

VNIVERSITAT
D VALÈNCIA

Facultad de CC Biológicas

Departamento de Bioquímica



VNIVERSITAT
D VALÈNCIA

TRANSCRIPTÓMICA DE
LA INFERTILIDAD
MASCULINA

**Tesis doctoral presentada por Sandra García Herrero
Licenciada en CC Biológicas
Valencia, 2012**

Directores:

Dr. Marcos Meseguer Escrivà

Dr. Nicolás Garrido Puchalt

Dr. Marcos Meseguer Escrivá, Doctor en Ciencias Biológicas
por la Universidad de Valencia.

CERTIFICA:

Que el trabajo titulado *Transcriptómica de la infertilidad masculina* ha sido íntegramente realizado por Doña Sandra García Herrero bajo mi dirección. Revisado el presente trabajo, se encuentra conforme para ser presentado en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Valencia.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, expido el presente certificado a 29 de mayo de 2012.



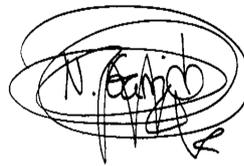
Fdo. Marcos Meseguer Escrivá

Dr. Nicolás Garrido Puchalt, Doctor en Ciencias Biológicas por la Universidad de Valencia.

CERTIFICA:

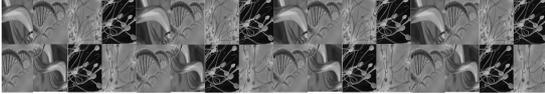
Que el trabajo titulado *Transcriptómica de la infertilidad masculina* ha sido íntegramente realizado por Doña Sandra García Herrero bajo mi dirección. Revisado el presente trabajo, se encuentra conforme para ser presentado en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Valencia.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, expido el presente certificado a 29 de mayo de 2012.

A handwritten signature in black ink, enclosed within a hand-drawn oval. The signature is stylized and appears to read 'N. Garrido'.

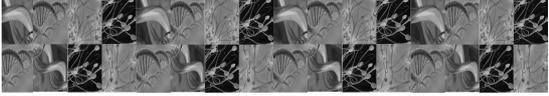
Fdo. Nicolás Garrido Puchalt

El presente trabajo de tesis ha sido realizado en los laboratorios de la Fundación IVI, así como en los laboratorios de Andrología y Fecundación *in vitro* del Instituto Universitario IVI Valencia con una ayuda IMPIVA.



Índice

Agradecimientos	página 3
Introducción	página 7
Hipótesis	página 41
Objetivos	página 43
Material y Métodos	página 45
Resultados	página 77
Discusión	página 171
Conclusiones	página 185
Bibliografía	página 187
Abreviaturas	página 205
Material Adicional (CD adjunto): Tablas completas. Artículos y presentaciones en congresos generados en esta tesis.	



Transcriptómica de la infertilidad masculina

Índice

Sandra García Herrero. 2012

Bueno, ya es hora de escribir la última parte de la tesis que viene a ser lo primero que se lee (y a veces lo único). Primero de todo quiero decir que yo estoy hoy aquí por un cúmulo de casualidades, ya que me inscribí al máster que luego me abrió las puertas del doctorado (y posteriormente las de mi vida laboral) el último día de inscripción, cuando sólo restaba media hora para cerrar el rectorado. Unos días antes ya me había inscrito en otros 3... Además, no me seleccionaron en la primera ronda y me llamaron ya en septiembre, a una semana de comenzar el curso. Cuando me llamaron para decirme que estaba aceptada en el máster, ya me habían aceptado de otros y mucho más baratos, de modo que les dije que me dieran unos minutos para comentarlo con mi familia, ya que supondría que me tendrían que ayudar económicamente.

Llamé a mi madre y le expliqué la situación, yo no quería que se metieran en un dinero que luego les iba a hacer falta, ya que yo sólo disponía de la mitad de lo que costaba el máster... Mi madre me dijo que hiciera lo que yo quisiera y que pensara en mi futuro... Si pensaba en mi futuro tenía que aceptar, y si pensaba en la situación económica (trabajaba vendiendo gas natural de puerta en puerta y vivía alquilada), rechazarlo... Como no quería ser una carga, decidí no aceptar y cuando estaba marcando el teléfono para decir que no, me llamó mi madre al móvil y me dijo que aceptara, que ya nos apañaríamos, que ese máster era el que más me gustaba y el que más futuro podría tener de todos los que me había inscrito... Así que con el permiso de mis directores de tesis... el primer agradecimiento es para mi mamá: GRACIAS MAMÁ, POR AYUDARME, ACONSEJARME, APOYARME, POR TODO. Porque gran parte de lo que soy y de lo que tengo es gracias a ti. Te quiero.

Gracias a los doctores Marcos Meseguer y Nicolás Garrido, mis dos estupendos y geniales directores de tesis, por sacar todo lo bueno que había en mí (y lo malo también). Ha sido un placer estar con vosotros, aunque ha habido momentos malos, los buenos son más y mejores, por lo que el balance es inmejorable. Gracias por darme la oportunidad de investigar, de hacer algo muy bonito y de dedicarme a lo que estudié y me apasiona, la biología. Hoy por hoy, y a toro pasado, me doy cuenta de lo afortunada y privilegiada que soy y eso es en gran parte, gracias a vosotros. Además, hacer una tesis y tener siempre a mano a tus directores, no tiene precio.

Gracias a toda la gente que me ha ayudado a lo largo de estos 5 años, me llevo un recuerdo precioso de los 3 primeros que pasé en el IVI y de los posteriores ya en iGenomix e IVIOMICS... Todos los que me conocéis sabéis que he reído (una barbaridad), disfrutado, aprendido, llorado (mucho), pataleado (bastante), rabiado... pero todos esos sentimientos y estados de ánimo han conformado un conglomerado de experiencia vital genial.

Y aunque no quiero que esto se parezca a un discurso de agradecimiento de los Oscar de Hollywood, allá voy...

Gracias a José Antonio (PpAn), mi antecesor en el puesto becario por introducirme en el “destelleante” mundo de las “lucecicas” de colores, Josón por adoptarme y por todas esas interminables tardes de cervezas, a Lala y Virginia, compañeras de tesis, por todas esas sesiones de sonrisas y lágrimas, a todos mis compañeros del laboratorio de andrología, en especial a Yolanda, porque me ayudó a comprender que no me estaba volviendo loca en un momento personal difícil (ya sabes), a todos los técnicos de los laboratorios de FIV por soportar (en mayor o menor medida) mis constantes llamadas al laboratorio, a María, mi “murcianica” favorita por acogerme como una hermana, a Gus (el increíble Hulk) también por hacerme sentir como una más, a TODOS mis compañeros de IVIOMICS, del primero al último, por hacerme sentir muy arropada y como en casa en desde el primer instante, a la Rubio por quedarse conmigo, a MC Martínez, mi segunda “murcianica” favorita, por mostrarme esa vitalidad y optimismo infinitos y ese incondicional amor al trabajo, y a todas las personas que en mayor o menor medida, con sus acciones o actitudes (buenas o no, favorables o no) han desencadenado, que hoy esté ante todos vosotros defendiendo mi tesis doctoral.

Gracias también a la Fundación, donde se respira ciencia y dónde me acogisteis con los brazos abiertos y me ayudasteis con la parte experimental, y de nuevo gracias con mayúsculas a la FUNDACIÓN, por poner en mi camino al hombre de mi vida.

Sebas, gracias por estar aquí, por animarme, por consolarme, por abrazarme y darme fuerza, por hacerme saber lo que significa ver al Sol morirse de ganas y ser mi perro verde, y sobre todo por quererme y haberme dado a la cosa más bonita del mundo, nuestra “fetita”, Alba. Te quiero, te necesito y te amo.

Gracias a todos mis amigos de siempre, a mi querido Comité de Crisis (Carlos, Laura, Cris, Ruth, David...) por estar ahí siempre, os quiero muchísimo, a mi amiga Sandra, que también sabe lo que cuesta una tesis, a Nieves, Isabel y Vero, mis amigas con la sangre más roja, a mis compañeros de facultad, a mis amigas del pueblo...

Muchas gracias a toda familia en especial a mi madre M^a José, mi padre Manolo (que todo hay que decir, no confiaba mucho en las posibilidades de la carrera que escogí, aunque lo entiendo) y mi hermano Manuel, os adoro y quiero mucho. También hoy me acuerdo de los que ya se fueron hace unos años y que

hoy les hubiera gustado estar aquí apoyándome, mis abuelos Antonia, Concha y Manolo, estéis donde estéis, nos acordamos mucho de vosotros.

Este es sólo el final de una etapa del que confío sea un largo viaje y espero contar con todos vosotros para llegar a mi destino.

