Universitat Autònoma de Barcelona

Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia

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

Supplemental Table 1. Demographic characteristics and seminal parameters of the individuals included in the study.

Samples	Age (years)	Ejaculate volume (ml)	Concentration (spz./ml)	Motility (%PR+%NP)	Morphology (%NF)	Karyotype	Proven fertility
Sample 01	28	3.2	$1.10x10^8$	52	7	Normal	√
Sample 02	20	3.7	$5.93x10^7$	47	7	Normal	√
Sample 03	22	2.2	$8.70x10^7$	50	ND	Normal	√
Sample 04	25	5	$5.00x10^7$	59	ND	Normal	√
Sample 05	30	5	$6.00x10^7$	31	5	Normal	√
Sample 06	33	6	$3.00x10^7$	65	8	Normal	√
Sample 07	30	2	$9.50x10^7$	53	18	Normal	√
Sample 08	29	3.4	$3.23x10^7$	56	ND	Normal	√
Sample 09	24	1.8	$1.03x10^8$	44	6	Normal	√
Sample 10	24	4	$4.50x10^7$	55	ND	Normal	√
Mean (±SD)	26.5 (±4.1)	3.6 (±1.4)	$6.72x10^7$ ($\pm 2.94x10^7$)	51.2 (±9.3)	8.5 (±4.8)	-	-

Spz.: Spermatozoa, PR: Progressive, NP: Non-progressive, NF: Normal forms, ND: No data.

Supplemental Table 2. RNA isolation data.

Samples	Total number spz.	Total RNA (ng)	RNA/spz. (fg)	Purity (260/280 nm)
Sample 01	$5.78x10^7$	3697	64	1.92
Sample 02	$1.96x10^7$	1229	63	1.94
Sample 03	$1.73x10^7$	828	48	1.93
Sample 04	$8.20x10^6$	696	85	1.84
Sample 05	$7.45x10^6$	737	99	1.85
Sample 06	$1.31x10^7$	712	54	1.84
Sample 07	$1.09x10^7$	402	37	1.84
Sample 08	$1.79x10^7$	458	26	1.97
Sample 09	$1.14x10^7$	428	38	1.85
Sample 10	$8.85x10^6$	373	42	1.96
Mean (±SD)	$1.72x10^7$ ($\pm 1.48x10^7$)	956 (±997)	55 (±22)	1.89 (±0.054)

Spz.: spermatozoa

Supplemental Table 3. Brief description of the ubiquitous miRNAs.

miRBase ID	miRBase Accession number[a]	Target Sequence 5'>3' [a]	DIANA microT[b]	Novel sperm miRNA[c]	Biological functions related to gametogenesis or embryogenesis	Localization	References
hsa-let-7a-5p	MIMAT0000062	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU	√		Spermatogenesis	Human germ cells and seminal plasma	(28,45)
hsa-let-7b-5p	MIMAT0000063	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU	√				
hsa-let-7c	MIMAT0000064	UGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUU	√				
hsa-let-7d-5p	MIMAT0000065	AGAGGUAGUAGGUUGCAUAGUU	√				
hsa-let-7g-5p	MIMAT0000414	UGAGGUAGUAGUUUGUACAGUU	√				
hsa-miR-7-1-3p	MIMAT0004553	CAACAAAUCACAGUCUGCCAUA		√	Spermatogenesis	Human seminal plasma	(46)
hsa-miR-9-5p	MIMAT0000441	UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGA	√	√			
hsa-miR-9-3p	MIMAT0000442	AUAAAGCUAGAUAACCGAAAGU					
hsa-miR-10a-5p	MIMAT0000253	UACCCUGUAGAUCCGAAUUUGUG	√				
hsa-miR-10b-5p	MIMAT0000254	UACCCUGUAGAACCGAAUUUGUG	√				
hsa-miR-10b-3p	MIMAT0004556	ACAGAUUCGAUUCUAGGGGAAU		√			
hsa-miR-15b-5p	MIMAT0000417	UAGCAGCACAUCAUGGUUUACA	√		Spermatogenesis	Human spermatczoa	(29)
hsa-miR-16-5p	MIMAT0000069	UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG	√		Spermatogenesis	Human spermatczoa. Total human ejaculate	(29,44)
hsa-miR-17-5p	MIMAT0000070	CAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG	√				
hsa-miR-19a-3p	MIMAT0000073	UGUGCAAAUCUAUGCAAAACUGA	√				
hsa-miR-19b-3p	MIMAT0000074	UGUGCAAAUCCAUGCAAAACUGA	√	√			
hsa-miR-20a-5p	MIMAT0000075	UAAAGUGCUUAUAGUGCAGGUAG	√				
hsa-miR-20b-5p	MIMAT0001413	CAAAGUGCUCAUAGUGCAGGUAG	√				
hsa-miR-21-5p	MIMAT0000076	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA	√		Self-renewal of mouse spermatogonial stem cells	Mouse spermatogonial stem cells	(47)
hsa-miR-22-5p	MIMAT0004495	AGUUCUUCAGUGGCAAGCUUUA		√			
hsa-miR-24-3p	MIMAT0000080	UGGCUCAGUUCAGCAGGAACAG	√				
hsa-miR-25-3p	MIMAT0000081	CAUUGCACUUGUCUCGGUCUGA	√				
hsa-miR-26a-5p	MIMAT0000082	UUCAAGUAAUCCAGGAUAGGCU	√		Spermatogenesis	Human spermatczoa. Total human ejaculate	(29,44)
hsa-miR-26b-5p	MIMAT0000083	UUCAAGUAAUUCAGGAUAGGU	√		Embryonic cell growth and regulation	Human Embryonic Stem Cells	(48)
hsa-miR-26b-3p	MIMAT0004500	CCUGUUCUCCAUUACUUGGCUC		√			
hsa-miR-27a-3p	MIMAT0000084	UUCACAGUGGCUAAGUUCCGC	√				
hsa-miR-28-5p	MIMAT0000085	AAGGAGCUCACAGUCUAUUGAG	√	√			
hsa-miR-28-3p	MIMAT0004502	CACUAGAUUGUGAGCUCCUGGA	√	√			
hsa-miR-29a-3p	MIMAT0000086	UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA	√				
hsa-miR-29c-5p	MIMAT0004673	UGACCGAUUUCUCCUGGUGUUC		√			
hsa-miR-30a-5p	MIMAT0000087	UGUAAACAUCCUCGACUGGAAG	√		Spermatogenesis	Human spermatczoa	(29)
hsa-miR-30a-3p	MIMAT0000088	CUUUCAGUCGGAUGUUUGCAGC					
hsa-miR-30b-5p	MIMAT0000420	UGUAAACAUCCUACACUCAGCU	√				
hsa-miR-30c-5p	MIMAT0000244	UGUAAACAUCCUACACUCUCAGC	√				
hsa-miR-30d-5p	MIMAT0000245	UGUAAACAUCCCCGACUGGAAG	√				
hsa-miR-30d-3p	MIMAT0004551	CUUUCAGUCAGAUGUUUGCUGC		√			
hsa-miR-30e-3p	MIMAT0000693	CUUUCAGUCGGAUGUUUACAGC					
hsa-miR-31-5p	MIMAT0000089	AGGCAAGAUGCUGGCAUAGCU	√				
hsa-miR-31-3p	MIMAT0004504	UGCUAUGCCAACAUAUUGCCAU		√			
hsa-miR-34b-5p	MIMAT0000685	UAGGCAGUGUCAUUAGCUGAUUG			Spermatogenesis	Human spermatczoa	(29)
hsa-miR-34b-3p	MIMAT0004676	CAAUCACUAACUCCACUGCCAU	√		Spermatogenesis	Human spermatczoa	(29)
hsa-miR-92a-3p	MIMAT0000092	UAUUGCACUUGUCCCGGCCUGU	√				
hsa-miR-93-5p	MIMAT0000093	CAAAGUGCUGUUCGUGCAGGUAG	√				

hsa-miR-93-3p	MIMAT0004509	ACUGCUGAGCUAGCACUUCCCG		√			
hsa-miR-95	MIMAT0000094	UUCAACGGGUAUUUAUUGAGCA		√			
hsa-miR-99a-5p	MIMAT0000097	AACCCGUAGAUCCGAUCUUGUG	√		Spermatogenesis	Human spermatczoa	(29)
hsa-miR-99b-5p	MIMAT0000689	CACCCGUAGAACCGACCUUGCG	√				
hsa-miR-99b-3p	MIMAT0004678	CAAGCUCGUGUCUGUGGGUCCG		√			
hsa-miR-100-5p	MIMAT0000098	AACCCGUAGAUCCGAACUUGUG	√		Spermatogenesis	Total human ejaculate	(44)
hsa-miR-103a-3p	MIMAT0000101	AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUGA	√				
hsa-miR-106a-5p	MIMAT0000103	AAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG	√	√			
hsa-miR-106b-5p	MIMAT0000680	UAAAGUGCUGACAGUGCAGAU	√				
hsa-miR-106b-3p	MIMAT0004672	CCGCACUGUGGGUACUUGCUGC		√			
hsa-miR-122-5p	MIMAT0000421	UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG	√		Spermatogenesis	Human spermatczoa. Total human ejaculate. Human seminal plasma	(29,44,49)
hsa-miR-125a-5p	MIMAT0000443	UCCCUGAGACCCUUUAACCUGUGA	√				
hsa-miR-125a-3p	MIMAT0004602	ACAGGUGAGGUUCUUGGGAGCC	√	√			
hsa-miR-125b-5p	MIMAT0000423	UCCCUGAGACCCUAACUUGUGA	√	√	Early embryo development	Mice preimplantation embryo	(50)
hsa-miR-126-5p	MIMAT0000444	CAUUAUUACUUUUGGUACGCG		√			
hsa-miR-126-3p	MIMAT0000445	UCGUACCGUGAGUAAUAAUGCG	√	√			
hsa-miR-130a-3p	MIMAT0000425	CAGUGCAAUGUUAAAAGGGCAU	√	√			
hsa-miR-130b-5p	MIMAT0004680	ACUCUUUCCCUGUUGCACUAC		√			
hsa-miR-130b-3p	MIMAT0000691	CAGUGCAAUGAUGAAAGGGCAU	√				
hsa-miR-132-3p	MIMAT0000426	UAACAGUCUACAGCCAUGGUCG	√				
hsa-miR-132-5p	MIMAT0004594	ACCGUGGCUUUCGAUUGUUACU		√			
hsa-miR-133a-3p	MIMAT0000427	UUUGGUCCCCUUCAACCAGCUG	√	√			
hsa-miR-135a-5p	MIMAT0000428	UAUGGCUUUUUAUUCCUAUGUGA	√	√			
hsa-miR-135b-5p	MIMAT0000758	UAUGGCUUUUCAUUCCUAUGUGA	√	√			
hsa-miR-139-5p	MIMAT0000250	UCUACAGUGCACGUGUCUCCAG	√	√			
hsa-miR-140-5p	MIMAT0000431	CAGUGGUUUUACCCUAUGGUAG	√	√			
hsa-miR-146a-5p	MIMAT0000449	UGAGAACUGAAUUCCAUGGGUU	√				
hsa-miR-146b-5p	MIMAT0002809	UGAGAACUGAAUUCCAUAGGCU	√		Spermatogenesis	Total human ejaculate	(49)
hsa-miR-146b-3p	MIMAT0004766	UGCCCUGUGGACUCAGUUCUGG	√	√			
hsa-miR-148a-3p	MIMAT0000243	UCAGUGCACUACAGAACUUUGU	√				
hsa-miR-149-5p	MIMAT0000450	UCUGGCUCCGUGUCUUCACUCCC	√	√			
hsa-miR-149-3p	MIMAT0004609	AGGGAGGGACGGGGGCUGUGC		√			
hsa-miR-150-5p	MIMAT0000451	UCUCCCAACCCUUGUACCAGUG	√		Embryonic development	Zebrafish zygotes	(51)
hsa-miR-151a-5p	MIMAT0004697	UCGAGGAGCUCACAGUCUAGU	√				
hsa-miR-152	MIMAT0000438	UCAGUGCAUGACAGAACUUGG	√				
hsa-miR-155-5p	MIMAT0000646	UUAAUGCUAAUCGUGAUAGGGGU	√	√			
hsa-miR-181a-2-3p	MIMAT0004558	ACCACUGACCGUUGACUGUACC		√			
hsa-miR-183-5p	MIMAT0000261	UAUGGCACUGGUAGAAUUCACU	√	√			
hsa-miR-183-3p	MIMAT0004560	GUGAAUUACCGAAGGGCCAUAA		√			
hsa-miR-184	MIMAT0000454	UGGACGGAGAACUGAUAAGGGU	√		Spermatogenesis	Mice testis and brain	
hsa-miR-186-5p	MIMAT0000456	CAAAGAAUUCUCCUUUUGGGCU	√	√			
hsa-miR-190b	MIMAT0004929	UGAUAUGUUUGAUAUUGGGUU	√	√			
hsa-miR-191-5p	MIMAT0000440	CAACGGAAUCCCAAAAGCAGCUG	√				
hsa-miR-191-3p	MIMAT0001618	GCUGCGCUUGGAUUUCGUCCCC					
hsa-miR-192-5p	MIMAT0000222	CUGACCUAUGAAUUGACAGCC	√				
hsa-miR-193a-5p	MIMAT0004614	UGGGUCUUUGCGGGCGAGAUGA	√				
hsa-miR-193b-3p	MIMAT0002819	AACUGGCCCUCAAAGUCCCGCU	√				
hsa-miR-193b-5p	MIMAT0004767	CGGGGUUUUGAGGGCGAGAUGA			Spermatogenesis	Human spermatczoa. Total human ejaculate	(29,44)

hsa-miR-194-5p	MIMAT0000460	UGUAACAGCAACUCCAUGUGGA	√	√			
hsa-miR-195-5p	MIMAT0000461	UAGCAGCACAGAAAUAUUGGC	√				
hsa-miR-197-3p	MIMAT0000227	UUCACCACCUUCUCCACCCAGC	√				
hsa-miR-199a-3p	MIMAT0000232	ACAGUAGUCUGCACAUUGGUUA	√	√			
hsa-miR-200a-3p	MIMAT0000682	UAACACUGUCUGGUAACGAUGU	√				
hsa-miR-200b-3p	MIMAT0000318	UAAUACUGCCUGGUAAUGAUGA	√				
hsa-miR-200c-3p	MIMAT0000617	UAAUACUGCCGGGUAAUGAUGGA	√				
hsa-miR-202-3p	MIMAT0002811	AGAGGUAUAGGGCAUGGGAA	√	√			
hsa-miR-203a	MIMAT0000264	GUGAAAUGUUUAGGACCACUAG	√	√			
hsa-miR-204-5p	MIMAT0000265	UUCCCUUUGUCAUCCUAUGCCU	√	√			
hsa-miR-205-5p	MIMAT0000266	UCCUUCAUUCCACCGGAGUCUG	√				
hsa-miR-210	MIMAT0000267	CUGUGCGUGUGACAGCGGCUGA	√				
hsa-miR-211-5p	MIMAT0000268	UUCCCUUUGUCAUCCUUCGCCU	√	√			
hsa-miR-212-3p	MIMAT0000269	UAACAGUCUCCAGUCACGGCC	√	√			
hsa-miR-214-3p	MIMAT0000271	ACAGCAGGCACAGACAGGCAGU	√	√			
hsa-miR-215	MIMAT0000272	AUGACCUAUGAAUUGACAGAC	√	√			
hsa-miR-218-5p	MIMAT0000275	UUGUGCUUGAUCUAACCAUGU	√	√			
hsa-miR-221-3p	MIMAT0000278	AGCUACAUUGUCUGCUGGGUUUC	√				
hsa-miR-222-3p	MIMAT0000279	AGCUACAUCUGGCUACUGGGU	√	√			
hsa-miR-223-3p	MIMAT0000280	UGUCAGUUUGUCAAAUACCCCA	√	√			
hsa-miR-224-5p	MIMAT0000281	CAAGUCACUAGUGGUUCCGUU	√	√			
hsa-miR-296-5p	MIMAT0000690	AGGGCCCCCCCUCAAUCCUGU	√	√			
hsa-miR-320a	MIMAT0000510	AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGA	√				
hsa-miR-320b	MIMAT0005792	AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCAA					
hsa-miR-323a-3p	MIMAT0000755	CACAUUACACGGUCGACCUCU	√	√			
hsa-miR-324-3p	MIMAT0000762	ACUGCCCCAGGUGCUGCUGG	√	√			
hsa-miR-328	MIMAT0000752	CUGGCCCUCUCUGCCCUUCCGU	√	√			
hsa-miR-331-3p	MIMAT0000760	GCCCCUGGGCCUAUCCUAGAA	√				
hsa-miR-335-5p	MIMAT0000765	UCAAGAGCAAUAACGAAAAAUGU	√				
hsa-miR-335-3p	MIMAT0004703	UUUUUCAUUAUUGCUCCUGACC		√			
hsa-miR-339-3p	MIMAT0004702	UGAGCGCCUCGACGACAGAGCCG	√	√			
hsa-miR-342-3p	MIMAT0000753	UCUCACACAGAAAUCGCACCCGU	√				
hsa-miR-345-5p	MIMAT0000772	GCUGACUCCUAGUCCAGGGCUC	√	√			
hsa-miR-346	MIMAT0000773	UGUCUGCCCGCAUGCCUGCCUCU	√	√			
hsa-miR-361-5p	MIMAT0000703	UUAUCAGAAUCUCCAGGGGUAC	√				
hsa-miR-363-3p	MIMAT0000707	AAUUGCACGGUAUCCAUCUGUA	√				
hsa-miR-365a-3p	MIMAT0000710	UAAUGCCCCUAAAAAUCCUUAU	√				
hsa-miR-370	MIMAT0000722	GCCUGCUGGGGUGGAACCUGGU	√	√			
hsa-miR-371a-3p	MIMAT0000723	AAGUGCCGCCAUCUUUUGAGUGU	√	√			
hsa-miR-372	MIMAT0000724	AAAGUGCUGCGACAUUUGAGCGU	√	√	Embryonic development	Absent in adult mice tissues with the exception of the gonads and embryo	(52)
hsa-miR-374a-5p	MIMAT0000727	UUAUAAUACAACCUGAUAAGUG	√				
hsa-miR-374b-5p	MIMAT0004955	AUAUAAUACAACCUGCUAAGUG	√		Spermatogenesis	Total human ejaculate	(49)
hsa-miR-375	MIMAT0000728	UUUGUUCGUUCGGCUCGCGUGA	√				
hsa-miR-376a-3p	MIMAT0000729	AUCAUAGAGGAAAAUCCACGU	√	√			
hsa-miR-378a-3p	MIMAT0000732	ACUGGACUUGGAGUCAGAAGG	√	√			
hsa-miR-382-5p	MIMAT0000737	GAAGUUGUUCGUGGUGGAUUCG	√				
hsa-miR-409-3p	MIMAT0001639	GAAUGUUGCUCGGUGAACCCCU	√	√			
hsa-miR-423-5p	MIMAT0004748	UGAGGGGCAGAGAGCGAGACUUU	√				

hsa-miR-425-5p	MIMAT0003393	AAUGACACGAUCACUCCCGUUGA	√				
hsa-miR-425-3p	MIMAT0001343	AUCGGGAAUGUCGUGUCCGCCC					
hsa-miR-429	MIMAT0001536	UAAUACUGUCUGGUAAAACCGU	√		Spermatogenesis	Human seminal plasma. Human sperm	(29,46)
hsa-miR-483-5p	MIMAT0004761	AAGACGGGAGGAAAGAAGGGAG	√	√			
hsa-miR-484	MIMAT0002174	UCAGGCUCAGUCCCCUCCCGAU	√	√			
hsa-miR-486-3p	MIMAT0004762	CGGGGCAGCUCAGUACAGGAU	√	√			
hsa-miR-486-5p	MIMAT0002177	UCCUGUACUGAGCUGCCCCGAG	√	√			
hsa-miR-491-5p	MIMAT0002807	AGUGGGGAACCCUUCCAUGAGG	√				
hsa-miR-495-3p	MIMAT0002817	AAACAAACAUGGUGCACUUCUU	√				
hsa-miR-505-5p	MIMAT0004776	GGGAGCCAGGAAGUAUUGAUGU		√			
hsa-miR-508-3p	MIMAT0002880	UGAUUGUAGCCUUUUGGAGUAGA	√	√			
hsa-miR-512-3p	MIMAT0002823	AAGUGCUGUCAUAGCUGAGGUC	√		Spermatogenesis	Total human ejaculate	(44)
hsa-miR-516a-3p	MIMAT0002860	UGCUUCCUUUCAGAGGGU	√	√			
hsa-miR-517-5p	MIMAT0002851	CCUCUAGAUGGAAGCACUGUCU		√			
hsa-miR-517a-3p	MIMAT0002852	AUCGUGCAUCCCUUUAGAGUGU	√	√			
hsa-miR-517c-3p	MIMAT0002866	AUCGUGCAUCCUUUUAGAGUGU	√	√			
hsa-miR-518b	MIMAT0002844	CAAAGCGCUCCCCUUUAGAGGU	√	√			
hsa-miR-518e-3p	MIMAT0002861	AAAGCGCUUCCCUUCAGAGUG	√				
hsa-miR-519a-3p	MIMAT0002869	AAAGUGCAUCCUUUUAGAGUGU	√	√			
hsa-miR-519d	MIMAT0002853	CAAAGUGCCUCCCUUUAGAGUG	√	√			
hsa-miR-520c-3p	MIMAT0002846	AAAGUGCUUCCUUUUAGAGGGU	√	√			
hsa-miR-520g	MIMAT0002858	ACAAAGUGCUUCCCUUUAGAGUGU	√	√			
hsa-miR-520h	MIMAT0002867	ACAAAGUGCUUCCCUUUAGAGU	√				
hsa-miR-522-3p	MIMAT0002868	AAAAUGGUUCCCUUUAGAGUGU	√	√			
hsa-miR-523-3p	MIMAT0002840	GAACGCGCUUCCCUAUAGAGGGU		√			
hsa-miR-526b-5p	MIMAT0002835	CUCUUGAGGGAAGCACUUUCUGU	√	√			
hsa-miR-532-5p	MIMAT0002888	CAUGCCUUGAGUGUAGGACCGU	√	√			
hsa-miR-532-3p	MIMAT0004780	CCUCCCACACCCAAGGCUUGCA	√	√			
hsa-miR-539-5p	MIMAT0003163	GGAGAAAUUAUCCUUGGUGUGU	√				
hsa-miR-543	MIMAT0004954	AAACAUUCGCGGUGCACUUCUU	√	√			
hsa-miR-564	MIMAT0003228	AGGCACGGUGUCAGCAGGC	√	√			
hsa-miR-572	MIMAT0003237	GUCCGCUCGGCGGUGGCCCA	√				
hsa-miR-574-3p	MIMAT0003239	CACGCUCAUGCACACACCCACA	√				
hsa-miR-592	MIMAT0003260	UUGUGUCAAUAUGCGAUGAUGU	√	√			
hsa-miR-598	MIMAT0003266	UACGUCAUCGUUGUCAUCGUCA	√	√			
hsa-miR-601	MIMAT0003269	UGGUCUAGGAUUGUUGGAGGAG	√				
hsa-miR-616-5p	MIMAT0003284	ACUCAAAACCCUUCAGUGACUU		√			
hsa-miR-622	MIMAT0003291	ACAGUCUGCUGAGGUUGGAGC	√	√			
hsa-miR-625-5p	MIMAT0003294	AGGGGGAAAGUUCUAUAGUCC	√				
hsa-miR-625-3p	MIMAT0004808	GACUAUAGAACUUUCCCCCUCA		√			
hsa-miR-628-3p	MIMAT0003297	UCUAGUAAGAGUGGCAGUCGA	√	√			
hsa-miR-629-3p	MIMAT0003298	GUUCUCCCAACGUAAGCCCAGC		√			
hsa-miR-636	MIMAT0003306	UGUGCUUGCUCGUCCCGCCCGCA	√	√			
hsa-miR-638	MIMAT0003308	AGGGAUCGCGGGCGGGUGGCGGCCU	√				
hsa-miR-650	MIMAT0003320	AGGAGGCAGCGCUCUCAGGAC	√	√			
hsa-miR-659-3p	MIMAT0003337	CUUGGUUCAGGGAGGGUCCCCA	√	√			
hsa-miR-660-5p	MIMAT0003338	UACCCAUUGCAUAUCGGAGUUG	√	√			
hsa-miR-661	MIMAT0003324	UGCCUGGGUCUCUGGCCUGCGCGU	√	√			
hsa-miR-663b	MIMAT0005867	GGUGGCCCGGCCGUGCCUGAGG		√			

hsa-miR-664a-3p	MIMAT0005949	UAUUCAUUUAUCCCCAGCCUACA		√			
hsa-miR-671-3p	MIMAT0004819	UCCGGUUCUCAGGGCUCCACC		√			
hsa-miR-744-5p	MIMAT0004945	UGCGGGGCUAGGGCUAACAGCA	√	√			
hsa-miR-744-3p	MIMAT0004946	CUGUUGCCACUAACCUCAACCU		√			
hsa-miR-766-3p	MIMAT0003888	ACUCCAGCCCCACAGCCUCAGC	√				
hsa-miR-769-5p	MIMAT0003886	UGAGACCUCUGGGUUCUGAGCU	√	√			
hsa-miR-885-5p	MIMAT0004947	UCCAUUACACUACCCUGCCUCU	√	√			
hsa-miR-888-5p	MIMAT0004916	UACUCAAAAAGCUGUCAGUCA	√				
hsa-miR-890	MIMAT0004912	UACUUGGAAAGGCAUCAGUUG	√	√	Epididymis sperm maturation	Corpus and cauda of the human epididymis	(53)
hsa-miR-891a	MIMAT0004902	UGCAACGAACCUGAGCCACUGA			Epididymis sperm maturation	Corpus and cauda of the human epididymis	(53)
hsa-miR-892a	MIMAT0004907	CACUGUGUCCUUUCUGCGUAG	√	√	Epididymis sperm maturation	Corpus and cauda of the human epididymis	(53)
hsa-miR-892b	MIMAT0004918	CACUGGCUCCUUUCUGGGUAGA	√	√	Epididymis sperm maturation	Corpus and cauda of the human epididymis	(53)
hsa-miR-935	MIMAT0004978	CCAGUUACCGCUUCCGCUACCGC	√	√			
hsa-miR-939-5p	MIMAT0004982	UGGGGAGCUGAGGCUCUGGGGGUG	√				
hsa-miR-942	MIMAT0004985	UCUUCUCUGUUUUGGCCAUGUG	√	√			
hsa-miR-1180	MIMAT0005825	UUUCCGGCUCGCGUGGGUGUGU					
hsa-miR-1183	MIMAT0005828	CACUGUAGGUGAUGGUGAGAGUGGGCA		√			
hsa-miR-1208	MIMAT0005873	UCACUGUUCAGACAGGCGGA		√			
hsa-miR-1233-3p	MIMAT0005588	UGAGCCCUGUCCUCCCGCAG		√			
hsa-miR-1247-5p	MIMAT0005899	ACCCGUCCCGUUCGUCCCCGGA		√			
hsa-miR-1254	MIMAT0005905	AGCCUGGAAGCUGGAGCCUGCAGU		√			
hsa-miR-1255b-5p	MIMAT0005945	CGGAUGAGCAAAGAAAGUGGUU		√			
hsa-miR-1260a	MIMAT0005911	AUCCCACCUCUGCCACCA					
hsa-miR-1275	MIMAT0005929	GUGGGGGAGAGGCUGUC			Spermatogenesis	Total human ejaculate	(44)
hsa-miR-1282	MIMAT0005940	UCGUUUGCCUUUUUCUGCUU		√			
hsa-miR-1285-3p	MIMAT0005876	UCUGGGCAACAAAGUGAGACCU		√			
hsa-miR-1290	MIMAT0005880	UGGAUUUUUGGAUCAGGGA		√			
hsa-miR-1291	MIMAT0005881	UGGCCCUGACUGAAGACCAGCAGU		√			
hsa-miR-1296	MIMAT0005794	UUAGGGCCCUGGCUCCAUCUCC		√			
hsa-miR-1298	MIMAT0005800	UUCAUUCGGCUGUCCAGAUGUA		√			
hsa-miR-1825	MIMAT0006765	UCCAGUGCCCUCCUCUCC					

a. Information obtained from miRBase data base (http://www.mirbase.org/).

b. Information obtained from DIANA microT data base (http://diana.cslab.ece.ntua.gr/microT/), tested with mirBase ID and mirBase Accession Number.

c. miRNA not previously detected in human spermatozoa (24, 29, 44).

Supplemental Table 4. Brief description of the constantly absent miRNAs.

miRBase ID	miRBase accession number [a]	Target Sequence 5'>3' [a]	Previously described sperm miRNA [b]
hsa-let-7d-3p	MIMAT0004484	CUAUACGACCUGCUGCCUUUCU	
hsa-let-7i-3p	MIMAT0004585	CUGCGCAAGCUACUGCCUUGCU	
hsa-miR-18b-3p	MIMAT0004751	UGCCCUAAAUGCCCCUUCUGGC	
hsa-miR-19a-5p	MIMAT0004490	AGUUUUGCAUAGUUGCACUACA	√
hsa-miR-30b-3p	MIMAT0004589	CUGGGAGGUGGAUGUUUACUUC	
hsa-miR-32-3p	MIMAT0004505	CAAUUUAGUGUGUGUGAUAUUU	
hsa-miR-105-3p	MIMAT0004516	ACGGAUGUUUGAGCAUGUGCUA	
hsa-miR-106a-3p	MIMAT0004517	CUGCAAUGUAAGCACUUCUUAC	
hsa-miR-137	MIMAT0000429	UUAUUGCUUAAGAAUACGCGUAG	
hsa-miR-185-3p	MIMAT0004611	AGGGGCUGGCUUUCCUCUGGUC	
hsa-miR-196a-3p	MIMAT0004562	CGGCAACAAGAAACUGCCUGAG	
hsa-miR-218-1-3p	MIMAT0004565	AUGGUUCCGUCAAGCACCAUGG	
hsa-miR-218-2-3p	MIMAT0004566	CAUGGUUCUGUCAAGCACCGCG	
hsa-miR-221-5p	MIMAT0004568	ACCUGGCAUACAAUGUAGAUUU	√
hsa-miR-302b-5p	MIMAT0000714	ACUUUAACAUGGAAGUGCUUUC	
hsa-miR-325	MIMAT0000771	CCUAGUAGGUGUCCAGUAAGUGU	
hsa-miR-337-3p	MIMAT0000754	CUCCUAUAUGAUGCCUUUCUUC	
hsa-miR-367-5p	MIMAT0004686	ACUGUUGCUAAUAUGCAACUCU	
hsa-miR-367-3p	MIMAT0000719	AAUUGCACUUUAGCAAUGGUGA	
hsa-miR-369-5p	MIMAT0001621	AGAUCGACCGUGUUAUAUUCGC	
hsa-miR-374a-3p	MIMAT0004688	CUUAUCAGAUUGUAUUGUAAUU	
hsa-miR-376b-3p	MIMAT0002172	AUCAUAGAGGAAAAUCCAUGUU	
hsa-miR-448	MIMAT0001532	UUGCAUAUGUAGGAUGUCCCAU	
hsa-miR-450a-5p	MIMAT0001545	UUUUGCGAUGUGUUCCUAAUAU	
hsa-miR-500a-3p	MIMAT0002871	AUGCACCUGGGCAAGGAUUCUG	
hsa-miR-503-5p	MIMAT0002874	UAGCAGCGGGAACAGUUCUGCAG	
hsa-miR-524-5p	MIMAT0002849	CUACAAAGGGAAGCACUUUCUC	
hsa-miR-542-5p	MIMAT0003340	UCGGGGAUCAUCAUGUCACGAGA	
hsa-miR-548d-3p	MIMAT0003323	CAAAAACCACAGUUUCUUUUGC	
hsa-miR-548e	MIMAT0005874	AAAAACUGAGACUACUUUUGCA	
hsa-miR-548h-5p	MIMAT0005928	AAAAGUAAUCGCGGUUUUUGUC	
hsa-miR-548m	MIMAT0005917	CAAAGGUAUUUGUGGUUUUUG	
hsa-miR-548n	MIMAT0005916	CAAAAGUAAUUGUGGAUUUUGU	
hsa-miR-555	MIMAT0003219	AGGGUAAGCUGAACCUCUGAU	
hsa-miR-556-5p	MIMAT0003220	GAUGAGCUCAUUGUAAUAUGAG	
hsa-miR-561-3p	MIMAT0003225	CAAAGUUUAAGAUCCUUGAAGU	
hsa-miR-569	MIMAT0003234	AGUUAAUGAAUCCUGGAAAGU	
hsa-miR-570-3p	MIMAT0003235	CGAAAACAGCAAUUACCUUUGC	
hsa-miR-599	MIMAT0003267	GUUGUGUCAGUUUAUCAAAC	
hsa-miR-603	MIMAT0003271	CACACACUGCAAUUACUUUUGC	
hsa-miR-607	MIMAT0003275	GUUCAAAUCCAGAUCUAUAAC	
hsa-miR-624-3p	MIMAT0004807	CACAAGGUAUUGGUAUUACCU	
hsa-miR-631	MIMAT0003300	AGACCUGGCCCAGACCUCAGC	
hsa-miR-633	MIMAT0003303	CUAAUAGUAUCUACCACAAUAAA	
hsa-miR-637	MIMAT0003307	ACUGGGGGCUUUCGGGCUCUGCGU	
hsa-miR-653	MIMAT0003328	GUGUUGAAACAAUCUCUACUG	
hsa-miR-658	MIMAT0003336	GGCGGAGGGAAGUAGGUCCGUUGGU	
hsa-miR-876-5p	MIMAT0004924	UGGAUUUCUUUGUGAAUCACCA	
hsa-miR-920	MIMAT0004970	GGGGAGCUGUGGAAGCAGUA	
hsa-miR-936	MIMAT0004979	ACAGUAGAGGGAGGAAUCGCAG	
hsa-miR-938	MIMAT0004981	UGCCCUUAAAGGUGAACCCAGU	
hsa-miR-1179	MIMAT0005824	AAGCAUUCUUUCAUUGGUUGG	
hsa-miR-1200	MIMAT0005863	CUCCUGAGCCAUUCUGAGCCUC	
hsa-miR-1206	MIMAT0005870	UGUUCAUGUAGAUGUUUAAGC	
hsa-miR-1245a	MIMAT0005897	AAGUGAUCUAAAGGCCUACAU	
hsa-miR-1251	MIMAT0005903	ACUCUAGCUGCCAAAGGCGCU	
hsa-miR-1272	MIMAT0005925	GAUGAUGAUGGCAGCAAAUUCUGAAA	
hsa-miR-1284	MIMAT0005941	UCUAUACAGACCCUGGCUUUUC	
hsa-miR-1286	MIMAT0005877	UGCAGGACCAAGAUGAGCCCU	
hsa-miR-1288	MIMAT0005942	UGGACUGCCCUGAUCUGGAGA	
hsa-miR-1301	MIMAT0005797	UUGCAGCUGCCUGGGAGUGACUUC	
hsa-miR-1302	MIMAT0005890	UUGGGACAUACUUAUGCUAAA	
hsa-miR-1304-5p	MIMAT0005892	UUUGAGGCUACAGUGAGAUGUG	

a. Information obtained from miRBase data base (http://www.mirbase.org/).

b. miRNA previously detected in human spermatozoa (24, 29, 44).

Publicació III

Títol: Spermatozoa from patients with seminal alterations exhibit a differential micro-ribonucleic acid profile

Autors: Albert Salas-Huetos, Joan Blanco, Francesca Vidal, Anna Godo, Mark Grossmann, Maria Carme Pons, Silvia F-Fernández, Nicolás Garrido i Ester Anton

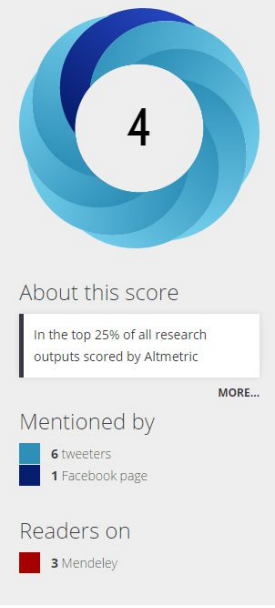
Revista: Fertility and Sterility, **2015**;104(3):591-601

Factor d'impacte: 4.590 (2014), Q1, *Reproductive Biology*

Citat en:

1 article

Altimetric score:



Spermatozoa from patients with seminal alterations exhibit a differential micro-ribonucleic acid profile

Albert Salas-Huetos, M.Sc.,[a] Joan Blanco, Ph.D.,[a] Francesca Vidal, Ph.D.,[a] Anna Godo, M.Sc.,[a] Mark Grossmann, Ph.D.,[b] Maria Carme Pons, M.Sc.,[b] Silvia F-Fernández, M.Sc.,[c] Nicolás Garrido, Ph.D.,[d] and Ester Anton, Ph.D.[a]

[a] Genetics of Male Fertility Group, Unitat de Biologia Cel·lular, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra; [b] Unidad de Reproducción Asistida, Centro Médico Teknon, Barcelona; [c] Institut Marquès, Barcelona; and [d] Laboratorio de Andrología y Banco de Semen, Instituto Valenciano de Infertilidad, Valencia, Spain

Objective: To compare the microRNA (miRNA) expression profile in spermatozoa from three infertile populations vs. a group of fertile men.
Design: Evaluation of the expression level of 736 miRNAs in human spermatozoa using TaqMan quantitative reverse transcription–polymerase chain reaction.
Setting: University research facility.
Patient(s): Semen samples with a single seminal alteration were collected from infertile individuals: asthenozoospermic (n = 10), teratozoospermic (n = 10), and oligozoospermic (n = 10).
Intervention(s): None.
Main Outcome Measure(s): Correlation of the expression level of each miRNA with seminal parameters, age, and chromosome instability; clustering of the individuals according to their miRNA expression profiles and influence of the seminogram, age, chromosome instability, and assisted reproductive technology outcome in the clustering; analysis of the differentially expressed miRNAs (DE-miRNAs) in each infertile population; genome annotation of these DE-miRNAs; and ontological analysis of their predicted targets.
Result(s): The hsa-miR-34b-3p correlated with age, the hsa-miR-629-3p with sperm motility, and the hsa-miR-335-5p, hsa-miR-885-5p, and hsa-miR-152-3p with sperm concentration. The individuals clustered into two groups, and only the seminogram was differentially distributed. We identified 32 DE-miRNAs in the asthenozoospermic group, 19 in the teratozoospermic group, and 18 in the oligozoospermic group. The up-regulated miRNAs presented an enriched localization in introns, affecting relevant genes for spermatogenesis. The predicted targets of the DE-miRNAs contained critical genes associated to infertility, and their ontological analysis revealed significantly associated functions related to the seminal alterations of each group.
Conclusion(s): Spermatozoa from patients with seminal alterations exhibit a differential miRNA profile. This provides new evidence that miRNAs have an essential role in spermatogenesis, contributing to the mechanisms involved in human fertility. (Fertil Steril® 2015;104: 591–601. ©2015 by American Society for Reproductive Medicine.)
Key Words: Infertility, microRNA, spermatozoa, seminal alterations, sperm biomarkers

Discuss: You can discuss this article with its authors and with other ASRM members at http://fertstertforum.com/salashuetosa-altered-mirna-profile-infertility/

Use your smartphone to scan this QR code and connect to the discussion forum for this article now.*

* Download a free QR code scanner by searching for "QR scanner" in your smartphone's app store or app marketplace.

