1.00x10 <sup>-8</sup>	4.30x10 <sup>-5</sup>
Transcription (GO:0006351)	1.40x10 <sup>-8</sup>	5.90x10 <sup>-5</sup>
Positive regulation of cellular biosynthetic process (GO:0031328)	1.70x10 <sup>-8</sup>	7.40x10 <sup>-5</sup>
Protein amino acid phosphorylation (GO:0006468)	2.20x10 <sup>-8</sup>	9.40x10 <sup>-5</sup>
Positive regulation of RNA metabolic process (GO:0051254)	4.10x10 <sup>-8</sup>	1.80x10 <sup>-4</sup>
Regulation of RNA metabolic process (GO:0051252)	5.10x10 <sup>-8</sup>	2.20x10 <sup>-4</sup>
Protein modification by small protein conjugation or removal (GO:0070647)	5.80x10 <sup>-8</sup>	2.50x10 <sup>-4</sup>
Positive regulation of transcription, DNA-dependent (GO:0045893)	8.50x10 <sup>-8</sup>	3.70x10 <sup>-4</sup>
Protein ubiquitination (GO:0016567)	1.50x10 <sup>-7</sup>	6.30x10 <sup>-4</sup>
Macromolecule catabolic process (GO:0009057)	2.10x10 <sup>-7</sup>	9.30x10 <sup>-4</sup>
Regulation of transcription from RNA Pol II promoter (GO:0006357)	2.70x10 <sup>-7</sup>	1.20x10 <sup>-3</sup>
Protein modification by small protein conjugation (GO:0032446)	5.20x10 <sup>-7</sup>	2.20x10 <sup>-3</sup>
<b>Chromatin modification (GO:0016568)</b>	6.90x10 <sup>-7</sup>	3.00x10 <sup>-3</sup>
Posttranscriptional regulation of gene expression (GO:0010608)	7.40x10 <sup>-7</sup>	3.20x10 <sup>-3</sup>
Regulation of transcription, DNA-dependent (GO:0006355)	9.40x10 <sup>-7</sup>	4.00x10 <sup>-3</sup>
<b>Cell projection morphogenesis (GO:0048858)</b>	4.80x10 <sup>-6</sup>	2.10x10 <sup>-2</sup>
Intracellular transport (GO:0046907)	5.60x10 <sup>-6</sup>	2.40x10 <sup>-2</sup>
Phosphate metabolic process (GO:0006796)	5.80x10 <sup>-6</sup>	2.50x10 <sup>-2</sup>
Phosphorus metabolic process (GO:0006793)	5.80x10 <sup>-6</sup>	2.50x10 <sup>-2</sup>
<b>Cell part morphogenesis (GO:0032990)</b>	6.20x10 <sup>-6</sup>	2.70x10 <sup>-2</sup>
Forebrain development (GO:0030900)	6.50x10 <sup>-6</sup>	2.80x10 <sup>-2</sup>
Regulation of small GTPase mediated signal transduction (GO:0051056)	6.90x10 <sup>-6</sup>	2.90x10 <sup>-2</sup>
Negative regulation of macromolecule metabolic process (GO:0010605)	8.00x10 <sup>-6</sup>	3.40x10 <sup>-2</sup>
Negative regulation of gene expression (GO:0010629)	9.20x10 <sup>-6</sup>	3.90x10 <sup>-2</sup>
<b>Cell morphogenesis (GO:0000902)</b>	1.10x10 <sup>-5</sup>	4.60x10 <sup>-2</sup>
Positive regulation of transcription from RNA Pol II promoter (GO:0045944)	1.10x10 <sup>-5</sup>	4.70x10 <sup>-2</sup>
Enzyme linked receptor protein signaling (GO:0007167)	1.20x10 <sup>-5</sup>	4.90x10 <sup>-2</sup>

Els DE-miRNAs implicats en la regulació dels gens que participen en els processos biològics enriquits relacionats directament amb les alteracions seminals presents en els individus analitzats i/o amb l'embriogènesi es mostren en la **Figura 4.16**.