Me he dejado muchos nombres, perdonadme si alguno de vosotros cree que debería haber sido nombrado, probablemente tenga razón, pero para todos, los que estáis y para los que deberíais estar:

*Déjame que pose para ti
eres tú mi artista preferida
déjame tenerte junto a mí
prometo estarte agradecido
prometo estarte agradecido.
Si fuera yo capaz de conseguir
tenerte alguna vez entretenida
hacerte por lo menos sonreír
prometo estarte agradecido
prometo estarte agradecido.*

*No te lo pienses más
baja la guardia y mira atrás
nadie te va a alcanzar
no tienes rival
no tienes rival.*

*Me paso el tiempo viéndote venir
y pasas a mi lado distraída
si dejas que camine tras de ti
prometo estarte agradecido
prometo estarte agradecido.*

*Te tengo tantas cosas que decir
y tú como si no fuera contigo
la historia se repite y aún así
prometo estarte agradecido
prometo estarte agradecido.*

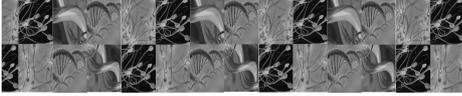
*No te lo pienses más
baja la guardia y mira atrás*

*nadie te va a alcanzar
no tienes rival
no tienes rival.*

*No te lo pienses más
baja la guardia y mira atrás
nadie te va a alcanzar
no tienes rival
no tienes rival.*

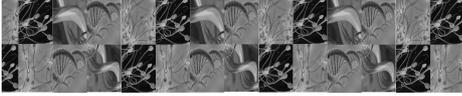
*Déjame que pose para ti
eres tú mi artista preferida
déjame tenerte junto a mí
prometo estarte agradecido
prometo estarte agradecido
prometo estarte agradecido.*

ROSENDO.



Introducción

*Se rompió la cadena que ataba el reloj a las horas,
se paró el aguacero ahora somos flotando dos gotas,
agarrado un momento a la cola del viento me siento mejor,
me olvidé de poner en el suelo los pies y me siento mejor.
(Dulce Introducción al Caos. La ley Innata. Extremoduro)*



1. Etiología de la infertilidad masculina.
2. Espermiograma: definición, ventajas e inconvenientes.
3. Nuevos métodos diagnósticos en el semen.
4. Transcriptómica aplicada a la andrología.
5. Microarrays de expresión génica.
6. Anotación funcional: Ontología génica.
7. Técnicas de reproducción asistida (TRAs).
 - 7.1. Inseminación Artificial Homóloga (IAH).
 - 7.2. La fecundación *in Vitro* (FIV).
 - 7.3. Inyección Intra-citoplasmática de espermatozoides (ICSI).
 - 7.4. Donación de gametos.
 - 7.4.1. Donación de semen.
 - 7.4.2. Donación de ovocitos.
 - 7.5. Preservación de fertilidad.
 - 7.5.1. Crio-conservación de semen.
 - 7.5.2. Crio-conservación de ovocitos



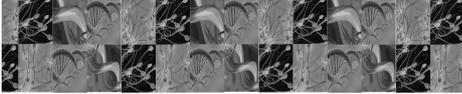
Introducción:

Hoy en día se asume que la infertilidad afecta alrededor de un 8% de las parejas en edad reproductiva, aunque este porcentaje varía según diferentes autores y la zona geográfica objeto del estudio; situándose alrededor de un 15% en Europa (Benagiano *et al.*, 2006, Sharlip *et al.*, 2002, Thonneau *et al.*, 1991).

La infertilidad se define como la incapacidad de completar un embarazo después de un tiempo razonable de relaciones sexuales sin medidas anticonceptivas.

El concepto de tiempo *razonable* es discutible, la Sociedad Europea de Reproducción y Embriología Humana (ESHRE, 1996) en sus recomendaciones, menciona un plazo mínimo de dos años para conseguir una gestación; si ésta no ocurre después de ese tiempo, la pareja es considerada infértil. Aunque la práctica médica suele ser la de empezar a actuar tras un año de haber fracasado los intentos de embarazo, además se deben tener en cuenta otros factores que pueden hacer que ese plazo mínimo se vea aún más reducido, como por ejemplo la edad, presencia de antecedentes de alteraciones que afecten a la fertilidad (por ejemplo la endometriosis o padecer del síndrome del ovario poliquístico) o los deseos reproductivos de la pareja. No sería lógico, ni mucho menos recomendable, establecer un periodo de 1 ó 2 años cuando la mujer tiene, por ejemplo 39 años, caso en el que sería aconsejable comenzar un estudio de infertilidad aunque sólo hayan transcurridos 6 meses de intentos fallidos (Brugo-Olmedo *et al.*, 2003).

Se habla de **infertilidad primaria** cuando la pareja logra fecundación natural con sus gametos pero los embriones no se desarrollaron o los fetos no alcanzan el desarrollo a término, es decir, nunca tuvo hijos viables e **infertilidad secundaria** cuando la pareja tuvo hijos en común y posteriormente



por alguna razón se encuentran una situación de infertilidad. El campo de la reproducción es un caso atípico dentro de la investigación científica, ya que el resultado (consecución exitosa de un embarazo), viene condicionado por la influencia de las características de dos individuos. Por tanto, intentar dilucidar factores o tratamientos que determinen el éxito reproductivo es complicado.

Debido a lo explicado anteriormente, el origen de la infertilidad es difícil de clasificar y/o determinar y aunque históricamente la infertilidad se ha asociado como un estigma y de manera de casi exclusiva a la mujer, hoy en día se sabe que casi un 50% de los casos implican, a algún nivel, el factor masculino (Nallella *et al.*, 2006), siendo en un 20% la causa única y exclusiva de los casos de infertilidad y contribuyendo entre otros entre un 20-40% de las veces (Thonneau *et al.*, 1991).

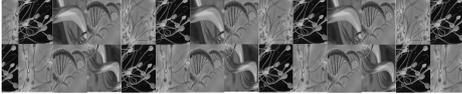
1. Etiología de la infertilidad masculina.

Una vez definidos los términos de infertilidad y el porcentaje que representa en el caso del factor masculino vamos a proceder a hacer una pequeña clasificación de la etiología de esa infertilidad masculina basada en la realizada por *Khorram*(*Khorram et al.*, 2001). Alrededor del 30% son patologías de origen genético, 50% no genético y un 20% de la infertilidad masculina es de origen idiopático.

El origen de la infertilidad que masculina se puede clasificar según el compartimento que está afectado:

- **Desórdenes pre-gonadales (a nivel de hipotálamo e hipófisis):**

Congénitos: Alteraciones síntesis de testosterona, alteraciones en los receptores de FSH/LH, Síndromes de resistencia androgénica, Hipogonadismos (como los causados por el Síndrome de *Kallman* o *Noonan*).



Adquiridos: Tumores de la pituitaria e hipotálamo, Desórdenes infiltradores, Traumatismos, post-cirugía y post-irradiación, Vascular (infarto, aneurisma), Hormonal (Hiperprolactinemia, excesos androgénicos, estrogénicos y corticoides), Drogas (Opioides y drogas psicotrópicas).

- **Desórdenes gonadales:**

Congénitos: Cromosopatías (47XXY, 47XYY, translocaciones, inversiones, trisomías, aneuploidías), Anomalías meióticas, Microdeleciones Y, Enfermedades monogénicas (por ejemplo la Distrofia Miotónica), Disgenesias gonadales y pseudohermafroditismo, Varicocele.

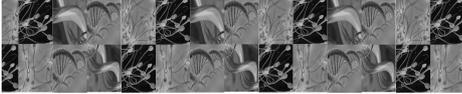
Adquiridas: Orquitis viral (por ejemplo de paperas), Orquitis granulomatosa (tuberculosis o lepra), Epididímo-orquitis (gonorrea y clamidia), Drogas (por ejemplo drogas citotóxicas, agentes alcalinizantes, alcohol, marihuana), Radiación ionizante, Tóxicos ambientales (por ejemplo cadmio, plomo o estrógenos ambientales), Hipertermia, Inmunológica, Trauma, Torsión, Castración, Enfermedades sistémicas (por ejemplo fallo renal, cirrosis hepáticas, cáncer, vasculitis, enfermedad celiaca), Desórdenes en el transporte de los espermatozoides (post-testicular), Disfunciones epididimales, Anormalidades de los vasos deferentes, Infertilidad de origen desconocido.

- **Desórdenes post-gonadales:**

Agenesia de los conductos deferentes, Alteraciones espermáticas, Poliquistosis renal 1 (*PKD1*), Síndrome de *Young*, Epispadias.

2. Espermiograma: definición, ventajas e inconvenientes.

El espermiograma es la piedra angular primer paso, además de ser la única herramienta diagnóstica recomendada por la Organización Mundial de la



Salud (OMS), a la hora de evaluar la infertilidad masculina. La determinación del potencial fértil de un varón también puede incluir un examen físico, un análisis hormonal y otro genético. Normalmente estas pruebas complementarias se realizan si hay algún antecedente contemplado en la anamnesis previa o si el resultado del espermiograma es patológico. El espermiograma debe realizarse conforme la OMS (**Tabla 1-I**) indica en sus manuales revisados por última vez en 2010 (World Health Organization., 2010). Sin embargo esta tesis se ha realizado bajo las indicaciones del anterior manual, publicado en 1999 (**Tabla 1-I**), ya que el último se publicó justo al final de la fase experimental. Los cambios no son tan sustanciales como para que varíen los resultados obtenidos en esta tesis.

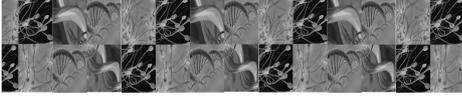
Tabla 1-I: *Parámetros seminales establecidos por la OMS (1999).*

Volumen (ml)	1,5	Movilidad total*	≥ 40%
pH	≥ 7.2	Movilidad progresiva**	≥ 32%
Concentración (millones/ml)	≥20	Nº de formas normales	≥ 4%
Leucocitos (millones/ml)	<1	Vitalidad	≥58%

* Se refiere a todos los espermatozoides que se mueven, independientemente de esta progresión sea mayor o menor o más o menos lineal.