Received March 26, 2015; revised May 22, 2015; accepted June 15, 2015; published online July 2, 2015.
A.S.-H. has nothing to disclose. J.B. has nothing to disclose. F.V. has nothing to disclose. A.G. has nothing to disclose. M.G. has nothing to disclose. M.C.P. has nothing to disclose. S.F.-F. has nothing to disclose. N.G. has nothing to disclose. E.A. has nothing to disclose.
Supported by the projects 2011FE16 (Ayudas Merck Serono 2011; Investigación Clínica en Fertilidad, Spain), FIS/PS09-00330 (Ministerio de Ciencia e Innovación, Gobierno de España, Spain), and 2014/SGR00524 (Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca, Generalitat de Catalunya, Catalonia, Spain). A.S.-H. is the recipient of Personal Investigador en Formació grant 456-01-1/E2010 (Universitat Autònoma de Barcelona).
Current affiliation for M.G.: Barcelona IVF, Barcelona, Spain.
Reprint requests: Ester Anton, Ph.D., Unitat de Biologia Cel·lular, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra (Cerdanyola del Vallès) 08193, Spain (E-mail: ester.anton@uab.cat).

Fertility and Sterility® Vol. 104, No. 3, September 2015 0015-0282/$36.00

http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.06.015

Infertility is a disease defined by the failure to achieve a successful pregnancy after 12 months or more of regular unprotected intercourse (1). Fertility problems are estimated to affect 15% of couples worldwide, and a male factor contributes in approximately 50% of cases (2). Reduced male fertility can result from several reasons (e.g., urogenital abnormalities, infections of male accessory glands,

varicocele, endocrine disturbances, or immunologic factors), but the only abnormality detected in 40%–60% of patients is the presence of abnormal seminal parameters (3). Although in some cases the origin of these abnormalities has been associated with specific gene alterations (4), most of the time the cause remains idiopathic. In fact, the classification of infertile individuals mostly relies on the raw results derived from this conventional seminal analysis. The seminogram categorizes a semen sample only according the sperm physical status in relation to predefined universal thresholds, which in addition have been subjected to changes over time (1, 5). Nevertheless, this classification does not always match with the fertile potential of the individual, and several authors have claimed the need for new, additional male fertility indicators (6, 7). Because the ultimate factors that would determine the fertility potential of spermatozoa would depend on their genetic and epigenetic load, studies focused on defining and understanding infertility at a molecular level would be of great interest.

Spermatogenesis is a complex differentiation process commonly divided into three main phases: self-renewal and proliferation of spermatogonia, meiotic division of spermatocytes, and postmeiotic differentiation of spermatids into spermatozoa. These events are controlled by well-coordinated transcriptional and posttranscriptional regulators. Several studies have analyzed the role of noncoding RNAs as posttranscriptional regulators of spermatogenesis (8–10), including [1] long noncoding RNAs, which mainly participate as transcription repressors and chromatin modification factors, [2] piwi-interacting RNAs, which are known to be responsible for transposon silencing, and [3] microRNAs (miRNAs), which regulate the expression of specific target messenger RNAs (mRNAs) (11).

Focusing on this last group of regulators, miRNAs are small molecules of 22–24 nucleotides that form partially complementary structures to their mRNA targets. MicroRNAs are transcribed into primary miRNA transcripts that are further processed in the nucleus to form the hairpin-shaped miRNA precursor (pre-miRNA). These pre-miRNAs can be exported to the cytoplasm, where they will be processed again, leading to the formation of the mature miRNAs. Their assembly with Argonaute proteins will form the ribonucleoprotein miRNA-induced silencing complex that will be responsible for executing the functional translational repression associated with these molecules (12).

It has been estimated that miRNAs can regulate up to 60% of protein-coding genes (13), and some studies have described their implication in the gene expression regulation of many biological processes, including spermatogenesis (14, 15). Recently some authors have observed a dysregulated expression of several miRNAs related to the particular fertility conditions of the individuals analyzed (16–20). Although all of these articles suggest a relationship between miRNA sperm cargo and male fertility, there is great variability among studies, either due to the types of biological material analyzed (spermatozoa, testicular cells, and seminal plasma) or regarding the origin of the reference values used to identify the differentially expressed miRNA, and also due to the way of interpreting the biological consequences of the results (from simple revision of previous published data to ontological analysis).

Additionally, the sperm miRNA profile has also been described to affect both early embryo development and assisted reproductive technology (ART) outcome (15). McCallie et al. (21) detected differential miRNA profiles in embryos from fertile and infertile individuals. In this study a significant decrease in the expression of six miRNAs in transferable-quality blastocysts was described in couples with male factor infertility. Besides the association between altered miRNA profiles and fertility, other authors have described a differential miRNA profile in young and old individuals, pointing to a potential regulatory role of miRNAs in the aging process (22). Furthermore, a differential expression of specific miRNAs has been associated with chromosome instability in tumoral processes (23–26). Because age (27) and sperm chromosome instability (28) are two of the factors related to male fertility, it would be interesting to consider the influence of these parameters over the sperm miRNA cargo in infertile patients.

In a recent study, we performed a comprehensive characterization of the miRNA expression profile in spermatozoa from 10 fertile individuals (29). Our results provided control reference values for 736 miRNAs that can be useful for determining the contribution of miRNAs as a possible underlying cause of idiopathic male infertility. We demonstrated that human sperm contain a stable population of miRNAs potentially related to embryogenesis and spermatogenesis.

The present study aimed to characterize the miRNA expression profile in spermatozoa from three different human infertile populations with a sole seminal parameter altered: a group of individuals with reduced sperm motility (asthenozoospermia), another group with abnormal sperm morphology (teratozoozpermia), and a third group with low sperm count (oligozoospermia). The analysis has been addressed to [1] evaluate a possible correlation between the expression level of every evaluated miRNA and the seminal parameters, age, and chromosome instability of the individuals analyzed; [2] cluster the individuals according to their miRNA expression profiles and determine the influence of the seminogram, age, chromosome instability, and ART outcome in the classification obtained; [3] identify differentially expressed miRNAs (DE-miRNAs) in each infertile population when compared with a previously described fertile control population (29); [4] evaluate the characteristics of the hosting regions encoding the DE-miRNAs; and [5] define the biological functions significantly associated with the predicted targets of these DE-miRNAs.

MATERIALS AND METHODS

Study Population and Sample Collection

Inclusion criteria for patient recruitment were directed toward the selection of semen samples from infertile individuals of unknown etiology showing the alteration of a single seminal parameter (i.e., reduced sperm motility, or abnormal sperm morphology, or lower sperm count) (World Health Organization 2010) (1, 30). Individuals presenting more than one alteration were discarded. According to

these criteria, 30 semen samples were collected by masturbation after 3 days of sexual abstinence and were classified into 3 groups (Supplemental Table 1, available online): pure asthenozoospermic (A) (n = 10; S11–S20), pure teratozoospermic (T) (n = 10; S21–S30), and pure oligozoospermic (O) (n = 10; S31–S40).

Additional information was compiled, including [1] age of the individuals; [2] results from chromosome instability inferred from the aneuploidy/diploidy sperm screening through fluorescence in situ hybridization for chromosomes X, Y, 13, 18, and 21; and [3] ART outcome from IVF/intracytoplasmic sperm injection cycles of these couples (Supplemental Table 1), which comprised the following data: fertilization rate (zygotes/mature oocytes), rate of discarded embryos, pregnancy rate per transfer, and miscarriage rate per clinical pregnancy (Supplemental Table 1).

Written, informed consent was obtained from all patients. The study was approved by the ethics committees of the collaborative ART centers and the Universitat Autònoma de Barcelona.

Sperm RNA Isolation, Quantification, and Quality Controls

To eliminate any possible somatic cells present in the ejaculate, semen samples were processed according to the somatic cell lysis method (31). Total sperm RNA was isolated using Trizol (Life Technologies, Carlsbad, CA) according to the protocol recommended by the manufacturer, with minor modifications (29). Once isolated, RNA was treated with 1 μL (2 U/μL) per 10 μg RNA of rDNaseI (Life Technologies, Chesire, United Kingdom). Samples were stored at −80°C until further analysis.

Ribonucleic acid concentration was determined using the Nanodrop-2000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE). To check the presence of small RNAs as well as confirming the lack of ribosomal RNA (spermatozoa are translationally inert), we ran the nanoeletrophoretic chips Small-RNA and Nano-RNA, respectively (Agilent Technologies, Wilmington, DE), in the Agilent-2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). The absence of any potential contaminating trace of DNA was verified by performing a reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies) followed by a conventional polymerase chain reaction (PCR) with exon–exon primers for the Protamine 1 gene (*PRM1*) and for the Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene (*GAPDH*) (Supplemental Table 2). An RT-PCR followed by a PCR with exon–exon primers for the surface receptor *CD45* gene (absent in spermatozoa) was also performed to verify the absence of leukocyte RNA (Supplemental Table 2).

Evaluation of the Sperm miRNA Profiles

Ribonucleic acid samples were processed for miRNA analysis, as described by Salas-Huetos et al. (29). Briefly, a total of 50 ng of RNA were reverse-transcribed using the TaqMan MicroRNA Reverse Transcription kit (Life Technologies, Foster City, CA) supplemented with RNase inhibitor and the Megaplex RT Primers, Human Pools A v.2.1 and B v.3.0 (Life Technologies). Subsequently, complementary DNA was preamplified using TaqMan PreAmp Master Mix (Life Technologies) and Megaplex PreAmp Primers, Human Pools A v.2.1 and B v.3.0 (Life Technologies), diluted with 0.1× TE (Life Technologies) and stored at −20°C until further analysis. A quantitative PCR (qPCR) was performed by mixing PreAmp product, TaqMan Universal PCR Master Mix, no AmpErase UNG (2×) (Life Technologies), and nuclease-free water. The mix was use to perform qPCR assays through the TaqMan Array Human MicroRNA A and B Cards Set v.3.0 (Life Technologies). Overall, this protocol enabled the accurate quantification of a total of 736 human miRNAs.

Data Analysis

Data from qPCR were processed by SDS v.2.3 and RQ Manager v.1.2 software (Life Technologies). Results were expressed as threshold cycle (Ct) values and classified as Determined ($15 \geq Ct < 35$), Undetermined ($Ct \geq 35$), and Unreliable. The miRNAs expressed in all of the samples studied were called ubiquitous miRNAs. The Ct values were transformed to the normalized threshold cycle (normCt) values according to the mean-centering restricted normalizing method (32).

Control population. Data obtained were compared with a control population composed of 10 normozoospermic (N) (S01–S10) men described in detail by Salas-Huetos et al. (29). This group of individuals was characterized by presenting a normal karyotype, proven fertility, normal sperm concentration, normal sperm motility, and normal sperm morphology.

Statistical analyses. Statistical analyses were performed using the freely available R statistical computing environment v.2.14.2 (www.r-project.org) (33) and the additional package for high-throughput analysis of qPCR data v.1.13.1 (HTqPCR package at www.bioconductor.org) (34). A P value of $< .05$ after post hoc Bonferroni correction was considered statistically significant in all tests except for the Wilcoxon analyses. In this particular case, P values of $< .01$ were considered significant after Benjamini-Hochberg false discovery rate correction.

To evaluate the possible correlation between the normCt value of each particular miRNA analyzed of all individuals assessed (including the control population) and the physiologic factors [1] seminal parameters (i.e., sperm concentration, sperm motility, and sperm morphology), [2] age, and [3] chromosome instability, we used the nonparametric Spearman test. Outliers were identified using Cook's distance method.

MicroRNA expression profiles from all individuals were subjected to an unsupervised hierarchical cluster analysis using Euclidean distance and Ward's method. To discard any influence of the $Ct \geq 35$ values (despite being different, $Ct \geq 35$ values do not represent any biological variation but just reflect lack of expression), we adjusted these values to [maximum normCt detected in all individuals] + 1. The optimal number of clusters that would define the dendrogram was calculated through the cubic clustering criterion method with SAS v.9.0 statistics (SAS Institute, Cary, NC). To identify

the factors that would influence the clustering, a bivariate analysis using the χ^2 test was applied for seminogram (four categories: N, A, T, and O), age (three categories: R1, range 19–29 years old; R2, range 30–39 years old; R3, range 40–50 years old), and chromosomal instability results (two categories: normal or altered), whereas the influence of ART outcome date (including fertilization rate, percentage of discarded embryos, pregnancy rate, and miscarriage rate) was evaluated using the Mann-Whitney test.

To identify the DE-miRNAs in each of the three infertile populations analyzed, the mean normCt value of every single miRNA observed in each group of infertile individuals was compared with the mean normCt value of the control population (29) using the nonparametric paired Wilcoxon rank sum test. Of each DE-miRNA, several characteristics were considered, including their localization in the 3′ untranslated region (UTR), or in intronic, exonic, or intergenic regions (miRNAMap 2.0 database at http://mirnamap.mbc.nctu.edu.tw/index.php [35]), their sense/antisense transcription (Genome Browser database at http://genome.ucsc.edu/; and miRcode microRNA sites external track at www.mircode.org/ [36]), and their localization in a methylated region that has been preferentially related to protaminic embedded chromatin, or in a nonmethylated region that is mostly associated to histonic embedded chromatin (37) (Genome Browser database at http://genome.ucsc.edu/; and DNA Methylation external track from Smith Lab at http://smithlabresearch.org/software/methbase/ [38]). To determine a possible enrichment of some of these parameters among the DE-miRNA, this information was contrasted with data from the background of 736 miRNAs analyzed using the χ^2 test.

Target prediction and functional annotation. DIANA-microT CDS v.5.0 software (http://diana.imis.athena-innovation.gr) (39, 40) was used to identify the predicted target genes for the miRNAs that were differentially expressed in each group of infertile individuals. For the inclusion of the potential target genes obtained in further analysis, we used an miRNA target gene score (miTG) $\geq$0.8. This miTG provides a sensitivity of >20% and a precision of >57% (information provided by the DIANA administration team), thus maximizing the reliability of the target genes identified. The enrichment of biological processes among these genes was evaluated by DAVID Bioinformatics Resources v.6.7 (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery at http://david.abcc.ncifcrf.gov/) (41, 42) considering the total human genome as a background and P values <.05 after Bonferroni correction.

RESULTS

The RNA isolation data from each individual are compiled in Supplemental Table 3. As an average ± SD, the RNA purity and the amount of RNA/sperm obtained were 1.70 ± 0.120 and 101 ± 35 fg, respectively.

PCR quality controls confirmed the absence of DNA contamination by detecting only complementary DNA transcripts of *PRM1* and *GAPDH*. The PCR for *CD45* discarded the presence of leukocytes in all samples. The Small-RNA chips and Nano-RNA chips confirmed the presence of transcripts comprising 4–150 nucleotides and the absence of ribosomal RNA, respectively.

From the 736 miRNAs screened, 210 were ubiquitous in all A individuals, 179 in T, and 131 in O individuals. Most of these miRNAs were constantly present in the control population (71%, 65%, and 54%, respectively). Overall, a total set of 98 miRNAs were detected in all samples (including the 30 infertile individuals and the 10 control cases). In contrast, 69 miRNAs were absent in A, 70 in T, and 81 in O individuals. Of these miRNAs, 51%, 30%, and 46% coincided with the miRNAs constantly absent in the control population.

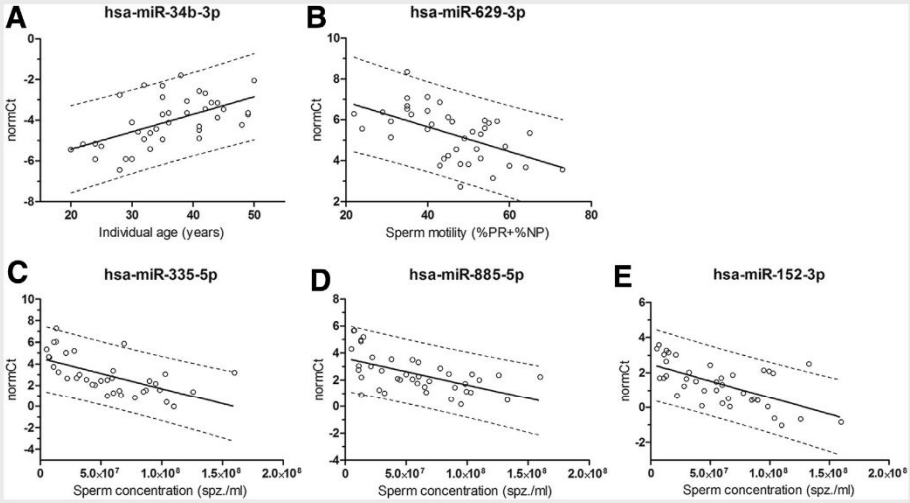
Concerning the relationship of the patient's characteristics with the normCt expression values of every specific miRNA, hsa-miR-34b-3p seemed to be positively correlated with age (P=9.74×10^{-5}, ρ=0.58), and hsa-miR-629-3p negatively correlated with sperm motility (P=8.59×10^{-5}, ρ=−0.59). Moreover, three other miRNAs were negatively correlated with sperm concentration values: hsa-miR-335-5p (P=6.81×10^{-6}, ρ=−0.67); hsa-miR-885-5p (P=7.07x10^{-5}, ρ=−0.59); and hsa-miR-152-3p (P=7.65×10^{-5}, ρ=−0.59) (Fig. 1). All individuals were included in the analysis because no outliers were found (Cook's D_i<1).

Unsupervised clustering allowed the classification of the individuals in a dendrogram that, according to the cubic clustering criterion method, presented two clearly differentiated groups (Fig. 2). Cluster 1 included all ten N individuals, eight A, and 5 O, whereas cluster 2 included all ten T individuals, two A, and five O. The bivariate analysis indicated a significant association between this classification and the characteristics of the seminogram (P<.001), whereas the other parameters analyzed (age, chromosome instability, fertilization rate, percentage of discarded embryos, pregnancy rate, and miscarriage rate) did not present a differential distribution between the two clusters.

We identified a total of 32 DE-miRNAs in the A group (26 up- and 6 down-regulated), 19 DE-miRNAs in the T group (11 up- and 8 down-regulated), and 18 DE-miRNAs in the O group (3 up-regulated and 15 down-regulated) (Table 1). Of these DE-miRNAs, 4.84% were positioned in 3′ UTR, 59.68% had an intronic localization, 1.61% had an exonic localization, and 35.48% were localized in intergenic regions (Table 1). We detected a significant enrichment of up-regulated miRNAs located in intronic regions (P=.0121), together with a significant reduction of intergenic locations (P=.0179) (Table 1). Among the DE-miRNAs, neither the frequencies of sense (51.35%) and antisense (48.65%) transcription nor their localization in histone-related (29.73%) and protamine-related regions (70.27%) showed significant differences when compared with the background (Table 1).

The DIANA-microT CDS analysis allowed the identification of 5,822 target genes for the 32 DE-miRNAs observed in A individuals, 5,511 genes for the 19 DE-miRNAs detected in the T group, and 3,155 genes for the 18 DE-miRNAs found in the O group. The analysis of these three sets of genes using DAVID allowed determining the presence of significantly enriched biological processes related to male fertility (Supplemental Table 4). The A population included chromatin modification, chordate embryonic development, embryonic development ending in birth or egg hatching, and cell motion

FIGURE 1

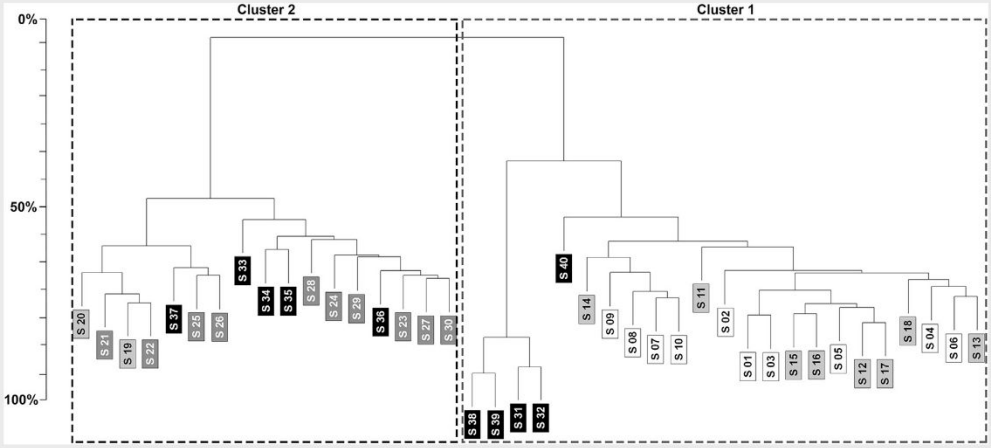


Significant correlations between the normalized Ct value of five miRNAs and the parameters of age (**A**), sperm motility (**B**), and sperm concentration (**C–E**). High normCt values indicate low miRNA expression levels. Low normCt values indicate high miRNA expression levels.

Salas-Huetos. Altered miRNA profiles in infertile men. Fertil Steril 2015.

(Fig. 3A). In the T individuals, the targets for the DE-miRNAs were significantly associated with cell cycle, negative regulation of cell differentiation, cell morphogenesis, cell projection morphogenesis, cellular component morphogenesis, cell morphogenesis involved in differentiation, cell part morphogenesis, and embryonic morphogenesis (Fig. 3B). Finally, in the O patients, the significantly enriched biological functions for the DE-miRNAs comprised chromatin modification, cell projection morphogenesis, cell part morphogenesis, and cell morphogenesis (Fig. 3C).

FIGURE 2



Hierarchical clustering based on the miRNA normCt values of the 30 infertile individuals analyzed in this study, and the 10 fertile individuals analyzed by Salas-Huetos et al. (26). Each individual is labeled in a specific color code according to the seminogram: *white* (normozoospermia), *grey* (asthenozoospermia), *dark grey* (teratozoospermia), and *black* (oligozoospermia).

Salas-Huetos. Altered miRNA profiles in infertile men. Fertil Steril 2015.

TABLE 1

DE-miRNAs in asthenozoospermic, teratozoospermic, and oligozoospermic populations.

DE-miRNAs	Mean normCt in N	Mean normCt in infertile	Δ value[a]	*P* value, FDR adjusted	Pre-miRNA gene location[b]	Sense/antisense transcription[c]	Methylation (protamine-/histone-related region)[d]
Asthenozoospermic							
hsa-miR-342-3p	−2.50	0.66	−3.16	.0068	Intronic	Sense	Yes (protamine)
hsa-miR-520h	2.61	5.46	−2.84	.0065	Intergenic	Sense	No (histone)
hsa-miR-629-3p	4.61	6.56	−1.94	.0070	Intronic	Antisense	Yes (protamine)
hsa-miR-942	2.30	4.05	−1.76	.0083	ND	Sense	Yes (protamine)
hsa-miR-184	2.87	4.62	−1.74	.0069	Intergenic	Sense	Yes (protamine)
hsa-miR-34b-3p	−5.40	−3.95	−1.45	.0086	Intergenic	Sense	Yes (protamine)
hsa-miR-615-5p	9.99	4.14	5.85	.0076	Intronic	Sense	Yes (protamine)
hsa-miR-548c-5p	10.18	4.46	5.73	.0089	Intronic	Sense	Yes (protamine)
hsa-miR-143-3p	10.24	5.06	5.18	.0091	Intergenic	Sense	Yes (protamine)
hsa-miR-548d-5p	8.18	3.01	5.17	.0081	Intronic	Antisense	No (histone)
hsa-miR-616-3p	8.37	4.06	4.31	.0084	Intronic	Antisense	No (histone)
hsa-miR-548b-5p	7.03	2.77	4.26	.0088	Intronic	Antisense	Yes (protamine)
hsa-miR-520d-3p	9.39	5.32	4.07	.0078	Intergenic	Sense	Yes (protamine)
hsa-miR-591	7.54	3.83	3.71	.0074	Intronic	Antisense	No (histone)
hsa-miR-605	6.35	2.73	3.61	.0074	Intronic	Sense	No (histone)
hsa-miR-27a-5p	9.04	5.58	3.47	.0070	Intergenic	Antisense	Yes (protamine)
hsa-miR-1303	3.49	0.15	3.34	.0064	ND	Sense	Yes (protamine)
hsa-miR-770-5p	7.16	3.90	3.26	.0078	Intronic	Sense	Yes (protamine)
hsa-miR-370	3.36	0.23	3.13	.0088	Intronic	Sense	Yes (protamine)
hsa-miR-604	8.75	5.65	3.10	.0078	Intronic	Antisense	Yes (protamine)
hsa-miR-939-5p	−0.23	−3.30	3.07	.0078	ND	Antisense	Yes (protamine)
hsa-miR-432-3p	4.90	2.17	2.73	.0077	Intergenic	Sense	Yes (protamine)
hsa-miR-1275	−1.93	−4.56	2.63	.0058	ND	Antisense	No (histone)
hsa-miR-19b-1-5p	9.14	6.57	2.57	.0076	Intronic/UTR	Sense	No (histone)
hsa-miR-1254	4.11	1.87	2.24	.0072	ND	Sense	No (histone)
hsa-miR-212-3p	3.91	1.69	2.22	.0081	Intergenic	Antisense	Yes (protamine)
hsa-miR-636	4.50	2.37	2.13	.0080	3′ UTR/intronic/exonic	Antisense	Yes (protamine)
hsa-miR-572	6.20	4.24	1.96	.0071	Intergenic	Sense	Yes (protamine)
hsa-miR-1255b-5p	3.31	1.47	1.84	.0071	ND	Sense	Yes (protamine)
hsa-miR-324-3p	3.60	2.10	1.50	.0087	Intronic	Antisense	Yes (protamine)
hsa-miR-638	3.81	2.45	1.36	.0064	Intronic	Sense	Yes (protamine)
hsa-miR-491-5p	3.38	2.11	1.27	.0093	Intronic	Sense	No (histone)
Teratozoospermic							
hsa-miR-151-5p	1.40	8.90	−7.50	.0078	Intronic	Antisense	Yes (protamine)
hsa-miR-935	1.63	7.26	−5.63	.0046	ND	Sense	Yes (protamine)
hsa-miR-125a-3p	5.40	10.96	−5.56	.0078	Intergenic	Sense	Yes (protamine)
hsa-miR-130b-5p	3.31	7.52	−4.21	.0087	Intergenic	Sense	Yes (protamine)
hsa-miR-191-3p	5.59	9.78	−4.19	.0078	Intronic	Antisense	Yes (protamine)
hsa-miR-132-5p	6.48	10.63	−4.14	.0050	Intergenic	Antisense	Yes (protamine)
hsa-miR-320b	2.99	6.32	−3.33	.0045	ND	Sense	No (histone)
hsa-miR-195-5p	1.39	4.18	−2.79	.0049	Intronic	Antisense	Yes (protamine)
hsa-miR-101-5p	10.52	−16.08	26.60	.0045	Intergenic	Antisense	No (histone)
hsa-miR-1305	8.98	−15.65	24.62	.0039	ND	Sense	No (histone)
hsa-miR-32-3p	10.96	−8.93	19.89	.0052	Intronic	Antisense	Yes (protamine)
hsa-miR-16-1-3p	10.42	4.18	6.25	.0098	Intronic	Antisense	Yes (protamine)
hsa-miR-198	7.57	1.63	5.95	.0041	3′ UTR	Antisense	No (histone)
hsa-miR-509-5p	6.66	1.44	5.22	.0078	Intergenic	Antisense	Yes (protamine)
hsa-miR-616-3p	8.37	3.28	5.09	.0037	Intronic	Antisense	No (histone)
hsa-miR-34a-5p	5.90	1.20	4.70	.0097	Intergenic	Antisense	Yes (protamine)
hsa-miR-770-5p	7.16	3.40	3.76	.0062	Intronic	Sense	Yes (protamine)
hsa-miR-605	6.34	2.78	3.57	.0097	Intronic	Sense	No (histone)
hsa-miR-380-5p	8.91	5.46	3.44	.0081	Intergenic	Sense	Yes (protamine)
Oligozoospermic							
hsa-miR-935	1.63	9.65	−8.02	.0078	ND	Sense	Yes (protamine)
hsa-miR-30d-3p	1.00	7.91	−6.91	.0049	Intergenic	Antisense	Yes (protamine)
hsa-miR-125a-3p	5.40	10.58	−5.19	.0053	Intergenic	Sense	Yes (protamine)
hsa-miR-9-3p	5.80	10.86	−5.06	.0062	Intronic/intergenic	Sense/antisense	Yes (protamine)
hsa-miR-151-5p	1.40	6.06	−4.66	.0052	Intronic	Antisense	Yes (protamine)
hsa-miR-195-5p	1.39	5.99	−4.60	.0064	Intronic	Antisense	Yes (protamine)
hsa-miR-132-5p	6.48	10.66	−4.17	.0045	Intergenic	Antisense	Yes (protamine)
hsa-miR-335-5p	2.29	6.28	−3.99	.0056	Intronic	Sense	No (histone)
hsa-miR-34b-3p	−5.40	−1.74	−3.66	.0050	Intergenic	Sense	Yes (protamine)
hsa-miR-15b-5p	−0.59	2.76	−3.35	.0078	Intronic	Sense	Yes (protamine)
hsa-miR-320b	2.99	5.90	−2.91	.0065	ND	Sense/antisense	No (histone)
hsa-miR-139-5p	1.69	4.54	−2.85	.0078	Intronic	Antisense	Yes (protamine)

Salas-Huetos. Altered miRNA profiles in infertile men. Fertil Steril 2015.

TABLE 1

Continued.

DE-miRNAs	Mean normCt in N	Mean normCt in infertile	Δ value[a]	*P* value, FDR adjusted	Pre-miRNA gene location[b]	Sense/antisense transcription[c]	Methylation (protamine-/histone-related region)[d]
hsa-miR-517a-3p	2.31	4.85	−2.54	.0076	Intergenic	Sense	Yes (protamine)
hsa-miR-28-5p	0.98	3.06	−2.08	.0078	Intronic	Sense	No (histone)
hsa-miR-1180	3.70	5.41	−1.71	.0061	ND	Antisense	Yes (protamine)
hsa-miR-483-5p	3.58	0.91	2.68	.0098	Intronic	Antisense	Yes (protamine)
hsa-miR-491-5p	3.38	1.45	1.93	.0041	Intronic	Sense	No (histone)
hsa-miR-324-3p	3.60	2.20	1.40	.0057	Intronic	Antisense	Yes (protamine)

Note: The information includes their genetic location as well as their sense/antisense transcription and their localization in a methylated region (protamine-related) or nonmethylated region (histone-related). FDR = false discovery rate; N = normozoospermic; ND = no data.

[a] Δ value = difference between control and infertile expression values (positive values indicate up-regulation in the corresponding infertile group, whereas negative values indicate down-regulation).

[b] Information obtained from the miRNAMap 2.0 database.

[c] Information obtained from the Genome Browser database and miRcode microRNA sites external track.

[d] Information obtained from the Genome Browser database and DNA Methylation external track from Smith Lab.

Salas-Huetos. Altered miRNA profiles in infertile men. Fertil Steril 2015.

DISCUSSION

In this work, the expression profile of 736 miRNAs was evaluated in three infertile populations with seminal alterations and compared with control donors (29). Regarding the resemblance of the miRNA expression profiles, two main clusters were formed (Fig. 2). In this binary classification, a significant influence of the parameters of age, chromosome instability, and ART outcome (including fertilization rate, percentage of discarded embryos, pregnancy rate, and miscarriage rate) was subsequently discarded.

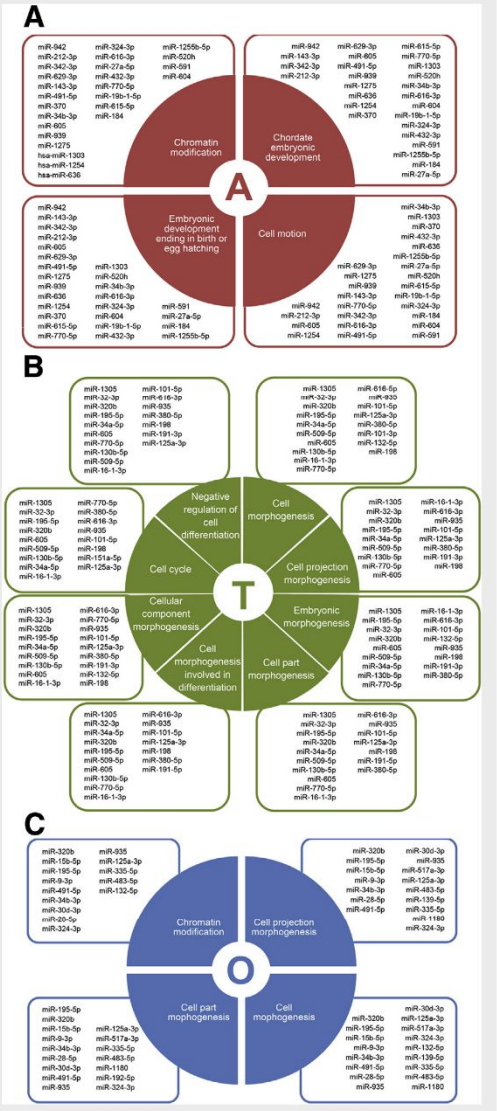
Starting with age, other authors have described an altered expression of circulating miRNAs associated with age-related diseases including cancer and cardiovascular alterations (43). Additionally, some specific circulating miRNAs have been proposed as biological markers of aging (i.e., hsa-mi151a-5p, hsa-miR-181a-5p, and hsa-miR-1248 [22]). In this context, although we failed to ascertain a general age effect on the clustering obtained, thus discarding an influence of aging on the sperm miRNA profile, the hsa-miR-34b-3p was significantly correlated with the age of the individuals. This is the first time that the expression level of a specific miRNA in sperm has been found to be directly related to aging and, according to this correlation, the older the individuals analyzed are, the lower the expression of this miRNA in their sperm is. Although no previous studies have related the involvement of this miRNA in age-related processes, the validated targets of this miRNA through strong evidence methods (miRTarBase: http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/index.php [44]) include *CCND1*, *CDK4*, *CDK6*, *MYC*, and *NOTCH1*. Interestingly, the functions associated with these genes include cell cycle progression and apoptosis (www.genecards.org/), processes that are commonly known to be related to aging (45).

Concerning the influence of sperm chromosome instability, recent studies have detected a differential expression of specific miRNAs associated with chromosome instability in different types of cancer, including the gain/loss of chromosome fractions, the formation of structural rearrangements, and the occurrence of aneuploidies (23–25). Such phenomena can occur through different mechanisms, including an induction of sister chromatid fusions (23), a low DNA damage response (24), or a promotion of mitotic checkpoint weakness (25). Our results did not show any association between an increase of numerical abnormalities in sperm for chromosomes 13, 18, 21, X and Y, and the global miRNA profile. Additionally, we did not find any relationship between the normCt value of each particular miRNAs and the rate of numerical chromosome anomalies for this five chromosome panel. In this sense, it must be considered that, although the five chromosomes included in the study are the most commonly analyzed in clinical settings and are considered the best indicators to evaluate sperm numerical chromosome abnormalities (28), we cannot discard a possible relationship between the sperm miRNA profile and the occurrence of chromosome anomalies other than numerical.

With respect to the ART outcome, some evidence demonstrates a relevant contribution of the sperm miRNA cargo to events beyond fertilization. Among them is the fact that the sperm miRNAs from fertile individuals enrich biological processes related to cell differentiation, development, morphogenesis, and embryogenesis (29). Other evidence includes the exclusive paternal origin of some embryonic miRNAs in mouse (i.e., mmu-miR-34b-5p, mmu-miR-34c, mmu-miR-99a-5p, mmu-miR-214-5p, mmu-miR-449a/b/c) (46), as well as the essential role of mmu-miR-34c during first embryo cleavage (46), although this result is controversial (47). Considering these facts, it would make sense to contemplate the possibility that alterations in the sperm miRNA cargo could have a negative impact on embryo development or pregnancy achievement. Nevertheless, no evidence of a relationship between the ART outcome and the clustering of individuals was observed, indicating a lack of correspondence between the miRNA expression profile and such postfertilization aspects. In any case, we have to keep in mind that the size of the number of data is still limited to extract definite conclusive results.

The only parameter that seemed to be unevenly distributed in the two clusters obtained, and which would consequently explain the differential distribution obtained, was

FIGURE 3



Differentially expressed miRNAs that target genes involved in the significantly enriched biological processes related to male fertility in (**A**) asthenozoospermic individuals; (**B**) teratozoospermic individuals; and (**C**) oligozoospermic individuals.

Salas-Huetos. Altered miRNA profiles in infertile men. Fertil Steril 2015.

the seminogram (Fig. 2). Several facts can be highlighted from the clustering obtained: T individuals have a homogeneous miRNA profile because they are all grouped in the same cluster. This profile is clearly different from the one displayed by N individuals, which are all grouped into the opposite cluster, also indicating a very homogenous profile. This great homogeneity of N individuals agrees with the high correlation between samples detected in our previously published study based on this fertile population (29). On the other hand, most A individuals also display a homogenous profile, which mostly resembles the profile described by the N population (80% of A individuals are classified together with N). Finally, the O group seems to display the most heterogeneous miRNA expression profile because they are split between both clusters (50% are classified in one cluster and 50% in the other).

In the context of identifying particular miRNAs associated with specific seminal features, the expression levels of the hsa-miR-629-3p seemed to be highly correlated with sperm motility. The presence of hsa-miR-629-3p in human spermatozoa had been previously described by Abu-Halima et al. (18), but this is the first time that a higher expression of this miRNA (lower normCT values; Fig. 1) has been related to a higher motility of spermatozoa. Although no functions or strongly validated targets of this miRNA have been described so far, our results suggest that the expression level of this miRNA could be considered a biomarker of the asthenozoospermic condition.

Moreover, three other miRNAs (i.e., hsa-miR-335-5p, hsa-miR-885-5p, and hsa-miR-152-3p) showed normCt values negatively correlated with sperm concentration, indicating an association between a lower expression level of these miRNAs and a lower production of spermatozoa in the ejaculate (Fig. 1). Regarding hsa-miR-335-5p, several authors have already detected it in sperm from fertile individuals (18, 29, 48). Furthermore, this miRNA has been observed to be down-regulated in oligoasthenozoospermic men (18), which agrees with the correlation observed in the present study. Additionally, strongly validated targets of this miRNA (including *BCL2L2*, *BIRC5*, *MAPK1*, *MERTK*, *PTPRN2*, *RASA1*, and *SOX4*) have been found to be directly related to the processes of *Cell death*, *Cell survival*, and *Cell proliferation*. Therefore, their differentially transcriptional regulation could alter these processes and explain the relationship between this miRNA and the number of sperm produced (49). On the other hand, hsa-miR-885-5p and hsa-miR-152-3p have also been previously detected in sperm from fertile individuals (29), although no evidence supporting their implication in sperm production has been published to date.

From the statistical comparison of the expression profiles obtained, 57 miRNAs were found to be differentially expressed in the three infertile populations: 32 DE-miRNAs in the A group, 19 DE-miRNAs in the T group, and 18 DE-miRNAs in the O group (Table 1). Two of the up-expressed miRNAs detected in the A population (hsa-miR-27a-5p and hsa-miR-34b-3p) were coincident with the results found by the only previous similar study published by Abu-Halima et al. (18) in asthenozoospermic individuals. These authors also detected six down-regulated miRNAs (hsa-miR-132-5p, hsa-miR-15b-5p, hsa-miR-335-5p, hsa-miR-34b-3p, hsa-miR-520h, and hsa-miR-9-3p) that are down-regulated in our O or A populations. However, other DE-miRNAs were not coincident between both studies, indicating either the existence of interindividual differences within populations or

the different sensibility and specificity of the techniques used (arrays vs. quantitative RT-PCR) (50, 51).