## 4.6. Anàlisi global de les poblacions

### 4.6.1. Semblances dels perfils d'expressió en funció dels miRNAs presents/absents

Es van identificar 98 miRNAs presents de forma ubiqüa en tots els individus analitzats i 5 miRNAs que no es van detectar en cap individu. Els 633 miRNAs restants es van detectar de forma variable (**Figura 4.17**).

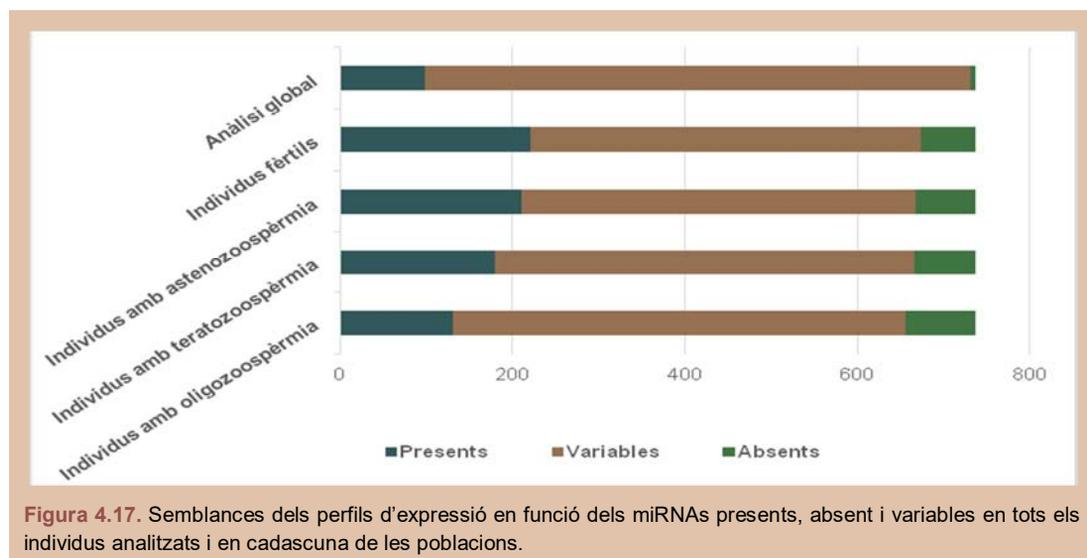


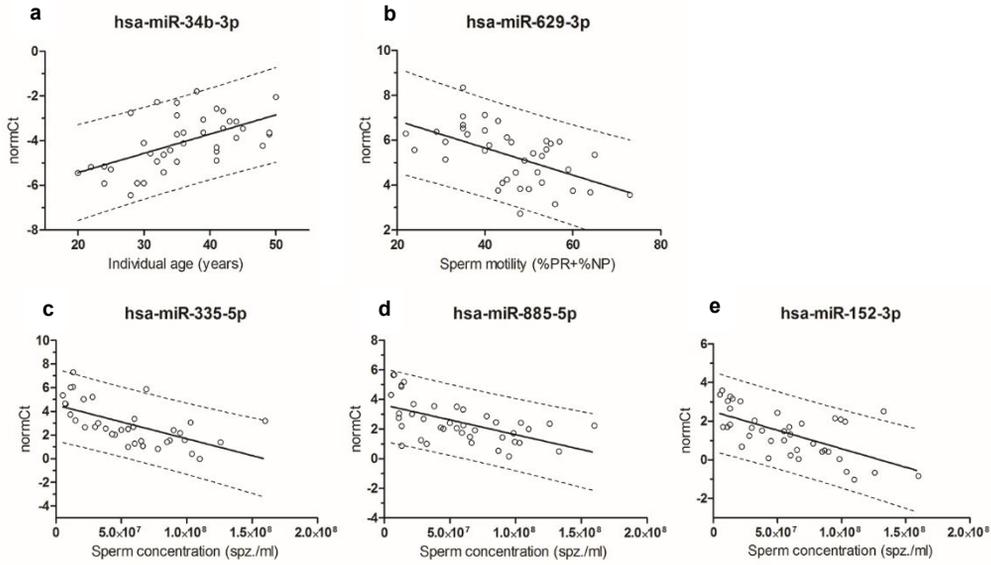
Figura 4.17. Semblances dels perfils d'expressió en funció dels miRNAs presents, absent i variables en tots els individus analitzats i en cadascuna de les poblacions.