**Hace referencia sólo aquellos espermatozoides que se mueven de manera progresiva.

En líneas generales, el análisis sigue incluyendo una valoración de la concentración, de la movilidad, morfología, vitalidad así como de la determinación de la presencia de células redondas, leucocitos y anticuerpos anti-espermatozoides, si bien los valores de referencia sí que han variado

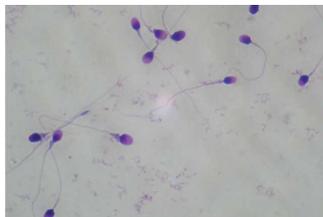


ligeramente, siendo en término general menos estrictos en esta última revisión(Kliesch and Cooper., 2008,World Health Organization., 2010, World Health Organization., 1999).

Brevemente, el paciente debe proporcionar al especialista una muestra de semen obtenida por masturbación, en las condiciones más asépticas posibles, tras mantener una abstinencia sexual de entre 48h y 7 días antes de la prueba. A continuación se deja licuar la muestra en una incubadora a 37°C durante aproximadamente 20 minutos. Entre la recogida de la muestra y el análisis de esta, no se debe de sobrepasar la hora.

Una vez la muestra está licuada, el especialista deposita una gota de semen de 10 microlitros en una cámara *Mackler* y bajo un microscopio a 400 aumentos valorará la concentración y la movilidad de los espermatozoides. Con otra gota diferente de la muestra se hará una extensión celular en un portaobjetos que teñiremos para poder valorar la morfología de los espermatozoides, bajo 1000 aumentos en el microscopio(**Figura 1-I**).

Figura 1-I: Tinción para valorar la morfología en una espermiograma.



También se hace un registro de los siguientes datos: volumen del eyaculado, pH, apariencia (color y consistencia) y olor.

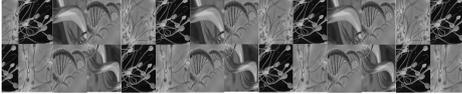


El espermiograma que es una técnica económica, relativamente sencilla e informativa, sin embargo posee una capacidad diagnóstica reducida. Esta prueba sólo se basa en los aspectos que podríamos definir como celulares (por ejemplo cantidad o movilidad de los espermatozoides) dejando un lado otros aspectos, por ejemplo los moleculares, que podrían aumentar la capacidad diagnóstica de este. En definitiva, el espermiograma puede explicar en parte por qué un oligozospermico severo no logra una gestación ¿pero hasta qué punto esa información es útil cuando hablamos de hombres con parámetros seminales normales que son incapaces de embarazar a sus parejas?, ¿es útil el espermiograma? (Lewis., 2007, Altmae and Salumets., 2011).

Por lo tanto deducimos que puede haber un considerable número factores, independientes de los parámetros seminales contemplados en los diferentes manuales de la OMS, que no se evalúan y que pueden limitar el valor diagnóstico del espermiograma, ya que un análisis de semen que esté dentro de los parámetros normales no indica necesariamente un potencial fértil satisfactorio que conlleve a la consecución de una gestación. De hecho varios trabajos sostienen que pacientes con factor masculino de infertilidad presentan parámetros normales tanto para movilidad, concentración y morfología y otros, de fertilidad probada, presentaban espermiogramas anormales (Nallella *et al.*, 2006, Schulte *et al.*, 2009).

3. Nuevos métodos diagnósticos en el semen.

Una vez se conocen cuáles son las deficiencias que presenta el espermiograma, la investigación en andrología en los últimos años, se ha centrado principalmente en encontrar nuevas pruebas, complementarias al espermiograma que mejoren su poder diagnóstico junto con nuevos métodos de selección espermática que aumenten las tasas de embarazo en los TRAs.

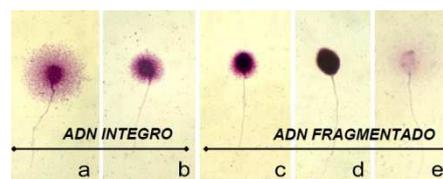


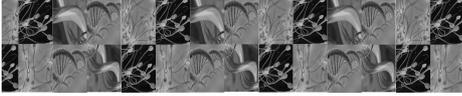
Marcados por la necesidad de establecer otras referencias que permitan diferenciar de manera más efectiva al hombre infértil de aquel que no lo es, se han llevado a cabo pruebas complementarias al espermograma, enfocadas en la búsqueda de nuevos marcadores de infertilidad como por ejemplo la fragmentación, la oxidación de ADN espermático y la presencia de ARNm en los espermatozoides(Garrido *et al.*, 2008).

- **Fragmentación ADN espermático:**La integridad del ADN espermático puede verse comprometida por lesiones en la doble cadena que pueden deberse a diferentes causas. Aunque los principales mecanismos en consideración son: empaquetamiento anormal del ADN espermático durante el proceso de espermatogénesis (Carrell *et al.*, 2007),la apoptosis abortiva (Singh *et al.*, 2003,Brinkworth and Nieschlag., 2000) y la presencia o acción sobre el ADN de las especies reactivas de oxígeno (Irvine *et al.*, 2000, Smith *et al.*, 2006, Gomez *et al.*, 1996, Ochsendorf., 1999).

Entre los métodos para evaluar la fragmentación están: el ensayo TUNEL (*Terminal TransferasedUTP Nick EndLabeling*)(Sailer *et al.*, 1995, Kodama *et al.*, 1997, Carrell *et al.*, 2003), el ensayo del análisis de la estructura cromatínica del esperma (SCSA)(Spano *et al.*, 1998, Larson *et al.*, 2000,Abu-Hassan *et al.*, 2006) el ensayo cometa y el *test* de de dispersión del cromatina espermática (SCD)(Figura 2-I)(Santiso *et al.*, 2010, Enciso *et al.*, 2006, Fernandez *et al.*, 2005a, Fernandez *et al.*, 2005b, Evenson and Wixon., 2006, Muriel *et al.*, 2006).

Figura 2-I: Ejemplo de SCD espermático.





Otros ensayos identifican defectos en el empaquetamiento de la cromatina espermática: tinción con azul de toluidina, con naranja acridina y cromomicina A.

Sin embargo, el valor predictivo de la fragmentación del ADN es altamente controvertido (Evenson and Wixon., 2006), ya que hay estudios que sí encuentran una correlación positiva entre el grado de fragmentación y la incapacidad de alcanzar una gestación (Henkel *et al.*, 2004, Henkel *et al.*, 2003, Virro *et al.*, 2004) y otros que no (Muriel *et al.*, 2006, Chohan *et al.*, 2006, Morris *et al.*, 2002). Además entre aquellos que sí que encuentran diferencias, el valor de corte que establecen es muy variable, por lo que es recomendable buscar otros marcadores de infertilidad más robustos y que no presenten estas ambigüedades.

- **Oxidación del ADN:** Las especies reactivas del oxígeno son derivados normales del metabolismo aeróbico y juegan un papel determinante en procesos fisiológicos reproductivos como la capacitación espermática, la reacción del acrosoma y la fusión del espermatozoide con la zona pelúcida del ovocito. Los niveles anormalmente altos de estas especies pueden dañar las membranas, las estructuras nucleicas (Guerin *et al.*, 2001) e incluso inducir la apoptosis (de Lamirande and O'Flaherty., 2008, Agarwal and Said., 2005, Agarwal *et al.*, 2006). El estrés oxidativo es una de las causas de daño espermático (como ya hemos indicado anteriormente). Parece ser que la oxidación del ADN espermático está débilmente relacionado con una tasas algo más bajas tanto en fecundación y peor calidad embrionaria en la fecundación *in Vitro* (Aguilar *et al.*, 2009, Meseguer *et al.*, 2008).

Cabe destacar que la literatura científica resulta bastante inconsistente en este tema (Bungum *et al.*, 2007, Bungum *et al.*, 2004).



La exposición del ADN a las especies reactivas del oxígeno, provocan alteraciones bioquímicas, modificaciones de las bases e incluso pequeñas roturas en las cadenas de ADN (Said *et al.*, 2005, Garrido *et al.*, 2004, Sakkas *et al.*, 1999).

La presencia de estrés oxidativo se puede determinar por 8-hidroxideoxiguanosina (8-OhdG), producto de las alteraciones causadas por las especies reactivas del oxígeno. Uno de los métodos para medir este producto consiste en marcar el residuo 8-OhdG con una sonda fluorescente y posteriormente medir las moléculas marcadas mediante citometría de flujo (Santiso *et al.*, 2010).

- **Otros marcadores moleculares de función espermática:**

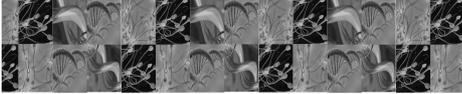
Hay una amplia batería de moléculas que han sido propuestas como marcadores de infertilidad. Generalmente, la relación de estas moléculas con la infertilidad es indirecta y son pocos los estudios que las relacionan de manera directa. Algunas de estas moléculas son:

Acrosina: enzima asociada a la penetración del espermatozoide de la zona pelúcida del ovocito, cuya concentración puede afectar a la capacidad de los espermatozoides para atravesar la zona pelúcida del ovocito. Sin embargo los resultados son controvertidos (Garrido *et al.*, 2008).

Moléculas marcadoras de apoptosis: Antes de que una célula entre en apoptosis, esta es marcada. La idea es poder separar los espermatozoides que van a morir seleccionándolos en base a estos marcadores (Romany *et al.*, 2009).

Factor de activación plaquetaria: Está relacionado con la capacidad del espermatozoide para atravesar la zona pelúcida (como la acrosina) (Toledo *et al.*, 2003).