When we assessed the characteristics of hosting regions encoding the DE-miRNAs, we only detected a significant enrichment of intronic regions in the up-regulated miRNAs. Recent studies of miRNA gene locations showed that most mammalian miRNA (approximately 70%) are located in defined transcription units, and of these, 75% correspond to intronic regions (52). These miRNAs are not transcribed from their own promoters but are instead transcribed from the promoters of genes in which they are included (53, 54). Bearing in mind these considerations, it would be plausible that the dysregulated expression of intronic miRNAs could be driven by a deregulation of the hosting gene. The analysis of the transcription units for the DE-miRNAs located in intronic regions was shown to affect 29 genes, 9 of which (i.e., *DALRD3*, *HOXC4*, *HOXC5*, *IFT80*, *IGF2*, *LPP*, *MEST*, *PTK2*, and *SMC4*) have been observed to have a direct relationship with spermatogenesis (Supplemental Table 5) (55–62), thus supporting a link between the differential miRNA expression levels detected and the fertility alterations present in these individuals. Analysis of the expression level of these mRNAs in germ cells would help to elucidate the role of these products in human fertility, although the difficulty in obtaining human testis tissue limits this kind of analysis.

Another alternative way to find a link between the DE-miRNAs and the characteristics of A, T, and O individuals comes from the ontological analyses of the potential target genes. The particular DE-miRNAs in each infertile group have shown a significant association with biological functions related to their specific seminal characteristics. These associations were especially relevant in the A group, in which the process *Cell motion* seemed to be significantly enriched, and in the T group, in which *cell morphogenesis*, *cell projection morphogenesis*, and *cellular component morphogenesis* were among the significantly enriched biological processes. In the O group, the results of the ontological analysis did not show an enrichment of processes directly linked to oligozoospermia. Nevertheless, the processes that were significantly enriched in this group included chromatin modification, cell projection morphogenesis, cell part morphogenesis, and cell morphogenesis, which can also ultimately be associated to a low sperm production.

To further identify genes specifically associated to the infertility present in these individuals, we applied a filtering strategy in the list of potential targets of the DE-miRNAs to select those with an annotated function associated to spermatogenesis or meiosis. This allowed us to define a set of 74 genes in the A group, 75 genes in the T group, and 26 genes in the O group. Among them, 11 genes (i.e., *BCL2L2*, *CCND2*, *CHEK1*, *DAZ1*, *DMWD*, *ESPL1*, *FNDC3A*, *SPAG16*, *PSME4*, *RAD51 C*, and *STAG2*) can be associated with the occurrence of seminal alterations (Supplemental Table 6) (63–73). Therefore it is very plausible that the dysregulation of these genes caused by the DE-miRNAs could be, at least in part, responsible for the altered fertility conditions present in these individuals. According to these premises, this set of genes could enlarge the list of candidates for consideration as potential biomarkers of human male infertility.

Further studies in similar populations of infertile individuals are needed to confirm some of the scenarios presented in this article. In this context, it would also be of great interest to screen the genetic expression in germ cells of the same individuals (spermatogonia, spermatocytes) because it would contribute to the elucidation of which kind of gene expression regulation is exerted by these miRNAs and at what level. On the other hand, the analysis in oocytes and early embryonic stages would also contribute to clarification of their possible role during further embryo development. In fact, among the biological functions that are significantly associated to the potential target genes of the DE-miRNAs in the A and T populations, we found an enrichment of processes related to embryogenesis (Supplemental Table 4), which would indicate a possible participation of these miRNAs in this process upon their transmission to the zygote.

Acknowledgments: The authors thank the staff of the Unitat de Genòmica (Edifici Clúster PCB, Centres Científics i Tecnològics, Universitat de Barcelona, Spain), the staff of the Servei de Genòmica Bioinformàtica (Institut de Biotecnologia i Biomedicina, Parc de Recerca UAB, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain), and the staff of the Servei d'Estadística Aplicada (Edifici D, Serveis Informàtics UAB, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain) for their technical assistance.

SUPPLEMENTAL DATA

Supplementary data related to this article can be found online at http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.06.015.

REFERENCES

1. World Health Organization. Laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. New York: Cambridge University Press; 2010.
2. Sabanegh ES. Male infertility—problems and solutions. New York: Springer; 2011.
3. Dohle GR, Colpi GM, Hargreave TB, Papp GK, Jungwirth A, Weidner W. EAU guidelines on male infertility. Eur Urol 2005;48:703–11.
4. Matzuk MM, Lamb DJ. The biology of infertility: research advances and clinical challenges. Nat Med 2008;14:1197–213.
5. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 4th ed. New York: Cambridge University Press; 1999.
6. Lefièvre L, Bedu-Addo K, Conner SJ, Machado-Oliveira GS, Chen Y, Kirkman-Brown JC, et al. Counting sperm does not add up any more: time for a new equation? Reproduction 2007;133:675–84.
7. Lewis SE. Is sperm evaluation useful in predicting human fertility? Reproduction 2007;134:31–40.
8. Yu Z, Raabe T, Hecht NB. MicroRNA Mirn122a reduces expression of the posttranscriptionally regulated germ cell transition protein 2 (Tnp2) messenger RNA (mRNA) by mRNA cleavage. Biol Reprod 2005;73:427–33.
9. Bouhallier F, Allioli N, Lavial F, Chalmel F, Perrard MH, Durand P, et al. Role of miR-34c microRNA in the late steps of spermatogenesis. RNA 2010;16:720–31.
10. Ni MJ, Hu ZH, Liu Q, Liu MF, Lu M, Zhang JS, et al. Identification and characterization of a novel non-coding RNA involved in sperm maturation. PLoS One 2011;6:e26053.
11. Mukherjee A, Koli S, Reddy KV. Regulatory non-coding transcripts in spermatogenesis: shedding light on "dark matter". Andrology 2014;2:360–9.

12. Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. Nat Rev Mol Cell Biol 2014;15:509–24.
13. Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. Genome Res 2009;19:92–105.
14. Yadav RP, Kotaja N. Small RNAs in spermatogenesis. Mol Cell Endocrinol 2013;382:498–508.
15. Schagdarsurengin U, Paradowska A, Steger K. Analysing the sperm epigenome: roles in early embryogenesis and assisted reproduction. Nat Rev Urol 2012;9:609–19.
16. Lian J, Zhang X, Tian H, Liang N, Wang Y, Liang C, et al. Altered microRNA expression in patients with non-obstructive azoospermia. Reprod Biol Endocrinol 2009;7:13.
17. Wu W, Hu Z, Qin Y, Dong J, Dai J, Lu C, et al. Seminal plasma microRNAs: potential biomarkers for spermatogenesis status. Mol Hum Reprod 2012; 18:489–97.
18. Abu-Halima M, Hammadeh M, Schmitt J, Leidinger P, Keller A, Meese E, et al. Altered microRNA expression profiles of human spermatozoa in patients with different spermatogenic impairments. Fertil Steril 2013;99: 1249–55.
19. Abu-Halima M, Backes C, Leidinger P, Keller A, Lubbad AM, Hammadeh M, et al. MicroRNA expression profiles in human testicular tissues of infertile men with different histopathologic patterns. Fertil Steril 2014;101:78–86.
20. Zhuang X, Li Z, Lin H, Gu L, Lin Q, Lu Z, et al. Integrated miRNA and mRNA expression profiling to identify mRNA targets of dysregulated miRNAs in non-obstructive azoospermia. Sci Rep 2015;5:7922.
21. McCallie B, Schoolcraft WB, Katz-Jaffe MG. Aberration of blastocyst microRNA expression is associated with human infertility. Fertil Steril 2010;93: 2374–82.
22. Noren Hooten N, Fitzpatrick M, Wood WH, De S, Ejiogu N, Zhang Y, et al. Age-related changes in microRNA levels in serum. Aging (Albany NY) 2013;5:725–40.
23. Dinami R, Ercolani C, Petti E, Piazza S, Ciani Y, Sestito R, et al. miR-155 drives telomere fragility in human breast cancer by targeting TRF1. Cancer Res 2014;74:4145–56.
24. Wang Z, Yin H, Zhang Y, Feng Y, Yan Z, Jiang X, et al. miR-214-mediated downregulation of RNF8 induces chromosomal instability in ovarian cancer cells. Cell Cycle 2014;13:3519–28.
25. Hell MP, Thoma CR, Fankhauser N, Christinat Y, Weber TC, Krek W. Mir-28-5p promotes chromosomal instability in VHL-associated cancers by inhibiting Mad2 translation. Cancer Res 2014;74:2432–43.
26. Ling H, Spizzo R, Atlasi Y, Nicoloso M, Shimizu M, Redis RS, et al. CCAT2, a novel noncoding RNA mapping to 8q24, underlies metastatic progression and chromosomal instability in colon cancer. Genome Res 2013;23: 1446–61.
27. Paul C, Robaire B. Ageing of the male germ line. Nat Rev Urol 2013;10:1–8.
28. Sarrate Z, Vidal F, Blanco J. Role of sperm fluorescent in situ hybridization studies in infertile patients: indications, study approach, and clinical relevance. Fertil Steril 2010;93:1892–902.
29. Salas-Huetos A, Blanco J, Vidal F, Mercader JM, Garrido N, Anton E. New insights into the expression profile and function of micro-ribonucleic acid in human spermatozoa. Fertil Steril 2014;102:213–22.
30. Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, Swanson RJ, Matta JF, Oehninger S. Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization. Fertil Steril 1988;49:112–7.
31. Goodrich RJ, Johnson GD, Krawetz S. The preparation of human spermatozoal RNA for clinical analysis. Arch Androl 2007;53:161–7.
32. Wylie D, Shelton J, Choudhary A, Adai AT. A novel mean-centering method for normalizing microRNA expression from high-throughput RT- qPCR data. BMC Res Notes 2011;4:555.
33. R Development Core Team. R: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing; 2010.
34. Dvinge H, Bertone P. HTqPCR: high-throughput analysis and visualization of quantitative real-time PCR data in R. Bioinformatics 2009;25:3325–6.
35. Hsu SD, Chu CH, Tsou AP, Chen SJ, Chen HC, Hsu PW, et al. miRNAMap 2.0: genomic maps of microRNAs in metazoan genomes. Nucleic Acids Res 2008;36(Database issue):165–9.
36. Jeggari A, Marks DS, Larsson E. miRcode: a map of putative microrna target sites in the long non-coding transcriptome. Bioinformatics 2012; 28:2062–3.
37. Hammoud SS, Nix DA, Zhang H, Purwar J, Carrell DT, Cairns BR. Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development. Nature 2009;460:473–8.
38. Song Q, Decato B, Hong EE, Zhou M, Fang F, Qu J, et al. A reference methylome database and analysis pipeline to facilitate integrative and comparative epigenomics. PLoS One 2013;8:e81148.
39. Paraskevopoulou MD, Georgakilas G, Kostoulas N, Vlachos IS, Vergoulis T, Reczko M, et al. DIANA-microT web server v5.0: service integration into miRNA functional analysis workflows. Nucleic Acids Res 2013;41(Web Server issue):W169–73.
40. Reczko M, Maragkakis M, Alexiou P, Grosse I, Hatzigeorgiou AG. Functional microRNA targets in protein coding sequences. Bioinformatics 2012;28: 771–6.
41. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. Nat Protoc 2009;4: 44–57.
42. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. Nucleic Acids Res 2009;37:1–13.
43. Esteller M. Non-coding RNAs in human disease. Nat Rev Genet 2011;12: 861–74.
44. Hsu SD, Tseng YT, Shrestha S, Lin YL, Khaleel A, Chou CH, et al. MiRTarBase update 2014: an information resource for experimentally validated miRNA-target interactions. Nucleic Acids Res 2014;42(Database Issue):78–85.
45. Masoro EJ, Austad SN. Handbook of the biology of aging. New York: Academic Press; 2010.
46. Liu W, Pang RT, Chiu PC, Wong BP, Lao KQ, Lee K. Sperm-borne microRNA-34c is required for the first cleavage division in mouse. Proc Natl Acad Sci U S A 2012;109:490–4.
47. Yuan S, Tang C, Zhang Y, Wu J, Bao J, Zheng H, et al. mir-34b/c and mir-449a/b/c are required for spermatogenesis, but not for the first cleavage division in mice. Biol Open 2015;4:212–23.
48. Krawetz S, Kruger A, Lalancette C, Tagett R, Anton E, Draghici S, et al. A survey of small RNAs in human sperm. Hum Reprod 2011;26:3401–12.
49. Print CG, Loveland KL. Germ cell suicide: new insights into apoptosis during spermatogenesis. BioEssays 2000;22:423–30.
50. Chen Y, Gelfond JA, McManus LM, Shireman PK. Reproducibility of quantitative RT-PCR array in miRNA expression profiling and comparison with microarray analysis. BMC Genomics 2009;10:407.
51. Koshiol J, Wang E, Zhao Y, Marincola F, Landi MT. Strengths and limitations of laboratory procedures for microRNA detection. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2010;19:907–11.
52. Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. Genome Res 2004;14:1902–10.
53. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Meyer J, Borkhardt A, Tuschl T. New microRNAs from mouse and human. RNA 2003;9:175–9.
54. Lim LP, Lim LP, Lau NC, Lau NC, Weinstein EG, Weinstein EG, et al. The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*. Genes Dev 2003;17:991–1008.
55. Grinchuk OV, Jenjaroenpun P, Orlov YL, Zhou J, Kuznetsov VA. Integrative analysis of the human cis-antisense gene pairs, miRNAs and their transcription regulation patterns. Nucleic Acids Res 2009;38:534–47.
56. Min H, Lee JY, Kim MH. Hoxc gene collinear expression and epigenetic modifications established during embryogenesis are maintained until after birth. Int J Biol Sci 2013;9:960–5.
57. Huang W, Kane JK, Li MD. Identification and characterization of a long isoform of human IFT80, IFT80-L. Biochem Biophys Res Commun 2008; 373:653–8.
58. Constância M, Hemberger M, Hughes J, Dean W, Ferguson-Smith A, Fundele R, et al. Placental-specific IGF-II is a major modulator of placental and fetal growth. Nature 2002;417:945–8.
59. Majesky MW. Organizing motility: LIM domains, LPP, and smooth muscle migration. Circ Res 2006;98:306–8.

60. Ferguson-Smith AC, Cattanach BM, Barton SC, Beechey CV, Surani MA. Embryological and molecular investigations of parental imprinting on mouse chromosome 7. Nature 1991;351:667–70.
61. Shen TL, Park AY, Alcaraz A, Peng X, Jang I, Koni P, et al. Conditional knockout of focal adhesion kinase in endothelial cells reveals its role in angiogenesis and vascular development in late embryogenesis. J Cell Biol 2005;169:941–52.
62. Ball AR, Yokomori K. The structural maintenance of chromosomes (SMC) family of proteins in mammals. Chromosome Res 2001;9:85–96.
63. Ross AJ, Waymire KG, Moss JE, Parlow AF, Skinner MK, Russell LD, et al. Testicular degeneration in Bclw-deficient mice. Nat Genet 1998;18:251–6.
64. Kozar K, Ciemerych MA, Rebel VI, Shigematsu H, Zagozdzon A, Sicinska E, et al. Mouse development and cell proliferation in the absence of D-cyclins. Cell 2004;118:477–91.
65. Takai H, Tominaga K, Motoyama N, Minamishima YA, Nagahama H, Tsukiyama T, et al. Aberrant cell cycle checkpoint function and early embryonic death in Chk1(-/-) mice. Genes Dev 2000;14:1439–47.
66. Tsui S, Dai T, Roettger S, Schempp W, Salido EC, Yen PH. Identification of two novel proteins that interact with germ-cell-specific RNA-binding proteins DAZ and DAZL1. Genomics 2000;65:266–73.
67. Jansen G, Mahadevan M, Amemiya C, Wormskamp N, Segers B, Hendriks W, et al. Characterization of the myotonic dystrophy region predicts multiple protein isoform-encoding mRNAs. Nat Genet 1992;1:261–6.
68. Sun Y, Kucej M, Fan HY, Yu H, Sun QY, Zou H. Separase is recruited to mitotic chromosomes to dissolve sister chromatid cohesion in a DNA-dependent manner. Cell 2012;29:997–1003.
69. Obholz KL, Akopyan A, Waymire KG, MacGregor GR. FNDC3A is required for adhesion between spermatids and Sertoli cells. Dev Biol 2006;298:498–513.
70. Zhang Z, Sapiro R, Kapfhamer D, Bucan M, Bray J, Chennathukuzhi V, et al. A sperm-associated WD repeat protein orthologous to Chlamydomonas PF20 associates with Spag6, the mammalian orthologue of Chlamydomonas PF16. Mol Cell Biol 2002;22:7993–8004.
71. Khor B, Bredemeyer AL, Huang CY, Turnbull IR, Evans R, Maggi LB, et al. Proteasome activator PA200 is required for normal spermatogenesis. Mol Cell Biol 2006;26:2999–3007.
72. Liu Y, Masson JY, Shah R, O'Regan P, West SC. RAD51C is required for Holliday junction processing in mammalian cells. Science 2004;303:243–6.
73. Renault NK, Renault MP, Copeland E, Howell RE, Greer WL. Familial skewed X-chromosome inactivation linked to a component of the cohesin complex, SA2. J Hum Genet 2011;56:390–7.

Supplemental Table 1. Age, seminal parameters, FISH result, ART procedure and outcome of the individuals included in the study.

Samples	Age (years)[a]	Seminal parameters				FISH result[d]	ART procedure & outcome				
		Seminogram	Concentration (spz./ml)	Motility (%PR+ %NP)	Morphology (%NF)		Technique	Fertilization rate (%)	Discarded embryos (%)	Pregnancy rate (%)	Miscarriage rate (%)
S11	32 (R2)	A	$1.26x10^8$	35	12[b]	Altered	ICSI	62.5	40	100	0
S12	36 (R2)	A	$9.80x10^7$	35	10[b]	Normal	ICSI	0	-	-	-
S13	31 (R2)	A	$6.53x10^7$	40	16[c]	Normal	ICSI	80	75	0	-
S14	41 (R3)	A	$9.94x10^7$	35	5[b]	Altered	ICSI	0	-	-	-
S15	35 (R2)	A	$6.03x10^7$	35	13[b]	Altered	ICSI	60	50	0	-
S16	41 (R3)	A	$1.04x10^8$	40	14[c]	Altered	ICSI	0	-	-	-
S17	42 (R3)	A	$2.23x10^7$	24	7[b]	Normal	ICSI	87.5	57.1	100	0
S18	49 (R3)	A	$4.30x10^7$	22	7[b]	Normal	ICSI	83.3	60	50	0
S19	44 (R3)	A	$6.90x10^7$	31	5[b]	Altered	ICSI	73.7	50	50	100
S20	39 (R2)	A	$7.80x10^7$	29	7[b]	Altered	ICSI	66.7	12.5	100	0
Mean (±SD)	39 (±5.6)	-	$7.65x10^7$ ($\pm3.11x10^7$)	32.6 (±6.1)	9.6 (±3.9)	-	-	51.27 (±36.44)	49.23 (±19.49)	57.14 (±44.99)	20.00 (±44.72)
S21	33 (R2)	T	$1.33x10^8$	73	1[b]	Normal	ICSI	70.6	33.3	100	33.3
S22	35 (R2)	T	$3.80x10^7$	49	3[b]	Normal	ICSI	58.3	71.4	100	0
S23	48 (R3)	T	$8.50x10^7$	41	3[b]	Normal	ICSI	50	0	0	-
S24	34 (R2)	T	$6.66x10^7$	54	3[b]	Normal	ICSI	58.3	52.4	33.3	0
S25	36 (R2)	T	$1.60x10^8$	46	3[b]	Normal	ICSI	52.4	54.6	50	0
S26	42 (R3)	T	$9.00x10^7$	56	3[b]	Normal	ICSI	75	66.7	100	0
S27	41 (R3)	T	$2.80x10^7$	51	2[b]	Altered	ICSI	50	71.4	0	-
S28	35 (R2)	T	$5.52x10^7$	45	10[c]	Altered	ICSI	66.7	50	0	-
S29	28 (R1)	T	$2.12x10^7$	45	6[c]	Normal	No ART	-	-	-	-
S30	32 (R2)	T	$4.72x10^7$	60	10[c]	Normal	ICSI	50	0	0	-
Mean (±SD)	36.4 (±5.8)	-	$7.24x10^7$ ($\pm4.54x10^7$)	52.0 (±9.4)	4.4 (±3.2)	-	-	59.03 (±9.60)	44.42 (±27.88)	42.59 (±46.48)	6.67 (±14.91)
S31	37 (R2)	O	$1.30x10^7$	43	4[b]	Altered	ICSI	46.7	28.6	100	0
S32	35 (R2)	O	$1.30x10^7$	64	5[b]	Altered	ICSI	50	0	100	50
S33	38 (R2)	O	$1.33x10^7$	36	4[b]	Altered	ICSI	46.3	4	100	50
S34	50 (R3)	O	$1.13x10^7$	54	5[b]	Altered	ICSI	0	-	-	-
S35	43 (R3)	O	$1.33x10^7$	43	5[b]	Altered	ICSI	90	33.3	50	0
S36	39 (R2)	O	$1.10x10^7$	57	4[b]	Altered	No ART	-	-	-	-
S37	45 (R3)	O	$5.30x10^6$	40	4[b]	Normal	No ART	-	-	-	-

S38	44 (R3)	O	$7.60x10^6$	48	5[b]	Altered	ICSI	90.5	73.7	66.7	50
S39	49 (R3)	O	$7.00x10^6$	53	4[b]	Normal	ICSI	85.7	75	100	0
S40	41 (R3)	O	$15.00x10^6$	48	7[b]	ND	ICSI	100	28.6	100	0
Mean (±SD)	42.1 (±5.0)	-	$1.10x10^7$ ($\pm3.24x10^6$)	48.6 (±8.5)	4.7 (±0.9)	-	-	63.64 (±33.91)	34.74 (±29.91)	91.6 (±20.41)	21.43 (±26.73)

FISH: Fluorescent *in situ* hybridization, ART: Assisted Reproductive Technology, ICSI: Intracytoplasmic Sperm Injection, SD: Standard deviation, A: Asthenozoospermia, T: Teratozoospermia, O: Oligozoospermia, Spz.: Spermatozoa, PR: Progressive, NP: Non-progressive, NF: Normal forms, ND: No Data.

a. R1=range 19-29 years old; R2=range 30-39 years old; R3=range 40-50 years old.

b. WHO morphology criteria (WHO 2010) (1); lower limit <4% normal forms.

c. Strict Kruger morphology criteria (Kruger *et al*., 1988) (27); lower limit <14% normal forms.

d. Altered FISH result: Patients with an increase incidence of numerical chromosome anomalies for chromosomes 13, 18, 21, X and Y in spermatozoa.

Supplemental Table 2. Primers and amplification conditions used in the PCR assays for the quality controls of the sperm RNA isolation.

Gene (GenBank Accession number)	Primer Sequence (5'-3')	Annealing temperature (ºC)	cDNA size (bp)	DNA size (bp)	Chromosome location
PRM1 (NM_002761.2)	For.CAGAGTTCCACCTGCTCACA Rev.GGATGGTGGCATTTTCAAGA	62	331	422	Chr16:11,374,707-11,375,129
GAPDH (NM_002046.5)	For.CGACCACTTTGTCAAGCTCA Rev.AGGGGTCTACATGGCAACTG	64	228	332	Chr12:6,643,571-6,647,541
CD45 or ***PTPRC*** (NM_002838.4)	For.CCTTGAACCCGAACATGAGT Rev.ATCTTTGAGGGGGATTCCAG	60	-	-	Chr1:198,608,098-198,726,605

Supplemental Table 3. RNA isolation data.

Samples	Total number spz.	Total RNA (ng)	RNA(fg)/spz	Purity (260/280 nm)
Asthenozoospermic				
S11	$2.58x10^7$	1,225	47	1.83
S12	$4.36x10^7$	477	11	1.79
S13	$7.78x10^7$	895	11	1.77
S14	$2.00x10^7$	207	10	1.62
S15	$2.62x10^7$	1,103	42	1.77
S16	$7.58x10^7$	2,066	27	1.78
S17	$6.65x10^6$	2,152	324	1.80
S18	$1.75x10^7$	5,313	304	1.83

S19	$2.95x10^{6}$	392	133	1.72
S20	$2.67x10^{7}$	9,532	357	1.80
Teratozoospermic				
S21	$5.39x10^{7}$	497	9	1.74
S22	$1.13x10^{7}$	765	68	1.75
S23	$6.29x10^{7}$	3,256	52	1.84
S24	$3.79x10^{7}$	3,085	81	1.80
S25	$8.89x10^{7}$	1,924	22	1.81
S26	$5.51x10^{7}$	1,923	35	1.75
S27	$1.29x10^{7}$	944	73	1.75
S28	$1.42x10^{7}$	3,165	223	1.77
S29	$2.06x10^{7}$	414	20	1.60
S30	$3.28x10^{7}$	769	23	1.80
Oligozoospermic				
S31	$7.00x10^{6}$	352	50	1.67
S32	$2.80x10^{6}$	463	165	1.61
S33	$8.00x10^{6}$	811	101	1.74
S34	$3.60x10^{6}$	698	194	1.64
S35	$1.05x10^{7}$	382	36	1.77
S36	$7.80x10^{6}$	446	57	1.70
S37	$8.60x10^{6}$	482	56	1.75
S38	$4.40x10^{6}$	493	112	1.36
S39	$4.60x10^{6}$	586	127	0.93
S40	$5.40x10^{6}$	1260	350	1.43

Spz.: Spermatozoa, ng: nanograms, fg: femtograms

Supplemental Table 4. Enriched biological functions associated with the predicted target genes of the differentially expressed miRNAs in the three populations analyzed. Note: Significantly enriched biological processes directly related to seminal alterations are indicated in bold.

Significantly enriched biological functions (GO term)	**Fisher Exact *P*-Value**	**Bonferroni correction**
Asthenozoospermic (32 DE-miRNAs; 5,822 Targets)		
Regulation of transcription (GO:0006355)	$4.40x10^{-24}$	$2.30x10^{-20}$
Transcription (GO:0006351)	$5.70x10^{-23}$	$3.00x10^{-19}$
Regulation of RNA metabolic process (GO:0051252)	$4.90x10^{-15}$	$2.60x10^{-11}$
Regulation of transcription, DNA-dependent (GO:0006355)	$3.90x10^{-14}$	$2.10x10^{-10}$
Negative regulation of macromolecule metabolic process (GO:0010605)	$4.10x10^{-13}$	$2.20x10^{-9}$

Negative regulation of macromolecule biosynthetic process (GO:0010558)	$8.00x10^{-13}$	$4.20x10^{-9}$
Negative regulation of gene expression (GO:0010629)	$1.20x10^{-12}$	$6.20x10^{-9}$
Negative regulation of transcription (GO:0045892)	$3.80x10^{-12}$	$2.00x10^{-8}$
Negative regulation of biosynthetic process (GO:0009890)	$6.20x10^{-12}$	$3.30x10^{-8}$
Negative regulation of cellular biosynthetic process (GO:0031327)	$9.80x10^{-12}$	$5.20x10^{-8}$
Regulation of transcription from RNA polymerase II promoter (GO:0006357)	$1.60x10^{-11}$	$8.60x10^{-8}$
Negative regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process (GO:0045934)	$9.30x10^{-11}$	$4.90x10^{-7}$
Negative regulation of nitrogen compound metabolic process (GO:0051172)	$2.20x10^{-10}$	$1.20x10^{-6}$
Negative regulation of RNA metabolic process (GO:0051253)	$8.00x10^{-10}$	$4.20x10^{-6}$
Positive regulation of transcription, DNA-dependent (GO:0045893)	$1.50x10^{-9}$	$8.10x10^{-6}$
Positive regulation of RNA metabolic process (GO:0051254)	$1.90x10^{-9}$	$1.00x10^{-5}$
Negative regulation of transcription, DNA-dependent (GO:0045892)	$2.70x10^{-9}$	$1.40x10^{-5}$
Positive regulation of gene expression (GO:0010628)	$8.30x10^{-9}$	$4.40x10^{-5}$
Positive regulation of transcription (GO:0045893)	$9.00x10^{-9}$	$4.80x10^{-5}$
Positive regulation of nitrogen compound metabolic process (GO:0051173)	$1.70x10^{-8}$	$9.10x10^{-5}$
Positive regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process (GO:0045935)	$1.90x10^{-8}$	$1.00x10^{-4}$
Positive regulation of macromolecule metabolic process (GO:0010604)	$3.00x10^{-8}$	$1.60x10^{-4}$
Positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter (GO:0045944)	$1.40x10^{-7}$	$7.50x10^{-4}$
Chromatin modification (GO:0016568)	$1.90x10^{-7}$	$1.00x10^{-3}$
Positive regulation of macromolecule biosynthetic process (GO:0010557)	$2.00x10^{-7}$	$1.10x10^{-3}$
Positive regulation of cellular biosynthetic process (GO:0031328)	$2.40x10^{-7}$	$1.30x10^{-3}$
Chordate embryonic development (GO:0043009)	$2.40x10^{-7}$	$1.30x10^{-3}$
Positive regulation of biosynthetic process (GO:0009891)	$2.80x10^{-7}$	$1.50x10^{-3}$
Embryonic development ending in birth or egg hatching (GO:0009792)	$4.50x10^{-7}$	$2.40x10^{-3}$
Negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter (GO:0000122)	$7.60x10^{-7}$	$4.00x10^{-3}$
Intracellular transport (GO:0046907)	$1.70x10^{-6}$	$9.00x10^{-3}$
Cell motion (GO:0006928)	$2.80x10^{-6}$	$1.50x10^{-2}$
Enzyme linked receptor protein signaling pathway (GO:0007167)	$6.40x10^{-6}$	$3.30x10^{-2}$
Teratozoospermic (19 DE-miRNAs; 5,511 Targets)		
Regulation of transcription (GO:0006355)	$6.10x10^{-15}$	$3.20x10^{-11}$
Transcription (GO:0006351)	$8.00x10^{-14}$	$4.10x10^{-10}$
Proteolysis involved in cellular protein catabolic process (GO:0051603)	$6.90x10^{-11}$	$3.60x10^{-7}$
Cellular protein catabolic process (GO:0044257)	$1.20x10^{-10}$	$6.40x10^{-7}$
Modification-dependent macromolecule catabolic process (GO:0043632)	$2.50x10^{-10}$	$1.30x10^{-6}$
Modification-dependent protein catabolic process (GO:0019941)	$2.50x10^{-10}$	$1.30x10^{-6}$
Protein catabolic process (GO:0030163)	$4.60x10^{-10}$	$2.40x10^{-6}$
Regulation of RNA metabolic process (GO:0051252)	$5.40x10^{-10}$	$2.80x10^{-6}$
Regulation of transcription, DNA-dependent (GO:0006355)	$2.60x10^{-9}$	$1.40x10^{-5}$
Negative regulation of gene expression (GO:0010629)	$3.10x10^{-9}$	$1.60x10^{-5}$
Phosphate metabolic process (GO:0006796)	$2.50x10^{-8}$	$1.30x10^{-4}$
Phosphorus metabolic process (GO:0006793)	$2.50x10^{-8}$	$1.30x10^{-4}$
Negative regulation of transcription (GO:0045892)	$2.80x10^{-8}$	$1.40x10^{-4}$
Positive regulation of nitrogen compound metabolic process (GO:0051173)	$3.00x10^{-8}$	$1.60x10^{-4}$
Cellular macromolecule catabolic process (GO:0044265)	$3.50x10^{-8}$	$1.80x10^{-4}$
Positive regulation of gene expression (GO:0010628)	$3.60x10^{-8}$	$1.90x10^{-4}$
Positive regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process (GO:0045935)	$3.80x10^{-8}$	$2.00x10^{-4}$
Enzyme linked receptor protein signaling pathway (GO:0007167)	$5.80x10^{-8}$	$3.00x10^{-4}$
Positive regulation of transcription (GO:0045893)	$7.20x10^{-8}$	$3.70x10^{-4}$
Positive regulation of biosynthetic process (GO:0009891)	$9.50x10^{-8}$	$4.90x10^{-4}$

Positive regulation of macromolecule biosynthetic process (GO:0010557)	$1.40x10^{-7}$	$7.00x10^{-4}$
Positive regulation of cellular biosynthetic process (GO:0031328)	$1.40x10^{-7}$	$7.00x10^{-4}$
Protein amino acid phosphorylation (GO:0006468)	$1.50x10^{-7}$	$7.70x10^{-4}$
Negative regulation of macromolecule biosynthetic process (GO:0010558)	$3.80x10^{-7}$	$2.00x10^{-3}$
Macromolecule catabolic process (GO:0009057)	$4.30x10^{-7}$	$2.20x10^{-3}$
Positive regulation of macromolecule metabolic process (GO:0010604)	$4.40x10^{-7}$	$2.30x10^{-3}$
Negative regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process (GO:0045934)	$5.00x10^{-7}$	$2.60x10^{-3}$
Cell cycle (GO:0007049)	$5.10x10^{-7}$	$2.60x10^{-3}$
Negative regulation of nitrogen compound metabolic process (GO:0051172)	$5.80x10^{-7}$	$3.00x10^{-3}$
Neuron projection morphogenesis (GO:0048812)	$8.30x10^{-7}$	$4.30x10^{-3}$
Negative regulation of cell differentiation (GO:0045596)	$8.70x10^{-7}$	$4.50x10^{-3}$
Cell morphogenesis (GO:0000902)	$9.60x10^{-7}$	$5.00x10^{-3}$
Positive regulation of RNA metabolic process (GO:0051254)	$1.20x10^{-6}$	$6.30x10^{-3}$
Negative regulation of cellular biosynthetic process (GO:0031327)	$1.20x10^{-6}$	$6.30x10^{-3}$
Positive regulation of transcription, DNA-dependent (GO:0045893)	$1.70x10^{-6}$	$8.70x10^{-3}$
Protein modification by small protein conjugation or removal (GO:0070647)	$1.70x10^{-6}$	$9.00x10^{-3}$
Negative regulation of biosynthetic process (GO:0009890)	$1.80x10^{-6}$	$9.30x10^{-3}$
Regulation of transcription from RNA polymerase II promoter (GO:0006357)	$2.00x10^{-6}$	$1.00x10^{-2}$
Heart development (GO:0007507)	$2.70x10^{-6}$	$1.40x10^{-2}$
Axonogenesis (GO:0007409)	$3.20x10^{-6}$	$1.70x10^{-2}$
Cell projection morphogenesis (GO:0048858)	$3.60x10^{-6}$	$1.80x10^{-2}$
Cellular component morphogenesis (GO:0032989)	$3.90x10^{-6}$	$2.00x10^{-2}$
Intracellular transport (GO:0046907)	$4.00x10^{-6}$	$2.00x10^{-2}$
Tube development (GO:0035295)	$4.50x10^{-6}$	$2.30x10^{-2}$
Negative regulation of macromolecule metabolic process (GO:0010605)	$4.60x10^{-6}$	$2.40x10^{-2}$
Cell morphogenesis involved in differentiation (GO:0000904)	$5.40x10^{-6}$	$2.80x10^{-2}$
Transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway (GO:0007169)	$5.70x10^{-6}$	$2.90x10^{-2}$
Cell part morphogenesis (GO:0032990)	$5.80x10^{-6}$	$2.90x10^{-2}$
Embryonic morphogenesis (GO:0048598)	$6.80x10^{-6}$	$3.50x10^{-2}$
Phosphorylation (GO:0016310)	$8.70x10^{-6}$	$4.40x10^{-2}$
Appendage development (GO:0048736)	$8.90x10^{-6}$	$4.50x10^{-2}$
Limb development (GO:0060173)	$8.90x10^{-6}$	$4.50x10^{-2}$
Pattern specification process (GO:0007389)	$9.00x10^{-6}$	$4.60x10^{-2}$
Oligozoospermic (18 DE-miRNAs; 3,155 Targets)		
Regulation of transcription (GO:0006355)	$2.10x10^{-11}$	$9.30x10^{-8}$
Modification-dependent protein catabolic process (GO:0019941)	$2.20x10^{-11}$	$9.70x10^{-8}$
Modification-dependent macromolecule catabolic process (GO:0043632)	$2.20x10^{-11}$	$9.70x10^{-8}$
Proteolysis involved in cellular protein catabolic process (GO:0051603)	$3.10x10^{-11}$	$1.40x10^{-7}$
Cellular protein catabolic process (GO:0044257)	$4.70x10^{-11}$	$2.00x10^{-7}$
Positive regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process (GO:0045935)	$1.20x10^{-10}$	$5.10x10^{-7}$
Protein catabolic process (GO:0030163)	$1.70x10^{-10}$	$7.20x10^{-7}$
Positive regulation of nitrogen compound metabolic process (GO:0051173)	$2.40x10^{-10}$	$1.00x10^{-6}$
Positive regulation of transcription (GO:0045893)	$3.00x10^{-10}$	$1.30x10^{-6}$
Positive regulation of gene expression (GO:0010628)	$4.30x10^{-10}$	$1.90x10^{-6}$
Positive regulation of macromolecule metabolic process (GO:0010604)	$4.70x10^{-10}$	$2.00x10^{-6}$
Positive regulation of macromolecule biosynthetic process (GO:0010557)	$1.50x10^{-9}$	$6.60x10^{-6}$
Cellular macromolecule catabolic process (GO:0044265)	$1.00x10^{-8}$	$4.30x10^{-5}$
Positive regulation of biosynthetic process (GO:0009891)	$1.00x10^{-8}$	$4.30x10^{-5}$
Transcription (GO:0006351)	$1.40x10^{-8}$	$5.90x10^{-5}$
Positive regulation of cellular biosynthetic process (GO:0031328)	$1.70x10^{-8}$	$7.40x10^{-5}$

Protein amino acid phosphorylation (GO:0006468)	$2.20x10^{-8}$	$9.40x10^{-5}$
Positive regulation of RNA metabolic process (GO:0051254)	$4.10x10^{-8}$	$1.80x10^{-4}$
Regulation of RNA metabolic process (GO:0051252)	$5.10x10^{-8}$	$2.20x10^{-4}$
Protein modification by small protein conjugation or removal (GO:0070647)	$5.80x10^{-8}$	$2.50x10^{-4}$
Positive regulation of transcription, DNA-dependent (GO:0045893)	$8.50x10^{-8}$	$3.70x10^{-4}$
Protein ubiquitination (GO:0016567)	$1.50x10^{-7}$	$6.30x10^{-4}$
Macromolecule catabolic process (GO:0009057)	$2.10x10^{-7}$	$9.30x10^{-4}$
Regulation of transcription from RNA polymerase II promoter (GO:0006357)	$2.70x10^{-7}$	$1.20x10^{-3}$
Protein modification by small protein conjugation (GO:0032446)	$5.20x10^{-7}$	$2.20x10^{-3}$
Chromatin modification (GO:0016568)	$6.90x10^{-7}$	$3.00x10^{-3}$
Posttranscriptional regulation of gene expression (GO:0010608)	$7.40x10^{-7}$	$3.20x10^{-3}$
Regulation of transcription, DNA-dependent (GO:0006355)	$9.40x10^{-7}$	$4.00x10^{-3}$
Cell projection morphogenesis (GO:0048858)	$4.80x10^{-6}$	$2.10x10^{-2}$
Intracellular transport (GO:0046907)	$5.60x10^{-6}$	$2.40x10^{-2}$
Phosphate metabolic process (GO:0006796)	$5.80x10^{-6}$	$2.50x10^{-2}$
Phosphorus metabolic process (GO:0006793)	$5.80x10^{-6}$	$2.50x10^{-2}$
Cell part morphogenesis (GO:0032990)	$6.20x10^{-6}$	$2.70x10^{-2}$
Forebrain development (GO:0030900)	$6.50x10^{-6}$	$2.80x10^{-2}$
Regulation of small GTPase mediated signal transduction (GO:0051056)	$6.90x10^{-6}$	$2.90x10^{-2}$
Negative regulation of macromolecule metabolic process (GO:0010605)	$8.00x10^{-6}$	$3.40x10^{-2}$
Negative regulation of gene expression (GO:0010629)	$9.20x10^{-6}$	$3.90x10^{-2}$
Cell morphogenesis (GO:0000902)	$1.10x10^{-5}$	$4.60x10^{-2}$
Positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter (GO:0045944)	$1.10x10^{-5}$	$4.70x10^{-2}$
Enzyme linked receptor protein signaling pathway (GO:0007167)	$1.20x10^{-5}$	$4.90x10^{-2}$

Supplemental Table 5. Host genes of the differentially expressed miRNAs located in intronic regions and related to spermatogenesis or embryogenesis processes.