#### 4.6.2. Efecte de les variables edat, seminograma i anomalies cromosòmiques numèriques sobre l'expressió de miRNAs

Les correlacions efectuades entre els valors normCt de cadascun dels miRNAs analitzats tenint en compte tots els individus analitzats (S01-S40) i les variables edat, paràmetres seminals (volum ejaculat, concentració, motilitat i morfologia espermàtica) i incidència d'anomalies cromosòmiques numèriques van mostrar diversos resultats significatius<sup>9</sup>:

- Correlació positiva entre el miRNA hsa-miR-34b-3p i l'edat dels individus (P-valor= $9.74 \times 10^{-5}$ , rho=0.58) (Figura 4.18).
- Correlació negativa entre el miRNA hsa-miR-629-3p i la motilitat (P-valor= $8.59 \times 10^{-5}$ , rho=-0.59) (Figura 4.18).
- Correlacions negatives entre els miRNAs hsa-miR-335-5p, (P-valor= $6.81 \times 10^{-6}$ , rho=-0.67), hsa-miR-885-5p (P-valor= $7.07 \times 10^{-5}$ , rho=-0.59) i hsa-miR-152-3p (P-valor= $7.65 \times 10^{-5}$ , rho=-0.59) i la concentració espermàtica (Figura 4.18).

<sup>9</sup> Tots els individus van ser inclosos en aquesta anàlisi ja que no es van trobar valors atípics (Cook's Di<1).

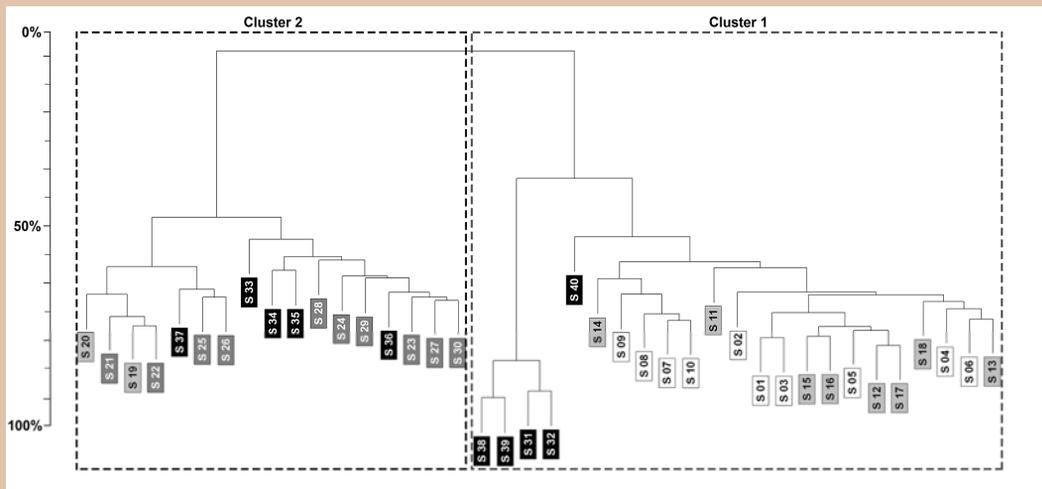


**Figura 4.18.** miRNAs amb valors normCt correlacionats significativament amb els paràmetres edat (a), motilitat espermàtica (b) i concentració espermàtica (c-e). Valors normCt elevats indiquen un menor nivell d'expressió de miRNAs i viceversa.