Heatshockprotein 2A (Hsp2A): Esta proteína se ha detectado en altas cantidades en espermatozoides de pacientes infértiles. Además el ratio de



la *Hsp2A* respecto a la actividad creatinafosfoquinasa tiene valor predictivo en gestaciones en ciclos de FIV (Ergur *et al.*, 2002).

Ubiquitina:La ubiquitina está relacionada con la apoptosis, ya que esta molécula “marca” aquellas células que van a ser fagocitadas o degradadas proteolíticamente. Parece ser que la ubiquitina es segregada por el epitelio del epidídimo y que se une a espermatozoides defectuosos que deben ser eliminados. Una alta ubiquitinización de los espermatozoides puede reflejar un fallo en ese mecanismo, de modo que los espermatozoide defectuosos no son eliminados pudiendo resultar perjudicada la fertilidad(Sutovsky *et al.*, 2001, Sutovsky *et al.*, 2004).

Contenido espermático en colesterol y calcio:Las concentraciones intracelulares de calcio y la cantidad de colesterol presente en la membrana espermática están relacionadas con la morfología espermática, potencial fértil y supervivencia tras un proceso de crio-conservación(Meseguer *et al.*, 2004a, Meseguer *et al.*, 2004b)

Mucina MUC1:Se trata de una glicoproteína de superficie presente tanto en el testículo como en espermatozoide. Martínez-Conejero *et al.* observaron que esta glicoproteína se expresaba de manera diferencial entre pacientes infértiles y donantes fértiles de semen que se sometían a un ciclo de ICSI y aunque no observaron diferencias significativas en cuanto a resultados del ciclo de reproducción asistida sí que las había en cuanto a la recuperación de espermatozoides móviles, procedimientoprevioal cual se somete una muestra de semenantes de cualquier TRA (Martinez-Conejero *et al.*, 2008).

- **ARN mensajero (ARNm) en los espermatozoides del eyaculado.**

El espermatozoide es una célula muy especializada y altamente diferenciada de la que se creía que sólo aportaba al futuro ser vivo el genoma paterno y se le consideraba un mero contenedor del ADN del padre. Carece de ARN ribosómico y contiene cantidades relativamente pequeñas de ARNm si se



compara con otros tipos celulares ya que durante la espermiogénesis, cuando pasa de ser una espermátida redonda a desarrollar su característica cola, sufre una remodelación que provoca la extrusión de la mayor parte del espermatozoide. Carece pues de actividad transduccional.

A pesar de que estas características y aunque sea en cantidades pequeñas, el espermatozoide contiene, además del ADN paterno, un conjunto de ARNm cuya función es altamente controvertida. Unos sugieren que son restos de la espermatogénesis y que no tiene función alguna, aunque pueden servir para monitorear el proceso espermatogénico, pero hoy en día ya hay trabajos que aportan pruebas de que estos ARNm pueden jugar un papel importante en el proceso de fecundación (Krawetz., 2005a, Krawetz., 2005b, Miller *et al.*, 2005).

El espermatozoide se ha considerado el “chico pobre” de la reproducción asistida por varios motivos, pero sobre todo por la entrada en escena de la técnica llamada Inyección Intra-citoplasmática de Espermatozoides (ICSI), que consiste en microinyectar un espermatozoide directamente en un ovocito. El hecho que para conseguir un embarazo sea sólo necesario un espermatozoide de los miles o millones que se encuentran en un eyaculado, ha supuesto que el factor masculino sea menos estudiado y valorado que el factor femenino, lógico por una parte teniendo en cuenta que la fuente de espermatozoides es casi infinita si la comparamos con la de ovocitos, sin embargo un embarazo se sigue consiguiendo con la fusión de ambos gametos.

A lo largo de estos últimos años el papel del espermatozoide ha ido adquiriendo mayor importancia, por ejemplo sabemos que es el que dona los centríolos al ovocito. Una vez fecundado, el óvulo se convierte en **cigoto**. Y la fecundación se completa cuando los dos núcleos (denominados **pronúcleos**) se fusionan. En los mamíferos los núcleos no se fusionan directamente, sino

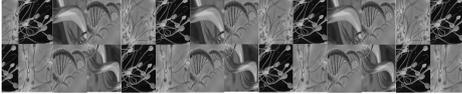


que se mantienen independientes hasta que la membrana nuclear de ambos se desintegra como paso previo a la primera división mitótica. El centriolo es un orgánulo, que curiosamente falta en el óvulo, que posee un centrosoma pero no un centríolo. El centríolo entra al ovocito junto con parte del flagelo en el momento de la fecundación, dotando al embrión la maquinaria necesaria para llevar a cabo de manera correcta las diversas divisiones celulares (Sutovsky and Schatten., 2000, Schatten., 1994).

Durante los últimos 50 años, se ha avanzado bastante en este campo, y hoy en día se sabe que esta pequeña célula también provee al futuro embrión de la maquinaria necesaria para la organización de los microtúbulos y por tanto para la correcta división celular (Schatten., 1994) además de un factor activador ovocitario (una enzima hidrolítica perteneciente al grupo de las fosfolipasas) (Parrington *et al.*, 2002).

Pero además, en las dos últimas décadas han surgido varios trabajos (Krawetz., 2005a, Krawetz., 2005b, Miller *et al.*, 2005, Lalancette *et al.*, 2008, Ostermeier *et al.*, 2004) que han descrito una serie de conjuntos de ARNm que son depositados junto al genoma paterno en el ovocito en el momento de la fecundación. Algunos autores consideran que estos ARNm son los restos del proceso de espermatogénesis y otros creen que juegan un papel importante en la fecundación y en las primeras divisiones embrionarias (hasta la transición materno-cigótica) (Lalancette *et al.*, 2008, Miller and Ostermeier., 2006a, Miller and Ostermeier., 2006b, Miller *et al.*, 2005, Ostermeier *et al.*, 2002, Ostermeier *et al.*, 2005, Ostermeier *et al.*, 2004, Garrido *et al.*, 2008, Garcia-Herrero *et al.*, 2009). Independientemente del origen de estos, el caso es que son depositados en el momento de la fecundación en el ovocito y cabe pensar que pueden jugar algún papel en el futuro desarrollo embrionario.

El descubrimiento de estas subpoblaciones de ARNm en los espermatozoides del eyaculado plantea preguntas como por ejemplo ¿para



qué sirven estos?; ¿a qué nivel están implicados en procesos de infertilidad y fecundación?; ¿tienen aplicación diagnóstica en el campo de la medicina reproductiva? (Altnae and Salumets., 2011). Y es precisamente sobre este punto, la implicación del ARNm del espermatozoide y su posible papel en la reproducción de lo que va a tratar el presente trabajo de tesis doctoral.

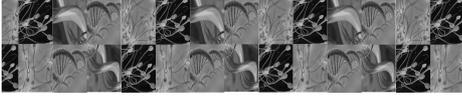
4. Transcriptómica aplicada a la andrología.

La transcriptómica en la ciencia que estudia el conjunto de ARNm que se expresan en un tejido o célula en un momento concreto y bajo una condiciones determinadas.

El descubrimiento de estos ARNm en los espermatozoides y la aparición de tecnología de análisis masivo de genes como las plataformas de microarrays, han propiciado que en los últimos años hayan surgido números trabajos en los que se ha intentado explorar la relación entre el contenido de ARNm en espermatozoides y tejido procedente del aparato reproductor masculino y el éxito reproductivo(Lalancette *et al.*, 2008, Miller and Ostermeier., 2006a, Miller and Ostermeier., 2006b, Miller *et al.*, 2005, Ostermeier *et al.*, 2002, Ostermeier *et al.*, 2005, Ostermeier *et al.*, 2004, Garrido*et al.*, 2008, Garcia-Herrero *et al.*, 2009).

Osteiemeret al. realizaron en 2002 un estudio con el propósito de averiguar si con los ARNm de los espermatozoides del eyaculado se podía generar una huella genética típica de hombres fértiles con el uso de microarrays.

Las conclusiones que se desprendieron de este estudio es que puede obtenerse un identificador genético de los ARNm espermáticos de varones fértiles normales. Así, este método puede utilizarse para monitorizar eventos pasados, por ejemplo la expresión genética de la espermatogénesis. Más aún,



los datos sugieren que, además de contribuir con el genoma paterno, los espermatozoides proveen al cigoto con un complemento único de ARNm paternos que podrían influir en el desarrollo embrionario precoz. Los espermatozoides eyaculados pueden ser ahora usados como una prueba no invasiva para investigaciones de la infertilidad relacionada específicamente con el testículo (Ostermeier *et al.*, 2002).

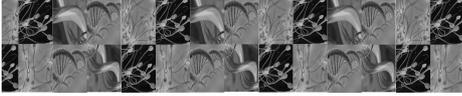
Una vez se descubrió la presencia de los ARNm *Ostermeier et al.* en 2004 quisieron demostrar la transferencia de ARNm espermáticos al ovocito durante la fecundación y determinar cuáles de estos transcritos están presentes en el espermatozoide humano pero no en el ovocito humano antes de la fecundación (Ostermeier *et al.*, 2004).

Para ello utilizó semen humano para fecundar ovocitos de hámster y localizó una subpoblación de ARNm que estaban presentes en los ovocitos fecundados y en los espermatozoides, pero que no en aquellos que no habían sido inseminados.

Con este modelo se comprobó que además de existir ARNm en los espermatozoides del eyaculado, estos podían ser depositados en el ovocito en el momento de la fecundación

Otro ejemplo de estudio de transcriptómica en semen lo llevó a cabo *Cedenho et al.* y que fue publicado en marzo de 2006, que se basó en perfiles génicos de expresión para encontrar diferencias entre dos grupos concretos, un grupo de oligozoospermicos frente a uno control normal (Cedenho *et al.*, 2006).