Gene (OMIM nomenclature)	Chromosome location	Function	Reference
DALR Anticodon binding domain containing 3 ***(DALRD3)***	Chr3:49,052,921-49,056,041	Testis expression suggesting a role in spermatogenesis	Grinchuk *et al.* 2010 (55)
Homeobox C4 ***(HOXC4)***	Chr12:54,388,715-54,449,813	Morphogenesis in multicellular organisms	Min *et al.* 2013 (56)
Homeobox C5 ***(HOXC5)***	Chr12:54,410,641-54,429,144	Morphogenesis in multicellular organisms	Min *et al.* 2013 (56)
Intraflagellar transport 80 ***(IFT80)***	Chr3:159,974,773-160,118,027	Maintenance of motility	Huang *et al.* 2008 (57)
Insulin-like growth factor II ***(IGF2)***	Chr11:2,150,345-2,179,610	Regulation of cell proliferation, growth, migration, differentiation, and survival	Constância *et al.* 2002 (58)
LIM Domain containing preferred translocation partner in lipoma ***(LPP)***	Chr3:187,871,096-188,608,459	Cell adhesion in maintaining cell shape and motility	Majesky *et al.* 2006 (59)
Mesoderm-specific transcript, mouse homolog ***(MEST)***	Chr7:130,126,015-130,146,137	Development of fetal tissues	Ferguson-Smith *et al.* 1991 (60)
Protein-tyrosine kinase 2 ***(PTK2)***	Chr8:141,668,480-142,011,411	Early embryonic development and angiogenesis	Shen *et al.* 2005 (61)
Structural maintenance of chromosomes 4 ***(SMC4)***	Chr3:160,117,077-160,152,754	Maintenance of chromosomes, mitotic chromosome condensation and DNA repair	Ball *et al.* 2001 (62)

Supplemental Table 6. Potential target genes of the DE-miRNAs in the three populations of infertile individuals analyzed which have been previously described to be associated with seminal alterations.

Gene (OMIM nomenclature)	Chromosome location	Function	Reference
BCL2-like2 (***BCL2L2***)	Chr14:23,775,970-23,790,240	Murine adult spermatogenesis	Ross *et al.* 1998 (63)
Cyclin D2 (***CCND2***)	Chr12:4,382,900-4,414,521	Murine germ cell proliferation	Kozar *et al.* 2004 (64)
Checkpoint kinase 1 (***CHEK1***)	Chr11:125,495,030-125,546,149	Checkpoint mediated cell cycle arrest in response to DNA damage in meiotic prophase I	Takai *et al.* 2000 (65)
Deleted in azoospermia (***DAZ1***)	ChrY:25,275,501-25,345,238	Critical role during spermatogenesis. Deletions of this gene have been associated to azoospermia	Tsui *et al.* 2000 (66)
Dystrophia myotonica, WD repeat containing (***DMWD***)	Chr19:46,286,204-46,296,059	Regulatory function in meiosis	Jansen *et al.* 1992 (67)
Extra spindle poles-like 1 (***ESPL1***)	Chr12:53,662,082-53,687,426	Central role in chromosome segregation	Sun *et al.* 2009 (68)
Fibronectin type III domain-containing 3A (***FNDC3A***)	Chr13:49,550,047-49,783,914	Spermatid-Sertoli adhesion during spermatogenesis	Obholz *et al.* 2006 (69)
Sperm-associated antigen 16 (***SPAG16*** *or* ***PF20***)	Chr2:214,149,102-215,275,224	Sperm flagellar function and motile ciliogenesis	Zhang *et al.* 2002 (70)
Proteasome activator subunit 4 (***PSME4***)	Chr2:54,091,203-54,197,976	Promotes ATP- and ubiquitin-independent degradation on acetylated histones during spermatogenesis or DNA damage response	Khor *et al.* 2006 (71)
RAD51 S. cerevisiae homolog C (***RAD51C***)	Chr17:56,769,933-56,811,702	Homologous DNA recombination and repair	Liu *et al.* 2004 (72)
Stromal antigen 2 (***STAG2***)	ChrX:123,094,474-123,236,505	Separation of sister chromatids during cell division	Renault *et al.* 2011 (73)

Capítol 6. Discussió general

Capítol 6. Discussió general

6.1. Extracció del transcriptoma espermàtic

6.1.1. Purificació de la fracció espermàtica

El punt de partida del desenvolupament experimental va requerir l'optimització d'un protocol de selecció de la fracció espermàtica de l'ejaculat, amb la finalitat d'assegurar que els resultats obtinguts reflecteixen específicament el contingut de miRNAs dels espermatozoides. S'han descrit una gran varietat de mètodes de purificació espermàtica (revisat per Henkel i Schill, 2003). La majoria es basen en la selecció dels espermatozoides mòbils, i tots ells tenen la finalitat de seleccionar els espermatozoides amb més capacitat fecundant com a pas previ a cicles de TRA.

No obstant, la major part d'aquests mètodes presenten limitacions per executar el disseny experimental plantejat en el nostre estudi. En primer lloc, hem de destacar que la recuperació cel·lular de la majoria d'ells és molt reduïda. A mode d'exemple, tant els mètodes basats en la centrifugació de la mostra mitjançant gradients de densitat (e.g. PureSperm®) com els mètodes de migració i sedimentació (e.g. *swim-up),* presenten pèrdues d'espermatozoides d'entre el 80- 90% (Rabe *et al.*, 2000). Aquest fet és altament condicionant per poder quantificar els 736 miRNAs mitjançant plaques preconfigurades TaqMan®, ja que la quantitat mínima d'RNA necessària per aquest tipus d'anàlisis és de 150ng (corresponent aproximadament a $1x10^7$ espermatozoides). En segon lloc, aquests mètodes de selecció no permeten l'anàlisi del transcriptoma de tots els espermatozoides de l'ejaculat, ja que els espermatozoides amb alteracions de motilitat i morfologia són descartats.

Per superar aquestes limitacions es va seleccionar el mètode SCL (Goodrich *et al.*, 2007), el qual es basa en la utilització d'una barreja de detergents que lisa les cèl·lules somàtiques però no els espermatozoides. Aquesta lisi selectiva es fonamenta en el fet que els espermatozoides presenten una membrana amb una càrrega proteica molt elevada en comparació a les cèl·lules somàtiques de l'ejaculat. Aquestes proteïnes són imprescindibles per la funció de l'espermatozoide -e.g. reacció acrosòmica, localització i fusió amb les membranes oocitàries, i penetració de la zona pel·lúcida-, i

s'acumulen en determinades regions que esdevenen especialment resistents a detergents (*detergent resistant membranes*; DRM) (Nixon *et al.*, 2009, 2011). Com a conseqüència, els espermatozoides tenen una major resistència al tractament amb detergents que qualsevol cèl·lula somàtica. El resultat final de l'aplicació d'aquest tractament és una purificació de la fracció espermàtica de l'ejaculat que permet recuperar fins i tot els espermatozoides amb alteracions de motilitat o morfologia. A més, comparat amb altres procediments de purificació, aquest redueix considerablement les pèrdues d'espermatozoides. Tot i això, el rang de pèrdua és força ampli (rang=2.22-53.56%), fet que podria indicar una diferent susceptibilitat dels espermatozoides procedents de diferents individus als detergents utilitzats (Nixon *et al.*, 2009, 2011). És important remarcar que altres autors han demostrat prèviament l'adequació de la metodologia escollida als estudis del transcriptoma espermàtic (Goodrich *et al.*, 2007; Jodar *et al.*, 2012; Pacheco *et al.*, 2012; Mao *et al.*, 2013; Bansal *et al.*, 2015).

Una modificació addicional introduïda en aquesta part del protocol va ser la confirmació visual de l'efectivitat del tractament de SCL mitjançant microscòpia òptica, així com l'establiment del criteri de proporció màxima acceptable de cèl·lules somàtiques respecte al total d'espermatozoides. Concretament es va establir una ràtio d'una cèl·lula somàtica per cada 10,000 espermatozoides com a valor màxim acceptable abans de prosseguir amb l'extracció d'RNA. Aquest criteri implica acceptar la presència de, com a molt, un 0.01% de l'RNA d'origen somàtic, i per tant permet assegurar que els resultats obtinguts de l'anàlisi d'expressió de miRNAs reflecteixen el contingut de miRNAs espermàtics.

6.1.2. Extracció d'RNA

La quantitat mitjana d'RNA obtinguda per espermatozoide s'ajusta a les dades publicades per altres autors, la qual s'ha establert entre 10 i 400fg (Pessot *et al.*, 1989; Krawetz, 2005; Goodrich *et al.*, 2007; Dadoune, 2009; Lalancette *et al.*, 2009; Hamatani, 2012). Per altra banda, l'existència d'una correlació positiva entre el nombre d'espermatozoides utilitzats en l'extracció i la quantitat d'RNA obtingut, indica que la recuperació d'RNA està en consonància amb el nombre d'espermatozoides utilitzats.

Pel que fa a la puresa de l'RNA, el valor de la ràtio 260/280nm descrit com a òptim en estudis realitzats en mostres d'origen somàtic, es situa entre 1.8 i 2 (Chomczynski,

1987; Chomczynski i Sacchi, 2006; Fleige i Pfaffl, 2006). En canvi, els nostres resultats mostren una disminució d'aquest valor, amb un rang de 0.93-1.97. Aquest fet el podem associar a dos factors relacionats amb el tipus de mostra utilitzada. En primer lloc, s'ha descrit que l'escassa presència d'RNA en espermatozoides provoca que la proporció RNA/TRIzol® en la solució recuperada estigui descompensada (Krebs *et al.*, 2009). Aquest fet dóna lloc a un desplaçament del valor d'absorbància de la mostra cap a 270nm, i conseqüentment a una disminució de la ràtio 260/280nm que es tradueix en una baixada de la puresa de la mostra. En segon lloc, l'elevat grau d'empaquetament de la cromatina espermàtica degut a la presència de protamines dificulta la dissociació dels complexes nucleoproteics per part del reactiu TRIzol®. Això implica una menor recuperació d'RNA, i per tant, influeix negativament en les pureses obtingudes. En qualsevol cas, els valors de puresa obtinguts en els nostres experiments són similars als publicats per altres investigadors que també utilitzen el mètode TRIzol® per realitzar extraccions d'RNA espermàtic (rang=1.70-1.98) (Das *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2012).

6.1.3. Controls de qualitat

Per tal de confirmar l'absència de contaminacions de DNA i assegurar la integritat dels transcrits obtinguts, es van realitzar PCRs amb encebadors exó-exó per diversos gens. L'aplicabilitat de les estratègies d'amplificació mitjançant un disseny d'encebadors situats en regions exòniques està extensament acceptada, i ha estat utilitzada prèviament per diversos autors (Ostermeier *et al.*, 2004; Goodrich *et al.*, 2007; Kempisty *et al.*, 2007).

Entre els transcrits analitzats es va incloure *PRM1*, seleccionat per presentar una expressió abastament descrita en espermatozoides humans (Steger *et al.*, 2000, 2008; Kempisty *et al.*, 2007). Tanmateix, degut a que *PRM1* és un dels transcrits més abundants en espermatozoides, i amb la finalitat de descartar emmascaraments per part del cDNA sobre amplificacions residuals de DNA, es va incorporar l'estudi del gen *GAPDH.* Aquest gen és d'expressió constitutiva però els seus nivells d'expressió en espermatozoides són significativament inferiors als de *PRM1*. Aquesta metodologia va permetre confirmar l'amplificació de productes de cDNA pels dos transcrits analitzats i constatar l'absència de contaminacions de DNA. A més, donat que les

amplificacions d'aquests fragments es va produir correctament, es va assumir una preservació òptima de la integritat dels transcrits purificats.

Per tal de confirmar l'efectivitat del mètode SCL en l'eliminació de leucòcits, els quals són un dels tipus de cèl·lules somàtiques més abundants de l'ejaculat (Kiessling *et al.*, 1995; Lambard *et al.*, 2004), es van realitzar PCRs pel transcrit *CD45*. Aquest gen és un receptor de superfície leucocitari present únicament en les cèl·lules hematopoètiques diferenciades (revisat per Donovan i Koretzky, 1993). L'absència d'amplificacions d'aquest transcrit va confirmar l'efectivitat del tractament en l'eliminació d'aquestes cèl·lules.

Els xips nanoelectroforètics *Agilent Small RNA* van permetre confirmar la presència d'RNAs amb mides corresponents a miRNAs en totes les mostres espermàtiques analitzades. El perfil de transcrits derivat d'aquestes mostres va ser clarament diferent de l'observat en les cèl·lules Jurkat, on apareixen pics corresponents a tRNAs, pre-miRNAs i rRNAs 5S o 5.8S. En espermatozoides, aquests pics es veuen emmascarats per una elevada presència de fragments amb mides similars a les d'aquestes molècules, els quals podrien haver-se originat a partir de la degradació de l'rRNA (Ostermeier *et al.*, 2002).

Finalment, els resultats de l'anàlisi de les mostres mitjançant els xips nanoelectroforètics d'*Agilent Nano 6000 RNA* van descartar la presència de les molècules d'rRNA 18S i 28S en espermatozoides (les quals sí que apareixen de forma íntegre en les mostres d'RNA obtingudes a partir de cèl·lules Jurkat) (Hamatani, 2012). Aquests resultats coincideixen amb la condició de silenciament transcripcional i traduccional existent en els espermatozoides tal i com ha estat descrit per altres autors (Ostermeier *et al.*, 2002). L'absència de pics electroforètics corresponents als rRNAs 18S i 28S en espermatozoides comporta la impossibilitat d'establir l'índex RIN en aquestes mostres. No obstant, els resultats RIN obtinguts en les extraccions d'RNA a partir de les cèl·lules Jurkat van mostrar valors òptims (propers a 10). Aquesta dada, juntament amb el fet que els processos d'extracció d'RNA en espermatozoides i cèl·lules Jurkat es van realitzar de forma paral·lela, va permetre estimar de forma indirecta una qualitat òptima de totes les extraccions realitzades.

6.1.4. Validació de la presència de miRNAs en espermatozoides

Tot i que els xips nanoeletroforètics *Agilent Small RNA* van permetre identificar transcrits amb mides corresponents als miRNAs madurs, no es va poder confirmar la presència de miRNAs fins a la realització de les qRT-PCR amb assajos individuals específics.

Els resultats van permetre confirmar la presència del hsa-miR-23a en espermatozoides humans, coincidint amb el que havien descrit altres autors (Krawetz *et al.*, 2011), i descriure per primera vegada la presència de hsa-miR-744 i hsa-let-7f. Per contra, en cap mostra es va detectar el hsa-miR-1.

A més, també es va valorar l'existència de diferències significatives en l'expressió d'aquests miRNAs entre les poblacions d'individus estudiats. En el cas del hsa-let-7f, es va observar una reducció significativa de la seva expressió en tres dels quatre individus infèrtils. Aquest miRNA no té una funció coneguda en humans tot i que, en diverses espècies animals s'ha descrit que la seva família (let-7) està estretament relacionada amb el desenvolupament embrionari (Pasquinelli *et al.*, 2000; Tennessen i Thummel, 2008) i la diferenciació dels gàmetes (McIver *et al.*, 2012). Dos dels tres individus en els quals es va detectar una sub-expressió de hsa-let-7f presentaven un seminograma alterat (astenoteratozoospèrmia i teratozoospèrmia) i en canvi, l'individu restant, no presentava cap anomalia del seminograma (normozoospèrmia).

Aquestes dades van suggerir que els espermatozoides humans presenten un perfil de miRNAs diferenciat que podria estar relacionat amb la fertilitat dels individus i van representar el punt de partida pel desenvolupament experimental de la resta dels objectius plantejats en aquesta Tesi.

6.2. Normalització de les dades

Les directrius pels controls de qualitat i l'estandardització dels experiments de qRT-PCR establerts per les MIQE (*Minimum Information for Publication of Quantitative Real-time PCR Experiments*) han resolt que la utilització d'una metodologia de normalització adequada és essencial per obtenir uns resultats d'expressió fiables (Bustin *et al.*, 2009).

Quan es fan anàlisis de perfils de miRNAs a gran escala (>100), existeix una estratègia de normalització àmpliament acceptada consistent en la utilització del valor mitjà

d'expressió de tots els miRNAs analitzats (MCR) (Wylie *et al.*, 2011). Com a conseqüència aquest va ser el mètode triat per a la normalització de les dades procedents de l'anàlisi mitjançant plaques preconfigurades.

En canvi, en l'anàlisi d'un nombre baix de miRNAs (<100), aquest mètode no ofereix un valor prou robust per realitzar una normalització fiable. En aquesta situació, alguns autors utilitzen com a normalitzadors els valors d'expressió de determinats snRNAs (e.g. RNU6B, també conegut com MammU6) (Chen *et al.*, 2009; Fukushima *et al.*, 2011; Wotschofsky *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2012; Abu-Halima *et al.*, 2013, 2014a, 2014b) o snoRNAs (e.g. RNU44 o RNU48) (Wotschofsky *et al.*, 2011). Fins i tot en alguns casos s'opta per utilitzar la mitjana d'expressió de diversos snRNAs i snoRNAs utilitzats conjuntament (Mestdagh *et al.*, 2009). De fet, la utilització d'un snRNA com a normalitzador va ser l'estratègia utilitzada per validar la presència de quatre miRNAs durant la optimització del protocol d'extracció d'RNA total espermàtic (concretament Mamm-U6; veure apartat 3.2.4.3). En qualsevol cas, l'ús de sncRNA de naturalesa diferent a la dels miRNAs és desaconsellable, ja que no presenten les mateixes propietats fisicoquímiques. De fet, la utilització de normalitzadors pertanyents a la mateixa classe de molècules que es volen analitzar és el més indicat (Vandesompele *et al.*, 2002). A més, tampoc està demostrat que les molècules RNU6B, RNU44 i RNU48 presentin una expressió constitutiva en espermatozoides, característica essencial que hauria de presentar qualsevol normalitzador.

Davant d'aquesta situació i d'acord amb el que alguns autors han suggerit (Mestdagh *et al.*, 2009; Chang *et al.*, 2010), ens vam plantejar l'objectiu de seleccionar un conjunt reduït de miRNAs per tal de presentar-los com a candidats a normalitzadors en anàlisis d'expressió de pocs miRNAs (<100). En aquest sentit, el mètode CCR (Wylie *et al.*, 2011) ens va permetre realitzar la selecció dels millors candidats a partir dels valors d'expressió de tots miRNAs inclosos en les plaques preconfigurades procedents de l'anàlisi dels 10 individus fèrtils. Els miRNAs que van mostrar valors d'expressió més similars a la mitjana d'expressió de tots els miRNAs presents en aquests individus van ser els hsa-miR-532-5p i hsa-miR-374b-5p per la placa A, i el hsa-miR-564 per la placa B. L'alt valor de correlació obtingut entre els valors normalitzats a partir del mètode MCR versus la normalització realitzada amb aquests tres miRNAs va confirmar la validesa de la selecció d'aquests tres transcrits com a normalitzadors per anàlisis d'expressió d'un nombre reduït de miRNAs (<100).

6.3. Expressió de miRNAs en espermatozoides d'individus fèrtils

6.3.1. Homogeneïtat de la població fèrtil

Per tal d'utilitzar els perfils d'expressió de la població fèrtil com a valors control de referència, va caldre primerament determinar-ne la seva homogeneïtat. Per abordar aquesta anàlisi es van realitzar dos tipus d'estudis. En un d'ells es va valorar l'agrupació de les mostres en base a la presència/absència de miRNAs. Les diferències observades entre els dos grups resultants va ser inferior al 10%, resultat que va permetre confirmar una elevada homogeneïtat entre les mostres. Per altra banda, els coeficients de correlació altament significatius obtinguts entre totes les mostres d'aquesta població van corroborar aquest resultat. Aquestes dades reafirmen l'adequació dels criteris d'inclusió utilitzats en la selecció dels individus d'aquesta població. A més a més, també indiquen que els protocols aplicats en el processament de les mostres i posterior anàlisi de miRNAs són eficaços i no provoquen distorsions metodològiques significatives.

La uniformitat dels resultats obtinguts està en consonància amb la falta de correlació detectada entre els valors d'expressió de miRNAs i les característiques d'edat i seminograma dels individus d'aquesta població. No obstant, no podem descartar que la manca de significança no estigui influenciada per la baixa potència estadística de l'anàlisi que no permeti detectar associacions moderades, atès que la mida mostral és reduïda.

L'elevat grau d'homogeneïtat observat en la població fèrtil indica l'existència de perfils de miRNAs estables en espermatozoides humans, i està en acord amb l'existència d'una retenció selectiva d'aquestes molècules durant l'espermatogènesi tal i com han suggerit anteriorment altres autors (revisat per Krawetz, 2005).

6.3.2. Característiques generals dels miRNAs espermàtics

Els perfils d'expressió observats en espermatozoides d'individus fèrtils va permetre identificar 221 miRNAs de forma ubiqua. D'aquest conjunt de molècules, 15 miRNAs (hsa-miR-15b-5p, -16-5p, -26a-5p, -30a-5p, -34b-5p, -34b-3p, -99a-5p, -100-5p, -122-5p, -146b-5p, -193b-5p, -374b-5p, -429, -512-3p, i -1275) havien estat descrits prèvi-

ament en espermatozoides i s'havien associat a processos relacionats amb l'espermatogènesi o embriogènesi (Wang *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2012a; Abu-Halima *et al.*, 2013, 2014b; Wu *et al.*, 2013). Per contra, 122 miRNAs no havien estat detectat en cap dels estudis publicats. Dels 63 miRNAs absents en totes les mostres analitzades, només dos d'ells (hsa-miR-19a-5p i hsa-miR-221-5p) havien estat descrits prèviament en espermatozoides humans per altres autors (Krawetz *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2012a; Abu-Halima *et al.*, 2013, 2014b).

De forma general podem observar que els perfils obtinguts en la població fèrtil van mostrar variacions substancials respecte els altres estudis publicats (Krawetz *et al.*, 2011; Abu-Halima *et al.*, 2013), sobretot en relació al nombre de miRNAs identificats. Considerem que la majoria de divergències detectades es podrien explicar per les diferències tècniques entre les metodologies d'anàlisi utilitzades (qRT-PCR, RNAseq i microarrays).

La tècnica d'RNAseq no es basa en l'avaluació d'assajos predefinits com el cas de la qRT-PCR o els microarrays, sinó que permet quantificar el conjunt total de transcrits presents en una mostra, fins i tot aquells que no han estat descrits prèviament (Pritchard *et al.*, 2012). Tanmateix, alguns autors han descrit que la precisió i sensibilitat de la tècnica d'RNAseq és més baixa que la obtinguda mitjançant qRT-PCR, tant pel que fa a l'anàlisi dels transcrits petits (inclosos els miRNAs) com per a la capacitat d'identificar canvis d'una sola base (*single nucleotide polymorphism*; SNP) (Git *et al.*, 2010; Kogenaru *et al.*, 2012). El principal inconvenient d'utilitzar aquesta metodologia en l'anàlisi d'RNA espermàtic és que requereix una elevada quantitat d'RNA de partida (>250ng), la qual és molt difícil d'aconseguir en mostres d'espermatozoides purificats a partir d'un sol ejaculat (Meyer *et al.*, 2010). Aquesta limitació és especialment rellevant en el cas de realitzar estudis en pacients amb recomptes espermàtics baixos.

En relació a la tècnica de microarrays, aquesta metodologia permet quantificar centenars de miRNAs a través de la utilització de sondes amb seqüències complementàries a les molècules d'interès (Pritchard *et al.*, 2012). Tot i que permet analitzar un nombre més elevat de miRNAs que mitjançant qRT-PCR per TaqMan® *arrays* (1,349 vs. 736 respectivament), la seva especificitat i sensibilitat és menor (Chen *et al.*, 2009; Koshiol *et al.*, 2010).

Així doncs, tot i les limitacions inherents a la tècnica de qRT-PCR escollida per dur a terme els nostres estudis, considerem que els valors d'expressió que proporciona són precisos i fiables, dos aspectes bàsics que ens han permès realitzar una caracterització òptima del perfil dels miRNAs espermàtics.

MiRNAs més abundants

El llistat dels 10 miRNAs més abundants en espermatozoides d'individus fèrtils es descriu a la **Taula 6.1**. La revisió bibliogràfica de les funcions associades a aquest miRNAs va mostrar que quatre molècules presentaven una funció relacionada, directa o indirectament, amb la fertilitat masculina: El hsa-miR-34b-3p pertany a la família miR-34 i s'ha associat amb la regulació de la via de E2F-pRb (*Transcription Factor 1-Retinoblastoma protein*), necessària per entrar a la fase S del cicle cel·lular (Bao *et al.*, 2012). El hsa-miR-132-3p s'ha associat amb la progressió del cicle cel·lular mitjançant l'activació de MYC (*v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog*) (Pede *et al.*, 2013). Els hsa-miR-191-5p i hsa-miR-891a presenten un rol destacat en la fertilitat, el primer relacionat amb la diferenciació de la morfologia espermàtica i la progressió del cicle cel·lular (revisat per McIver *et al.*, 2012), i el segon amb la maduració dels espermatozoides durant el trànsit epididimal (Belleannée *et al.*, 2012).

Per altra banda, els miRNAs hsa-miR-19b-3p, -30b-5p, -30c-5p, -200c-3p, i -375 no se'ls ha atribuït una relació directa amb la fertilitat i s'han relacionat amb processos com d'envelliment i càncer (Xi *et al.*, 2006; Grillari *et al.*, 2010; Hackl *et al.*, 2010; Gao *et al.*, 2011; Radisky, 2011; Kong *et al.*, 2012). Finalment, encara no s'ha vinculat amb cap funció biològica coneguda al hsa-miR-1233-3p.

Taula 6.1. Funcions dels deu miRNAs més abundants en espermatozoides procedents d'individus fèrtils.

miRNA	Funcions	Referències
hsa-miR-34b-3p	Control del cicle cel·lular	(Bao *et al.*, 2012)
hsa-miR-375	Supressor tumoral	(Kong *et al.*, 2012)
hsa-miR-191-5p	Progressió del cicle cel·lular i diferenciació de la morfologia espermàtica	(McIver *et al.*, 2012)
hsa-miR-19b-3p	Progressió del càncer i control de l'envelliment	(Grillari *et al.*, 2010; Hackl *et al.*, 2010)
hsa-miR-200c-3p	Supressor tumoral	(Radisky, 2011)
hsa-miR-132-3p	Progressió del cicle cel·lular	(Pede *et al.*, 2013)
hsa-miR-30c-5p	Progressió del càncer, diferenciació d'osteoblasts i cèl·lules epitelials	(Xi *et al.*, 2006; Gao *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2012)
hsa-miR-891a	Maduració epididimal dels espermatozoides	(Belleannée *et al.*, 2012)
hsa-miR-30b-5p	Progressió del càncer i diferenciació d'osteoblast i cèl·lules epitelials	(Xi *et al.*, 2006; Gao *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2012)
hsa-miR-1233-3p	SD	SD

SD: Sense dades publicades

MiRNAs més estables

Entre els 10 miRNAs amb nivells d'expressió més estables (**Taula 6.2**), el hsa-miR-744 està implicat en funcions relacionades amb la fertilitat masculina, ja que participa en processos de proliferació cel·lular, diferenciació i apoptosi (revisat per Massague, 1998) a través de la regulació del factor de creixement *TGFB1* (Martin *et al.*, 2011). Per altra banda, el hsa-miR-638 s'ha relacionat amb el desenvolupament embrionari i també amb la progressió de diferents tipus de càncers (carcinoma hepatocel·lular, carcinoma del cèrvix uterí i adenocarcinoma d'estómac) (Lin *et al.*, 2013).

Altres miRNAs d'aquesta llista s'han relacionat amb el creixement i progressió de processos tumorals: hsa-miR-663b (leucèmia i càncer de bufeta) (Takada *et al.*, 2008; Du *et al.*, 2015), hsa-miR-564 (leucèmia i càncer gàstric) (Rokah *et al.*, 2012; Chang *et al.*, 2015), hsa-miR-935 (càncer de cèrvix uterí) (Lui *et al.*, 2007), hsa-let-7d (càncer de cap i coll) (Childs *et al.*, 2009), hsa-miR-543 (càncer de mama, carcinoma hepàtic i càncer gàstric) (Feifei *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015a), i hsa-miR-572 (carcinoma de cèl·lules basals i càncer d'ovaris) (Sand *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2015). Pel que fa als dos miRNAs restants (hsa-miR-1180 i hsa-miR-1282), encara no s'han relacionat directament amb cap procés biològic conegut.

Taula 6.2. Funcions dels deu miRNAs més estables en espermatozoides humans procedents d'individus fèrtils.

miRNA	Funcions	Referències
hsa-miR-663b	Progressió de la leucèmia i del càncer de bufeta	(Takada *et al.*, 2008; Du *et al.*, 2015)
hsa-miR-564	Progressió de la leucèmia i del càncer gàstric	(Rokah *et al.*, 2012; Chang *et al.*, 2015)
hsa-miR-744-5p	Proliferació cel·lular, diferenciació i apoptosi	(Massague, 1998)
hsa-miR-1282	SD	SD
hsa-miR-935	Progressió del càncer cervical	(Lui *et al.*, 2007)
hsa-let-7d-5p	Progressió del càncer coll	(Childs *et al.*, 2009)
hsa-miR-543	Progressió del càncer de mama, del carcinoma hepàtic i del càncer gàstric	(Feifei *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015b)
hsa-miR-572	Progressió del carcinoma de les cèl·lules basals i del càncer d'ovaris	(Sand *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2015)
hsa-miR-1180	SD	SD
hsa-miR-638	Embriogènesi i progressió del càncer	(Lin *et al.*, 2013)

SD: Sense dades publicades

Famílies de miRNAs

En relació a les famílies de miRNA més representades entre els miRNAs presents en tots els individus de la població fèrtil, destaca la presència de la totalitat de membres de les famílies miR-30 i miR-10 (**Taula 6.3**), ambdues associades amb la fertilitat masculina.

La família miR-30 s'ha relacionat amb la via Hedgehog en *Danio rerio* (peix zebra) (Ketley *et al.*, 2013), una ruta de senyalització extensament estudiada que participa en el desenvolupament embrionari des de *Drosophila sp.* a humans (Chang *et al.*, 1994; Marigo *et al.*, 1995). Aquesta família també s'ha relacionat amb el factor de transcripció *Xlim1*, localitzat dins de la caixa LIM homeobox 1 (*Lhx1*), que està involucrada amb l'organització dels teixits, el control de la morfogènesi neuronal i la diferenciació dels embrions de *Xenopus sp.* (Taira *et al.*, 1992; Hobert i Westphal, 2000). De manera addicional, també s'ha suggerit que aquesta família participa en el desenvolupament endometrial en humans (Ye *et al.*, 2012). Tal com s'ha comentat anteriorment, dos dels membres d'aquesta família (hsa-miR-30b-5p i hsa-miR-30c-5p) s'han trobat entre els 10 miRNAs més abundants.

Pel que fa a la família miR-10, aquesta es distribueix dins de l'anomenat clúster de gens de desenvolupament *HOX*, altament conservat al llarg de l'evolució en mamífers (Tanzer *et al.*, 2005; Quinonez i Innis, 2014). La família miR-10 conté cinc miRNAs (miR-10a, miR-10b, miR-196a-1, miR-196a-2, i miR-196b) (Lemons i McGinnis, 2006) que s'han identificat en tots els individus fèrtils. Existeixen evidències de que molts gens diana de la família miR-10 són gens *HOX*. Per exemple, en l'espècie *Danio rerio* s'ha descrit que el miRNA miR-10 regula els gens *hoxb1a*, i *hoxb3a* (Woltering i Durston, 2008).

En els espermatozoides de tots els individus fèrtils també s'han identificat més del 50% dels miRNAs de les famílies let-7 (diferenciació de gàmetes) (Pasquinelli *et al.*, 2000; Tennessen i Thummel, 2008; McIver *et al.*, 2012), miR-8 (promoció del creixement cel·lular) (Hyun *et al.*, 2009), miR-15 (control del cicle cel·lular) (Klein *et al.*, 2010), miR-17 (control cicle cel·lular, desenvolupament en mamífers i diferenciació) (Foshay i Gallicano, 2009; Trompeter *et al.*, 2011), miR-28 (regulació del càncer) (Almeida *et al.*, 2012), miR-99 (regulació del càncer) (Sun *et al.*, 2011), miR-188 (control del sistema nerviós) (Lee *et al.*, 2012), i miR-743 (funció desconeguda).

Taula 6.3. Famílies de miRNAs més representades en espermatozoides humans procedents d'individus fèrtils.

Família miRNA	% membres detectats	Funcions	Referències
miR-30	100%	Embriogènesi, desenvolupament de l'endometri i diferenciació cel·lular	(Taira *et al.*, 1992; Hobert i Westphal, 2000; Ye *et al.*, 2012; Ketley *et al.*, 2013)
miR-10	100%	Diferenciació cel·lular i desenvolupament	(Tanzer *et al.*, 2005; Woltering i Durston, 2008; Foley *et al.*, 2011)
miR-17	87.5%	Control del cicle cel·lular, desenvolupament cel·lular i diferenciació	(Foshay and Gallicano, 2009; Trompeter *et al.*, 2011)
miR-743	87.5%	SD	SD
miR-28	66.6%	Progressió del càncer	(Almeida *et al.*, 2012)
miR-188	66.6%	Control de la sinapsi i plasticitat dendrítica	(Lee *et al.*, 2012)
miR-99	66.6%	Progressió del càncer	(Sun *et al.*, 2011)
miR-8	60%	Promoció del creixement cel·lular	(Hyun *et al.*, 2009)
miR-15	60%	Control del cicle cel·lular	(Klein *et al.*, 2010)
let-7	50%	Diferenciació dels gàmetes	(Pasquinelli *et al.*, 2000; Tennessen i Thummel, 2008; McIver *et al.*, 2012)

SD: Sense dades publicades

En definitiva, l'anàlisi dels miRNAs més abundants, més estables i les famílies més representades en espermatozoides d'individus fèrtils reforcen la hipòtesi de que aquestes molècules no són simples romanents del procés de l'espermatogènesi sinó que constitueixen una càrrega precisa que mostra una clara relació amb processos implicats en la fertilitat.

Predicció gens diana i ontologia gènica dels miRNAs amb expressió ubiqua

Entre els 2,356 gens diana predits pels 221 miRNAs presents de manera constant en els 10 individus fèrtils analitzats, els gens *PTPRD, FIGN, MLL, CPEB2, KLF12*, i *TNRC6B* van aparèixer com les dianes compartides per més miRNAs (>15 miRNAs diferents). Aquests transcrits es van considerar essencials en la regulació de processos biològics relacionats amb la fertilitat. De fet, les funcions descrites a la bibliografia per aquests gens van revelar una forta vinculació amb processos d'espermatogènesi o embriogènesi, així com amb les rutes de síntesi de miRNAs (**Taula 6.4**).

Concretament el gen *protein tyrosine phosphatase receptor type delta* (*PTPRD*) (diana predita per 27 miRNAs diferents presents en tots els individus fèrtils) és un membre de la família de les proteïnes tirosina fosfatases, les quals estan relacionades amb una gran varietat de processos cel·lulars que inclouen la diferenciació i creixement cel·lular, i la regulació de la mitosi (Denu i Dixon, 1998; Paul i Lombroso, 2003;

Clark *et al.*, 2012). El gen *fidgetin belongs to the superfamily of ATPases associated with diverse cellular activities (AAA-ATPases)* o *FIGN*, (predit per 20 miRNAs diferents) duu a terme un rol important pel desenvolupament embrionari en mamífers (Cox *et al.*, 2000; Bar-Nun i Glickman, 2012). La seva activitat principal s'ha associat amb la despolimerització dels microtúbuls, procés relacionat amb el manteniment de l'arquitectura del fus mitòtic i la dinàmica de l'anafase A (Mukherjee *et al.*, 2012). El gen *mixed-lineage leukemia* (*MLL*) (predit per 20 miRNAs) és un regulador positiu de la transcripció que s'ha relacionat amb la preservació de la memòria epigenètica transcripcional, el desenvolupament embrionari primerenc i hematopoiesi (Rizzo *et al.*, 2011). La proteïna codificada per el transcrit *CPEB2* (predit per 17 miRNAs) és molt similar a la proteïna *cytoplasmic polyadenylation element binding* (CPEB), responsable de la traducció de les proteïnes *synaptonemal complex proteins* (SCPs) durant la meiosi. L'expressió de *CEPB2* però, té lloc a un estadi posterior (espermàtides rodones) que alguns autors han associat a un rol regulador de la traducció d'mRNAs durant l'espermiogènesi (Kurihara *et al.*, 2003). El gen *kruppel-like factor 12* (*KLF12*) o també anomenat *activator protein-2* (*AP-2*) (predit per 17 miRNAs), és un factor de transcripció relacionat amb el desenvolupament de vertebrats i la carcinogènesi (Zhu *et al.*, 2001). Finalment el gen *trinucleotide repeat-containing 6B* (*TNRC6B*) (predit per 27 miRNAs), codifica per una proteïna que interacciona amb les proteïnes AGO i per tant s'ha relacionat amb el mecanisme de regulació de l'expressió gènica mediada per miRNAs (Meister *et al.*, 2005).

Taula 6.4. Dianes predites per més de 15 miRNAs d'entre tots els que presenten una expressió ubiqua en espermatozoides d'individus fèrtils.

Gen	Nombre de miRNAs que el regulen	Funcions	Referències
PTPRD	27	Diferenciació i creixement cel·lular, i regulació de la mitosi	(Denu i Dixon, 1998; Paul i Lombroso, 2003; Clark *et al.*, 2012)
TNRC6B	27	Biosíntesi i funció dels miRNAs	(Meister *et al.*, 2005)
FIGN	20	Desenvolupament embrionari i manteniment de l'arquitectura del fus mitòtic	(Bar-Nun i Glickman, 2012; Mukherjee *et al.*, 2012)
MLL	20	Modificació de la cromatina, desenvolupament embrionari primerenc i hematopoesi	(Rizzo *et al.*, 2011)
CPEB2	17	Traducció d'mRNAs en l'espermiogènesi	(Kurihara *et al.*, 2003)
KLF12 o *AP-2*	17	Desenvolupament embrionari	(Zhu *et al.*, 2001)

L'anàlisi de GO de les 2,356 dianes predites pels miRNAs d'expressió ubiqua en individus fèrtils va permetre identificar processos biològics enriquits relacionats amb la diferenciació i desenvolupament cel·lular, la morfogènesi i l'embriogènesi. Aquests resultats indiquen que el conjunt de miRNAs amb una presència constant en espermatozoides són rellevants per la fertilitat masculina.

Entre els processos més significatius regulats per aquests miRNAs destaquen[10]: i) *Regulation of cell development* (GO:0045595), que es defineix com el procés que modula la formació de tots els tipus cel·lulars; ii) C*ell fate commitment* (GO:0045165), procés pel qual les cèl·lules es diferencien i donen lloc als diferents tipus cel·lulars, tant somàtics com germinals; iii) *Embryonic morphogenesis* (GO:0048598), procés implicat en la generació i organització de les estructures anatòmiques durant la fase embrionària.

D'altra banda, l'anàlisi mitjançant GO dels 597 gens diana predits pels miRNAs absents en espermatozoides de tots els individus fèrtils, no va mostrar cap enriquiment de processos relacionats amb espermatogènesi o embriogènesi. Els únics processos que van mostrar un enriquiment significatius estaven relacionats amb aspectes generals com la regulació de la transcripció (GO:0006351, GO:0006357, GO:0006355, GO:0045893, GO:0045944, GO:0045893) o la síntesi de molècules (GO:0010557, GO:0009891, GO:0031328). El fet de no detectar cap relació amb la fertilitat per part dels processos vinculats al conjunt de miRNAs constantment absents en espermatozoides recolza la hipòtesi de que el perfil de miRNAs espermàtics no és resultat d'un procés aleatori.