### 4.6.3. Anàlisi de l'agrupació dels individus en funció de perfils d'expressió de miRNAs

L'anàlisi de conglomerats jeràrquics va mostrar la formació de dos grups principals, les diferències entre els quals es va quantificar en un 40%. L'anàlisi mitjançant el mètode *cubic clustering criterion* va revelar que el nombre òptim de conglomerats que defineixen el dendrograma era de dos (**Figura 4.19**).

En el clúster 1 hi van quedar inclosos tots els individus fèrtils de la població control (S01-S10), vuit individus amb astenozoospermia (S11-S18) i cinc individus amb oligozoospermia (S31-S32, S38-S40), mentre que al clúster 2 s'hi van agrupar tots els individus amb teratozoospermia (S21-S30), dos individus amb astenozoospermia (S19-S20) i cinc individus amb oligozoospermia (S33-S37).



**Figura 4.19.** Dendrograma resultant de l'anàlisi de conglomerats jeràrquics basada en els valors normCt de tots els miRNAs dels 40 individus analitzats. Cada individu es marca amb un color diferent segons el seminograma que presenta: blanc (normozoospermia; control), gris (astenozoospermia), gris fosc (teratozoospermia), i negre (oligozoospermia).

L'anàlisi bivariant per determinar la influència de les variables edat, seminograma, FISH en espermatozoides, taxa de fecundació, percentatge d'embrions descartats, taxa d'embaràs i taxa d'avortament en l'agrupació obtinguda va mostrar una associació significativa únicament amb el factor seminograma ( $P < 0.001$ ) (**Taula 4.13**).

**Taula 4.13.** Resultats de les anàlisis bivariants per les variables edat, seminograma, FISH en espermatozoides, taxa de fecundació, percentatge d'embrions descartats, taxa d'embaràs i taxa d'avortament en l'agrupació obtinguda. Nota: Els P-valor significatius s'indiquen amb negra.

Paràmetres analitzats	Valor estadístic	P-valor
Edat	Khi=3.68	0.159
Seminograma	Khi=23.22	<b>&lt;0.001</b>
FISH en espermatozoides	Khi=0.94	0.332
Taxa fecundació	U=79.50	0.583
Percentatge embrions descartats	U=49.00	0.343
Taxa embaràs	U=52.50	0.446
Taxa avortament	U=39.00	0.815

#### 4.6.4. Caracterització de regions genòmiques en les que s'inclouen els DE-miRNAs

Pel que fa a les anàlisis de les característiques de les regions genòmiques codificants pels DE-miRNAs observats en el conjunt de les tres poblacions d'individus infèrtils analitzades, es va detectar un 4.84% de miRNAs localitzats en regions 3'UTR, un 59.68% en regions intròniques, un 1.61% en regions exòniques, mentre que el 35.48% restant ho va fer en regions intergèniques (**Taula 4.14**).

Al comparar aquestes dades amb els valors de referència corresponents al conjunt de 736 miRNAs analitzats, es va detectar un augment significatiu de DE-miRNAs localitzats en introns (P-valor=0.016), especialment dels DE-miRNAs sobre-expressats (P-valor=0.012). També es va observar una reducció significativa de DE-miRNAs sobre-expressats localitzats en regions intergèniques (P-valor=0.018) (**Taula 4.14**).

**Taula 4.14.** Nombre i percentatge relatiu de DE-miRNAs codificats en les diverses localitzacions genòmiques, així com dels valors de referència utilitzats (736 miRNAs inclosos en les plaques preconfigurades). Nota: Les diferències significatives s'indiquen amb P-valors marcats amb negreta.