Este estudio tenía como objetivo comparar la expresión génica del gen *HspA2*, que codifica para una creatina quinasa, en espermatozoides de hombres oligozoospermicos frente a unos controles normozoospermicos, siendo su expresión mucho menor en los primeros.



La actividad e inmunoreactividad de creatina quinasa son indicativas de espermiogénesis defectuosa y de retención proximal de citoplasma.

Después de este estudio concluyeron que los espermatozoides inmaduros que no expresaban *HspA2* retenían el citoplasma residual y no externalizaban el ligando que se une a la zona pelúcida. Estos hallazgos sugerían que la *HspA2* podría considerarse como un marcador bioquímico de función espermática y capacidad fecundante (Ergur *et al.*, 2002b). Es más, en testículos cuya espermatogénesis estaba detenida, los niveles de la proteína *HspA2* eran mucho más bajos que en testículos donde la espermatogénesis es normal, en hombres con el Síndrome SCO (*Sertolicells-only*), que carecen de espermatozoides, esta proteína estaba completamente ausente.

Como ya hemos indicado anteriormente, estos ARNm también pueden ser útiles para monitorizar una correcta espermatogénesis.

Fox *et al.* en 2003, pusieron en marcha su posible aplicación clínica intentando determinar la viabilidad de comparar la expresión génica global en biopsias testiculares. Se centraron en comparar la expresión global génica en hombres sólo con células de Sertoli (SCO) frente a hombres con histología testicular normal (Fox *et al.*, 2003). Encontraron un listado de 683 de genes diferencialmente expresados cuando comparaban las biopsias de testículos normales vs aquellas SCO, siendo los genes más sobre-expresados en estas últimas genes con un patrón ubicuo de expresión y genes relacionados con la reparación de ADN y meiosis los más sobre-expresados en las biopsias de hombres con una espermatogénesis normal.

La espermatogénesis es un proceso cíclico de división celular que se renueva constantemente, y cuyo resultado es la producción de millones de espermatozoides diarios. En el hombre este proceso de maduración o capacitación espermática, requiere aproximadamente de 74 días. Se inicia en la



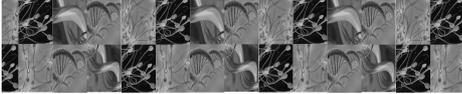
pubertad bajo influencia hormonal, con una serie de divisiones mitóticas de la espermatogonia primitiva; posteriormente, se producen divisiones meióticas en la generación subsiguiente de espermatozoides para reducir el número diploide de cromosomas al número haploide y, por último, la transformación del espermatozoides en el espermatozoides maduro, lo cual incluye adquisición de motilidad progresiva y la capacidad fecundante.

Es lógico pensar que una correcta expresión de los genes implicados en la espermatogénesis es esencial para un buen pronóstico reproductivo. Para llegar a saber esto, primero debemos saber cuáles son estos genes y cuál es su expresión diferencial entre diferentes grupos y como afecta esta a la fertilidad del individuo en cuestión (Wang *et al.*, 2004).

Para encontrar estos genes, compararon los perfiles de expresión génica de testículos procedentes de hombres adultos frente a otros de origen fetal (al ser la espermatogénesis un proceso que se inicia en la pubertad, los genes que se expresen en los adultos pero no en los testículos fetales, son grandes candidatos a ser considerados genes relacionados con la espermatogénesis).

Identificaron 266 genes que se expresan de manera diferencial entre esos dos grupos, indicando su potencial papel en la espermatogénesis (Sha *et al.*, 2002). De estos, 169 también se expresaban en los espermatozoides del eyaculado, candidatos pues a estar implicados en la espermatogénesis en las células germinales.

Ya en 2008, Garrido *et al.*, buscaron diferencias a nivel de expresión génica entre muestras de semen de donantes de esperma y pacientes infértiles que requerían de alguna TRA, trabajo que supuso el punto de partida para la presente tesis doctoral (Garrido *et al.*, 2009) .



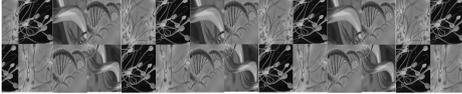
5. Microarrays de expresión génica.

En la última década, conocida como la era post-genómica, las herramientas de análisis genético han sufrido una revolución técnica. La entrada en escena de sistemas que permiten el análisis masivo de genes en un solo experimento frente aquellos en los que sólo permitían el estudio gen por gen (o de un pequeño grupo de ellos) han proporcionado una nueva dimensión en a la hora de plantear y extraer conclusiones de los experimentos. Los microarrays, que es como se conocen estos sistemas, fueron descritos por primera vez por *Schenna* en 1995 (*Schenna et al.*, 1995) y nos permiten estudiar, por ejemplo, qué genes se expresan en un situación biológica concreta y compararla con una patológica y ver en qué se diferencian, dándonos una visión global de una enfermedad y cuáles son los mecanismos que operan en dicho proceso patológico, además de jugar un potencial papel en el diagnóstico de enfermedades.

Básicamente el microarray es un formato experimental en el que una superficie sólida en las que están impresas miles de sondas que detectan genes de secuencia conocida.

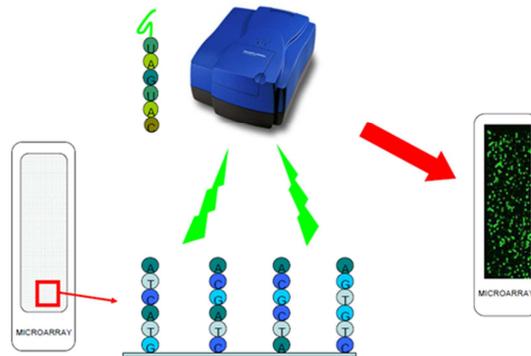
Microarrays hay de diferentes tipos y su clasificación depende, por ejemplo, de los que queremos detectar (oligos, ADNc, proteínas...), del tipo de soporte (un *slide*, sílice o gel) o del tipo de impresión de las sondas en la matriz.

El caso que nos ocupa es el de los microarrays de expresión génica que nos permiten evaluar el conjunto de ARNm que se generan en un tejido o un grupo de células en una situación biológica determinada y saber qué genes se expresan de manera diferencial en cada situación (Genes diferencialmente expresados (GDE)). En este caso la matriz contiene una serie de sondas que son unos oligonucleótidos sintéticos (*Barrett and Kawasaki.*, 2003) que serán expuestos a un *pool* de ARNm que serán extraídos de las muestras biológicas que queremos estudiar (**Figura 3-1**).



Los datos brutos generados por el microarray son leídos en un primer momento por un escáner, posteriormente son normalizados y transformados de forma matemática para eliminar el ruido de fondo de la técnica y poder comparar las distintas muestras/ condiciones biológicas.

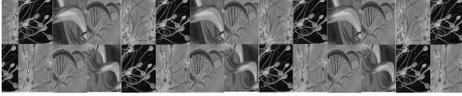
Figura 3-1: Esquema general del funcionamiento de un microarray de expresión de un solo color: sobre un soporte sólido se localizan miles de sondas de secuencias conocidas que son expuestas a nuestro ARNm problema, que se unirán a la sonda de la cual sean complementaria.



Esta tecnología genera un importante número de datos que hace necesario que usemos sistemas de análisis que nos ayuden a procesarlos e integrarlos en términos de sus implicaciones biológicas.

6. Anotación funcional: Ontología génica.

En la era post-genómica, la interpretación biológica de los largos listados de genes que se obtienen de los experimentos de microarrays es un auténtico reto y la ontología génica nace con este propósito.

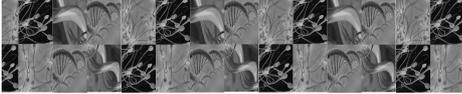


Un problema fundamental en todas las grandes bases de datos genómicas es que los registros provienen de una gran variedad de fuentes, desde investigadores individuales hasta grandes centros de secuenciación. Como resultado, las secuencias mismas y principalmente las anotaciones biológicas adjuntas a estas secuencias, varían notablemente en calidad. También hay mucha redundancia ya que muchos laboratorios ingresan a menudo secuencias que son idénticas o muy similares a otras en la base de datos.

El Consorcio de Ontología Genética (GO, siglas de *Gene Ontology Consortium*) establece pues vocabularios controlados. Éstos permiten que un programa informático explore las bases de datos genómicas y vinculen genes relacionados entre sí utilizando palabras que describan sistemáticamente sus funciones, independientemente de cómo se denominen los genes.

La definición de ontología según la RAE es “parte de la metafísica que trata del ser en general y de sus propiedades trascendentales”, pero en el caso que nos ocupa la definiremos como una manera formal de estructurar el conocimiento biológico, refiriéndose a los genes y a sus productos génicos. La ontología provee un vocabulario controlado que describe el gen y los atributos del producto génico en cualquier organismo dividiendo el conocimiento biológico en tres áreas fundamentales que a su vez se subdividirán en otras, cada vez menos complejas, estando contenidas las de menor nivel en las de su inmediato nivel superior.

Es una manera de descomponer un todo muy complejo en diferentes dominios/ o niveles que a su vez se ramifican en otros niveles más básicos cada vez. Con la ontología esta estructuración del conocimiento es sistemática, con lo que esta subdivisión de los diferentes dominios o niveles no se hace de manera subjetiva, y todo el mundo debe acogerse a los mismos términos,



dictados por la ontología, para hacer esta estructuración del conocimiento biológico.