6.3.3. Parelles de miRNA estables com a candidats a biomarcadors

En reproducció humana existeix un debat creixent sobre la fiabilitat de l'anàlisi dels paràmetres estàndards del semen com a valors indicadors de fertilitat (Lewis, 2007). Per aquesta raó, estudis recents s'han centrat en la identificació de nous biomarcadors de fertilitat, entre els que destaquen les investigacions dirigides a l'anàlisi del transcriptoma. Fins ara s'han descrit un centenar de molècules d'mRNAs com a biomarcadors de fertilitat (revisat per Garrido *et al.*, 2013). Recentment, s'ha proposat la

[10] La descripció dels processos biològics s'ha obtingut de Gene Ontology Consortium (Novembre 2015 (http://geneontology.org/).

utilització de parelles de transcrits amb nivells d'expressió relativa estable com a eina biomarcadora (Lalancette *et al.*, 2009; Lima-Souza *et al.*, 2012).

Amb la finalitat d'utilitzar una estratègia similar però basada en els nostres estudis, vam valorar la presència de parelles de miRNAs amb una expressió correlacionada i estable en espermatozoides procedents d'individus fèrtils. Es van identificar 48 parelles amb nivells de correlació molt elevats. La parella amb major índex d'estabilitat va ser la formada per hsa-miR-20a-5p/hsa-miR-106a-5p. Aquests dos miRNAs són membres de la mateixa família (miR-17), la qual ha estat relacionada per alguns autors amb el desenvolupament de mamífers i la diferenciació de cèl·lules mare (Foshay i Gallicano, 2009). Curiosament, dues de les altres parelles identificades també estaven formades per miRNAs de la mateixa família: miR-30 (hsa-miR-30a-3p/hsa-miR-30e-3p, i hsa-miR-30a-5p/hsa-miR-30d-5p). Les funcions d'aquesta família han estat relacionades amb el desenvolupament embrionari, la morfogènesi, i la diferenciació cel·lular en diferents espècies (Taira *et al.*, 1992; Chang *et al.*, 1994; Marigo *et al.*, 1995; Hobert i Westphal, 2000; Ketley *et al.*, 2013).

Aquests resultats són un punt de partida per estudis futurs en els que caldrà avaluar el comportament d'aquestes parelles de miRNAs en poblacions d'individus infèrtils per tal d'establir el seu valor diagnòstic i confirmar la seva validesa com a biomarcadors de fertilitat.

6.4. Perfils d'expressió de miRNAs en individus infèrtils

6.4.1. Homogeneïtat de les poblacions infèrtils

L'anàlisi d'homogeneïtat dins de cadascuna de les poblacions d'individus infèrtils es va realitzar tenint en compte l'agrupació de les mostres en base a la presència/absència de miRNAs i els valors de rho de les correlacions mostra-mostra. En el primer cas, les diferències observades van ser inferiors al 25% en tots els grups d'individus analitzats, un resultat que va indicar una elevada homogeneïtat dels perfils d'expressió de miRNAs dins de cada grup. Per altra banda, els coeficients de correlació altament significatius obtinguts entre mostres amb la mateixa alteració seminal van corroborar aquest resultat.

6.4.2. Variables explicatives dels perfils d'expressió

Els resultats de l'anàlisi conglomerats jeràrquics on es reflexa el grau de semblança dels perfils d'expressió de miRNAs de la totalitat de les mostres analitzades (població fèrtil i poblacions d'individus infèrtils), van evidenciar la presència de dos grups principals d'individus diferenciats en un 40%. Tal i com es descriu a continuació, aquesta distribució va mostrar una associació significativa amb la variable seminograma. La resta de variables analitzades (edat, la incidència d'anomalies cromosòmiques, resultats de TRA) no van presentar relacions significatives amb la distribució dels individus.

6.4.2.1. Relació amb seminograma

El seminograma va ser la única variable que va mostrar una distribució diferencial en els dos grups d'individus que constituïen el dendrograma. Tots els individus amb teratozoospèrmia van quedar agrupats al mateix grup, mentre que de tots els individus fèrtils van quedar agrupats a l'altre conjunt. Aquest resultat va confirmar l'elevada homogeneïtat dels perfils de miRNAs dins d'aquests dos grups d'individus, a la vegada que va indicar la poca similitud existent entre les dues poblacions. Per altra banda, els individus amb astenozoospèrmia van mostrar una agrupació preferencial amb la població fèrtil, resultat que indica l'elevada semblança d'ambdues poblacions. Per últim, els individus amb oligozoospèrmia van quedar distribuïts equitativament entre els dos grups, fet que assenyala aquesta població com la més heterogènia. Aquesta dada coincideix amb els resultats obtinguts en l'anàlisi d'homogeneïtat de les poblacions, els quals van mostrar una major variabilitat (rang de rho més ampli) entre els individus de la població amb oligozoospèrmia.

Amb la finalitat de determinar l'existència d'un conjunt de miRNAs que puguin explicar de forma específica la relació entre el seminograma i els perfils d'expressió obtinguts es van realitzar correlacions entre els valors d'expressió de cada miRNA respecte les variables recompte, motilitat, i morfologia espermàtiques. Els nivells d'expressió del miRNA hsa-miR-629-3p van mostrar una correlació negativa amb la motilitat espermàtica: a menor presència d'aquest miRNA (valors normCt més elevats), menor motilitat dels espermatozoides. No obstant això, la revisió bibliogràfica de les funcions de les dianes validades per aquest miRNA no va mostrar cap relació amb la fertilitat ni amb processos vinculats amb el moviment cel·lular.

Tres miRNAs (i.e., hsa-miR-335-5p, hsa-miR-885-5p, i hsa-miR-152-3p) van mostrar correlacions negatives amb la concentració espermàtica: a menor presència d'aquests miRNAs (valors normCt més elevats), menor producció d'espermatozoides. Pel que fa al miRNA hsa-miR-335-5p, alguns autors han descrit prèviament la seva presència en espermatozoides d'individus fèrtils (Krawetz *et al.*, 2011; Abu-Halima *et al.*, 2013) i la seva expressió diferencial en individus infèrtils amb oligoastenozoospèrmia (Abu-Halima *et al.*, 2013). Els gens diana validats per aquest miRNA, entre els que s'inclouen *BCL2L2, BIRC5, MAPK1, MERTK, PTPRN2, RASA1,* i *SOX4*, s'han relacionat amb processos de mort cel·lular, supervivència i proliferació cel·lular. Per tant, la regulació diferencial d'aquests gens, a partir de la desregulació de hsa-miR-335-5p, podria provocar alteracions en aquests processos i explicar, en certa mesura, la relació obtinguda entre l'expressió d'aquest miRNA i la baixa producció d'espermatozoides (Print i Loveland, 2000). Pel que fa als altres dos miRNAs, tant hsa-miR-885-5p com hsa-miR-152-3p, havien estat detectats prèviament en espermatozoides d'individus fèrtils (**Taula suplementària 1**), tot i que no hi ha dades publicades que sostinguin la seva implicació amb la producció espermàtica.

Finalment, cap miRNA va mostrar una correlació significativa amb el paràmetre de morfologia espermàtica, malgrat que la població amb teratozoospèrmia estava distribuïda en un grup totalment diferenciat a la població fèrtil.

En conjunt, podem afirmar que la relació obtinguda entre els miRNAs i seminograma està més relacionada amb la presència d'un perfil miRNAs espermàtics diferencial, que no pas per valors d'expressió incrementats/disminuïts de determinats miRNAs particulars.

6.4.2.2. Relació amb edat

Alguns autors han descrit una expressió diferencial de miRNAs circulants en sang entre individus joves i individus d'edat avançada, i ho han relacionat amb malalties associades amb l'edat com el càncer i les alteracions cardiovasculars (Esteller, 2011; Hatse *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015b; Wang *et al.*, 2015). També s'ha demostrat que alteracions en l'expressió de miRNAs, -així com d'altres ncRNAs com els lncRNAs-, estan associades a l'envelliment cardiovascular i a un major risc de patir cardiomio-

paties (revisat per Greco *et al.*, 2015). D'altra banda, s'ha proposat que alguns miRNAs circulants (i.e., hsa-miR-151a-5p, -181a-5p, i -1248) podrien actuar com a marcadors de l'edat biològica de l'individu (Noren Hooten *et al.*, 2013).

Tot i això, en el nostre estudi de miRNAs espermàtics no es va observar una associació entre el perfil global d'expressió de miRNAs i l'edat dels individus. Aquest fet indicaria una manca d'influència de l'edat de l'individu sobre el perfil de miRNAs en espermatozoides, almenys pel que fa al rang d'edat dels individus avaluats (entre 20-50 anys) i en base a la mida mostral analitzada.

De totes maneres, un miRNA específic, el hsa-miR-34b-3p, va mostrar una correlació positiva amb l'edat: a major edat de l'individu, menor expressió d'hsa-miR-34b-3p (valors normCt més elevats). Entre les dianes validades per aquest miRNA s'hi inclouen els gens *CCND1, CDK4, CDK6, MYC,* i *NOTCH1*. Aquests gens estan implicats en funcions relacionades amb la progressió del cicle cel·lular i l'apoptosi, processos que normalment es relacionen amb l'envelliment, i per tant amb l'edat, dels individus (Masoro i Austad, 2011).

6.4.2.3. Relació amb anomalies cromosòmiques numèriques

Hi ha estudis que relacionen una expressió diferencial de miRNAs amb inestabilitat cromosòmica (e.g. delecions i duplicacions, reorganitzacions estructurals, i aneuploïdies) i càncer (Dinami *et al.*, 2014; Hell *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014). En aquest sentit, l'expressió diferencial de determinats miRNAs s'ha relacionat amb fenòmens inductors d'anomalies cromosòmiques, com la fragilitat telomèrica (miR-155; Dinami *et al.*, 2014), disfuncions del mecanisme de resposta als trencaments de doble cadena del DNA (miR-214; Wang *et al.*, 2014), o una disminució de la eficiència dels punts de control mitòtics (mir-28-5p; Hell *et al.*, 2014).

Malgrat això, els nostres resultats no van mostrar cap associació entre la incidència d'anomalies numèriques en espermatozoides pels cromosomes 13, 18, 21, X i Y i el perfil global de miRNAs analitzats. A més, no vam observar cap miRNA amb valors d'expressió correlacionats amb el percentatge d'anomalies detectades per aquests cromosomes. Cal tenir en compte que els cinc cromosomes seleccionats per a dur a terme aquest estudi es consideren els millors indicadors per identificar increments

significatius d'anomalies numèriques en espermatozoides (Sarrate *et al.*, 2010). Tanmateix, no podem descartar una possible relació entre els perfils de miRNAs obtinguts i la presència d'altres tipus d'anomalies, com per exemple les estructurals.

6.4.2.4. Relació amb resultats de TRA

No vam observar cap relació entre els paràmetres de TRA analitzats (taxa de fecundació, taxa d'embrions descartats, taxa d'embaràs i taxa d'avortament) i l'agrupació dels perfils d'expressió de miRNAs. De totes maneres cal tenir en compte que la mida mostral analitzada és limitada per descartar categòricament una influència d'aquests perfils en esdeveniments post-fecundació.

De fet, existeixen diverses evidències que apunten a una afectació dels processos de fecundació i desenvolupament embrionari primerenc a partir de la càrrega de miRNAs transmesos per l'espermatozoide. En primer lloc, els nostres resultats en població fèrtil han mostrat que els perfils de miRNAs espermàtics presenten una relació -a través dels seus gens diana-, amb processos com la diferenciació i desenvolupament cel·lular, la morfogènesi i l'embriogènesi (veure apartat 6.3). Per altra banda, estudis en models murins han atribuït un origen exclusivament patern a determinats miRNAs identificats en zigots i embrions a l'estadi de dues cèl·lules (mmu-miR-34b-5p, mmu-miR-34c, mmu-miR-99a-5p, mmu-miR-214-5p, mmu-miR-449a/b/c; Liu *et al.*, 2012). Alguns autors han determinat que el mmu-miR-34c és essencial per a l'assoliment de la primera divisió embrionària (Liu *et al.*, 2012b), tot i que un estudi recent qüestiona aquest resultat (Yuan *et al.*, 2015). A més, aquest miRNA ha estat relacionat amb un augment d'embrions de bona qualitat a dia 3, un augment de les taxes d'implantació i embaràs, i un increment de nens nascuts (Cui *et al.*, 2015).

Tenint en compte aquestes evidències, existeix la possibilitat que alteracions en la càrrega de miRNAs en espermatozoides tinguin un impacte negatiu en el desenvolupament de l'embrió i per tant en la fertilitat de l'individu.

6.4.3. Caracterització dels DE-miRNAs

La comparació dels perfils d'expressió entre la població fèrtil i les tres poblacions infèrtils va permetre identificar 57 DE-miRNAs: 32 DE-miRNAs (26 sobre-expressats i 6 sub-expressats) en la població d'individus amb astenozoospèrmia, 19 DE-miRNAs

(11 sobre-expressats i 8 sub-expressats) en la d'individus amb teratozoospèrmia i 18 (3 sobre-expressats i 15 sub-expressats) en la d'individus amb oligozoospèrmia.

Només dos dels miRNAs sobre-expressats detectats en la població d'individus amb astenozoospèrmia (hsa-miR-27a-5p i hsa-miR-34b-3p) coincidien amb els resultats descrits prèviament per altres autors (Abu-Halima *et al.*, 2013). Aquests mateixos investigadors van identificar sis miRNAs sub-expressats (hsa-miR-9-3p, -15b-5p, -34b-3p, -132-5p, -335-5p, i -520h), que també ho estaven en les nostres poblacions d'individus amb astenozoospèrmia i oligozoospèrmia.

Així doncs, els nostres resultats i els publicats per Abu-Halima i col·laboradors (2013) són força discordants pel que fa a la identificació de DE-miRNAs. Aquestes variacions es podrien explicar per l'existència de diferències interindividuals dins de les poblacions analitzades, tot i que com ja hem comentat anteriorment (veure apartat 6.3.2), les tècniques utilitzades (microarrays versus qRT-PCR) presenten sensibilitats i especificitats molt diferents que també poden condicionar els resultats obtinguts.

6.4.3.1. Localització genòmica dels DE-miRNAs

S'ha descrit que un 70% dels gens que codifiquen per miRNAs es localitzen en regions intròniques de gens hoste (Rodriguez *et al.*, 2004). És important tenir en compte que els miRNAs intragènics són transcrits pels promotors d'aquests gens hoste mentre que el control de la transcripció dels miRNAs intergènics es realitza mitjançant un promotor propi (Lagos-quintana *et al.*, 2003; Lim *et al.*, 2003; Bartel *et al.*, 2004). Els nostres resultats van mostrar un increment significatiu de DE-miRNAs localitzats en introns. Per tant, seria esperable que l'expressió alterada d'aquests miRNAs anés acompanyada d'una desregulació de l'expressió dels gens inclosos en aquestes unitats de transcripció. L'anàlisi d'aquestes regions va permetre la identificació de 29 gens, 9 dels quals (i.e., *DALRD3, HOXC4, HOXC5, IFT80, IGF2, LPP, MEST, PTK2,* i *SMC4*) es van poder relacionar directament amb l'espermatogènesi i embriogènesi (**Taula 4.15**). L'anàlisi dels nivells d'expressió d'aquests gens en cèl·lules germinals en diferents estadis de diferenciació, podria ajudar a elucidar el seu rol en la fertilitat humana. No obstant, som conscients que la dificultat en l'obtenció de teixit testicular humà limita la realització d'aquests tipus d'anàlisis.

6.4.3.2. Predicció de gens diana dels DE-miRNAs i ontologia gènica

L'anàlisi d'ontologia gènica dels gens diana predits pels DE-miRNAs detectats en cada població d'individus infèrtils va demostrar un increment significatiu de processos biològics relacionats amb l'espermatogènesi i l'embriogènesi[11]. Tot i que la relació entre aquests processos i l'embriogènesi es basa en aspectes de caràcter general, en el cas de la relació amb seminograma es fa palès l'existència d'un vincle molt més específic. Per exemple, entre els processos enriquits en els individus amb astenozoospèrmia destaca *Cell motion* (GO:0006928), el qual es defineix com el procés de moviment autopropulsat d'una cèl·lula o component subcel·lular sense la participació d'un agent extern. L'enriquiment d'aquest procés en individus que precisament mostren una reducció de la motilitat dels espermatozoides posa en evidencia aquesta relació.

En la població d'individus amb teratozoospèrmia els gens diana es van relacionar amb processos com *Cell morphogenesis* (GO:0000902)*, Cell projection morphogenesis* (GO:0048858), *Cellular component morphogenesis* (GO:0032989) i *Cell part morphogenesis* (GO:0032990). Aquests processos estan implicats en la generació de cèl·lules i estructures cel·lulars, la seva morfologia, i organització. Per tant, el seu enriquiment en individus que presenten alteracions en la morfologia dels espermatozoides també permet vincular els resultats observats i les característiques seminals d'aquesta població.

En el cas dels individus amb oligozoospèrmia, la relació que s'estableix entre els processos biològics enriquits i el seminograma no és tan obvia. Entre ells hi trobem *Cell projection morphogenesis* (GO:0048858)*, Cell part morphogenesis* (GO:0032990), i *Cell morphogenesis* (GO:0000902), els quals estan implicats en la generació de cèl·lules i estructures cel·lulars, en la seva organització i morfologia. Aquests processos podrien estar relacionats amb una reducció de la producció espermàtica i per tant, en última instància també es podrien relacionar amb l'alteració seminal d'aquests individus.

Per tal d'aprofundir en la identificació de gens associats a la infertilitat present en les tres poblacions d'individus infèrtils analitzades, d'entre totes les dianes potencials dels DE-miRNAs, es van seleccionar aquelles relacionades amb l'espermatogènesi

[11] La descripció dels processos biològics s'ha obtingut de Gene Ontology Consortium (Novembre 2015 (http://geneontology.org/).

o meiosis. Aquest filtratge va permetre identificar un conjunt de 74 gens en la població d'individus amb astenozoospèrmia, 75 amb teratozoospèrmia, i 26 en la d'oligozoospèrmia. D'aquests, se'n van trobar 11 que coincidien en les 3 poblacions (i.e., *BCL2L2, CCND2, CHEK1, DAZ1, DMWD, ESPL1, FNDC3A, SPAG16, PSME4, RAD51C*, i *STAG2*) els quals ja havien estat vinculats a alteracions de l'espermatogènesi i meiosi per altres autors (**Taula 4.18**). Per tant és probable que desregulacions d'aquests gens, causades per una expressió diferencial dels miRNAs que els regulen, puguin estar implicades en l'alteració de la fertilitat present en aquests individus.

Capítol 7. Conclusions

Capítol 7. Conclusions

Primera. La metodologia desenvolupada permet l'obtenció del transcriptoma complert de l'espermatozoide humà, inclosos els miRNAs, amb una elevada qualitat i puresa.

Segona. Els hsa-miR-532-5p, hsa-miR-374b-5p i hsa-miR-564 es poden utilitzar com a normalitzadors en estudis d'expressió de miRNAs en espermatozoides on s'avaluïn menys de 100 assajos.

Tercera. Els espermatozoides humans procedents d'individus fèrtils presenten una càrrega homogènia de miRNAs que indica una retenció no aleatòria d'aquestes molècules durant l'espermatogènesi.

Quarta. La revisió bibliogràfica de les funcions associades als miRNAs més abundants i més estables en espermatozoides d'individus fèrtils, així com de les famílies de miRNAs més representades en el transcriptoma espermàtic, reforça la hipòtesi de que aquestes molècules constitueixen una càrrega precisa que mostra una clara relació amb processos implicats en la fertilitat.

Cinquena. L'anàlisi d'ontologia gènica dels processos biològics associats a les dianes predites del miRNAs presents de forma ubiqua en els espermatozoides dels individus fèrtils, mostra un enriquiment selectiu de funcions rellevants per la fertilitat, com són la diferenciació i desenvolupament cel·lular, la morfogènesi, i l'embriogènesi.

Sisena. Existeix una clara relació entre els perfils d'expressió de miRNAs espermàtics i les condicions seminals que permet agrupar els individus en funció d'aquests paràmetres: els individus fèrtils i astenozoospèrmics mostren perfils d'expressió més similars els quals són els que més divergeixen dels individus amb teratozoospèrmia. Els individus oligozoospèrmics són els que mostren perfils d'expressió més heterogenis.

Setena. S'han descrit miRNAs correlacionats amb motilitat, concentració espermàtica i l'edat dels individus, mentre que no s'ha detectat cap relació amb morfologia espermàtica, anomalies cromosòmiques numèriques en espermatozoides i paràmetres de TRA.

Vuitena. S'han identificat un conjunt de 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.

Novena. 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.

Desena. L'anàlisi de la càrrega de miRNAs espermàtics ha permès elaborar un llistat de 26 gens que poden estar relacionats amb la infertilitat dels individus analitzats: 7 dianes de miRNAs correlacionats amb els paràmetres seminals, 9 gens localitzats en les mateixes unitats de transcripció que els DE-miRNAs i 11 dianes predites pels DE-miRNAs en individus infèrtils.

IV. Annex

IV.1. Material suplementari

Taula suplementària 1. Descripció dels miRNAs detectats en els espermatozoides de tots els individus fèrtils (S01-S10) i informació de la família i clúster al qual pertanyen.

miRBase ID	miRBase Accession number[a]	Família de miRNAs[b]	Clúster de miRNAs[b]
hsa-let-7a-5p	MIMAT0000062	let-7	let-7a
hsa-let-7b-5p	MIMAT0000063	let-7	let-7a
hsa-let-7c	MIMAT0000064	let-7	let-7c
hsa-let-7d-5p	MIMAT0000065	let-7	-
hsa-let-7g-5p	MIMAT0000414	let-7	let-7g
hsa-miR-7-1-3p	MIMAT0004553	-	miR-1179
hsa-miR-9-5p	MIMAT0000441	-	-
hsa-miR-9-3p	MIMAT0000442	-	-
hsa-miR-10a-5p	MIMAT0000253	miR-10	-
hsa-miR-10b-5p	MIMAT0000254	miR-10	-
hsa-miR-10b-3p	MIMAT0004556	miR-10	-
hsa-miR-15b-5p	MIMAT0000417	miR-15	-
hsa-miR-16-5p	MIMAT0000069	miR-15	miR-15a
hsa-miR-17-5p	MIMAT0000070	miR-17	miR-17
hsa-miR-19a-3p	MIMAT0000073	miR-19	miR-17
hsa-miR-19b-3p	MIMAT0000074	miR-19	miR-106a/miR-17
hsa-miR-20a-5p	MIMAT0000075	miR-17	miR-17
hsa-miR-20b-5p	MIMAT0001413	miR-17	miR-106a
hsa-miR-21-5p	MIMAT0000076	-	-
hsa-miR-22-5p	MIMAT0004495	-	-
hsa-miR-24-3p	MIMAT0000080	-	miR-181c/miR-23b
hsa-miR-25-3p	MIMAT0000081	miR-25	miR-106b
hsa-miR-26a-5p	MIMAT0000082	miR-26	-
hsa-miR-26b-5p	MIMAT0000083	miR-26	-
hsa-miR-26b-3p	MIMAT0004500	miR-26	-
hsa-miR-27a-3p	MIMAT0000084	miR-27	miR-181c
hsa-miR-28-5p	MIMAT0000085	miR-28	-
hsa-miR-28-3p	MIMAT0004502	miR-28	-
hsa-miR-29a-3p	MIMAT0000086	miR-29	miR-29a
hsa-miR-29c-5p	MIMAT0004673	miR-29	miR-29b
hsa-miR-30a-5p	MIMAT0000087	miR-30	miR-30a
hsa-miR-30a-3p	MIMAT0000088	miR-30	miR-30a
hsa-miR-30b-5p	MIMAT0000420	miR-30	miR-30b
hsa-miR-30c-5p	MIMAT0000244	miR-30	miR-30a/miR-30c
hsa-miR-30d-5p	MIMAT0000245	miR-30	miR-30b
hsa-miR-30d-3p	MIMAT0004551	miR-30	miR-30b
hsa-miR-30e-3p	MIMAT0000693	miR-30	miR-30c
hsa-miR-31-5p	MIMAT0000089	-	-
hsa-miR-31-3p	MIMAT0004504	-	-

hsa-miR-34b-5p	MIMAT0000685	miR-34	miR-34b
hsa-miR-34b-3p	MIMAT0004676	miR-34	miR-34b
hsa-miR-92a-3p	MIMAT0000092	miR-25	miR-106a/miR-17
hsa-miR-93-5p	MIMAT0000093	miR-17	miR-106b
hsa-miR-93-3p	MIMAT0004509	miR-17	miR-106b
hsa-miR-95	MIMAT0000094	miR-95	-
hsa-miR-99a-5p	MIMAT0000097	miR-99	let-7c
hsa-miR-99b-5p	MIMAT0000689	miR-99	let-7e
hsa-miR-99b-3p	MIMAT0004678	miR-99	let-7e
hsa-miR-100-5p	MIMAT0000098	miR-99	-
hsa-miR-103a-3p	MIMAT0000101	-	-
hsa-miR-106a-5p	MIMAT0000103	miR-17	miR-106a
hsa-miR-106b-5p	MIMAT0000680	miR-17	miR-106b
hsa-miR-106b-3p	MIMAT0004672	miR-17	miR-106b
hsa-miR-122-5p	MIMAT0000421	-	-
hsa-miR-125a-5p	MIMAT0000443	miR-125	let-7e
hsa-miR-125a-3p	MIMAT0004602	miR-125	let-7e
hsa-miR-125b-5p	MIMAT0000423	miR-125	-
hsa-miR-126-5p	MIMAT0000444	-	-
hsa-miR-126-3p	MIMAT0000445	-	-
hsa-miR-130a-3p	MIMAT0000425	miR-130	-
hsa-miR-130b-5p	MIMAT0004680	miR-130	miR-130b
hsa-miR-130b-3p	MIMAT0000691	miR-130	miR-130b
hsa-miR-132-3p	MIMAT0000426	miR-132	miR-132
hsa-miR-132-5p	MIMAT0004594	miR-132	miR-132
hsa-miR-133a-3p	MIMAT0000427	miR-133	miR-1
hsa-miR-135a-5p	MIMAT0000428	miR-135	let-7g
hsa-miR-135b-5p	MIMAT0000758	miR-135	-
hsa-miR-139-5p	MIMAT0000250	-	-
hsa-miR-140-5p	MIMAT0000431	-	-
hsa-miR-146a-5p	MIMAT0000449	miR-146	-
hsa-miR-146b-5p	MIMAT0002809	miR-146	-
hsa-miR-146b-3p	MIMAT0004766	miR-146	-
hsa-miR-148a-3p	MIMAT0000243	miR-148	-
hsa-miR-149-5p	MIMAT0000450	-	-
hsa-miR-149-3p	MIMAT0004609	-	-
hsa-miR-150-5p	MIMAT0000451	-	-
hsa-miR-151a-5p	MIMAT0004697	-	-
hsa-miR-152	MIMAT0000438	miR-148	-
hsa-miR-155-5p	MIMAT0000646	-	-
hsa-miR-181a-2-3p	MIMAT0004558	miR-181	miR-181a
hsa-miR-183-5p	MIMAT0000261	-	miR-182
hsa-miR-183-3p	MIMAT0004560	-	miR-182
hsa-miR-184	MIMAT0000454	-	-
hsa-miR-186-5p	MIMAT0000456	-	-
hsa-miR-190b	MIMAT0004929	miR-190	-
hsa-miR-191-5p	MIMAT0000440	-	miR-191
hsa-miR-191-3p	MIMAT0001618	-	miR-191
hsa-miR-192-5p	MIMAT0000222	miR-192	miR-192
hsa-miR-193a-5p	MIMAT0004614	miR-193	miR-193a
hsa-miR-193b-3p	MIMAT0002819	miR-193	miR-193b
hsa-miR-193b-5p	MIMAT0004767	miR-193	miR-193b

hsa-miR-194-5p	MIMAT0000460	-	miR-192/miR-194
hsa-miR-195-5p	MIMAT0000461	miR-15	miR-195
hsa-miR-197-3p	MIMAT0000227	-	-
hsa-miR-199a-3p	MIMAT0000232	miR-199	miR-199a
hsa-miR-200a-3p	MIMAT0000682	miR-8	miR-200a
hsa-miR-200b-3p	MIMAT0000318	miR-8	miR-200a
hsa-miR-200c-3p	MIMAT0000617	miR-8	miR-141
hsa-miR-202-3p	MIMAT0002811	-	-
hsa-miR-203a	MIMAT0000264	-	-
hsa-miR-204-5p	MIMAT0000265	miR-204	-
hsa-miR-205-5p	MIMAT0000266	-	-
hsa-miR-210	MIMAT0000267	-	-
hsa-miR-211-5p	MIMAT0000268	miR-204	-
hsa-miR-212-3p	MIMAT0000269	miR-132	miR-132
hsa-miR-214-3p	MIMAT0000271	-	miR-199a
hsa-miR-215	MIMAT0000272	miR-192	miR-194
hsa-miR-218-5p	MIMAT0000275	-	
hsa-miR-221-3p	MIMAT0000278	miR-221	miR-221
hsa-miR-222-3p	MIMAT0000279	miR-221	miR-221
hsa-miR-223-3p	MIMAT0000280	-	-
hsa-miR-224-5p	MIMAT0000281	-	miR-224
hsa-miR-296-5p	MIMAT0000690	-	miR-296
hsa-miR-320a	MIMAT0000510	miR-320	-
hsa-miR-320b	MIMAT0005792	miR-320	-
hsa-miR-323a-3p	MIMAT0000755	-	-
hsa-miR-324-3p	MIMAT0000762	-	-
hsa-miR-328	MIMAT0000752	-	-
hsa-miR-331-3p	MIMAT0000760	-	-
hsa-miR-335-5p	MIMAT0000765	-	-
hsa-miR-335-3p	MIMAT0004703	-	-
hsa-miR-339-3p	MIMAT0004702	-	-
hsa-miR-342-3p	MIMAT0000753	-	-
hsa-miR-345-5p	MIMAT0000772	-	-
hsa-miR-346	MIMAT0000773	-	-
hsa-miR-361-5p	MIMAT0000703	-	-
hsa-miR-363-3p	MIMAT0000707	-	miR-106a
hsa-miR-365a-3p	MIMAT0000710	-	-
hsa-miR-370	MIMAT0000722	-	miR-127
hsa-miR-371a-3p	MIMAT0000723	-	-
hsa-miR-372	MIMAT0000724	miR-290	miR-1283
hsa-miR-374a-5p	MIMAT0000727	miR-374	miR-374a
hsa-miR-374b-5p	MIMAT0004955	miR-374	miR-374b
hsa-miR-375	MIMAT0000728	-	-
hsa-miR-376a-3p	MIMAT0000729	miR-368	miR-1185
hsa-miR-378a-3p	MIMAT0000732	-	-
hsa-miR-382-5p	MIMAT0000737	miR-154	miR-1185
hsa-miR-409-3p	MIMAT0001639	miR-154	miR-1185
hsa-miR-423-5p	MIMAT0004748	-	-
hsa-miR-425-5p	MIMAT0003393	-	miR-191
hsa-miR-425-3p	MIMAT0001343	-	miR-191
hsa-miR-429	MIMAT0001536	miR-8	miR-200a
hsa-miR-483-5p	MIMAT0004761	-	-

hsa-miR-484	MIMAT0002174	-	-
hsa-miR-486-3p	MIMAT0004762	-	-
hsa-miR-486-5p	MIMAT0002177	-	-
hsa-miR-491-5p	MIMAT0002807	-	-
hsa-miR-495-3p	MIMAT0002817	miR-329	miR-1185
hsa-miR-505-5p	MIMAT0004776	-	-
hsa-miR-508-3p	MIMAT0002880	miR-506	miR-506
hsa-miR-512-3p	MIMAT0002823	miR-506	miR-1283
hsa-miR-516a-3p	MIMAT0002860	miR-515	miR-1283
hsa-miR-517-5p	MIMAT0002851	-	-
hsa-miR-517a-3p	MIMAT0002852	miR-515	miR-1283
hsa-miR-517c-3p	MIMAT0002866	miR-515	miR-1283
hsa-miR-518b	MIMAT0002844	miR-515	-
hsa-miR-518e-3p	MIMAT0002861	miR-515	miR-1283
hsa-miR-519a-3p	MIMAT0002869	miR-515	miR-1283
hsa-miR-519d	MIMAT0002853	miR-515	miR-1283
hsa-miR-520c-3p	MIMAT0002846	miR-515	miR-1283
hsa-miR-520g	MIMAT0002858	miR-515	miR-1283
hsa-miR-520h	MIMAT0002867	miR-515	miR-1283
hsa-miR-522-3p	MIMAT0002868	miR-515	miR-1283
hsa-miR-523-3p	MIMAT0002840	miR-515	miR-1283
hsa-miR-526b-5p	MIMAT0002835	miR-515	miR-1283
hsa-miR-532-5p	MIMAT0002888	miR-188	miR-188
hsa-miR-532-3p	MIMAT0004780	miR-188	miR-188
hsa-miR-539-5p	MIMAT0003163	miR-154	miR-1185
hsa-miR-543	MIMAT0004954	miR-329	miR-1185
hsa-miR-564	MIMAT0003228	-	-
hsa-miR-572	MIMAT0003237	-	-
hsa-miR-574-3p	MIMAT0003239	-	-
hsa-miR-592	MIMAT0003260	-	-
hsa-miR-598	MIMAT0003266	-	-
hsa-miR-601	MIMAT0003269	-	-
hsa-miR-616-5p	MIMAT0003284	-	-
hsa-miR-622	MIMAT0003291	-	-
hsa-miR-625-5p	MIMAT0003294	-	-
hsa-miR-625-3p	MIMAT0004808	-	-
hsa-miR-628-3p	MIMAT0003297	-	-
hsa-miR-629-3p	MIMAT0003298	-	-
hsa-miR-636	MIMAT0003306	-	-
hsa-miR-638	MIMAT0003308	-	-
hsa-miR-650	MIMAT0003320	-	-
hsa-miR-659-3p	MIMAT0003337	-	miR-658
hsa-miR-660-5p	MIMAT0003338	miR-188	miR-188
hsa-miR-661	MIMAT0003324	-	-
hsa-miR-663b	MIMAT0005867	miR-663	-
hsa-miR-664a-3p	MIMAT0005949	-	-
hsa-miR-671-3p	MIMAT0004819	-	-
hsa-miR-744-5p	MIMAT0004945	-	-
hsa-miR-744-3p	MIMAT0004946	-	-
hsa-miR-766-3p	MIMAT0003888	-	-
hsa-miR-769-5p	MIMAT0003886	-	-
hsa-miR-885-5p	MIMAT0004947	-	-

hsa-miR-888-5p	MIMAT0004916	miR-743	-
hsa-miR-890	MIMAT0004912	miR-743	-
hsa-miR-891a	MIMAT0004902	miR-891	-
hsa-miR-892a	MIMAT0004907	miR-743	-
hsa-miR-892b	MIMAT0004918	miR-743	-
hsa-miR-935	MIMAT0004978	-	-
hsa-miR-939-5p	MIMAT0004982	-	miR-1234
hsa-miR-942	MIMAT0004985	-	-
hsa-miR-1180	MIMAT0005825	-	-
hsa-miR-1183	MIMAT0005828	-	-
hsa-miR-1208	MIMAT0005873	-	-
hsa-miR-1233-3p	MIMAT0005588	-	-
hsa-miR-1247-5p	MIMAT0005899	-	-
hsa-miR-1254	MIMAT0005905	-	-
hsa-miR-1255b-5p	MIMAT0005945	miR-1255	-
hsa-miR-1260a	MIMAT0005911	-	-
hsa-miR-1275	MIMAT0005929	-	-
hsa-miR-1282	MIMAT0005940	-	-
hsa-miR-1285-3p	MIMAT0005876	-	-
hsa-miR-1290	MIMAT0005880	-	-
hsa-miR-1291	MIMAT0005881	-	-
hsa-miR-1296	MIMAT0005794	-	-
hsa-miR-1298	MIMAT0005800	-	miR-1298
hsa-miR-1825	MIMAT0006765	-	-

[a.] Informació obtinguda de la base de dades miRBase (http://www.mirbase.org).
[b.] Informació obtinguda de la base de dades TAM (http://cmbi.bjmu.edu.cn/tam).

Taula suplementària 2. Descripció dels miRNAs absents en els espermatozoides de tots els individus fèrtils (S01-S10) i informació de la família i clúster al qual pertanyen.

miRBase ID	miRBase accession number [a]	Família de miRNAs[b]	Clúster de miRNAs[b]
hsa-let-7d-3p	MIMAT0004484	let-7	-
hsa-let-7i-3p	MIMAT0004585	let-7	-
hsa-miR-18b-3p	MIMAT0004751	miR-17	miR-106a
hsa-miR-19a-5p	MIMAT0004490	miR-19	miR-17
hsa-miR-30b-3p	MIMAT0004589	miR-30	miR-30b
hsa-miR-32-3p	MIMAT0004505	-	-
hsa-miR-105-3p	MIMAT0004516	-	miR-105
hsa-miR-106a-3p	MIMAT0004517	miR-17	miR-106a
hsa-miR-137	MIMAT0000429	-	-
hsa-miR-185-3p	MIMAT0004611	-	-
hsa-miR-196a-3p	MIMAT0004562	miR-196	miR-196a
hsa-miR-218-1-3p	MIMAT0004565	-	-
hsa-miR-218-2-3p	MIMAT0004566	-	-
hsa-miR-221-5p	MIMAT0004568	miR-221	miR-221
hsa-miR-302b-5p	MIMAT0000714	miR-302	miR-302a
hsa-miR-325	MIMAT0000771	-	-
hsa-miR-337-3p	MIMAT0000754	-	miR-127
hsa-miR-367-5p	MIMAT0004686	-	miR-302a
hsa-miR-367-3p	MIMAT0000719	-	miR-302a
hsa-miR-369-5p	MIMAT0001621	miR-154	miR-1185

hsa-miR-374a-3p	MIMAT0004688	miR-374	miR-374a
hsa-miR-376b-3p	MIMAT0002172	miR-368	miR-1185
hsa-miR-448	MIMAT0001532	-	-
hsa-miR-450a-5p	MIMAT0001545	miR-450	miR-424
hsa-miR-500a-3p	MIMAT0002871	-	-
hsa-miR-503-5p	MIMAT0002874	-	miR-424
hsa-miR-524-5p	MIMAT0002849	miR-515	miR-1283
hsa-miR-542-5p	MIMAT0003340	-	miR-424
hsa-miR-548d-3p	MIMAT0003323	miR-548	-
hsa-miR-548e	MIMAT0005874	miR-548	-
hsa-miR-548h-5p	MIMAT0005928	miR-548	-
hsa-miR-548m	MIMAT0005917	miR-548	-
hsa-miR-548n	MIMAT0005916	miR-548	-
hsa-miR-555	MIMAT0003219	-	-
hsa-miR-556-5p	MIMAT0003220	-	-
hsa-miR-561-3p	MIMAT0003225	-	-
hsa-miR-569	MIMAT0003234	-	-
hsa-miR-570-3p	MIMAT0003235	miR-548	-
hsa-miR-599	MIMAT0003267	-	miR-599
hsa-miR-603	MIMAT0003271	miR-548	-
hsa-miR-607	MIMAT0003275	-	-
hsa-miR-624-3p	MIMAT0004807	-	-
hsa-miR-631	MIMAT0003300	-	-
hsa-miR-633	MIMAT0003303	-	-
hsa-miR-637	MIMAT0003307	-	-
hsa-miR-653	MIMAT0003328	-	miR-489
hsa-miR-658	MIMAT0003336	-	miR-658
hsa-miR-876-5p	MIMAT0004924	-	miR-873
hsa-miR-920	MIMAT0004970	-	-
hsa-miR-936	MIMAT0004979	-	-
hsa-miR-938	MIMAT0004981	-	-
hsa-miR-1179	MIMAT0005824	-	miR-1179
hsa-miR-1200	MIMAT0005863	-	-
hsa-miR-1206	MIMAT0005870	-	miR-1205
hsa-miR-1245a	MIMAT0005897	-	-
hsa-miR-1251	MIMAT0005903	-	-
hsa-miR-1272	MIMAT0005925	-	-
hsa-miR-1284	MIMAT0005941	-	-
hsa-miR-1286	MIMAT0005877	-	-
hsa-miR-1288	MIMAT0005942	-	-
hsa-miR-1301	MIMAT0005797	-	-
hsa-miR-1302	MIMAT0005890	-	miR-1302
hsa-miR-1304-5p	MIMAT0005892	-	-

[a.] Informació obtinguda de la base de dades miRBase (http://www.mirbase.org).
[b.] Informació obtinguda de la base de dades TAM (http://cmbi.bjmu.edu.cn/tam).