DE-miRNAs	Localització											
	Intergènica			Intrònica			Exònica			3'UTR		
	n	%	P-valor	n	%	P-valor	n	%	P-valor	n	%	P-valor
Sobre-expressats	10	27.9	<b>0.0179</b>	24	64.9	<b>0.0121</b>	1	2.7	0.7185	3	8.1	0.6835
Sub-expressats	12	48.0	0.9186	13	52.0	0.4159	0	0	0.3416	0	0	0.2163
Totals	22	35.5	0.0830	37	69.7	<b>0.0161</b>	1	1.6	0.4299	3	4.8	0.7610
<b>MiRNAs de referència</b>	309	47.0	-	288	43.8	-	23	3.5	-	38	5.78	-

En les unitats de transcripció dels DE-miRNAs localitzats en regions intròniques, es van identificar un conjunt de 29 gens, 9 dels quals mostraven una funció relacionada amb l'espermatogènesi o l'embriogènesi (*GeneCards* v4.0; <http://genecards.org/>): *DALRD3*, *HOXC4*, *HOXC5*, *IFT80*, *IGF2*, *LPP*, *MEST*, *PTK2*, i *SMC4*) (**Taula 4.15**).

**Taula 4.15.** Gens relacionats amb l'espermatogènesi i/o embriogènesi continguts en les unitats de transcripció que inclouen els DE-miRNAs localitzats en regions intròniques.

Gen (nomenclatura OMIM)	Localització cromosòmica	Funció	Referència
DALR Anticodon binding domain containing 3 ( <i>DALRD3</i> )	Chr3:49,052,921-49,056,041	Regulació espermatogènesi	(Grinchuk <i>et al.</i> , 2009)
Homeobox C4 ( <i>HOXC4</i> )	Chr12:54,388,715-54,449,813	Regulació morfogènesi	(Min <i>et al.</i> , 2013)
Homeobox C5 ( <i>HOXC5</i> )	Chr12:54,410,641-54,429,144	Regulació morfogènesi	(Min <i>et al.</i> , 2013)
Intraflagellar transport 80 ( <i>IFT80</i> )	Chr3:159,974,773-160,118,027	Manteniment de la motilitat	(Huang <i>et al.</i> , 2008)
Insulin-like growth factor II ( <i>IGF2</i> )	Chr11:2,150,345-2,179,610	Regulació de la proliferació, creixement migració, diferenciació i supervivència cel·lular	(Constância <i>et al.</i> , 2002)
LIM Domain containing preferred translocation partner in lipoma ( <i>LPP</i> )	Chr3:187,871,096-188,608,459	Adhesió cel·lular, manteniment de la forma cel·lular i motilitat	(Majesky, 2006)
Mesoderm-specific transcript, mouse homolog ( <i>MEST</i> )	Chr7:130,126,015-130,146,137	Desenvolupament dels teixits fetals	(Ferguson-Smith <i>et al.</i> , 1991)
Protein-tyrosine kinase 2 ( <i>PTK2</i> )	Chr8:141,668,480-142,011,411	Desenvolupament embrionari primerenc i angiogènesi	(Shen <i>et al.</i> , 2005)
Structural maintenance of chromosomes 4 ( <i>SMC4</i> )	Chr3:160,117,077-160,152,754	Manteniment dels cromosomes, condensació dels cromosomes mitòtics i reparació del DNA	(Ball A.R. i Yokomori, 2001)

Pel que fa al sentit de la transcripció, es va observar que un 51.35% dels DE-miRNAs presentaven un sentit de la transcripció *forward* i un 48.65% un sentit *reverse*. Aquests resultats no van mostrar diferències significatives (P-valor=0.5337) en relació als valors de referència (Taula 4.16).

**Taula 4.16.** Nombre i percentatge relatiu de DE-miRNAs pel que fa al sentit de la transcripció, així com dels seus valors de referència (736 miRNAs inclosos en les plaques preconfigurades).

DE-miRNAs	Sentit de la transcripció					
	<i>Forward</i>			<i>Reverse</i>		
	n	%	P-valor	n	%	P-valor
Sobre-expressats	20	48.8	0.4266	21	51.2	0.4266
Sub-expressats	19	57.6	0.8585	14	42.4	0.8585
Totals	39	52.7	0.7120	35	47.3	0.7120
<b>MiRNAs de referència</b>	342	55.2	-	278	44.8	-

Per altra banda, un 29.73% de DE-miRNAs estaven localitzats en regions genòmiques no metilades (preferentment empaquetades amb histones: baix grau de compactació), i un 70.27% en regions genòmiques metilades (preferentment empaquetades amb protamines: elevat grau de compactació). Aquesta distribució no va presentar diferències significatives (P-valor=0.7880) al comparar-se amb els valors de referència (**Taula 4.17**).