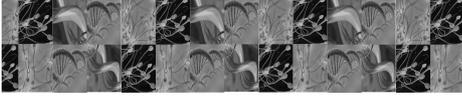
En un primer paso, la ontología génica, divide en tres dominios diferentes, Procesos Biológicos (PB), Componentes Celulares (CC) y Funciones Moleculares (FM), que a su vez se subdividen en otros.

Con estos términos se pretenden describir las funciones biológicas de un producto génico: sus funciones a nivel molecular, qué procesos ayuda a llevar a cabo y en qué lugar de la célula tiene lugar (Thomas *et al.*, 2007). Los componentes celulares se definen como parte de un todo más grande como por ejemplo una estructura anatómica, las funciones moleculares se definen como la potencial capacidad para llevar a cabo una actividad concreta (por ejemplo actividad catalítica) y finalmente un proceso biológico se define como la serie de acontecimientos para lograr el ensamblaje de una o más funciones moleculares de manera ordenada (Thomas *et al.*, 2007).

Cada término GO consiste en un único identificador alfanumérico, un nombre común, sinónimos y una definición y engloba a un grupo de genes. Cuando un término tiene múltiples significados dependiendo de las especies, el GO usa una etiqueta "*sensu*" para diferenciarlos entre ellos. Los términos son clasificados en sólo una de las tres ontologías, las cuales están estructuradas, cada una de ellas, como un grafo dirigido acíclico.

Una de las páginas disponibles en línea y de forma gratuita sobre recursos bioinformáticos que proveen una interpretación funcional de amplias listas de genes derivados de los estudios genómicos y basado en el *Gene Ontology* es la página DAVID genes (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>).

La base de datos DAVID integra y aglomera millones de identificadores de genes y proteínas de gran variedad de fuentes de información genéticas



públicas proporcionando una anotación heterogénea aunque nosotros nos centraremos en la información basada en el GO(Sherman *et al.*, 2007)

DAVID posee gran número de herramientas, aunque la que hemos utilizado principalmente para este estudio es la de Análisis funcional, que principalmente nos proporciona un grupo de términos GO destacando aquellos más relevantes respecto a un listado inicial de genes que le hemos proporcionado.

Pero además, también nos permite integrar la información proporcionada por los tres dominios para definir procesos más complejos como son las rutas metabólicas, ya que entre las numerosas bases de datos que recogen se hallan el *BBID*, *Biocarta* y *Kegg* (todas ellas bases de datos que representan el conocimiento biológico en redes de reacciones e interacciones moleculares para el metabolismo (de lípidos, carbohidratos, etc.) o lo que anteriormente hemos definido como rutas metabólicas).

Un dato a tener en cuenta es que estas bases de datos se actualizan constantemente, de modo que el análisis ontológico de los datos extraídos en esta tesis pueden haber variado ligeramente, ya que el análisis de los datos se hizo por último vez en febrero de 2012.

7. Técnicas de reproducción asistida (TRAs).

La medicina reproductiva ha sufrido una gran revolución en los últimos años, tanto por sus avances como por la demanda de estos servicios que se ha incrementado en muchos puntos en los últimos años.



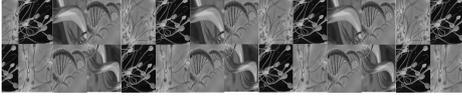
Detrás de este aumento de los servicios están más bien los cambios socio-culturales que aquellos que tiene que ver con la biología reproductiva, por eso la demanda de este tipo de medicina es muy variable dependiendo de la parte del mundo de la que estemos hablando. Como ya se ha indicado anteriormente, la infertilidad alcanza hoy en día en los países desarrollados hasta a un 8% de las parejas en edad reproductiva. El estado de bienestar en estos países de los denominados del primer mundo, hace que la medicina pueda ocuparse de temas como la reproducción asistida, que si bien para muchos no es una cuestión de salud pública, sí que es altamente demandada por una sociedad donde cada vez se retrasa más la edad para tener hijos. Con objeto de cubrir estas nuevas necesidades se han producido en estos últimos años un gran avance en las TRAs, aplicando cada vez tecnologías más punteras en el campo para hacer que los tratamientos de reproducción asistida sean cada vez más eficaces.

7.1. La inseminación artificial.

La inseminación artificial o IA es el método más sencillo dentro de las TRAs y se supone que es la primera línea a utilizar a la hora de enfrentarse a un caso de infertilidad.

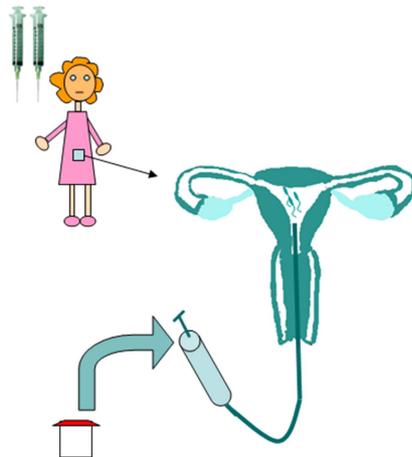
Hoy en día se cree que la IA es una invención como mucho del siglo XX, pero nada más lejos de la realidad. Se tienen datos no documentados que sostienen que la primera inseminación artificial humana fue intentada en Juana, esposa del Rey Enrique IV de Castilla (conocido como "el impotente") a mitad del siglo XV (Maganto-Pavón., 2003)

Brevemente la IA consiste en el depósito mediante una fina cánula de los espermatozoides en el tracto reproductor femenino, generalmente en el interior del útero, acortando de este modo el recorrido que deben completar los



espermatozoides hasta encontrarse con el ovocito (**Figura 4-I**). En este caso la mujer debe presentar permeabilidad de las trompas y ovarios funcionales.

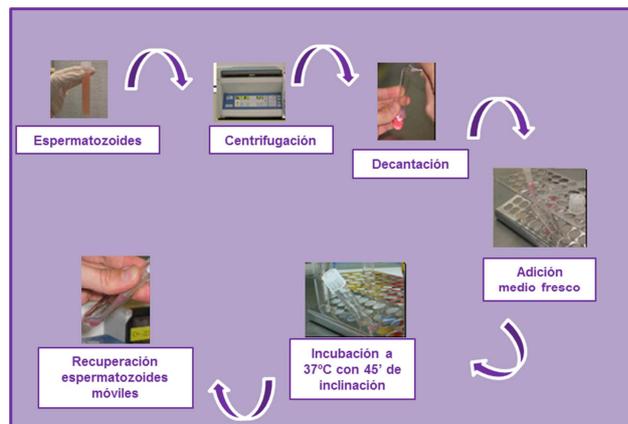
Figura 4-I: Esquema representativo de la técnica de la IA intrauterina.



Previamente a realizar la inseminación las muestras de semen deben ser procesadas para eliminar el plasma seminal, de este modo se evitan las contracciones uterinas provocadas por las prostaglandinas presentes en este y se seleccionan aquellos espermatozoides con mejor movilidad. Además este proceso de selección espermática, denominado de forma coloquial como capacitación, disminuye las posibilidades de que se produzca una inflamación pélvica tras el tratamiento. Lo métodos de selección espermática más empleados en las TRAs son los gradientes de *Percoll* y el *Swim-Up*(**Figura 5-I**)(Boomsma *et al.*, 2007, ESHRE Capri Workshop Group., 2009).

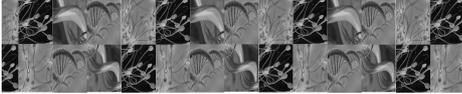


Figura 5-1 Esquema del proceso de “swim-up”.



Existen varias modalidades de IA dependiendo del lugar exacto del tracto reproductor femenino donde se hace el depósito de los espermatozoides, sin embargo la más extensamente utilizada y la que ha sido objeto de estudio en esta tesis es la Inseminación Intrauterina Homóloga (IAH); la que tras someter a la muestra de semen a un proceso de selección espermática, el preparado se deposita en la cavidad uterina de la mujer mediante una cánula. Homóloga hace referencia a que el semen utilizado es el de su pareja y no procede de un tercero, como por ejemplo, un donante de semen.

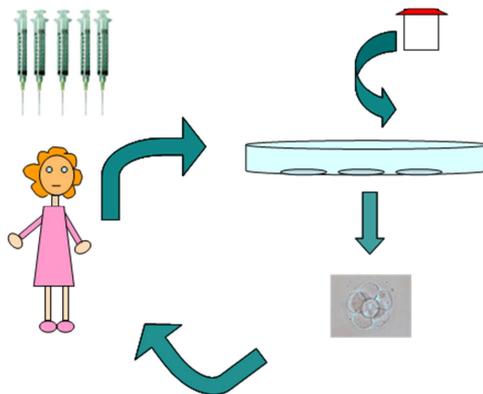
La IAH puede realizarse en ciclo natural o ciclo estimulado, siendo este último el más efectivo y el estudiado en esta tesis, especialmente cuando se trata de parejas que llevan más de tres años intentando tener descendencia, ya que con la estimulación conseguimos un mejor control y seguimiento de la ovulación (ESHRE Capri Workshop Group., 2009).



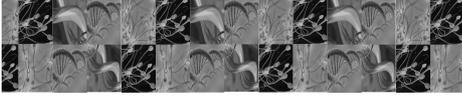
7.2. La fecundación *in Vitro*(FIV).