Taula suplementària 3. Descripció dels miRNAs detectats en els espermatozoides de tots els individus amb astenozoospèrmia (S11-S20) i informació de la família i clúster al qual pertanyen.

miRBase ID	miRBase Accession number[a]	Família de miRNA[b]	Clúster de miRNA[b]
hsa-let-7b-5p	MIMAT0000063	let-7	let-7a
hsa-let-7c	MIMAT0000064	let-7	let-7c

hsa-let-7d-5p	MIMAT0000065	let-7	-
hsa-miR-100-5p	MIMAT0000098	miR-99	-
hsa-miR-106a-5p	MIMAT0000103	miR-17	miR-106a
hsa-miR-106b-5p	MIMAT0000680	miR-17	miR-106b
hsa-miR-10a-5p	MIMAT0000253	miR-10	-
hsa-miR-10b-3p	MIMAT0004556	miR-10	-
hsa-miR-1180	MIMAT0005825	-	-
hsa-miR-1183	MIMAT0005828	-	-
hsa-miR-1208	MIMAT0005873	-	-
hsa-miR-1225-3p	MIMAT0005573	-	-
hsa-miR-122-5p	MIMAT0000421	-	-
hsa-miR-1226-5p	MIMAT0005576	-	-
hsa-miR-1227-3p	MIMAT0005580	-	-
hsa-miR-1233-3p	MIMAT0005588	-	-
hsa-miR-1244	MIMAT0005896	-	-
hsa-miR-1247-5p	MIMAT0005899	-	-
hsa-miR-1249	MIMAT0005901	-	-
hsa-miR-1254	MIMAT0005905	-	-
hsa-miR-1255b-5p	MIMAT0005945	miR-1255	-
hsa-miR-125a-3p	MIMAT0004602	miR-125	let-7e
hsa-miR-125a-5p	MIMAT0000443	miR-125	let-7e
hsa-miR-125b-5p	MIMAT0000423	miR-125	-
hsa-miR-1260a	MIMAT0005911	-	-
hsa-miR-1267	MIMAT0005921	-	-
hsa-miR-127-3p	MIMAT0000446	-	miR-127
hsa-miR-1275	MIMAT0005929	-	-
hsa-miR-1276	MIMAT0005930	-	-
hsa-miR-1283	MIMAT0005799	miR-515	miR-1283
hsa-miR-1285-3p	MIMAT0005876	-	-
hsa-miR-1290	MIMAT0005880	-	-
hsa-miR-1291	MIMAT0005881	-	-
hsa-miR-1298	MIMAT0005800	-	miR-1298
hsa-miR-1303	MIMAT0005891	-	-
hsa-miR-132-3p	MIMAT0000426	miR-132	miR-132
hsa-miR-133a	MIMAT0000427	miR-133	miR-1
hsa-miR-134	MIMAT0000447	-	miR-1185
hsa-miR-135a-5p	MIMAT0000428	miR-135	let-7g
hsa-miR-138-5p	MIMAT0000430	-	-
hsa-miR-139-5p	MIMAT0000250	-	-
hsa-miR-140-5p	MIMAT0000431	-	-
hsa-miR-146a-5p	MIMAT0000449	miR-146	-
hsa-miR-146b-3p	MIMAT0004766	miR-146	-
hsa-miR-146b-5p	MIMAT0002809	miR-146	-
hsa-miR-148a-3p	MIMAT0000243	miR-148	-
hsa-miR-149-5p	MIMAT0000450	-	-
hsa-miR-150-5p	MIMAT0000451	-	-
hsa-miR-151a-5p	MIMAT0004697	-	-
hsa-miR-152	MIMAT0000438	miR-148	-
hsa-miR-155-5p	MIMAT0000646	-	-
hsa-miR-15b-5p	MIMAT0000417	miR-15	-
hsa-miR-16-5p	MIMAT0000069	miR-15	miR-15a
hsa-miR-17-5p	MIMAT0000070	miR-17	miR-17
hsa-miR-1825	MIMAT0006765	-	-
hsa-miR-184	MIMAT0000454	-	-
hsa-miR-186-5p	MIMAT0000456	-	-
hsa-miR-187-3p	MIMAT0000262	-	-
hsa-miR-190b	MIMAT0004929	miR-190	-
hsa-miR-191-5p	MIMAT0000440	-	miR-191
hsa-miR-192-5p	MIMAT0000222	miR-192	miR-192
hsa-miR-193a-5p	MIMAT0004614	miR-193	miR-193a
hsa-miR-193b-3p	MIMAT0002819	miR-193	miR-193
hsa-miR-194-5p	MIMAT0000460	-	miR-192/miR-194
hsa-miR-195-5p	MIMAT0000461	miR-15	miR-195
hsa-miR-19b-1-5p	MIMAT0004491	miR-19	miR-106a/ miR-17

hsa-miR-19b-3p	MIMAT0000074	miR-19	miR-106a/ miR-17
hsa-miR-200a-3p	MIMAT0000682	miR-8	miR-200a
hsa-miR-200b-3p	MIMAT0000318	miR-8	miR-200a
hsa-miR-200c-3p	MIMAT0000617	miR-8	miR-141
hsa-miR-202-3p	MIMAT0002811	-	-
hsa-miR-203a	MIMAT0000264	-	-
hsa-miR-204-5p	MIMAT0000265	miR-204	-
hsa-miR-205-5p	MIMAT0000266	-	-
hsa-miR-20a-5p	MIMAT0000075	miR-17	miR-17
hsa-miR-20b-5p	MIMAT0001413	miR-17	miR-106a
hsa-miR-212-3p	MIMAT0000269	miR-132	miR-132
hsa-miR-215	MIMAT0000272	miR-192	miR-194
hsa-miR-21-5p	MIMAT0000076	-	-
hsa-miR-218-5p	MIMAT0000275	-	-
hsa-miR-222-3p	MIMAT0000279	miR-221	miR-221
hsa-miR-223-3p	MIMAT0000280	-	-
hsa-miR-24-3p	MIMAT0000080	-	miR-181c/miR-23b
hsa-miR-25-3p	MIMAT0000081	miR-25	miR-106b
hsa-miR-26a-5p	MIMAT0000082	miR-26	-
hsa-miR-26b-3p	MIMAT0004500	miR-26	-
hsa-miR-26b-5p	MIMAT0000083	miR-26	-
hsa-miR-27a-5p	MIMAT0004501	miR-27	miR-181c
hsa-miR-27b-3p	MIMAT0000419	miR-27	miR-23b
hsa-miR-28-3p	MIMAT0004502	miR-28	-
hsa-miR-28-5p	MIMAT0000085	miR-28	-
hsa-miR-29a-3p	MIMAT0000086	miR-29	miR-29a
hsa-miR-29c-5p	MIMAT0004673	miR-29	miR-29b
hsa-miR-30a-3p	MIMAT0000088	miR-30	miR-30a
hsa-miR-30a-5p	MIMAT0000087	miR-30	miR-30a
hsa-miR-30b-5p	MIMAT0000420	miR-30	miR-30b
hsa-miR-30c-5p	MIMAT0000244	miR-30	miR-30a/miR-30c
hsa-miR-30d-5p	MIMAT0000245	miR-30	miR-30b
hsa-miR-30e-3p	MIMAT0000693	miR-30	miR-30c
hsa-miR-31-5p	MIMAT0000089	-	-
hsa-miR-320a	MIMAT0000510	miR-320	-
hsa-miR-320b	MIMAT0005792	miR-320	-
hsa-miR-323a-3p	MIMAT0000755	-	-
hsa-miR-324-3p	MIMAT0000762	-	-
hsa-miR-328	MIMAT0000752	-	-
hsa-miR-331-3p	MIMAT0000760	-	-
hsa-miR-335-3p	MIMAT0004703	-	-
hsa-miR-33a-3p	MIMAT0004506	miR-33	-
hsa-miR-342	MIMAT0000753	-	-
hsa-miR-345-5p	MIMAT0000772	-	-
hsa-miR-34a-3p	MIMAT0004557	miR-34	-
hsa-miR-34a-5p	MIMAT0000255	miR-34	-
hsa-miR-34b-3p	MIMAT0004676	miR-34	miR-34b
hsa-miR-34b-5p	MIMAT0000685	miR-34	miR-34b
hsa-miR-365a-3p	MIMAT0000710	-	-
hsa-miR-370	MIMAT0000722	-	miR-127
hsa-miR-371a-3p	MIMAT0000723	-	-
hsa-miR-373-3p	MIMAT0000726	-	miR-1283
hsa-miR-374b-5p	MIMAT0004955	-	-
hsa-miR-375	MIMAT0000728	-	-
hsa-miR-378a-3p	MIMAT0000732	-	-
hsa-miR-380-5p	MIMAT0000734	miR-379	miR-1185
hsa-miR-382-5p	MIMAT0000737	miR-154	miR-1185
hsa-miR-409-3p	MIMAT0001639	miR-154	miR-1185
hsa-miR-425-5p	MIMAT0003393	-	miR-191
hsa-miR-425-3p	MIMAT0001343	-	miR-191
hsa-miR-429	MIMAT0001536	miR-8	miR-200a
hsa-miR-432-3p	MIMAT0002815	-	miR-127
hsa-miR-433	MIMAT0001627	-	miR-127
hsa-miR-483-5p	MIMAT0004761	-	-

hsa-miR-484	MIMAT0002174	-	-
hsa-miR-486-3p	MIMAT0004762	-	-
hsa-miR-486-5p	MIMAT0002177	-	-
hsa-miR-487	MIMAT0002178	-	-
hsa-miR-489	MIMAT0002805	-	miR-489
hsa-miR-491-5p	MIMAT0002807	-	-
hsa-miR-495-3p	MIMAT0002817	miR-329	miR-1185
hsa-miR-509-5p	MIMAT0004779	miR-506	miR-506
hsa-miR-512-3p	MIMAT0002823	miR-506	miR-1283
hsa-miR-516a-3p	MIMAT0002860	miR-515	miR-1283
hsa-miR-517a-3p	MIMAT0002852	miR-515	miR-1283
hsa-miR-517c-3p	MIMAT0002866	miR-515	miR-1283
hsa-miR-518b	MIMAT0002844	miR-515	miR-1283
hsa-miR-518d-3p	MIMAT0002864	miR-515	miR-1283
hsa-miR-518e-3p	MIMAT0002861	miR-515	miR-1283
hsa-miR-519e-3p	MIMAT0002829	miR-515	miR-1283
hsa-miR-520d-3p	MIMAT0002856	miR-515	miR-1283
hsa-miR-520h	MIMAT0002867	miR-515	miR-1283
hsa-miR-522-3p	MIMAT0002868	miR-515	miR-1283
hsa-miR-523-3p	MIMAT0002840	miR-515	miR-1283
hsa-miR-524-3p	MIMAT0002850	miR-515	miR-1283
hsa-miR-525-3p	MIMAT0002839	miR-515	miR-1283
hsa-miR-532-3p	MIMAT0004780	miR-188	miR-188
hsa-miR-539-5p	MIMAT0003163	miR-154	miR-1185
hsa-miR-543	MIMAT0004954	miR-329	miR-1185
hsa-miR-548b-5p	MIMAT0004798	miR-548	-
hsa-miR-548c-5p	MIMAT0004806	miR-548	-
hsa-miR-548d-5p	MIMAT0004812	miR-548	-
hsa-miR-550a-5p	MIMAT0004800	-	-
hsa-miR-564	MIMAT0003228	-	-
hsa-miR-566	MIMAT0003230	-	-
hsa-miR-571	MIMAT0003236	-	-
hsa-miR-572	MIMAT0003237	-	-
hsa-miR-574	MIMAT0003239	-	-
hsa-miR-584-5p	MIMAT0003249	-	-
hsa-miR-591	MIMAT0003259	-	-
hsa-miR-595	MIMAT0003263	-	-
hsa-miR-601	MIMAT0003269	-	-
hsa-miR-604	MIMAT0003272	-	-
hsa-miR-605	MIMAT0003273	-	-
hsa-miR-615-3p	MIMAT0003283	-	miR-196a
hsa-miR-615-5p	MIMAT0004804	-	miR-196a
hsa-miR-616-3p	MIMAT0004805	-	-
hsa-miR-618	MIMAT0003287	-	-
hsa-miR-622	MIMAT0003291	-	-
hsa-miR-625-3p	MIMAT0004808	-	-
hsa-miR-628	MIMAT0003297	-	-
hsa-miR-629-3p	MIMAT0003298	-	-
hsa-miR-636	MIMAT0003306	-	-
hsa-miR-638	MIMAT0003308	-	-
hsa-miR-639	MIMAT0003309	-	-
hsa-miR-642a-5p	MIMAT0003312	-	-
hsa-miR-650	MIMAT0003320	-	-
hsa-miR-652-3p	MIMAT0003322	-	-
hsa-miR-657	MIMAT0003335	-	miR-1250
hsa-miR-659-3p	MIMAT0003337	-	miR-658
hsa-miR-661	MIMAT0003324	-	-
hsa-miR-664-3p	MIMAT0005949	-	-
hsa-miR-671-3p	MIMAT0004819	-	-
hsa-miR-7-1-3p	MIMAT0004553	-	miR-1179
hsa-miR-744-3p	MIMAT0004946	-	-
hsa-miR-766-3p	MIMAT0003888	-	-
hsa-miR-769-5p	MIMAT0003886	-	-
hsa-miR-770-5p	MIMAT0003948	-	miR-127

hsa-miR-885-5p	MIMAT0004947	-	-
hsa-miR-890	MIMAT0004912	miR-743	-
hsa-miR-891a	MIMAT0004902	miR-891	-
hsa-miR-892a	MIMAT0004907	miR-743	-
hsa-miR-892b	MIMAT0004918	miR-743	-
hsa-miR-92a-3p	MIMAT0000092	miR-25	miR-106a/ miR-17
hsa-miR-93-3p	MIMAT0004509	miR-17	miR-106b
hsa-miR-93-5p	MIMAT0000093	miR-17	miR-106b
hsa-miR-939-5p	MIMAT0004982	-	miR-1234
hsa-miR-942	MIMAT0004985	-	-
hsa-miR-943	MIMAT0004986	-	-
hsa-miR-9-5p	MIMAT0000441	-	-
hsa-miR-99a-3p	MIMAT0004511	miR-99	hsa-let-7c
hsa-miR-99a-5p	MIMAT0000097	miR-99	hsa-let-7c
hsa-miR-99b-3p	MIMAT0004678	miR-99	hsa-let-7e
hsa-miR-99b-5p	MIMAT0000689	miR-99	hsa-let-7e

[a.] Informació obtinguda de la base de dades miRBase (http://www.mirbase.org).
[b.] Informació obtinguda de la base de dades TAM (http://cmbi.bjmu.edu.cn/tam).

Taula suplementària 4. Descripció dels miRNAs absents en els espermatozoides de tots els individus amb astenozoospèrmia (S11-S20) i informació de la família i clúster al qual pertanyen.

miRBase ID	miRBase Accession number[a]	Família de miRNA[b]	Clúster de miRNA[b]
hsa-miR-1204	MIMAT0005868	-	-
hsa-miR-1206	MIMAT0005870	-	miR-1205
hsa-miR-1236-3p	MIMAT0005591	-	-
hsa-miR-1245a	MIMAT0005897	-	-
hsa-miR-1252	MIMAT0005944	-	-
hsa-miR-1272	MIMAT0005925	-	-
hsa-miR-127-5p	MIMAT0004604	-	miR-127
hsa-miR-1278	MIMAT0005936	-	-
hsa-miR-1284	MIMAT0005941	-	-
hsa-miR-1288	MIMAT0005942	-	-
hsa-miR-1292-5p	MIMAT0005943	-	-
hsa-miR-1301	MIMAT0005797	-	-
hsa-miR-1302	MIMAT0005890	-	miR-1302
hsa-miR-1304-5p	MIMAT0005892	-	-
hsa-miR-137	MIMAT0000429	-	-
hsa-miR-141-5p	MIMAT0004598	miR-8	miR-141
hsa-miR-142-5p	MIMAT0000433	-	-
hsa-miR-143-5p	MIMAT0004599	-	miR-143
hsa-miR-146a-3p	MIMAT0004608	miR-146	-
hsa-miR-154-5p	MIMAT0000452	miR-154	miR-1185
hsa-miR-155-3p	MIMAT0004658	-	-
hsa-miR-16-2-3p	MIMAT0004518	miR-15	miR-15a
hsa-miR-185-3p	MIMAT0004611	-	-
hsa-miR-18b-3p	MIMAT0004751	miR-17	miR-106a
hsa-miR-192-3p	MIMAT0004543	miR-192	miR-192
hsa-miR-195-3p	MIMAT0004615	miR-15	miR-195
hsa-miR-196a-3p	MIMAT0004562	miR-196	miR-196a
hsa-miR-199b-5p	MIMAT0000263	miR-199	-
hsa-miR-217	MIMAT0000274	-	miR-216a
hsa-miR-24-1-5p	MIMAT0000079	-	miR-181c/miR-23b
hsa-miR-24-2-5p	MIMAT0004497	-	miR-181c/miR-23b
hsa-miR-29b-1-5p	MIMAT0004514	miR-29	miR-29a/miR-29b
hsa-miR-302b-5p	MIMAT0000714	miR-302	miR-302a
hsa-miR-30b-3p	MIMAT0004589	miR-30	miR-30b
hsa-miR-30c-1-3p	MIMAT0004674	miR-30	miR-30a/miR-30c
hsa-miR-325	MIMAT0000771	-	-
hsa-miR-329	MIMAT0001629	miR-329	miR-1185
hsa-miR-367-5p	MIMAT0004686	-	miR-302a
hsa-miR-374a-3p	MIMAT0004688	miR-374	miR-374a

hsa-miR-424-5p	MIMAT0001341	-	miR-424
hsa-miR-448	MIMAT0001532	-	-
hsa-miR-454-5p	MIMAT0003884	-	miR-301a
hsa-miR-485-5p	MIMAT0002175	-	miR-1185
hsa-miR-500a-3p	MIMAT0002871	-	-
hsa-miR-520d-5p	MIMAT0002855	miR-515	miR-1283
hsa-miR-542-5p	MIMAT0003340	-	miR-424
hsa-miR-545-5p	MIMAT0004785	miR-95	miR-374a
hsa-miR-548a-5p	MIMAT0004803	miR-548	-
hsa-miR-548e	MIMAT0005874	miR-548	-
hsa-miR-548n	MIMAT0005916	miR-548	-
hsa-miR-553	MIMAT0003216	-	-
hsa-miR-556-5p	MIMAT0003220	-	-
hsa-miR-569	MIMAT0003234	-	-
hsa-miR-570-3p	MIMAT0003235	miR-548	-
hsa-miR-588	MIMAT0003255	-	-
hsa-miR-599	MIMAT0003267	-	miR-599
hsa-miR-603	MIMAT0003271	miR-548	-
hsa-miR-624-3p	MIMAT0004807	-	-
hsa-miR-631	MIMAT0003300	-	-
hsa-miR-633	MIMAT0003303	-	-
hsa-miR-647	MIMAT0003317	-	miR-1914
hsa-miR-654-5p	MIMAT0003330	-	miR-1185
hsa-miR-767-3p	MIMAT0003883	-	miR-105
hsa-miR-767-5p	MIMAT0003882	-	miR-105
hsa-miR-876-3p	MIMAT0004925	-	miR-873
hsa-miR-920	MIMAT0004970	-	-
hsa-miR-934	MIMAT0004977	-	-
hsa-miR-936	MIMAT0004979	-	-
hsa-miR-944	MIMAT0004987	-	-

[a.] Informació obtinguda de la base de dades miRBase (http://www.mirbase.org).
[b.] Informació obtinguda de la base de dades TAM (http://cmbi.bjmu.edu.cn/tam).

Taula suplementària 5. Descripció dels miRNAs detectats en els espermatozoides de tots els individus amb teratozoospèrmia (S21-S30) i informació de la família i clúster al qual pertanyen.

miRBase ID	miRBase Accession number[a]	Família de miRNA[b]	Clúster de miRNA[b]
hsa-let-7b-5p	MIMAT0000063	let-7	let-7a
hsa-let-7c	MIMAT0000064	let-7	let-7c
hsa-let-7d-5p	MIMAT0000065	let-7	-
hsa-let-7e-5p	MIMAT0000066	let-7	let-7e
hsa-let-7g-5p	MIMAT0000414	let-7	let-7g
hsa-miR-100-5p	MIMAT0000098	miR-99	-
hsa-miR-101-5p	MIMAT0004513	-	-
hsa-miR-106a-5p	MIMAT0000103	miR-17	miR-106a
hsa-miR-10a-5p	MIMAT0000253	miR-10	-
hsa-miR-10b-3p	MIMAT0004556	miR-10	-
hsa-miR-10b-5p	MIMAT0000254	miR-10	-
hsa-miR-1180	MIMAT0005825	-	-
hsa-miR-1183	MIMAT0005828	-	-
hsa-miR-1208	MIMAT0005873	-	-
hsa-miR-122-5p	MIMAT0000421	-	-
hsa-miR-1226-5p	MIMAT0005576	-	-
hsa-miR-1227-3p	MIMAT0005580	-	-
hsa-miR-1233-3p	MIMAT0005588	-	-
hsa-miR-1247-5p	MIMAT0005899	-	-
hsa-miR-1253	MIMAT0005904	-	-
hsa-miR-1254	MIMAT0005905	-	-
hsa-miR-1255b-5p	MIMAT0005945	miR-1255	-
hsa-miR-125b-5p	MIMAT0000423	miR-125	-
hsa-miR-1260a	MIMAT0005911	-	-
hsa-miR-1267	MIMAT0005921	-	-

hsa-miR-1275	MIMAT0005929	-	-
hsa-miR-1285-3p	MIMAT0005876	-	-
hsa-miR-128a	MIMAT0000424	-	-
hsa-miR-1290	MIMAT0005880	-	-
hsa-miR-1291	MIMAT0005881	-	-
hsa-miR-1305	MIMAT0005893	-	-
hsa-miR-130a-3p	MIMAT0000425	miR-130	-
hsa-miR-132-3p	MIMAT0000426	miR-132	miR-132
hsa-miR-133a	MIMAT0000427	miR-133	miR-1
hsa-miR-135a-5p	MIMAT0000428	miR-135	let-7g
hsa-miR-135b-5p	MIMAT0000758	miR-135	-
hsa-miR-140-3p	MIMAT0004597	-	-
hsa-miR-146a-5p	MIMAT0000449	miR-146	-
hsa-miR-146b-5p	MIMAT0002809	miR-146	-
hsa-miR-148a-3p	MIMAT0000243	miR-148	-
hsa-miR-149-5p	MIMAT0000450	-	-
hsa-miR-150-5p	MIMAT0000451	-	-
hsa-miR-152	MIMAT0000438	miR-148	-
hsa-miR-15b-5p	MIMAT0000417	miR-15	-
hsa-miR-16-5p	MIMAT0000069	miR-15	miR-15a
hsa-miR-17-5p	MIMAT0000070	miR-17	miR-17
hsa-miR-1825	MIMAT0006765	-	-
hsa-miR-183-3p	MIMAT0004560	-	-
hsa-miR-184	MIMAT0000454	-	-
hsa-miR-186-5p	MIMAT0000456	-	-
hsa-miR-190b	MIMAT0004929	miR-190	-
hsa-miR-191-5p	MIMAT0000440	-	miR-191
hsa-miR-192-5p	MIMAT0000222	miR-192	miR-192
hsa-miR-193a-5p	MIMAT0004614	miR-193	miR-193a
hsa-miR-193b-3p	MIMAT0002819	miR-193	miR-193b
hsa-miR-194-5p	MIMAT0000460	-	miR-192/miR-194
hsa-miR-197-3p	MIMAT0000227	-	-
hsa-miR-198	MIMAT0000228	-	-
hsa-miR-19a-3p	MIMAT0000073	miR-19	miR-17
hsa-miR-19b-3p	MIMAT0000074	miR-19	miR-106a/miR-17
hsa-miR-200a-3p	MIMAT0000682	miR-8	miR-200a
hsa-miR-200b-3p	MIMAT0000318	miR-8	miR-200a
hsa-miR-200c-3p	MIMAT0000617	miR-8	miR-141
hsa-miR-202-3p	MIMAT0002811	-	-
hsa-miR-203a	MIMAT0000264	-	-
hsa-miR-204-5p	MIMAT0000265	miR-204	-
hsa-miR-20a-5p	MIMAT0000075	miR-17	miR-17
hsa-miR-20b-5p	MIMAT0001413	miR-17	miR-106a
hsa-miR-210	MIMAT0000267	-	-
hsa-miR-211-5p	MIMAT0000268	miR-204	-
hsa-miR-212-3p	MIMAT0000269	miR-132	miR-132
hsa-miR-215	MIMAT0000272	miR-192	miR-194
hsa-miR-21-5p	MIMAT0000076	-	-
hsa-miR-218-5p	MIMAT0000275	-	-
hsa-miR-221-3p	MIMAT0000278	miR-221	miR-221
hsa-miR-222-3p	MIMAT0000279	miR-221	miR-221
hsa-miR-223-3p	MIMAT0000280	-	-
hsa-miR-24-3p	MIMAT0000080	-	miR-181c/miR-23b
hsa-miR-25-3p	MIMAT0000081	miR-25	miR-106b
hsa-miR-25-5p	MIMAT0004498	miR-25	miR-106b
hsa-miR-26a-5p	MIMAT0000082	miR-26	-
hsa-miR-26b-5p	MIMAT0000083	miR-26	-
hsa-miR-28-3p	MIMAT0004502	miR-28	-
hsa-miR-28-5p	MIMAT0000085	miR-28	-
hsa-miR-296-5p	MIMAT0000690	-	miR-296
hsa-miR-302c-3p	MIMAT0000717	miR-302	miR-302a
hsa-miR-30a-3p	MIMAT0000088	miR-30	miR-30a
hsa-miR-30a-5p	MIMAT0000087	miR-30	miR-30a
hsa-miR-30b-5p	MIMAT0000420	miR-30	miR-30b

hsa-miR-30c-5p	MIMAT0000244	miR-30	miR-30a/miR-30c
hsa-miR-30d-3p	MIMAT0004551	miR-30	miR-30b
hsa-miR-30d-5p	MIMAT0000245	miR-30	miR-30b
hsa-miR-30e-3p	MIMAT0000693	miR-30	miR-30c
hsa-miR-31-5p	MIMAT0000089	-	-
hsa-miR-320a	MIMAT0000510	miR-320	-
hsa-miR-323a-3p	MIMAT0000755	-	-
hsa-miR-32-3p	MIMAT0004505	-	-
hsa-miR-324-3p	MIMAT0000762	-	-
hsa-miR-328	MIMAT0000752	-	-
hsa-miR-331-3p	MIMAT0000760	-	-
hsa-miR-339-3p	MIMAT0004702	-	-
hsa-miR-342-3p	MIMAT0000753	-	-
hsa-miR-345-5p	MIMAT0000772	-	-
hsa-miR-346	MIMAT0000773	-	-
hsa-miR-34a-3p	MIMAT0004557	miR-34	-
hsa-miR-34a-5p	MIMAT0000255	miR-34	-
hsa-miR-34b-3p	MIMAT0004676	miR-34	miR-34b
hsa-miR-370	MIMAT0000722	-	miR-127
hsa-miR-372	MIMAT0000724	miR-290	miR-1283
hsa-miR-374b-5p	MIMAT0004955	miR-374	miR-374b
hsa-miR-375	MIMAT0000728	-	-
hsa-miR-378a-3p	MIMAT0000732	-	-
hsa-miR-380-5p	MIMAT0000734	miR-379	miR-1185
hsa-miR-382-5p	MIMAT0000737	miR-154	miR-1185
hsa-miR-409-3p	MIMAT0001639	miR-154	miR-1185
hsa-miR-425-3p	MIMAT0001343	-	miR-191
hsa-miR-425-5p	MIMAT0003393	-	miR-191
hsa-miR-432-3p	MIMAT0002815	-	miR-127
hsa-miR-433	MIMAT0001627	-	miR-127
hsa-miR-449a	MIMAT0001541	miR-449	miR-449a
hsa-miR-483-5p	MIMAT0004761	-	-
hsa-miR-484	MIMAT0002174	-	-
hsa-miR-486-3p	MIMAT0004762	-	-
hsa-miR-486-5p	MIMAT0002177	-	-
hsa-miR-487a	MIMAT0002178	miR-154	miR-1185
hsa-miR-491-5p	MIMAT0002807	-	-
hsa-miR-509-5p	MIMAT0004779	miR-506	miR-506
hsa-miR-516a-3p	MIMAT0002860	miR-515	miR-1283
hsa-miR-517a-3p	MIMAT0002852	miR-515	miR-1283
hsa-miR-517b-3p	MIMAT0002857	miR-515	miR-1283
hsa-miR-517c-3p	MIMAT0002866	miR-515	miR-1283
hsa-miR-518d-3p	MIMAT0002864	miR-515	miR-1283
hsa-miR-518e-3p	MIMAT0002861	miR-515	miR-1283
hsa-miR-520c-3p	MIMAT0002846	miR-515	miR-1283
hsa-miR-520g	MIMAT0002858	miR-515	miR-1283
hsa-miR-532-3p	MIMAT0004780	miR-188	miR-188
hsa-miR-532-5p	MIMAT0002888	miR-188	miR-188
hsa-miR-548b-5p	MIMAT0004798	miR-548	-
hsa-miR-564	MIMAT0003228	-	-
hsa-miR-566	MIMAT0003230	-	-
hsa-miR-571	MIMAT0003236	-	-
hsa-miR-572	MIMAT0003237	-	-
hsa-miR-574-3p	MIMAT0003239	-	-
hsa-miR-575	MIMAT0003240	-	-
hsa-miR-584-5p	MIMAT0003249	-	-
hsa-miR-596	MIMAT0003264	-	-
hsa-miR-604	MIMAT0003272	-	-
hsa-miR-605	MIMAT0003273	-	-
hsa-miR-616-3p	MIMAT0004805	-	-
hsa-miR-618	MIMAT0003287	-	-
hsa-miR-625-3p	MIMAT0004808	-	-
hsa-miR-636	MIMAT0003306	-	-
hsa-miR-638	MIMAT0003308	-	-

hsa-miR-639	MIMAT0003309	-	-
hsa-miR-650	MIMAT0003320	-	-
hsa-miR-659-3p	MIMAT0003337	-	miR-658
hsa-miR-660-5p	MIMAT0003338	miR-188	miR-188
hsa-miR-663b	MIMAT0005867	miR-663	-
hsa-miR-664a-3p	MIMAT0005949	-	-
hsa-miR-7-1-3p	MIMAT0004553	-	miR-1179
hsa-miR-744-3p	MIMAT0004946	-	-
hsa-miR-766-3p	MIMAT0003888	-	-
hsa-miR-769-5p	MIMAT0003886	-	-
hsa-miR-770-5p	MIMAT0003948	-	miR-127
hsa-miR-885-5p	MIMAT0004947	-	-
hsa-miR-888-5p	MIMAT0004916	miR-743	-
hsa-miR-890	MIMAT0004912	miR-743	-
hsa-miR-891a	MIMAT0004902	miR-891	-
hsa-miR-892a	MIMAT0004907	miR-743	-
hsa-miR-892b	MIMAT0004918	miR-743	-
hsa-miR-92a-3p	MIMAT0000092	miR-25	miR-106a/miR-17
hsa-miR-93-3p	MIMAT0004509	miR-17	miR-106b
hsa-miR-93-5p	MIMAT0000093	miR-17	miR-106b
hsa-miR-939-5p	MIMAT0004982	-	miR-1234
hsa-miR-942	MIMAT0004985	-	-
hsa-miR-943	MIMAT0004986	-	-
hsa-miR-9-5p	MIMAT0000441	-	-
hsa-miR-99a-5p	MIMAT0000097	miR-99	let-7c
hsa-miR-99b-5p	MIMAT0000689	miR-99	let-7e

[a.] Informació obtinguda de la base de dades miRBase (http://www.mirbase.org).
[b.] Informació obtinguda de la base de dades TAM (http://cmbi.bjmu.edu.cn/tam).

Taula suplementària 6. Descripció dels miRNAs absents en els espermatozoides de tots els individus amb teratozoospèrmia (S21-S30) i informació de la família i clúster al qual pertanyen.

miRBase ID	miRBase Accession number[a]	Família de miRNA[b]	Clúster de miRNA[b]
hsa-miR-106a-3p	MIMAT0004517	miR-17	miR-106a
hsa-miR-10a-3p	MIMAT0004555	miR-10	-
hsa-miR-1200	MIMAT0005863	-	-
hsa-miR-1205	MIMAT0005869	-	miR-1205
hsa-miR-1236-3p	MIMAT0005591	-	-
hsa-miR-1245a	MIMAT0005897	-	-
hsa-miR-1248	MIMAT0005900	-	-
hsa-miR-125a-3p	MIMAT0004602	miR-125	let-7e
hsa-miR-1263	MIMAT0005915	-	-
hsa-miR-1271-5p	MIMAT0005796	-	-
hsa-miR-127-5p	MIMAT0004604	-	miR-127
hsa-miR-129-5p	MIMAT0000242	-	miR-129
hsa-miR-1302	MIMAT0005890	-	miR-1302
hsa-miR-146a-3p	MIMAT0004608	miR-146	-
hsa-miR-153	MIMAT0000439	-	-
hsa-miR-154-5p	MIMAT0000452	miR-154	miR-1185
hsa-miR-192-3p	MIMAT0004543	miR-192	-
hsa-miR-19a-5p	MIMAT0004490	miR-19	miR-17
hsa-miR-218-1-3p	MIMAT0004565	-	-
hsa-miR-221-5p	MIMAT0004568	miR-221	miR-221
hsa-miR-23b-5p	MIMAT0004587	miR-23	miR-23b
hsa-miR-29b-1-5p	MIMAT0004514	miR-29	miR-29a/miR-29b
hsa-miR-302b-5p	MIMAT0000714	miR-302	miR-302a
hsa-miR-30b-3p	MIMAT0004589	miR-30	miR-30b
hsa-miR-30c-1-3p	MIMAT0004674	miR-30	miR-30a/miR-30c
hsa-miR-337-3p	MIMAT0000754	-	miR-127
hsa-miR-362-3p	MIMAT0004683	-	miR-188
hsa-miR-369-5p	MIMAT0001621	miR-154	miR-1185
hsa-miR-377-5p	MIMAT0004689	miR-154	miR-1185

hsa-miR-384	MIMAT0001075	-	-
hsa-miR-409-5p	MIMAT0001638	miR-154	miR-1185
hsa-miR-454-5p	MIMAT0003884	-	miR-301a
hsa-miR-485-5p	MIMAT0002175	-	miR-1185
hsa-miR-497-3p	MIMAT0004768	-	-
hsa-miR-501-3p	MIMAT0004774	miR-500	miR-188
hsa-miR-503-5p	MIMAT0002874	-	miR-424
hsa-miR-512-5p	MIMAT0002822	miR-506	miR-1283
hsa-miR-518c-3p	MIMAT0002848	miR-515	miR-1283
hsa-miR-518e-5p	MIMAT0005450	miR-515	miR-1283
hsa-miR-520e	MIMAT0002825	miR-515	miR-1283
hsa-miR-548c-3p	MIMAT0003285	miR-548	-
hsa-miR-548e	MIMAT0005874	miR-548	-
hsa-miR-548l	MIMAT0005889	miR-548	-
hsa-miR-550a-3p	MIMAT0003257	-	-
hsa-miR-555	MIMAT0003219	-	-
hsa-miR-562	MIMAT0003226	-	-
hsa-miR-578	MIMAT0003243	-	miR-1979
hsa-miR-582-5p	MIMAT0003247	-	-
hsa-miR-588	MIMAT0003255	-	-
hsa-miR-590-3p	MIMAT0004801	-	-
hsa-miR-603	MIMAT0003271	miR-548	-
hsa-miR-606	MIMAT0003274	-	-
hsa-miR-607	MIMAT0003275	-	-
hsa-miR-630	MIMAT0003299	-	-
hsa-miR-631	MIMAT0003300	-	-
hsa-miR-641	MIMAT0003311	-	-
hsa-miR-645	MIMAT0003315	-	miR-1302
hsa-miR-647	MIMAT0003317	-	miR-195
hsa-miR-656	MIMAT0003332	miR-154	miR-1185
hsa-miR-658	MIMAT0003336	-	miR-658
hsa-miR-665	MIMAT0004952	-	miR-127
hsa-miR-708-3p	MIMAT0004927	-	-
hsa-miR-767-5p	MIMAT0003882	-	miR-105
hsa-miR-875-3p	MIMAT0004923	-	miR-599
hsa-miR-876-3p	MIMAT0004925	-	miR-873
hsa-miR-876-5p	MIMAT0004924	-	miR-873
hsa-miR-922	MIMAT0004972	-	-
hsa-miR-933	MIMAT0004976	-	-
hsa-miR-937	MIMAT0004979	-	-
hsa-miR-944	MIMAT0004987	-	-

[a.] Informació obtinguda de la base de dades miRBase (http://www.mirbase.org).
[b.] Informació obtinguda de la base de dades TAM (http://cmbi.bjmu.edu.cn/tam).