**Taula 4.17.** Nombre i percentatge relatiu de DE-miRNAs pel que fa al empaquetament existent, així com dels seus valors de referència (736 miRNAs inclosos en les plaques preconfigurades).

DE-miRNAs	Empaquetament					
	Histones			Protamines		
	n	%	P-valor	n	%	P-valor
Sobre-expressats	15	36.6	0.2870	26	63.4	0.2870
Sub-expressats	7	22.6	0.6834	24	77.4	0.6834
Totals	22	29.7	0.7880	52	70.3	0.7880
<b>MiRNAs de referència</b>	226	28.2	-	576	71.8	-

#### 4.6.5. Identificació de gens associats a espermatogènesi i meiosi

Entre les dianes predites pels DE-miRNAs en cadascuna de les tres poblacions d'individus infèrtils es van identificar gens associats amb la espermatogènesi o meiosi (74 gens en la població d'individus amb astenozoospèrmia, 75 gens en la població d'individus amb teratozoospèrmia, i 26 gens en la població d'individus amb oligozoospèrmia).

En les tres llistes, es van detectar 11 gens coincidents que es van poder associar amb la presència de les alteracions seminals (*GeneCards* v4.0; <http://genecards.org/>) (**Taula 4.18**).

**Taula 4.18.** Gens associats als processos d'espermatogènesi o meiosi coincidents en les tres poblacions d'individus infèrtils analitzades.

Gen (nomenclatura OMIM)	Localització cromosòmica	Funció	Referència
BCL2-like2 ( <b>BCL2L2</b> )	Chr14:23,775,970-23,790,240	Regulació espermatogènesi	(Ross <i>et al.</i> , 1998)
Cyclin D2 ( <b>CCND2</b> )	Chr12:4,382,900-4,414,521	Regulació espermatogènesi	(Kozar <i>et al.</i> , 2004)
Checkpoint kinase 1 ( <b>CHEK1</b> )	Chr11:125,495,030-125,546,149	Control del cicle cel·lular	(Takai <i>et al.</i> , 2000)
Deleted in azoospermia ( <b>DAZ1</b> )	ChrY:25,275,501-25,345,238	Regulació espermatogènesi	(Tsui <i>et al.</i> , 2000)
Dystrophia myotonica, WD repeat containing ( <b>DMWD</b> )	Chr19:46,286,204-46,296,059	Regulació de la meiosi	(Jansen <i>et al.</i> , 1992)
Extra spindle poles-like 1 ( <b>ESPL1</b> )	Chr12:53,662,082-53,687,426	Segregació cromosòmica	(Sun <i>et al.</i> , 2012)
Fibronectin type III domain-containing 3A ( <b>FNDC3A</b> )	Chr13:49,550,047-49,783,914	Adhesió espermàtida-cèl·lula de Sertoli durant l'espermatogènesi	(Obholz <i>et al.</i> , 2006)
Sperm-associated antigen 16 ( <b>SPAG16</b> or <b>PF20</b> )	Chr2:214,149,102-215,275,224	Motilitat de flagels en l'espermatozoide i mobilitat de cilis	(Zhang <i>et al.</i> , 2002)
Proteasome activator subunit 4 ( <b>PSME4</b> )	Chr2:54,091,203-54,197,976	Promou degradació durant l'espermatogènesi i respon al dany del DNA	(Khor <i>et al.</i> , 2006)
RAD51 <i>S. cerevisiae</i> homolog C ( <b>RAD51C</b> )	Chr17:56,769,933-56,811,702	Recombinació homòloga del DNA i reparació	(Liu <i>et al.</i> , 2004)
Stromal antigen 2 ( <b>STAG2</b> )	ChrX:123,094,474-123,236,505	Separació de cromàtides germanes durant la divisió cel·lular	(Renault <i>et al.</i> , 2011)