Explicado de una forma sencilla, en este procedimiento se somete a la paciente a una estimulación ovárica suficiente para conseguir que se desarrollen varios folículos que posteriormente son extraídos de la mujer mediante una punción folicular. Una vez fuera del cuerpo se depositan en una placa *Petri* junto con unas gotas en las que hay espermatozoides y se espera que sean fecundados, reduciendo aún más que en una IAH el espacio a recorrer por parte del espermatozoide. Una vez se ha producido la fecundación el embrión es depositado de nuevo en el útero de la madre (**Figura 6-I**).

Figura 6-I: Esquema representativo de la técnica de la FIV.



El primer embarazo conseguido mediante FIV con un ovocito humano fue descrito por el equipo de la Universidad de *Monash* (Australia) liderado por *Alan Trounson* y *Carl Wood* (De Kretze *et al.*, 1973) en la revista *TheLancet* en 1973, aunque sólo duró algunos días y hoy en día se denominaría un embarazo

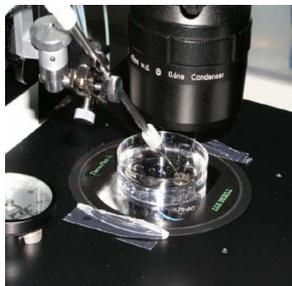


bioquímico. Habría que esperar hasta 1978 para que tuviera lugar el primer nacimiento de un niño probeta, como se les denominó entonces. *Louis Brown* fue la primare niña nacida de una FIV y fue logrado gracias al esfuerzo del investigador británico *Robert G. Edwards*(recientemente nombrado Nobel de Medicina (2011)) junto con cirujano *Patrick Steptoe* (Steptoe and Edwards, 1978).

7.3. Inyección Intra-citoplasmática de espermatozoides (ICSI).

La inyección intra-citoplasmática del espermatozoide (ICSI) consiste en microinyectar con un micromanipulador(**Figura 7-I**)un espermatozoide móvil y morfológicamente normal en un ovocito que previamente ha sido extraído del ovario de la mujer (como en el caso de la FIV) (Palermo *et al.*, 1992). Tras la microinyección y después de haberse comprobado que ha habido fecundación y que las primeras divisiones embrionarias han sido correctas, se transfiere al útero de la paciente dentro los siguientes 3-6 días tras la microinyección (**Figura 8-I**) (Garcia-Herrero *et al.*, 2011, Meseguer *et al.*, 2003).

Figura 7-I: Foto de un micromanipulador.



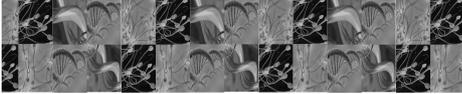
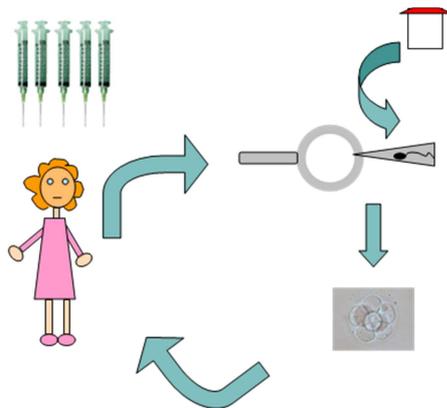
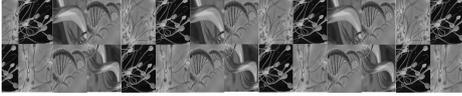


Figura 8-I: Esquema representativo de la técnica de la ICSI.



Esta TRA se prescribe en casos (entre otros) de oligoastenoteratozoospermia, fallo repetido de fecundación tras la *in Vitro* convencional, cuando el semen presenta grandes cantidades de anticuerpos anti-espermatozoide, en pacientes de cáncer que crio-conservan sus muestras de semen previamente a un tratamiento oncológico, pacientes con daños en la médula ósea, aquellos hombres con problemas de eyaculación o eyaculación retrógrada o pacientes que conservaron muestras de semen antes de realizarse una vasectomía(Lahteenmaki *et al.*, 1995, Nagy *et al.*, 1995, Benadiva *et al.*, 1999, Gil-Salom *et al.*, 2000, Nikolettos *et al.*, 1999, Schatte *et al.*, 2000). También puede ser usado en casos de diagnóstico genético pre-implantacional para enfermedades monogénicas (Liebaers *et al.*, 1998) o en hombres con azoospermia por ausencia bilateral congénita de vasos deferentes o por obstrucción inguinal de los conductos eyaculadores(Tournaye *et al.*, 1994). Aunque la ICSI se emplea en casos con factor masculino severo, también existen indicaciones femeninas como anomalías en la zona pelúcida(Mandelbaum *et al.*, 1997).



En el caso de la ICSI, tanto el recorrido del espermatozoide como el proceso de penetración por parte de este de la zona pelúcida del ovocito son inexistentes. Podemos resumir que cada técnica de las aquí descritas contemplan unos requerimientos distintos por parte del espermatozoide ya que cada técnica “puentea” diferentes obstáculos que el espermatozoide debería superar en una fecundación conseguida de manera natural, haciendo cada vez más fácil la fecundación conforme más invasiva es la técnica.

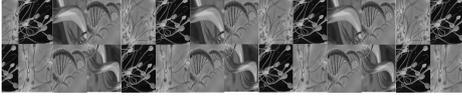
7.4 Donación de gametos.

Hay muchos casos en el que no se pueden usar los gametos propios de la pareja, por ejemplo porque sean portadores de enfermedades genéticas, que el hombre sea azoospermico o que la mujer presente por ejemplo, edad avanzada, fallo ovárico, anovulación o fallos repetidos en FIV. En estos casos se pueden realizar las mismas TRAs explicadas anteriormente pero con gametos de donante haciendo uso del banco de espermatozoides, (en el caso del hombre) o del programa de ovodonación en el caso de las mujeres. Tanto el semen como los ovocitos donados provienen de hombres y mujeres sanas y jóvenes, que tras pasar varios análisis de sangre (donde se comprueba que están sanos y que no presentan enfermedades infecciosas entre otras cosas) y un test psicológico, donan sus gametos para que lo usen las parejas que lo necesiten.

7.4.1. Donación de semen.

La donación de semen está indicada en:

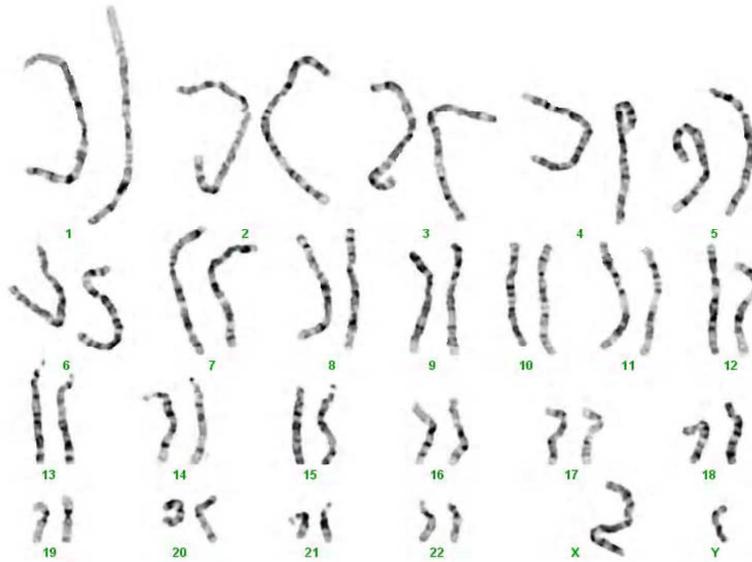
- Parejas heterosexuales en los que el hombre presenta ausencia de espermatozoides, tanto en el eyaculado como en el testículo/ epidídimo.
- Mujeres sin parejas u homosexuales.
- Para evitar la transmisión de enfermedades genéticas.

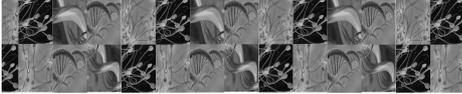


- Fallos repetidos en diferentes TRAs con el semen conyugal.

Los donantes deben ser jóvenes y sanos y sus edades deben estar comprendidas entre los 18 y 35 años, deben pasar una serie de entrevistas con el personal de la clínica donde se les informará de todo el procedimiento y dónde se les someterá a un test psicológico por parte del equipo de psicólogos además de analíticas de sangre y un estudio cromosómico (cariotipo) (**Figura 9-I**) para evitar enfermedades de transmisión sexual y problemas cromosómicos.

Figura 9-I: Cariotipo de alta resolución de fórmula cromosómica 46,XY.





Se les realiza una primera prueba en la que los candidatos a ser donantes dejan una primera muestra a la que se realiza un espermiograma completo.

Sólo si tienen más de 90 millones de espermatozoides por mililitro se les hará una segunda prueba, para confirmar los resultados de la primera y realizar un test de congelación /descongelación para evaluar la viabilidad tras el proceso de congelación.

7.4.2.1. Donación de ovocitos:

En España las donantes deben mayores de 18, estar sanas y no presentar historia familiar de enfermedades cromosómicas. Al igual que los hombres, se les realizan varias analíticas para descartar enfermedades de transmisión sexual además de un estudio cromosómico (cariotipo), y se les somete a una serie de entrevistas donde se les evalúa psicológicamente y se les informa de todo el proceso de donación (Escriba *et al.*, 2006).