Taula suplementària 7. Descripció dels miRNAs detectats en els espermatozoides de tots els individus amb oligozoospèrmia (S31-S40) i informació de la família i clúster al qual pertanyen.

miRBase ID	miRBase Accession number[a]	Família de miRNA[b]	Clúster de miRNA[b]
hsa-let-7b-5p	MIMAT0000063	let-7	let-7a
hsa-let-7c	MIMAT0000064	let-7	let-7c
hsa-let-7d-5p	MIMAT0000065	let-7	-
hsa-let-7e-5p	MIMAT0000066	let-7	let-7e
hsa-miR-100-5p	MIMAT0000098	miR-99	-
hsa-miR-106a-5p	MIMAT0000103	miR-17	miR-106a
hsa-miR-10a-5p	MIMAT0000253	miR-10	-
hsa-miR-10b-3p	MIMAT0004556	miR-10	-
hsa-miR-1180	MIMAT0005825	-	-
hsa-miR-122-5p	MIMAT0000421	-	-
hsa-miR-1233-3p	MIMAT0005588	-	-
hsa-miR-1254	MIMAT0005905	-	-
hsa-miR-1255b-5p	MIMAT0005945	miR-1255	-
hsa-miR-125a-5p	MIMAT0000443	miR-125	let-7e

hsa-miR-125b-5p	MIMAT0000423	miR-125	-
hsa-miR-1260a	MIMAT0005911	-	-
hsa-miR-127-3p	MIMAT0000446	-	miR-127
hsa-miR-1290	MIMAT0005880	-	-
hsa-miR-1291	MIMAT0005881	-	-
hsa-miR-1303	MIMAT0005891	-	-
hsa-miR-132-3p	MIMAT0000426	miR-132	miR-132
hsa-miR-133a	MIMAT0000427	miR-133	miR-1
hsa-miR-135a-5p	MIMAT0000428	miR-135	let-7g
hsa-miR-139-5p	MIMAT0000250	-	-
hsa-miR-140-3p	MIMAT0004597	-	-
hsa-miR-146a-5p	MIMAT0000449	miR-146	-
hsa-miR-146b-5p	MIMAT0002809	miR-146	-
hsa-miR-148a-3p	MIMAT0000243	miR-148	-
hsa-miR-149-5p	MIMAT0000450	-	-
hsa-miR-150-5p	MIMAT0000451	-	-
hsa-miR-151a-3p	MIMAT0000757	-	-
hsa-miR-155-5p	MIMAT0000646	-	-
hsa-miR-15b-5p	MIMAT0000417	miR-15	-
hsa-miR-16-5p	MIMAT0000069	miR-15	miR-15a
hsa-miR-17-5p	MIMAT0000070	miR-17	miR-17
hsa-miR-184	MIMAT0000454	-	-
hsa-miR-186-5p	MIMAT0000456	-	-
hsa-miR-190b	MIMAT0004929	miR-190	-
hsa-miR-191-5p	MIMAT0000440	-	miR-191
hsa-miR-192-5p	MIMAT0000222	miR-192	miR-192
hsa-miR-193a-5p	MIMAT0004614	miR-193	miR-193a
hsa-miR-193b-3p	MIMAT0002819	miR-193	miR-193b
hsa-miR-19b-3p	MIMAT0000074	miR-19	miR-106a/miR-17
hsa-miR-200b-3p	MIMAT0000318	miR-8	miR-200a
hsa-miR-200c-3p	MIMAT0000617	miR-8	miR-141
hsa-miR-202-3p	MIMAT0002811	-	-
hsa-miR-203a	MIMAT0000264	-	-
hsa-miR-204-5p	MIMAT0000265	miR-204	-
hsa-miR-205-5p	MIMAT0000266	-	-
hsa-miR-20a-5p	MIMAT0000075	miR-17	miR-17
hsa-miR-20b-5p	MIMAT0001413	miR-17	miR-106a
hsa-miR-212-3p	MIMAT0000269	miR-132	miR-132
hsa-miR-218-5p	MIMAT0000275	-	-
hsa-miR-221-3p	MIMAT0000278	miR-221	miR-221
hsa-miR-222-3p	MIMAT0000279	miR-221	miR-221
hsa-miR-223-3p	MIMAT0000280	-	-
hsa-miR-24-3p	MIMAT0000080	-	miR-181c/miR-23b
hsa-miR-25-3p	MIMAT0000081	miR-25	miR-106b
hsa-miR-26a-5p	MIMAT0000082	miR-26	-
hsa-miR-27a-3p	MIMAT0000084	miR-27	miR-181c
hsa-miR-28-3p	MIMAT0004502	miR-28	-
hsa-miR-28-5p	MIMAT0000085	miR-28	-
hsa-miR-302a-3p	MIMAT0000684	miR-302	miR-302a
hsa-miR-302c-3p	MIMAT0000717	miR-302	miR-302a
hsa-miR-30a-5p	MIMAT0000087	miR-30	miR-30a
hsa-miR-30a-3p	MIMAT0000088	miR-30	miR-30a
hsa-miR-30b-5p	MIMAT0000420	miR-30	miR-30b
hsa-miR-30c-5p	MIMAT0000244	miR-30	miR-30a/miR-30c
hsa-miR-30d-5p	MIMAT0000245	miR-30	miR-30b
hsa-miR-30e-3p	MIMAT0000693	miR-30	miR-30c
hsa-miR-31-5p	MIMAT0000089	-	-
hsa-miR-320a	MIMAT0000510	miR-320	-
hsa-miR-320b	MIMAT0005792	miR-320	-
hsa-miR-323a-3p	MIMAT0000755	-	-
hsa-miR-324-3p	MIMAT0000762	-	-
hsa-miR-328	MIMAT0000752	-	-
hsa-miR-331-3p	MIMAT0000760	-	-
hsa-miR-342-3p	MIMAT0000753	-	-

hsa-miR-345-5p	MIMAT0000772	-	-
hsa-miR-365a-3p	MIMAT0000710	-	-
hsa-miR-370	MIMAT0000722	-	miR-127
hsa-miR-374a-5p	MIMAT0000727	miR-374	miR-374a
hsa-miR-375	MIMAT0000728	-	-
hsa-miR-376a-3p	MIMAT0000729	miR-368	miR-1185
hsa-miR-378a-3p	MIMAT0000732	-	-
hsa-miR-382-5p	MIMAT0000737	miR-154	miR-1185
hsa-miR-409-3p	MIMAT0001639	miR-154	miR-1185
hsa-miR-425-3p	MIMAT0001343	-	miR-191
hsa-miR-425-5p	MIMAT0003393	-	miR-191
hsa-miR-432-5p	MIMAT0002814	-	miR-127
hsa-miR-454-3p	MIMAT0003885	-	miR-301a
hsa-miR-483-5p	MIMAT0004761	-	-
hsa-miR-484	MIMAT0002174	-	-
hsa-miR-489	MIMAT0002805	-	miR-489
hsa-miR-491-5p	MIMAT0002807	-	-
hsa-miR-501-5p	MIMAT0002872	miR-500	miR-188
hsa-miR-517a-3p	MIMAT0002852	miR-515	miR-1283
hsa-miR-517c-3p	MIMAT0002866	miR-515	miR-1283
hsa-miR-518e-3p	MIMAT0002861	miR-515	miR-1283
hsa-miR-519d	MIMAT0002853	miR-515	miR-1283
hsa-miR-520c-3p	MIMAT0002846	miR-515	miR-1283
hsa-miR-522-3p	MIMAT0002868	miR-515	miR-1283
hsa-miR-523-3p	MIMAT0002840	miR-515	miR-1283
hsa-miR-532-3p	MIMAT0004780	-	miR-188
hsa-miR-532-5p	MIMAT0002888	miR-188	miR-188
hsa-miR-539-5p	MIMAT0003163	miR-154	miR-1185
hsa-miR-564	MIMAT0003228	-	-
hsa-miR-574-3p	MIMAT0003239	-	-
hsa-miR-601	MIMAT0003269	-	-
hsa-miR-616-3p	MIMAT0004805	-	-
hsa-miR-625-3p	MIMAT0004808	-	-
hsa-miR-629-3p	MIMAT0003298	-	-
hsa-miR-636	MIMAT0003306	-	-
hsa-miR-638	MIMAT0003308	-	-
hsa-miR-650	MIMAT0003320	-	-
hsa-miR-660-5p	MIMAT0003338	miR-188	miR-188
hsa-miR-664a-3p	MIMAT0005949	-	-
hsa-miR-671-3p	MIMAT0004819	-	-
hsa-miR-885-5p	MIMAT0004947	-	-
hsa-miR-888-5p	MIMAT0004916	miR-743	-
hsa-miR-890	MIMAT0004912	miR-743	-
hsa-miR-891a	MIMAT0004902	miR-891	-
hsa-miR-892a	MIMAT0004907	miR-743	-
hsa-miR-892b	MIMAT0004918	miR-743	-
hsa-miR-92a-3p	MIMAT0000092	miR-25	miR-106a/miR-17
hsa-miR-93-3p	MIMAT0004509	miR-17	miR-106b
hsa-miR-93-5p	MIMAT0000093	miR-17	miR-106b
hsa-miR-939-5p	MIMAT0004982	-	miR-1234
hsa-miR-942	MIMAT0004985	-	-
hsa-miR-99a-5p	MIMAT0000097	miR-99	let-7c
hsa-miR-99b-5p	MIMAT0000689	miR-99	let-7e

[a.] Informació obtinguda de la base de dades miRBase (http://www.mirbase.org).
[b.] Informació obtinguda de la base de dades TAM (http://cmbi.bjmu.edu.cn/tam).

Taula suplementària 8. Descripció dels miRNAs absents en els espermatozoides de tots els individus amb oligo-zoospèrmia (S31-S40) i informació de la família i clúster al qual pertanyen.

miRBase ID	miRBase Accession number[a]	Família de miRNA[b]	Clúster de miRNA[b]
hsa-miR-105-3p	MIMAT0004516	-	miR-105
hsa-miR-10a-3p	MIMAT0004555	miR-10	-

hsa-miR-1179	MIMAT0005824	-	miR-1179
hsa-miR-1203	MIMAT0005866	-	-
hsa-miR-1205	MIMAT0005869	-	miR-1205
hsa-miR-1236-3p	MIMAT0005591	-	-
hsa-miR-1238-3p	MIMAT0005593	-	-
hsa-miR-124-5p	MIMAT0004591	-	-
hsa-miR-1248	MIMAT0005900	-	-
hsa-miR-1263	MIMAT0005915	-	-
hsa-miR-1272	MIMAT0005925	-	-
hsa-miR-127-5p	MIMAT0004604	-	miR-127
hsa-miR-1284	MIMAT0005941	-	-
hsa-miR-1286	MIMAT0005877	-	-
hsa-miR-1288	MIMAT0005942	-	-
hsa-miR-129-1-3p	MIMAT0004548	-	miR-129
hsa-miR-1304-5p	MIMAT0005892	-	-
hsa-miR-139-3p	MIMAT0004552	-	-
hsa-miR-142-5p	MIMAT0000433	-	-
hsa-miR-143-5p	MIMAT0004599	-	miR-143
hsa-miR-146a-3p	MIMAT0004608	miR-146	-
hsa-miR-153	MIMAT0000439	-	-
hsa-miR-154-5p	MIMAT0000452	miR-154	miR-1185
hsa-miR-155-3p	MIMAT0004658	-	-
hsa-miR-15a-5p	MIMAT0000068	miR-15	miR-15a
hsa-miR-185-3p	MIMAT0004611	-	-
hsa-miR-18b-3p	MIMAT0004751	miR-17	miR-106a
hsa-miR-192-3p	MIMAT0004543	miR-192	miR-192
hsa-miR-196a-3p	MIMAT0004562	miR-196	miR-196a
hsa-miR-199b-5p	MIMAT0000263	miR-199	-
hsa-miR-20b-3p	MIMAT0004752	miR-17	miR-106a
hsa-miR-299-5p	MIMAT0002890	-	miR-1185
hsa-miR-302b-5p	MIMAT0000714	miR-302	miR-302a
hsa-miR-302d-5p	MIMAT0004685	miR-302	miR-302a
hsa-miR-30b-3p	MIMAT0004589	miR-30	miR-30b
hsa-miR-337-3p	MIMAT0000754	-	miR-127
hsa-miR-367-5p	MIMAT0004686	-	miR-302a
hsa-miR-369-5p	MIMAT0001621	miR-154	miR-1185
hsa-miR-376b-3p	MIMAT0002172	miR-368	miR-1185
hsa-miR-384	MIMAT0001075	-	-
hsa-miR-409-5p	MIMAT0001638	miR-154	miR-1185
hsa-miR-424-5p	MIMAT0001341	-	miR-424
hsa-miR-431-5p	MIMAT0001625	-	miR-127
hsa-miR-455-3p	MIMAT0004784	-	-
hsa-miR-499a-5p	MIMAT0002870	-	-
hsa-miR-503-5p	MIMAT0002874	-	miR-424
hsa-miR-513b	MIMAT0005788	miR-506	miR-506
hsa-miR-518c-3p	MIMAT0002848	miR-515	miR-1283
hsa-miR-518e-5p	MIMAT0005450	miR-515	miR-1283
hsa-miR-519e-5p	MIMAT0002828	miR-515	miR-1283
hsa-miR-524-5p	MIMAT0002849	miR-515	miR-1283
hsa-miR-525-5p	MIMAT0002838	miR-515	miR-1283
hsa-miR-544a	MIMAT0003164	-	-
hsa-miR-548c-3p	MIMAT0003285	miR-548	-
hsa-miR-548d-3p	MIMAT0003323	miR-548	-
hsa-miR-548e	MIMAT0005874	miR-548	-
hsa-miR-548n	MIMAT0005916	miR-548	-
hsa-miR-551b-3p	MIMAT0003233	miR-551	-
hsa-miR-555	MIMAT0003219	-	-
hsa-miR-558	MIMAT0003222	-	-
hsa-miR-563	MIMAT0003227	-	-
hsa-miR-569	MIMAT0003234	-	-
hsa-miR-585	MIMAT0003250	-	-
hsa-miR-599	MIMAT0003267	-	miR-599
hsa-miR-603	MIMAT0003271	miR-548	-
hsa-miR-607	MIMAT0003275	-	-

hsa-miR-608	MIMAT0003276	-	-
hsa-miR-613	MIMAT0003281	-	-
hsa-miR-624-3p	MIMAT0004807	-	-
hsa-miR-624-5p	MIMAT0003293	-	-
hsa-miR-631	MIMAT0003300	-	-
hsa-miR-633	MIMAT0003303	-	-
hsa-miR-634	MIMAT0003304	-	-
hsa-miR-647	MIMAT0003317	-	miR-1914
hsa-miR-651	MIMAT0003321	-	-
hsa-miR-767-3p	MIMAT0003883	-	miR-105
hsa-miR-874	MIMAT0004911	-	-
hsa-miR-920	MIMAT0004970	-	-
hsa-miR-924	MIMAT0004974	-	-
hsa-miR-92a-2-5p	MIMAT0004508	miR-25	miR-106a/miR-17
hsa-miR-944	MIMAT0004987	-	-

[a.] Informació obtinguda de la base de dades miRBase (http://www.mirbase.org).
[b.] Informació obtinguda de la base de dades TAM (http://cmbi.bjmu.edu.cn/tam).

IV.2. Scripts

```
#Obrir directori de treball
setwd("C:/Users/Albert Salas/Desktop/Directori treball R/Epi-
cromStudy")

#Carregar paquet estadístic HTqPCR
library(HTqPCR)

#Carregar les dades provinents d'assajos múltiples en plaques precon-
figurades
files<-dir("plateA")
raw<-readCtData(files, path="plateA",header = TRUE, SDS = TRUE, fea-
ture = 4, type = 5, position = 1, Ct = 6)
files<-dir("plateB")
raw2<-readCtData(files, path="plateB",header = TRUE, SDS = TRUE, fe-
ature = 4, type = 5, position = 1, Ct = 6
q.comb2<-rbind(raw,raw2)
DATA<-data.frame(t(exprs(q.comb2)))
raw.cat.new<-setCategory(q.comb2,Ct.min=15,quantile = NULL)

#Anàlisi descriptiva
pdf("Cluster_analysis_accordingtoquality2.pdf")
par(mfrow=c(2,2))
PLOT<-plotCtCategory(raw.cat.new, by.feature = TRUE)
dev.off()
pdf("plot_by_categories.pdf")
plotCtCategory(raw.cat.new)
dev.off()

#Normalització de les dades (mètode MCR)
```

```
DATA_RAW<-t(DATA)
for (i in 1:ncol(DATA_RAW))      {
       DATA_RAW[,i][DATA_RAW[,i] > 35] <- NA
       }
DATA_FOR_MEAN_CENTERED<-DATA_RAW
write.table(DATA_FOR_MEAN_CENTERED,"RAW_DATA_ready_FOR_MEAN_CENTE-
RED.txt",sep="\t")
meanCenter = function(rawData, restricted=TRUE, ...) {
              if (restricted) {
              means = apply(X=na.omit(rawData), MARGIN=2, FUN=mean)
       } else {
              means = apply(X=rawData, MARGIN=2, FUN=mean,
na.rm=TRUE)
       }
       return(meanCenteredData)
}
MEAN.Centered.norm1 <-meanCenter(DATA_FOR_MEAN_CENTERED[1:384,],
restricted=TRUE)
MEAN.Centered.norm2<-meanCenter(DATA_FOR_MEAN_CENTERED[385:768,],
restricted=TRUE)
MEAN_all_restricted<-rbind(MEAN.Centered.norm1,MEAN.Centered.norm2)
rownames(MEAN_all_restricted)<-rownames(DATA_FOR_MEAN_CENTERED)
DATA_MEAN<-data.frame(MEAN_all_restricted)
DATA_MEAN<-data.frame(t(DATA_MEAN))
DATA_MEAN$subjects<-rownames(DATA_MEAN)
write.table(DATA_MEAN,"DATA_quantileNorm.txt",sep="\t",row.names=F)

#Carregar les dades de edat, seminograma, i incidència d'anomalies
cromosòmiques numèriques
pheno<-read.delim("../Dades seminograma et al. de mostres_recod_com-
plete.txt")
miRNApheno<-merge(pheno,DATA_MEAN,by.x="UABcode",by.y="subjects")
write.table(miRNApheno,"Normalized_data_meanRestricted_with_phe-
notypes_complete.txt",sep="\t",row.names=F)

#Anàlisi de l'efecte de les variables edat i seminograma sobre l'ex-
pressió de miRNAs
for (z in 3:7) {
print(names(miRNApheno)[z])
spearman<-rep(NA,length(9:ncol(miRNApheno)))
nsamplesControls<-rep(NA,length(9:ncol(miRNApheno)))
meanControls<-rep(NA,length(9:ncol(miRNApheno)))
spearman_rho<-rep(NA,length(9:ncol(miRNApheno)))
for (i in 9:ncol(miRNApheno)){
       Controls<-miRNApheno[,i]
       nControls<-length(Controls[!is.na(Controls)])
       nsamplesControls[i-8]<-nControls
       meanControls[i-8]<-mean(Controls,na.rm=T)
       if (nControls>4){
```

```
            spearman[i-8]<-cor.test(miRNApheno[,i],miR-
NApheno[,z],method="spearman")$p.value
            spearman_rho[i-8]<-cor.test(miRNApheno[,i],miR-
NApheno[,z],method="spearman")$estimate
      }
}
sign<-which(spearman<(0.1/(768-summary(spearman)[7])))
print(names(miRNApheno)[sign+8])
spearman<-data.frame(spearman)
spearman$miRNA_assay<-names(miRNApheno)[9:ncol(miRNApheno)]
spearman$nControls<-nsamplesControls
spearman$meanControls<-meanControls
spearman$spearman_rho<-spearman_rho
spearman<-spearman[order(spearman$spearman),]
print(head(spearman))
write.table(spearman,paste("spearman_correlation_",names(miR-
NApheno)[z],".txt",sep=""),sep="\t",row.names=F)
pdf(paste("hist_of_",names(miRNApheno)[z],"pvalues.pdf",sep=""))
plot(hist(spearman$spearman),main=paste("hist_of_",names(miR-
NApheno)[z],"pvalues.pdf",sep=""),xlab="p values distribution")
dev.off()
pdf(paste("hist_of_",names(miRNApheno)[z],"rho_values.pdf",sep=""))
plot(hist(spearman$spearman_rho),main=paste("hist_of_",names(miR-
NApheno)[z],"pvalues.pdf",sep=""),xlab="rho values distribution")
dev.off()
}

#Variacions interindividuals (amb paquet estadístic Deducer)
corr.mat<-cor.matrix(variables=d(Sample11,Sample12,Sample13,Sam-
ple14,Sample15,Sample16,Sample17,Sample18,Sample19,
Sample20),,
       data=samplevssample_asteno,
       test=cor.test,
       method='spearman',
      alternative="two.sided",
      exact=FALSE)
print(corr.mat)
ggcorplot(cor.mat=corr.mat,data=samplevssample_asteno,
      cor_text_limits=c(5,20),
      line.method="lm")
rm('corr.mat')

#Carregar paquet estadístic lattice
library(lattice)

#Anàlisi de l'agrupació dels individus segons els perfils d'expressió
de miRNAs (amb paquet estadístic Deducer)
Dist<-dist(miRNApheno_noNas[,8:ncol(miRNApheno_noNas)])
DIST<-as.matrix(Dist)
rownames(DIST)<-substr(miRNApheno_noNas$UABcode,7,9)
```

```
colnames(DIST)<-substr(miRNApheno_noNas$UABcode,7,9)
pdf("resultsMeanRestritcedNormalization/DistancesBetweenSam-
ples.pdf")
levelplot(DIST,xlab = "id",ylab="id")
dev.off()
method<-c("ward","mcquitty", "complete","average")
for (i in method){
pdf(paste("resultsMeanRestritcedNormalization/",i,"_clustering_sam-
ples.pdf",sep=""))
plot(hclust(Dist,method=i),labels=substr(miRNApheno_noNas$UAB-
code,7,9),ylab="Distance",xlab=paste(i,"method"))
dev.off()
}
test<-miRNApheno_noNas[,8:ncol(miRNApheno_noNas)]
test<-rbind(test,data.frame(test[1,]*5))
Dist<-dist(test)
DIST<-as.matrix(Dist)
library(lattice)
levelplot(DIST,xlab = "id",ylab="id")
method<-c("ward","mcquitty", "complete","average")
for (i in method){
pdf(paste("resultsMeanRestritcedNormalization/testraro",i,"_cluste-
ring_samples.pdf",sep=""))
plot(hclust(Dist,method=i),ylab="Distance",xlab=paste(i,"method"))
dev.off()
}

#Identificació de DE-miRNAs (amb paquet estadístic Deducer)
descriptive.ta-
ble(d(hsa.let.7a.000377,hsa.let.7c.000379,hsa.let.7d.002283,...,hsa.
miR.1296.002908),Category,wilcoxon_controlvsasteno,func.names
=c("Mean","St. Deviation","Valid N"))
print(two.sample.test(for-
mula=d(hsa.let.7a.000377,hsa.let.7c.000379,hsa.let.7d.002283,...,hsa
.miR.1296.002908) ~ Category,
             data=wilcoxon_controlvsasteno,
             test=wilcox.test,
             alternative="two.sided",
              correct=FALSE)
)

#Identificació de parelles de miRNAs estables com a candidats a bio-
marcadors
COR<-cor(miRNApheno[,9:(ncol(miRNApheno)-1)],method="spearman")
write.table(COR,"COR_spearman.txt",sep="\t")
NetworkSIF<-data.frame(cbind(NA,NA,NA))
names(NetworkSIF)<-c("miRNA_1", "rho_value","miRNA_2")
NetSIF<-NetworkSIF
NetworkSIF<-NetworkSIF[-1,]
for (i in 1:nrow(COR)){
```

```
	print(row.names(COR)[i])
	print(i)
	for (z in 1:ncol(COR)){
		if (z>i){
			if (!is.na(COR[i,z])){
				NetSIF[1,1]<-row.names(COR)[i]
				NetSIF[1,3]<-colnames(COR)[z]
				NetSIF[1,2]<-COR[i,z]
				NetworkSIF<-rbind(NetworkSIF,NetSIF)
			}
		}
	}
}
NetworkSIF$abs_rho_value<-abs(NetworkSIF$rho_value)
NetworkSIF<-NetworkSIF[order(NetworkSIF$abs_rho_value,decrea-
sing=T),]
NetworkSIF<-NetworkSIF[order(NetworkSIF$rho_value),]
write.table(NetworkSIF,"NetworkSIF.txt",sep="\t")

#Selecció de miRNAs com a candidats a normalitzadors i validació
fastCCC = function(x, y) {
	pearson = cor(x, y)
	m1 = mean(x)
	m2 = mean(y)
	s1 = sqrt(mean(x*x) - m1*m1)
	s2 = sqrt(mean(y*y) - m2*m2)
	correction = (2 * s1 * s2) / (s1^2 + s2^2 + (m1-m2)^2)
	ccc = pearson * correction
	return(ccc)
}
selectCCRNormalizers = function(data, ctThreshold=35, ccRankCu-
toff=10, normCount=NA) {
	require(epiR)
	data[data>ctThreshold] = NA
		data = na.omit(data)
	if (nrow(data) < ccRankCutoff) {
		stop(paste("Need at least ccRankCutoff =", ccRankCu-
toff, "fully observed rows."))
	}
	geneSymbol = rownames(data)
	sampleMeans = apply(X=data, MARGIN=2, FUN=mean)
	allCCCVals = apply(X=data, MARGIN=1, FUN=fastCCC, y=sampleMe-
ans)
	cccOrder = order(allCCCVals, decreasing=TRUE)[1:ccRankCutoff]
	data = data[cccOrder,]
	geneSymbol = geneSymbol[cccOrder]
	excludedData = data[-1,]
	excludedGeneSymbol = geneSymbol[-1]
	data = as.data.frame(data[1,])
	normalizerSymbol = geneSymbol[1]
```

```
	converged = FALSE
	groupMeanCCC = list(epi.ccc(unlist(data), sampleMeans))
	while (!converged) {
		bestCCC = list(rho.c = list(est = -Inf))
		bestCCCIndex = -Inf
		for (addedIndex in 1:nrow(excludedData)) {
			potentialData = rbind(data, as.data.frame(exclu-
dedData[addedIndex,]))
			potentialMean = apply(X=potentialData, MARGIN=2,
FUN=mean)
			cccVal = fastCCC(potentialMean, sampleMeans)
			if (cccVal > bestCCC$rho.c$est) {
				bestCCC = epi.ccc(potentialMean, sampleMe-
ans)
				bestCCCIndex = addedIndex
			}
		}
		converged = (bestCCC$rho.c$est <= groupMe-
anCCC[[nrow(data)]]$rho.c$upper)
		if (!converged || !is.na(normCount)) {
			groupMeanCCC[[length(groupMeanCCC)+1]] = bestCCC
			data = rbind(data, as.data.frame(exclu-
dedData[bestCCCIndex,]))
			normalizerSymbol = c(normalizerSymbol, exclu-
dedGeneSymbol[bestCCCIndex])
			excludedData = excludedData[-bestCCCIndex,]
			excludedGeneSymbol = excludedGeneSymbol[-
bestCCCIndex]
		}
		if (!is.na(normCount)) {
			converged = (nrow(data) >= normCount)
		}
	}
	return(list(normalizers=normalizerSymbol, cccTrace=groupMe-
anCCC))
}
applyNormalizers = function(rawData, normalizers, ...) {
	if (missing(normalizers) || length(normalizers)==0) {
		stop("No normalizers supplied.")
	}
	normalizerData = rawData[normalizers,]
	if (nrow(na.omit(normalizerData)) < nrow(normalizerData)) {
		stop("Normalizer(s) not fully observed.")
	}
	normValues = apply(X=normalizerData, MARGIN=2, FUN=mean)
	normalizedData = rawData - data.frame(lapply(X=normValues,
FUN=rep, times=nrow(rawData)))
	if (is.numeric(normalizers)) {
		normalizedData = normalizedData[-normalizers,]
	} else if (is.character(normalizers)) {
```

```
            normalizedData = normalizedData[!(rownames(normalized-
Data) %in% normalizers),]
      }
      return(normalizedData)
}
TLDA_RAW<-read.delim("RAW_DATA_ready_FOR_MEAN_CENTERED.txt")
head(TLDA_RAW)
ccrNormalizerSelection.A = selectCCRNormalizers(TLDA_RAW[1:384,])
ccrNormalizers.A = ccrNormalizerSelection.A$normalizers
ccrData.A = applyNormalizers(TLDA_RAW[1:384,], normalizers=ccrNorma-
lizers.A)
ccrNormalizerSelection.B = selectCCRNormalizers(TLDA_RAW[385:768,])
ccrNormalizers.B = ccrNormalizerSelection.B$normalizers
ccrData.B = applyNormalizers(TLDA_RAW[385:768,], normalizers=ccrNor-
malizers.B)
Data<-TLDA_RAW[1:384,]
ctThreshold<-35
Data[Data>ctThreshold] = NA
      Data = na.omit(Data)
sampleMeans.A = apply(X=Data, MARGIN=2, FUN=mean)
for (i in ccrNormalizers.A){
      print(cor(sampleMeans.A,t(TLDA_RAW[grep(i,rowna-
mes(TLDA_RAW)),])))
}
Data<-TLDA_RAW[385:768,]
ctThreshold<-35
Data[Data>ctThreshold] = NA
      Data = na.omit(Data)
sampleMeans.B = apply(X=Data, MARGIN=2, FUN=mean)
for (i in ccrNormalizers.B){
      print(cor(sampleMeans.B,t(TLDA_RAW[grep(i,rowna-
mes(TLDA_RAW)),])))
}
rawRowSds = apply(X=TLDA_RAW[1:384,], MARGIN=1, FUN=sd, na.rm=TRUE)
ccrRowSds = apply(X=ccrData.A, MARGIN=1, FUN=sd, na.rm=TRUE)
cat("Raw row standard deviations:\n")
print(summary(rawRowSds))
cat("\nCCR normalized row standard deviations:\n")
print(summary(ccrRowSds))
rawRowSds = apply(X=TLDA_RAW[385:768,], MARGIN=1, FUN=sd,
na.rm=TRUE)
ccrRowSds = apply(X=ccrData.B, MARGIN=1, FUN=sd, na.rm=TRUE)
cat("Raw row standard deviations:\n")
print(summary(rawRowSds))
cat("\nCCR normalized row standard deviations:\n")
print(summary(ccrRowSds))
ccrNormalizers.all<-c(ccrNormalizers.A,ccrNormalizers.B)
ccrData.ALL = applyNormalizers(TLDA_RAW, normalizers=ccrNorma-
lizers.all)
rawRowSds = apply(X=TLDA_RAW, MARGIN=1, FUN=sd, na.rm=TRUE)
```

```
ccrallRowSds = apply(X=ccrData.ALL, MARGIN=1, FUN=sd, na.rm=TRUE)
cat("Raw row standard deviations:\n")
print(summary(rawRowSds))
cat("\nCCR using all genes from both plates normalized row standard
deviations:\n")
print(summary(ccrallRowSds))
DATA_MEAN2<-data.frame(t(ccrData.ALL))
DATA_MEAN2$subjects<-rownames(DATA_MEAN2)
pheno<-read.delim("../Dades seminograma et al. de mostres IVI con-
trols_recod_complete.txt")
miRNApheno<-merge(pheno,DATA_MEAN2,by.x="UABcode",by.y="subjects")
mumber_controls_expressed<-rep(NA,(length(9:ncol(miRNApheno))))
for (i in 9:ncol(miRNApheno)){
            mumber_controls_expressed[i-8]<-length(miR-
NApheno[!is.na(miRNApheno[,i]),i])
}
NumExpressed<-data.frame(mumber_controls_expressed)
NumExpressed$miRNA<-names(miRNApheno)[-1:-8]
write.table(NumExpressed,"test_normalizedDatathreemiRNAs/Num-
miRNA_Expressed_cases_controls.txt",sep="\t",row.names=F)
setwd("test_normalizedDatathreemiRNAs")
```

V. Bibliografia

A

Abe M, Bonini NM. MicroRNAs and neurodegeneration: Role and impact. *Trends Cell Biol* 2013;**23**:30–36.

Abu-Halima M, Backes C, Leidinger P, Keller A, Lubbad AM, Hammadeh M, Meese E. MicroRNA expression profiles in human testicular tissues of infertile men with different histopathologic patterns. *Fertil Steril* 2014a;**101**:78–86.

Abu-Halima M, Hammadeh M, Backes C, Fischer U, Leidinger P, Lubbad AM, Keller A, Meese E. A panel of five microRNAs as potential biomarkers for the diagnosis and assessment of male infertility. *Fertil Steril* 2014b;**102**:989-997.

Abu-Halima M, Hammadeh M, Schmitt J, Leidinger P, Keller A, Meese E, Backes C. Altered microRNA expression profiles of human spermatozoa in patients with different spermatogenic impairments. *Fertil Steril* 2013;**99**:1249–1255.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell*. 6th edn, 2014. Garland Science, Taylor & Francis Group, New York, US.

Almeida MI, Nicoloso MS, Zeng L, Ivan C, Spizzo R, Gafà R, Xiao L, Zhang X, Vannini I, Fanini F, *et al.* Strand-specific miR-28-5p and miR-28-3p have distinct effects in colorectal cancer cells. *Gastroenterology* 2012;**142**:886–896.

Alvarez-Garcia I, Miska EA. MicroRNA functions in animal development and human disease. *Development* 2005;**132**:4653–4662.

Ambros V. MicroRNAs: Tiny regulators with great potential. *Cell* 2001;**107**:823–826.

Anton E, Krawetz SA. Spermatozoa as biomarkers for the assessment of human male infertility and genotoxicity. *Syst Biol Reprod Med* 2012;**58**:41–50.

B

Ball JAR, Yokomori K. The structural maintenance of chromosomes (SMC) family of proteins in mammals. *Chromosom Res* 2001;**9**:85–96.

Bansal SK, Gupta N, Sankhwar SN, Rajender S. Differential genes expression between fertile and infertile spermatozoa revealed by transcriptome analysis. *PLoS One* 2015;**10**:e0127007.

Bao J, Li D, Wang L, Wu J, Hu Y, Wang Z, Chen Y, Cao X, Jiang C, Yan W, *et al.* MicroRNA-449 and microRNA-34b/c function redundantly in murine testes by targeting E2F transcription factor-retinoblastoma protein (E2F-pRb) pathway. *J Biol Chem* 2012;**287**:21686–21698.

Bar-Nun S, Glickman MH. Proteasomal AAA-ATPases: structure and function. *Biochim Biophys Acta* 2012;**1823**:67–82.

Bartel DP, Lee RC, Feinbaum R. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004;**116**:281–297.

Belleannée C, Calvo E, Thimon V, Cyr DG, Légaré C, Garneau L, Sullivan R. Role of microRNAs in controlling gene expression in different segments of the human epididymis. *PLoS One*

2012;**7**:e34996.

Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the False Discovery Rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc* 1995;**57**:289–300.

Berezikov E, Tetering G, Verheul M, Belt J, Laake L, Vos J, Verloop R, Wetering M, Guryev V, Takada S, *et al.* Many novel mammalian microRNA candidates identified by extensive cloning and RAKE analysis. *Genome Res* 2006;**16**:1289–1298.

Björk JK, Sandqvist A, Elsing AN, Kotaja N, Sistonen L. MiR-18, a member of Oncomir-1, targets heat shock transcription factor 2 in spermatogenesis. *Development* 2010;**137**:3177–3184.

Boon WC, Petkovic-Duran K, Zhu Y, Manasseh R, Horne MK, Aumann TD. Increasing cDNA yields from single-cell quantities of mRNA in standard laboratory reverse transcriptase reactions using acoustic microstreaming. *J Vis Exp* 2011;**53**:e3144.

Borchert GM, Lanier W, Davidson BL. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol* 2006;**13**:1097–1101.

Bouhallier F, Allioli N, Lavial F, Chalmel F, Perrard M-H, Durand P, Samarut J, Pain B, Rouault J-P. Role of miR-34c microRNA in the late steps of spermatogenesis. *RNA* 2010;**16**:720–731.

Boyd SD. Everything you wanted to know about small RNA but were afraid to ask. *Lab Invest* 2008;**88**:569–578.

Buckingham S. The major world of microRNAs. *Nature* 2003;**Horizon Symposia**:1–3.

Bueno MJ, Malumbres M. MicroRNAs and the cell cycle. *Biochim Biophys Acta* 2011;**1812**:592–601.

Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, *et al.* The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 2009;**55**:611–622.

C

Chang DT, López A, Kessler DP, Chiang C, Simandl BK, Zhao R, Seldin MF, Fallon JF, Beachy PA. Products, genetic linkage and limb patterning activity of a murine Hedgehog gene. *Development* 1994;**120**:3339–3353.

Chang H, Kim N, Park JH, Nam RH, Choi YJ, Lee HS, Yoon H. Different microRNA expression levels in gastric cancer depending on *Helicobacter pylori* Infection. *Gut Liver* 2015;**9**:188–196.

Chang KH, Mestdagh P, Vandesompele J, Kerin MJ, Miller N. MicroRNA expression profiling to identify and validate reference genes for relative quantification in colorectal cancer. *BMC Cancer* 2010;**10**:173.

Chen B, Li H, Zeng X, Yang P, Liu X, Zhao X, Liang S. Roles of microRNA on cancer cell metabolism. *J Transl Med* 2012a;**10**:228.

Chen PS, Su JL, Hung MC. Dysregulation of microRNAs in cancer. *J Biomed Sci* 2012b;**19**:90.

Chen Y, Gelfond JAL, McManus LM, Shireman PK. Reproducibility of quantitative RT-PCR array in miRNA expression profiling and comparison with microarray analysis. *BMC Genomics* 2009;**10**:407.

Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, Norman J, Cooch N, Nishikura K, Shiekhattar R. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* 2005;**436**:740–744.

Childs G, Fazzari M, Kung G, Kawachi N, Brandwein-Gensler M, McLemore M, Chen Q, Burk RD, Smith R

V, Prystowsky MB, *et al.* Low-level expression of microRNAs let-7d and miR-205 are prognostic markers of head and neck squamous cell carcinoma. *Am J Pathol* 2009;**174**:736–745.

Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc* 2006;**1**:581–585.

Chomczynski P. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium extraction. *Anal Biochem* 1987;**159**:156–159.

Clark O, Schmidt F, Coles CH, Tchetchelnitski V, Stoker AW. Functional analysis of the putative tumor suppressor PTPRD in neuroblastoma cells. *Cancer Invest* 2012;**30**:422–432.

Constância M, Hemberger M, Hughes J, Dean W, Ferguson-Smith A, Fundele R, Stewart F, Kelsey G, Fowden A, Sibley C, *et al.* Placental-specific IGF-II is a major modulator of placental and fetal growth. *Nature* 2002;**417**:945–948.

Cox G, Mahaffey C, Nystuen A, Letts V, Frankel W. The mouse fidgetin gene defines a new role for AAA family proteins in mammalian development. *Nat Genet* 2000;**26**:198–202.

Cui L, Fang L, Shi B, Qiu S, Ye Y. Spermatozoa micro ribonucleic acid–34c level is correlated with intracytoplasmic sperm injection outcomes. *Fertil Steril* 2015;**104**:312–317.

D

Dadoune J-P. Spermatozoal RNAs: what about their functions? *Microsc Res Tech* 2009;**72**:536–551.

Dai L, Tsai-Morris CH, Sato H, Villar J, Kang JH, Zhang J, Dufau ML. Testis-specific miRNA-469 up-regulated in gonadotropin-regulated testicular RNA helicase (GRTH/DDX25)-null mice silences transition protein 2 and protamine 2 messages at sites within coding region: Implications of its role in germ cell development. *J Biol Chem* 2011;**286**:44306–44318.

Das PJ, Paria N, Gustafson-Seabury A, Vishnoi M, Chaki SP, Love CC, Varner DD, Chowdhary BP, Raudsepp T. Total RNA isolation from stallion sperm and testis biopsies. *Theriogenology* 2010;**74**:1099–1106.

Denu JM, Dixon JE. Protein tyrosine phosphatases: mechanisms of catalysis and regulation. *Curr Opin Chem Biol* 1998;**2**:633–641.

Dinami R, Ercolani C, Petti E, Piazza S, Ciani Y, Sestito R, Sacconi A, Biagioni F, Sage CL, Agami R, *et al.* miR-155 drives telomere fragility in human breast cancer by targeting TRF1. *Cancer Res* 2014;**74**:4145–4156.

Dohle GR, Colpi GM, Hargreave TB, Papp GK, Jungwirth A, Weidner W. EAU guidelines on male infertility. *Eur Urol* 2005;**48**:703–711.

Donovan JA, Koretzky GA. CD45 and the immune response. *J Am Soc Nephrol* 1993;**4**:976–985.

Du M, Shi D, Yuan L, Li P, Chu H, Qin C, Yin C, Zhang Z, Wang M. Circulating miR-497 and miR-663b in plasma are potential novel biomarkers for bladder cancer. *Sci Rep* 2015;**5**:10437.

Dvinge H, Bertone P. HTqPCR: High-throughput analysis and visualization of quantitative real-time PCR data in R. *Bioinformatics* 2009;**25**:3325–3326.

E

Esteller M. Non-coding RNAs in human disease. *Nat Rev Genet* 2011;**12**:861–874.

Evers JLH. Female subfertility. *Lancet* 2002;**360**:151–159.

F

Feifei N, Mingzhi Z, Yanyun Z, Huanle Z, Fang R, Mingzhu H, Mingzhi C, Yafei S, Fengchun Z. MicroRNA expression analysis of mammospheres cultured from human breast cancers. *J Cancer Res Clin Oncol* 2012;**138**:1937–1944.

Fellows I. Deducer: A Data Analysis GUI for R. *J Stat Softw* 2012;**49**:1–15.

Ferguson-Smith AC, Cattanach BM, Barton SC, Beechey CV, Surani MA. Embryological and molecular investigations of parental imprinting on mouse chromosome 7. *Nature* 1991;**351**:667–670.

Ferlin A, Arredi B, Foresta C. Genetic causes of male infertility. *Reprod Toxicol* 2006;**22**:133–141.

Ferlin A, Raicu F, Gatta V, Zuccarello D, Palka G, Foresta C. Male infertility: role of genetic background. *Reprod Biomed Online* 2007;**14**:734–745.

Filippov V, Solovyev V, Filippova M, Gill SS. A novel type of RNase III family proteins in eukaryotes. *Gene* 2000;**245**:213–221.

Finnegan EF, Pasquinelli AE. MicroRNA biogenesis: regulating the regulators. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2013;**48**:51–68.

Fleige S, Pfaffl MW. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Mol Aspects Med* 2006;**27**:126–139.

Foley NH, Bray I, Watters KM, Das S, Bryan K, Bernas T, Prehn JHM, Stallings RL. MicroRNAs 10a and 10b are potent inducers of neuroblastoma cell differentiation through targeting of nuclear receptor corepressor 2. *Cell Death Differ* 2011;**18**:1089–1098.

Foshay KM, Gallicano GI. miR-17 family miRNAs are expressed during early mammalian development and regulate stem cell differentiation. *Dev Biol* 2009;**326**:431–443.

Friedman RC, Farh KK-H, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 2009;**19**:92–105.

Fukushima T, Taki K, Ise R, Horii I, Yoshida T. MicroRNAs expression in the Ethylene Glycol Monomethyl Ether-induced testicular lesion. *J Toxicol Sci* 2011;**36**:601–611.

G

Galliano D, Pellicer A. MicroRNA and implantation. *Fertil Steril* 2014;**101**:1531–1544.

Gao W, Shen H, Liu L, Xu J, Xu J, Shu Y. MiR-21 overexpression in human primary squamous cell lung carcinoma is associated with poor patient prognosis. *J Cancer Res Clin Oncol* 2011;**137**:557–566.

Garrido N, García-Herrero S, Meseguer M. Assessment of sperm using mRNA microarray technology. *Fertil Steril* 2013;**99**:1008–1022.

Git A, Dvinge H, Salmon-Divon M, Osborne M, Kutter C, Hadfield J, Bertone P, Caldas C. Systematic comparison of microarray profiling, real-time PCR, and next-generation sequencing technologies for measuring differential microRNA expression. *RNA* 2010;**16**:991–1006.

Goodrich RJ, Anton E, Krawetz SA. Isolating mRNA and Small Noncoding RNAs from Human Sperm. *Spermatogenes Methods Protoc* 2013;**927**:, p. 385–396.

Goodrich RJ, Johnson GD, Krawetz SA. The preparation of human spermatozoal RNA for clinical analysis. *Arch Androl* 2007;**53**:161–167.

Gou L-T, Dai P, Liu M-F. Small noncoding RNAs and male infertility. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2014;**5**:733-745

Greco S, Gorospe M, Martelli F. Noncoding RNA in age-related cardiovascular diseases. *J Mol Cell Cardiol* 2015;**83**:142–155.

Grillari J, Hackl M, Grillari-Voglauer R. miR-17-92 cluster: ups and downs in cancer and aging. *Biogerontology* 2010;**11**:501–506.

Grinchuk OV, Jenjaroenpun P, Orlov YL, Zhou J, Kuznetsov VA. Integrative analysis of the human cis-antisense gene pairs, miRNAs and their transcription regulation patterns. *Nucleic Acids Res* 2009;**38**:534–547.

Gurunath S, Pandian Z, Anderson RA, Bhattacharya S. Defining infertility-a systematic review of prevalence studies. *Hum Reprod Update* 2011;**17**:575–588.

H

Hackl M, Brunner S, Fortschegger K, Schreiner C, Micutkova L, Muck C, Laschober GT, Lepperdinger G, Sampson N, Berger P, *et al.* miR-17, miR-19b, miR-20a, and miR-106a are down-regulated in human aging. *Aging Cell* 2010;**9**:291–296.

Hamatani T. Human spermatozoal RNAs. *Fertil Steril* 2012;**97**:275–281.

Hammoud SS, Nix DA, Zhang H, Purwar J, Carrell DT, Cairns BR. Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development. *Nature* 2009;**460**:473–478.

Han J, Lee Y, Yeom KH, Kim YK, Jin H, Kim VN. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev* 2004;**18**:3016–3027.

Harton GL, Tempest HG. Chromosomal disorders and male infertility. *Asian J Androl* 2012;**14**:32–39.

Hata A. Functions of microRNAs in cardiovascular biology and disease. *Annu Rev Physiol* 2013;**75**:69–93.

Hatse S, Brouwers B, Dalmasso B, Laenen A, Kenis C, Schöffski P, Wildiers H. Circulating microRNAs as easy-to-measure aging biomarkers in older breast cancer patients: correlation with chronological age but not with fitness/frailty status. *PLoS One* 2014;**9**:e110644.

Hayashi K, Chuva de Sousa Lopes SM, Kaneda M, Tang F, Hajkova P, Lao K, O'Carroll D, Das PP, Tarakhovsky A, Miska EA, *et al.* MicroRNA biogenesis is required for mouse primordial germ cell development and spermatogenesis. *PLoS One* 2008;**3**:e1738.

He Z, Kokkinaki M, Pant D, Gallicano GI, Dym M. Small RNA molecules in the regulation of spermatogenesis. *Reproduction* 2009;**137**:901–911.

Hell MP, Thoma CR, Fankhauser N, Christinat Y, Weber TC, Krek W. Mir-28-5p promotes chromosomal instability in vhl-Associated cancers by inhibiting mad2 translation. *Cancer Res* 2014;**74**:2432–2443.

Henkel RR, Schill W-B. Sperm preparation for ART. *Reprod Biol Endocrinol* 2003;**1**:108.

Hobert O, Westphal H. Functions of LIM-homeobox genes. *Trends Genet* 2000;**16**:75–83.

Hsu S Da, Chu CH, Tsou AP, Chen SJ, Chen HC, Hsu PWC, Wong YH, Chen YH, Chen GH, Huang HD. miRNAMap 2.0: Genomic maps of microRNAs in metazoan genomes. *Nucleic Acids Res* 2008;**36**:165–169.

Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res* 2009a;**37**:1–13.

Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 2009b;**4**:44–57.

Huang W, Kane JK, Li MD. Identification and characterization of a long isoform of human IFT80, IFT80-L. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;**373**:653–658.

Huszar JM, Payne CJ. MicroRNA 146 (Mir146) modulates spermatogonial differentiation by retinoic acid in mice. *Biol Reprod* 2013;**88**:15.

Hutvágner G, Zamore PD. RNAi: Nature abhors a double-strand. *Curr Opin Genet Dev* 2002;**12**:225–232.

Hwang HW, Mendell JT. MicroRNAs in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis. *Br J Cancer* 2006;**94**:776–780.

Hynes CJ, Clancy JL, Preiss T. miRNAs in cardiac disease: sitting duck or moving target? *IUBMB Life* 2012;**64**:872–878.

Hyun S, Lee JH, Jin H, Nam J, Namkoong B, Lee G, Chung J, Kim VN. Conserved microRNA miR-8/miR-200 and its target USH/FOG2 control growth by regulating PI3K. *Cell* 2009;**139**:1096–1108.

I

Imbar T, Eisenberg I. Regulatory role of microRNAs in ovarian function. *Fertil Steril* 2014;**101**:1524–1530.

J

Jansen G, Mahadevan M, Amemiya C, Wormskamp N, Segers B, Hendriks W, O'Hoy K, Baird S, Sabourin L, Lennon G. Characterization of the myotonic dystrophy region predicts multiple protein isoform-encoding mRNAs. *Nat Genet* 1992;**1**:261–266.

Jeggari A, Marks DS, Larsson E. miRcode: A map of putative microrna target sites in the long non-coding transcriptome. *Bioinformatics* 2012;**28**:2062–2063.

Jenkins TG, Carrell DT. Dynamic alterations in the paternal epigenetic landscape following fertilization. *Front Genet* 2012;**3**:143–151.

Jodar M, Kalko S, Castillo J, Ballescà JL, Oliva R. Differential RNAs in the sperm cells of asthenozoospermic patients. *Hum Reprod* 2012;**27**:1431–1438.

Jungwirth A, Diemer T, Dohle GR, Giwercman A, Kopa Z, Krausz C, Tournaye H. *Guidelines on Male Infertility*. 2014. European Association of Urology.

K

Kempisty B, Depa-Martynow M, Lianeri M, Jedrzejczak P, Darul-Wasowicz A, Jagodzinski PP. Evaluation of protamines 1 and 2 transcript contents in spermatozoa from asthenozoospermic men. *Folia Histochem Cytobiol* 2007;**45 Suppl 1**:S109–S113.

Ketley A, Warren A, Holmes E, Gering M, Aboobaker AA, Brook JD. The miR-30 microRNA family targets smoothened to regulate Hedgehog signalling in Zebrafish early muscle development. *PLoS One* 2013;**8**:e65170.

Khor B, Bredemeyer AL, Huang C-Y, Turnbull IR, Evans R, Maggi LB, White JM, Walker LM, Carnes K, Hess RA, *et al.* Proteasome activator PA200 is required for normal spermatogenesis. *Mol Cell Biol* 2006;**26**:2999–3007.

Kiessling AA, Lamparelli N, Yin HZ, Seibel MM, Eyre RC. Semen leukocytes: friends or foes? *Fertil Steril* 1995;**64**:196–198.

Kim VN, Han J, Siomi MC. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009;**10**:126–139.

Klein U, Lia M, Crespo M, Siegel R, Shen Q, Mo T, Ambesi-Impiombato A, Califano A, Migliazza A, Bhagat G, *et al.* The DLEU2/miR-15a/16-1 cluster controls B cell proliferation and its deletion leads to chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell* 2010;**17**:28–40.

Kogenaru S, Qing Y, Guo Y, Wang N. RNA-seq and microarray complement each other in transcriptome profiling. *BMC Genomics* 2012;**13**:629.

Kong KL, Kwong DLW, Chan TH-M, Law SY-K, Chen L, Li Y, Qin Y-R, Guan X-Y. MicroRNA-375 inhibits tumour growth and metastasis in oesophageal squamous cell carcinoma through repressing insulin-like growth factor 1 receptor. *Gut* 2012;**61**:33–42.

Koshiol J, Wang E, Zhao Y, Marincola F, Landi MT. Strengths and limitations of laboratory procedures for microRNA detection. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010;**19**:907–911.

Kotaja N. MicroRNAs and spermatogenesis. *Fertil Steril* 2014;**101**:1552–1562.

Kozar K, Ciemerych MA, Rebel VI, Shigematsu H, Zagozdzon A, Sicinska E, Geng Y, Yu Q, Bhattacharya S, Bronson RT, *et al.* Mouse development and cell proliferation in the absence of D-cyclins. *Cell* 2004;**118**:477–491.

Krawetz SA, Kruger A, Lalancette C, Tagett R, Anton E, Draghici S, Diamond MP. A survey of small RNAs in human sperm. *Hum Reprod* 2011;**26**:3401–3412.

Krawetz SA. Paternal contribution: new insights and future challenges. *Nat Rev Genet* 2005;**6**:633–642.

Krebs S, Fischaleck M, Blum H. A simple and loss-free method to remove TRIzol contaminations from minute RNA samples. *Anal Biochem* 2009;**387**:136–138.

Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, Swanson RJ, Matta JF, Oehninger S. Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1988;**49**:112–117.

Küpker W, Schwinger E, Hiort O, Ludwig M, Nikolettos N, Schlegel PN, Diedrich K. Genetics of male subfertility: Consequences for the clinical work-up. *Hum Reprod* 1999;**14 Suppl 1**:24–37.

Kurihara Y, Tokuriki M, Myojin R, Hori T, Kuroiwa A, Matsuda Y, Sakurai T, Kimura M, Hecht NB, Uesugi S. CPEB2, a novel putative translational regulator in mouse haploid germ cells. *Biol Reprod* 2003;**69**:261–268.

L

Lagos-Quintana M, Rauhut R, Meyer J, Borkhardt A, Tuschl T. New microRNAs from mouse and human. *RNA* 2003;**9**:175–179.

Lakshmipathy U, Love B, Goff LA, Jörnsten R, Graichen R, Hart RP, Chesnut JD. MicroRNA expression pattern of undifferentiated and differentiated human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev* 2007;**16**:1003–1016.

Lalancette C, Platts AE, Johnson GD, Emery BR, Carrell DT, Krawetz SA. Identification of human sperm transcripts as candidate markers of male fertility. *J Mol Med (Berl)* 2009;**87**:735–748.

Lambard S, Galeraud-Denis I, Martin G, Levy R, Chocat A, Carreau S. Analysis and significance of mRNA in human ejaculated sperm from normozoospermic donors: relationship to sperm motility and capacitation. *Mol Hum Reprod* 2004;**10**:535–541.

Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, *et al.* Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001;**409**:860–921.

Lee K, Kim J-H, Kwon O-B, An K, Ryu J, Cho K, Suh Y-H, Kim H-S. An activity-regulated microRNA, miR-188, controls dendritic plasticity and synaptic transmission by downregulating neuropilin-2. *J Neurosci* 2012;**32**:5678–5687.

Lefièvre L, Bedu-Addo K, Conner SJ, Machado-Oliveira GSM, Chen Y, Kirkman-Brown JC, Afnan MA, Publicover SJ, Ford WCL, Barratt CLR. Counting sperm does not add up any more: Time for a new equation? *Reproduction* 2007;**133**:675–684.

Lemons D, McGinnis W. Genomic evolution of Hox gene clusters. *Science* 2006;**313**:1918–1922.

Lewin B. *Genes IX*. 9th edn, 2007. Jones and Bartlett, Sudbury, MA, US.

Lewis SEM. Is sperm evaluation useful in predicting human fertility? *Reproduction* 2007;**134**:31–40.

Li FQ, Xu B, Wu YJ, Yang ZL, Qian JJ. Differential microRNA expression in signet-ring cell carcinoma compared with tubular adenocarcinoma of human gastric cancer. *Genet Mol Res* 2015a;**14**:739–747.

Li P, Teng F, Gao F, Zhang M, Wu J, Zhang C. Identification of circulating microRNAs as potential biomarkers for detecting acute ischemic stroke. *Cell Mol Neurobiol* 2015b;**35**:433–447.

Li Y, Li M, Liu Y, Song G, Liu N. A microarray for microRNA profiling in spermatozoa from adult men living in an environmentally polluted site. *Bull Environ Contam Toxicol* 2012;**89**:1111–1114.

Lian J, Zhang X, Tian H, Liang N, Wang Y, Liang C, Li X, Sun F. Altered microRNA expression in patients with non-obstructive azoospermia. *Reprod Biol Endocrinol* 2009;**7**:13.

Lim LP, Lim LP, Lau NC, Lau NC, Weinstein EG, Weinstein EG, Abdelhakim A, Abdelhakim A, Yekta S, Yekta S, *et al.* The microRNAs of Caenorhabditis elegans. *Genes Dev* 2003;**17**:991–1008.

Lima-Souza A, Anton E, Mao S, Ho WJ, Krawetz SA. A platform for evaluating sperm RNA biomarkers: dysplasia of the fibrous sheath--testing the concept. *Fertil Steril* 2012;**97**:1061–1066.

Lin Y, Zeng Y, Zhang F, Xue L, Huang Z, Li W, Guo M. Characterization of microRNA expression profiles and the discovery of novel microRNAs involved in cancer during human embryonic development. *PLoS One* 2013;**8**:e69230.

Liu T, Cheng W, Gao Y, Wang H, Liu Z. Microarray analysis of microRNA expression patterns in the semen of infertile men with semen abnormalities. *Mol Med Rep* 2012a;**6**:535–542.

Liu W, Pang RTK, Chiu PCN, Wong BPC, Lao KQ, Lee K. Sperm-borne microRNA-34c is required for the first cleavage division in mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012b;**109**:490–494.

Liu Y, Masson J-Y, Shah R, O'Regan P, West SC. RAD51C is required for Holliday junction processing in mammalian cells. *Science* 2004;**303**:243–246.

Lu M, Shi B, Wang J, Cao Q, Cui Q. TAM: a method for enrichment and depletion analysis of a microRNA category in a list of microRNAs. *BMC Bioinformatics* 2010;**11**:419.

Lu YC, Chen H, Fok KL, Tsang LL, Yu MK, Zhang XH, Chen J, Jiang X, Chung YW, Ma ACH, *et al.* CFTR mediates bicarbonate-dependent activation of miR-125b in preimplantation embryo development. *Cell Res* 2012;**22**:1453–1466.

Lui WO, Pourmand N, Patterson BK, Fire A. Patterns of known and novel small RNAs in human cervical cancer. *Cancer Res* 2007;**67**:6031–6043.

Lund E, Güttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science*

2004;**303**:95–98.

M

Maatouk DM, Loveland KL, McManus MT, Moore K, Harfe BD. Dicer1 is required for differentiation of the mouse male germline. *Biol Reprod* 2008;**79**:696–703.

Majesky MW. Organizing motility: LIM domains, LPP, and smooth muscle migration. *Circ Res* 2006;**98**:306–308.

Mao S, Goodrich RJ, Hauser R, Schrader SM, Chen Z, Krawetz SA. Evaluation of the effectiveness of semen storage and sperm purification methods for spermatozoa transcript profiling. *Syst Biol Reprod Med* 2013;**59**:287–295.

Maragkakis M, Alexiou P, Papadopoulos GL, Reczko M, Dalamagas T, Giannopoulos G, Goumas G, Koukis E, Kourtis K, Simossis VA, *et al.* Accurate microRNA target prediction correlates with protein repression levels. *BMC Bioinformatics* 2009a;**10**:295.

Maragkakis M, Reczko M, Simossis V, Alexiou P, Papadopoulos GL, Dalamagas T, Giannopoulos G, Goumas G, Koukis E, Kourtis K, *et al.* DIANA-microT web server: elucidating microRNA functions through target prediction. *Nucleic Acids Res* 2009b;**37**:W273–W276.

Marigo V, Roberts DJ, Lee SMK, Tsukurov O, Levi T, Gastier JM, Epstein DJ, Gilbert DJ, Copeland NG, Seidman CE, *et al.* Cloning, expression, and chromosomal location of SHH and IHH: Two human homologues of the Drosophila segment polarity gene Hedgehog. *Genomics* 1995;**28**:44–51.

Martin J, Jenkins RH, Bennagi R, Krupa A, Phillips AO, Bowen T, Fraser DJ. Post-transcriptional regulation of Transforming Growth Factor Beta-1 by microRNA-744. *PLoS One* 2011;**6**:e25044.

Masoro EJ, Austad SN. *Handbook of the biology of aging*. 7th edn, 2011. Academic Press, San Antonio, TX, US.

Massague J. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 1998;**67**:753–791.

Matzuk MM, Lamb DJ. The biology of infertility: research advances and clinical challenges. *Nat Med* 2008;**14**:1197–1213.

Mau-Holzmann UA. Somatic chromosomal abnormalities in infertile men and women. *Cytogenet Genome Res* 2005;**111**:317–336.

McCallie B, Schoolcraft WB, Katz-Jaffe MG. Aberration of blastocyst microRNA expression is associated with human infertility. *Fertil Steril* 2010;**93**:2374–2382.

McIver SC, Roman SD, Nixon B, McLaughlin EA. miRNA and mammalian male germ cells. *Hum Reprod Update* 2012;**18**:44–59.

Meister G, Landthaler M, Peters L, Chen PY, Urlaub H, Lührmann R, Tuschl T. Identification of novel argonaute-associated proteins. *Curr Biol* 2005;**15**:2149–2155.

Mestdagh P, Vlierberghe P, Weer A, Muth D, Westermann F, Speleman F, Vandesompele J. A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization. *Genome Biol* 2009;**10**:R64.

Meyer SU, Pfaffl MW, Ulbrich SE. Normalization strategies for microRNA profiling experiments: a “normal” way to a hidden layer of complexity? *Biotechnol Lett* 2010;**32**:1777-1788

Miller D, Briggs D, Snowden H, Hamlington J, Rollinson S, Lilford R, Krawetz SA. A complex population of RNAs exists in human ejaculate spermatozoa: implications for understanding molecular aspects of spermiogenesis. *Gene* 1999;**237**:385–392.

Miller D, Ostermeier GC. Towards a better understanding of RNA carriage by ejaculate spermatozoa. *Hum Reprod Update* 2006;**12**:757–767.

Min H, Lee JY, Kim MH. Hoxc gene collinear expression and epigenetic modifications established during embryogenesis are maintained until after birth. *Int J Biol Sci* 2013;**9**:960–965.

Mukherjee S, Valencia JDD, Stewman S, Metz J, Monnier S, Rath U, Asenjo AB, Charafeddine RA, Sosa HJ, Ross JL, *et al.* Human fidgetin is a microtubule severing enzyme and minus-end depolymerase that regulates mitosis. *Cell Cycle* 2012;**11**:2359–2366.

N

Nagaraja AK, Andreu-Vieyra C, Franco HL, Ma L, Chen R, Han DY, Zhu H, Agno JE, Gunaratne PH, DeMayo FJ, *et al.* Deletion of Dicer in somatic cells of the female reproductive tract causes sterility. *Mol Endocrinol* 2008;**22**:2336–2352.

Navarro-Costa P, Plancha CE, Gonaçlves J. Genetic dissection of the AZF regions of the human Y chromosome: Thriller or filler for male (In)fertility? *J Biomed Biotechnol* 2010;**2010**:1-18

Niu Z, Goodyear SM, Rao S, Wu X, Tobias JW, Avarbock MR, Brinster RL. MicroRNA-21 regulates the self-renewal of mouse spermatogonial stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;**108**:12740–12745.

Nixon B, Bielanowicz A, Mclaughlin EA, Tanphaichitr N, Ensslin MA, Aitken RJ. Composition and significance of detergent resistant membranes in mouse spermatozoa. *J Cell Physiol* 2009;**218**:122–134.

Nixon B, Mitchell LA, Anderson AL, Mclaughlin EA, O'bryan MK, Aitken RJ. Proteomic and functional analysis of human sperm detergent resistant membranes. *J Cell Physiol* 2011;**226**:2651–2665.

Noren Hooten N, Fitzpatrick M, Wood WH, De S, Ejiogu N, Zhang Y, Mattison JA, Becker KG, Zonderman AB, Evans MK. Age-related changes in microRNA levels in serum. *Aging (Albany NY)* 2013;**5**:725–740.

O

Obholz KL, Akopyan A, Waymire KG, MacGregor GR. FNDC3A is required for adhesion between spermatids and Sertoli cells. *Dev Biol* 2006;**298**:498–513.

Ohlsson Teague EMC, Print CG, Hull ML. The role of microRNAs in endometriosis and associated reproductive conditions. *Hum Reprod Update* 2009;**16**:142–165.

Olsen PH, Ambros V. The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. *Dev Biol* 1999;**216**:671–680.

Ono K, Kuwabara Y, Han J. MicroRNAs and cardiovascular diseases. *FEBS J* 2011;**278**:1619–1633.

Ostermeier GC, Dix DJ, Miller D, Khatri P, Krawetz SA. Spermatozoal RNA profiles of normal fertile men. *Lancet* 2002;**360**:772–777.

Ostermeier GC, Miller D, Huntriss JD, Diamond MP, Krawetz SA. Reproductive biology: Delivering spermatozoan RNA to the oocyte. *Nature* 2004;**429**:154.

P

Pacheco SE, Anderson LM, Sandrof MA, Vantangoli MM, Hall SJ, Boekelheide K. Sperm mRNA transcripts are indicators of sub-chronic low dose testicular injury in the fischer 344 rat. *PLoS One*

2012;**7**:e44280.

Paraskevopoulou MD, Georgakilas G, Kostoulas N, Vlachos IS, Vergoulis T, Reczko M, Filippidis C, Dalamagas T, Hatzigeorgiou AG. DIANA-microT web server v5.0: service integration into miRNA functional analysis workflows. *Nucleic Acids Res* 2013;**41**:W169–W173.

Pasquinelli A, Reinhart B, Slack F, Martindale M, Kuroda M, Maller B, Hayward D, Ball E, Degnan B, Müller P, *et al.* Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature* 2000;**408**:86–89.

Paul S, Lombroso PJ. Receptor and nonreceptor protein tyrosine phosphatases in the nervous system. *Cell Mol Life Sci* 2003;**60**:2465–2482.

Pede V, Rombout A, Vermeire J, Naessens E, Mestdagh P, Robberecht N, Vanderstraeten H, Roy N, Vandesompele J, Speleman F, *et al.* CLL cells respond to B-Cell receptor stimulation with a microRNA/mRNA signature associated with MYC activation and cell cycle progression. *PLoS One* 2013;**8**:e60275.

Pellestor F, Anahory T, Lefort G, Puechberty J, Liehr T, Hedon B, Sarda P. Complex chromosomal rearrangements: origin and meiotic behavior. *Hum Reprod Update* 2011;**17**:476–494.

Pessot CA, Brito M, Figueroa J, Concha II, Yanez A, Burzio LO. Presence of RNA in the sperm nucleus. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;**158**:272–278.

Pierik FH, Ginneken AM, Dohle GR, Vreeburg JT, Weber RF. The advantages of standardized evaluation of male infertility. *Int J Androl* 2000;**23**:340–346.

Pillai RS. MicroRNA function: Multiple mechanisms for a tiny RNA ? *RNA* 2005;1753–1761.

Print CG, Loveland KL. Germ cell suicide: New insights into apoptosis during spermatogenesis. *BioEssays* 2000;**22**:423–430.

Pritchard CC, Cheng HH, Tewari M. MicroRNA profiling: approaches and considerations. *Nat Rev Genet* 2012;**13**:358–369.

Q

Quinonez SC, Innis JW. Human HOX gene disorders. *Mol Genet Metab* 2014;**111**:4–15.

R

R Development Core Team. *R: A language and environment for statistical computing*. 2012. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

Rabe T, Dietrich K, Strowitzki T. *Manual on Assisted Reproduction*. 2nd edn, 2000. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, Germany.

Radisky DC. miR-200c at the nexus of epithelial-mesenchymal transition, resistance to apoptosis, and the breast cancer stem cell phenotype. *Breast Cancer Res* 2011;**13**:110.

Reczko M, Maragkakis M, Alexiou P, Grosse I, Hatzigeorgiou AG. Functional microRNA targets in protein coding sequences. *Bioinformatics* 2012;**28**:771–776.

Reiner A, Yekutieli D, Benjamini Y. Identifying differentially expressed genes using false discovery rate controlling procedures. *Bioinformatics* 2003;**19**:368–375.

Renault NKE, Renault MP, Copeland E, Howell RE, Greer WL. Familial skewed X-chromosome inactivation linked to a component of the cohesin complex, SA2. *J Hum Genet* 2011;**56**:390–397.

Rhoades MW, Reinhart BJ, Lim LP, Burge CB, Bartel B, Bartel DP. Prediction of plant microRNA targets. *Cell* 2002;**110**:513–520.

Rizzo PA, Trievel RC. Substrate and product specificities of SET domain methyltransferases. *Epigenetics* 2011;**6**:1059–1067.

Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res* 2004;**14**:1902–1910.

Rokah OH, Granot G, Ovcharenko A, Modai S, Pasmanik-Chor M, Toren A, Shomron N, Shpilberg O. Downregulation of miR-31, miR-155, and miR-564 in chronic myeloid leukemia cells. *PLoS One* 2012;**7**:e35501.

Rosenbluth EM, Shelton DN, Sparks AET, Devor E, Christenson L, Voorhis BJ. MicroRNA expression in the human blastocyst. *Fertil Steril* 2013;**99**:855–861.

Ross AJ, Waymire KG, Moss JE, Parlow AF, Skinner MK, Russell LD, MacGregor GR. Testicular degeneration in Bclw-deficient mice. *Nat Genet* 1998;**18**:251–256.

Rottiers V, Naar AM. MicroRNAs in metabolism and metabolic disorders. *Nat Rev cell Biol* 2012;**13**:239–250.

Rozen S, Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 2000;**132**:365–386.

S

Sabanegh ES. *Male Infertility: Problems and Solutions*. 1st edn, 2011. Springer, Humana Press, Cleveland, OH, US.

Sand M, Skrygan M, Sand D, Georgas D, Hahn SA, Gambichler T, Altmeyer P, Bechara FG. Expression of microRNAs in basal cell carcinoma. *Br J Dermatol* 2012;**167**:847–855.

Sarrate Z, Anton E. Fluorescence in situ hybridization (FISH) protocol in human sperm. *J Vis Exp* 2009;**31**:1–2

Sarrate Z, Vidal F, Blanco J. Role of sperm fluorescent in situ hybridization studies in infertile patients: indications, study approach, and clinical relevance. *Fertil Steril* 2010;**93**:1892–1902.

Schagdarsurengin U, Paradowska A, Steger K. Analysing the sperm epigenome: roles in early embryogenesis and assisted reproduction. *Nat Rev Urol* 2012;**9**:609–619.

Segen JC. *Concise dictionary of modern medicine*. 2nd edn, 2006. McGraw-Hill, New York, US.

Seggerson K, Tang L, Moss EG. Two genetic circuits repress the *Caenorhabditis elegans* heterochronic gene lin-28 after translation initiation. *Dev Biol* 2002;**243**:215–225.

Shen T-L, Park AY-J, Alcaraz A, Peng X, Jang I, Koni P, Flavell RA, Gu H, Guan J-L. Conditional knockout of focal adhesion kinase in endothelial cells reveals its role in angiogenesis and vascular development in late embryogenesis. *J Cell Biol* 2005;**169**:941–952.

Song Q, Decato B, Hong EE, Zhou M, Fang F, Qu J, Garvin T, Kessler M, Zhou J, Smith AD. A reference methylome database and analysis pipeline to facilitate integrative and comparative epigenomics. *PLoS One* 2013;**8**:e81148.

Steger K, Pauls K, Klonisch T, Franke FE, Bergmann M. Expression of protamine-1 and -2 mRNA during human spermiogenesis. *Mol Hum Reprod* 2000;**6**:219–225.

Steger K, Wilhelm J, Konrad L, Stalf T, Greb R, Diemer T, Kliesch S, Bergmann M, Weidner W. Both

protamine-1 to protamine-2 mRNA ratio and Bcl2 mRNA content in testicular spermatids and ejaculated spermatozoa discriminate between fertile and infertile men. *Hum Reprod* 2008;**23**:11–16.

Sun D, Lee YS, Malhotra A, Kim HK, Matecic M, Evans C, Jensen R V, Moskaluk CA, Dutta A. miR-99 family of MicroRNAs suppresses the expression of prostate-specific antigen and prostate cancer cell proliferation. *Cancer Res* 2011;**71**:1313–1324.

Sun Y, Kucej M, Fan H-Y, Yu H, Sun Q-Y, Zou H. Separase is recruited to mitotic chromosomes to dissolve sister chromatid cohesion in a DNA-dependent manner. *Cell* 2012;**29**:997–1003.

Sutovsky P. Sperm proteasome and fertilization. *Reproduction* 2011;**142**:1–14.

T

Taira M, Jamrich M, Good PJ, Dawid IB. The LIM domain-containing homeo box gene Xlim-1 is expressed specifically in the organizer region of Xenopus gastrula embryos. *Genes Dev* 1992;**6**:356–366.

Takada S, Yamashita Y, Berezikov E, Hatanaka H, Fujiwara S, Kurashina K, Watanabe H, Enomoto M, Soda M, Choi YL, *et al.* MicroRNA expression profiles of human leukemias. *Leukemia* 2008;**22**:1274–1278.

Takai H, Tominaga K, Motoyama N, Minamishima YA, Nagahama H, Tsukiyama T, Ikeda K, Nakayama K, Nakanishi M, Nakayama KI. Aberrant cell cycle checkpoint function and early embryonic death in Chk1(-/-) mice. *Genes Dev* 2000;**14**:1439–1447.

Tanzer A, Amemiya CT, Kim C-B, Stadler PF. Evolution of microRNAs located within Hox gene clusters. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 2005;**304**:75–85.

Tennessen JM, Thummel CS. Developmental timing: let-7 function conserved through evolution. *Curr Biol* 2008;**18**:R707–R708.

Toloubeydokhti T, Bukulmez O, Chegini N. Potential regulatory functions of microRNA in the ovary. *Endocrinology* 2009;**26**:469–478.

Tomari Y, Zamore PD. Perspective: Machines for RNAi. *Genes Dev* 2005;**19**:517–529.

Tong M-H, Mitchell DA, McGowan SD, Evanoff R, Griswold MD. Two miRNA clusters, Mir-17-92 (Mirc1) and Mir-106b-25 (Mirc3), are involved in the regulation of spermatogonial differentiation in mice. *Biol Reprod* 2012;**86**:72–72.

Trompeter H-I, Abbad H, Iwaniuk KM, Hafner M, Renwick N, Tuschl T, Schira J, Müller HW, Wernet P. MicroRNAs MiR-17, MiR-20a, and MiR-106b act in concert to modulate E2F activity on cell cycle arrest during neuronal lineage differentiation of USSC. *PLoS One* 2011;**6**:e16138.

Tsui S, Dai T, Roettger S, Schempp W, Salido EC, Yen PH. Identification of two novel proteins that interact with germ-cell-specific RNA-binding proteins DAZ and DAZL1. *Genomics* 2000;**65**:266–273.

V

Vandesompele J, Preter K, Pattyn F, Poppe B, Roy N, Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002;**3**:research0034.

Vogt PH. Human chromosome deletions in Yq11, AZF candidate genes and male infertility: history and update. *Mol Hum Reprod* 1998;**4**:739–744.

W

Wang C, Yang C, Chen X, Yao B, Yang C, Zhu C, Li L, Wang J, Li X, Shao Y, *et al.* Altered profile of seminal plasma microRNAs in the molecular diagnosis of male infertility. *Clin Chem* 2011;**57**:1722–1731.

Wang Y, Yang L, Li P, Huang H, Liu T, He H, Lin Z, Jiang Y, Ren N, Wu B, *et al.* Circulating microRNA signatures associated with childhood asthma. *Clin Lab* 2015;**61**:467-474.

Wang Z, Yin H, Zhang Y, Feng Y, Yan Z, Jiang X, Bukhari I, Iqbal F, Cooke HJ, Shi Q. miR-214-mediated downregulation of RNF8 induces chromosomal instability in ovarian cancer cells. *Cell Cycle* 2014;**13**:3519–3528.

World Health Organization. *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen*. 5th edn, 2010. Cambridge University Press, New York, US.

Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol* 2009;**11**:228–234.

Woltering JM, Durston AJ. MiR-10 represses HoxB1a and HoxB3a in zebrafish. *PLoS One* 2008;**3**:e1396.

Wotschofsky Z, Meyer HA, Jung M, Fendler A, Wagner I, Stephan C, Busch J, Erbersdobler A, Disch AC, Mollenkopf HJ, *et al.* Reference genes for the relative quantification of microRNAs in renal cell carcinomas and their metastases. *Anal Biochem* 2011;**417**:233–241.

Wu T, Zhou H, Hong Y, Li J, Jiang X, Huang H. miR-30 family members negatively regulate osteoblast differentiation. *J Biol Chem* 2012;**287**:7503–7511.

Wu W, Qin Y, Li Z, Dong J, Dai J, Lu C, Guo X, Zhao Y, Zhu Y, Zhang W, *et al.* Genome-wide microRNA expression profiling in idiopathic non-obstructive azoospermia: significant up-regulation of miR-141, miR-429 and miR-7-1-3p. *Hum Reprod* 2013;**28**:1827–1836.

Wylie D, Shelton J, Choudhary A, Adai AT. A novel mean-centering method for normalizing microRNA expression from high-throughput RT- qPCR data. *BMC Res Notes* 2011;**4**:555.

X

Xi Y, Formentini A, Chien M, Weir DB, Russo JJ, Ju J, Kornmann M, Ju J. Prognostic values of microRNAs in colorectal cancer. *Biomark Insights* 2006;**2**:113–121.

Y

Yadav RP, Kotaja N. Small RNAs in spermatogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 2013;**382**:498–508.

Yanagimachi R. Fertilization studies and assisted fertilization in mammals: Their development and future. *J Reprod Dev* 2012;**58**:25–32.

Yang Q, Hua J, Wang L, Xu B, Zhang H, Ye N, Zhang Z, Yu D, Cooke HJ, Zhang Y, *et al.* MicroRNA and piRNA profiles in normal human testis detected by next generation sequencing. *PLoS One* 2013a;**8**:e66809.

Yang Q-E, Racicot KE, Kaucher AV, Oatley MJ, Oatley JM. MicroRNAs 221 and 222 regulate the undifferentiated state in mammalian male germ cells. *Development* 2013b;**140**:280–290.

Yang Y, Bai W, Zhang L, Yin G, Wang X, Wang J, Zhao H, Han Y, Yao YQ. Determination of microRNAs in mouse preimplantation embryos by microarray. *Dev Dyn* 2008;**237**:2315–2327.

Ye L, Evans J, Gargett CE. Lim1/LIM1 is expressed in developing and adult mouse and human endometrium. *Histochem Cell Biol* 2012;**137**:527–536.

Yeom KH, Lee Y, Han J, Suh MR, Kim VN. Characterization of DGCR8/Pasha, the essential cofactor for Drosha in primary miRNA processing. *Nucleic Acids Res* 2006;**34**:4622–4629.

Yu L, Zhou L, Cheng Y, Sun L, Fan J, Liang J, Guo M, Liu N, Zhu L. MicroRNA-543 acts as an oncogene by targeting PAQR3 in hepatocellular carcinoma. *Am J Cancer Res* 2014;**4**:897–906.

Yu Z, Raabe T, Hecht NB. MicroRNA Mirn122a reduces expression of the posttranscriptionally regulated germ cell transition protein 2 (Tnp2) messenger RNA (mRNA) by mRNA cleavage. *Biol Reprod* 2005;**73**:427–433.

Yuan S, Tang C, Zhang Y, Wu J, Bao J, Zheng H, Xu C. mir-34b/c and mir-449a/b/c are required for spermatogenesis, but not for the first cleavage division in mice. *Biol Open* 2015;**4**:212-213.

Z

Zhang X, Liu J, Zang D, Wu S, Liu A, Zhu J. Upregulation of miR-572 transcriptionally suppresses SOCS1 and p21 and contributes to human ovarian cancer progression. *Oncotarget* 2015;**6**:15180-15193

Zhang Z, Sapiro R, Kapfhamer D, Bucan M, Bray J, Chennathukuzhi V, Mcnamara P, Curtis A, Zhang M, Blanchette-mackie EJ. A sperm-associated WD repeat protein orthologous to Chlamydomonas PF20 associates with Spag6, the mammalian orthologue of Chlamydomonas PF16. *Society* 2002;**22**:7993–8004.

Zhu CH, Huang Y, Broman MT, Domann FE. Expression of AP-2 alpha in SV40 immortalized human lung fibroblasts is associated with a distinct pattern of cytosine methylation in the AP-2 alpha promoter. *Biochim Biophys Acta* 2001;**1519**:85–91.

Zhuang X, Li Z, Lin H, Gu L, Lin Q, Lu Z, Tzeng C-M. Integrated miRNA and mRNA expression profiling to identify mRNA targets of dysregulated miRNAs in non-obstructive azoospermia. *Sci Rep* 2015;**5**:7922.