La donación de ovocitos está indicada (entre otros) en casos de:

- Edad materna avanzada.
- Baja respuesta ovárica.
- Mala calidad ovocitaria.
- Fallos de implantación.
- Fallo ovárico oculto o prematuro.
- Pérdida recurrente de la gestación.
- Causas genéticas (para evitar la transmisión de enfermedades genéticas a la descendencia)



7.5. Preservación de fertilidad.

En el mundo desarrollado, la maternidad/paternidad se he postergado de manera considerable. Una manera de poder asegurarnos de poder ser padres biológicos en un futuro, sobre todo en el caso de las mujeres donde el factor edad cobra gran relevancia, es por ejemplo, la vitrificación(Cobo and Diaz., 2011, Cobo *et al.*, 2008) (congelación ultra-rápida) de los ovocitos.

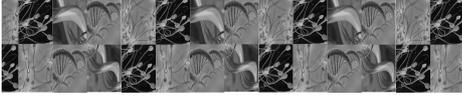
Además debemos tener en cuenta que con los avances de la medicina, las tasas de supervivencia de enfermedades como el cáncer ha aumentado espectacularmente, haciendo que las personas que han sufrido esta enfermedad se planteen el deseo gestacional. Sin embargo, la gran mayoría de tratamientos oncológicos pueden derivar en una esterilidad que en ocasiones es irreversible, por eso, la vitrificación de ovocitos(Cobo and Diaz., 2011, Cobo *et al.*, 2008) y la congelación de semen (Meseguer *et al.*, 2004b, Meseguer *et al.*,2004c) pueden ayudarnos a evitar que en un futuro esos pacientes no logren su deseo de tener hijos.

Para esta tesis se han utilizado muestras de semen tanto en fresco, como con muestras que previamente han sidocrio-conservadas y ovocitos en fresco (no procedentes de vitrificación/congelación).

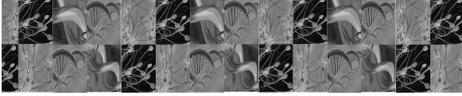
7.5.1 Crio-conservación de semen:

La congelación de semen está indicada en los siguientes casos:

- Conservación de muestras valiosas como por ejemplo aquellas obtenidas de biopsia de testículo o aspiración de epidídimo o muestras de paciente que posteriormente van a someterse a un tratamiento oncológico.
- Planificación óptima de los ciclos de los TRAs.
- Transporte de las muestras a distintas áreas geográficas.
- Preservación y almacenamiento de muestras de semen de donantes.



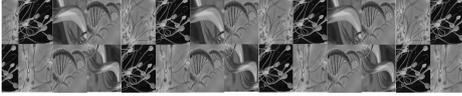
- Para evitar la transmisión de enfermedades sexuales, evitando los periodos silenciosos previos a la presentación de algunas patologías, como por ejemplo el SIDA o la Hepatitis (en caso de donación de semen).
- En casos en los que la obtención por eyaculación es muy problemática (por ejemplo cuando el paciente requiere de una electro-eyaculación).
- En casos en los que llegan muestras para valorar al laboratorio de andrología y son casos de oligo o astenozoospermia severas como medida preventiva para evitar la ausencia total de espermatozoides en el momento que se vaya a realizar el TRA.



Hipótesis Hipótesis

Pero el hombre, dado que vive sólo una vida, nunca tiene la posibilidad de comprobar una hipótesis mediante un experimento y por eso nunca llega a averiguar si debía haber prestado oído a su sentimiento o no.

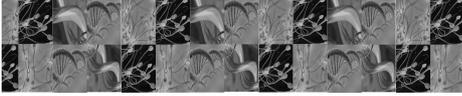
(La insoportable levedad del ser. Milan Kundera)



Hipótesis

Una vez establecida la posible relación entre el ARNm espermático y el potencial fértil, queremos determinar el perfil de expresión génica, esto es el conjunto de ARN mensajeros que se expresan en muestras de semen de pacientes infértiles que se someten a un tratamiento de reproducción asistida, consiguiendo embarazo en comparación con los que no lo logran, mediante la tecnología del microarray, para así establecer la huella genómica de la fertilidad masculina en los espermatozoides.

Por tanto, hipotetizamos que existen diferencias en la expresión de ARNm entre estos dos grupos, y que éstas variarán dependiendo del tipo de tratamiento de reproducción asistida que estemos estudiando, ya que cada técnica presenta diferentes niveles de exigencia funcional para los espermatozoides.

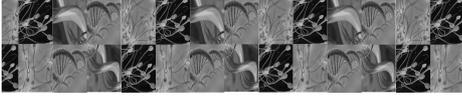


Objetivo

Objetivo

De ti depende y de mí que entre los dos siga siendo ayer noche, hoy por la mañana.

(Y si amanece por fin. Mentiras Piadosas. Joaquín Sabina)



Objetivo

El objetivo general es determinar el perfil de expresión génica de muestras de semen que logran un embarazo frente a aquellas que no, con las diferentes técnicas de reproducción asistida, mediante la técnica del microarray, como un primer paso para mejorar la capacidad de diagnóstico sobre la infertilidad masculina.

Objetivos específicos;

- Comparar el perfil de expresión génica entre muestras de semen que consiguieron embarazo mediante inseminación intrauterina y las que no, y describir sus diferencias.
- Comparar el perfil de expresión génica entre muestras de semen que consiguieron embarazo mediante fecundación *in vitro* y las que no, y describir sus diferencias.
- Comparar el perfil de expresión génica entre muestras de semen que consiguieron embarazo mediante inyección intra-citoplásmica y las que no, y describir sus diferencias.

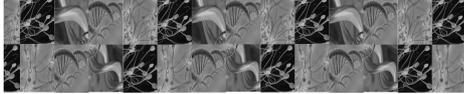


Material y métodos

Material y métodos

*Abrí los ojos para ver
Con el destino me encontré
De cara
Lo tengo todo a medio hacer
Me preguntaba, Si tal vez
Mañana*

(Segundo movimiento (lo de fuera). La ley Innata. Extremoduro)



Material y métodos:

1. Material:

1.1. Equipamientos.

1.2. Reactivos.

1.3. Diluciones.

2. Métodos:

2.1. Obtención del tejido biológico:

2.1.1. Inseminación Artificial Homóloga.

2.1.2. Fecundación *in vitro*.

2.1.3. Inyección Intra-citoplasmática de espermatozoides (muestras en fresco).

2.1.4. Inyección Intra-citoplasmática de espermatozoides (muestras crio-conservadas).

2.2. Esquema de los experimentos de microarrays:

2.2.1 Extracción y cuantificación del ARNm.

2.2.2 Experimentos de microarrays en IAH.

2.2.3 Experimentos de microarrays en FIV.

2.2.4 Experimentos de microarrays en ICSI semen fresco.

2.2.5 Experimentos de microarrays en ICSI con semen crio-conservado.

2.3. Experimentos de microarrays (Procesado, escaneado y análisis de los datos).

2.4. Perfiles de expresión:

2.4.1. Genes diferencialmente expresados.

2.4.2. Genes exclusivos.

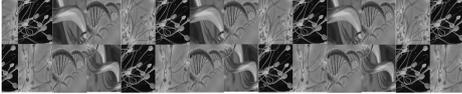
2.4.3. Genes descritos en procesos reproductivos.

2.4.4. Análisis ontológico.

2.5. Validación de los microarrays:

2.5.1. Diseño cebadores.

2.5.2. PCR cuantitativa.



Material y métodos.

1. MATERIAL:

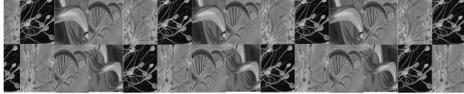
1.1. EQUIPAMIENTOS.

Equipamiento Microarrays.

- Escáner *GenePix Personal 4100A (Axon Instruments)*.
- Cámara de hibridación de acero inoxidable.
- *HibridizationChambergasketslides*.
- Horno de hibridación.
- *Nuclease-free* 1.5 ml tubos de microcentrífuga.
- *Magneticstir bar (x2)*
- Microcentrífuga (*MiniSpin, Eppendorf*).
- *NanoDrop 2000*.
- Bloques de calor o baños de agua.
- Incubador- agitador (*Innova40, IncubatorShaker Series*).

Equipamiento extracción y cuantificación ARNm.

- Pipetas.
- Tubos cónicos de plásticos.
- Centrifugadora *Centronic BL P Selecta*.
- Cabina de extracción de flujo laminar.
- *NanoDrop 2000*.
- Microscopio.
- Microcentrífuga (*MiniSpin, Eppendorf*).
- Equipamiento PCR cuantitativa y RT-PCR
- *LigthCycler (Roche)*.
- Termociclador *Gene AM PCR System 9700*.



1.2. REACTIVOS.

Reactivos microarrays.

- *Low Input Quick Amp Labeling Kit, One Color.*
- *ARN Spike-In, One color.*
- Kit de Hibridación de Expresión génica.
- Búfer de lavado 1.
- Búfer de lavado 2.
- Agua destilada libre de *DNA*sas y *RNA*sas.
- Agua Mili-Q o equivalente.
- *Mini Kits RNeasy*
- Etanol 100%.

Reactivos extracción y cuantificación ARNm.

- Trizol.

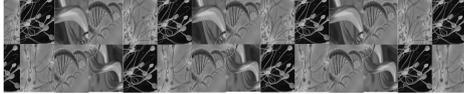
Reactivos PCR cuantitativa y RT-PCR.

- *LightCycler Fast Start Master SYBR Green I (Roche).*
- *Advantage RT for PCR kit (Clontech).*

1.3. Soluciones.

Soluciones tampón.

PBS: NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, KH₂PO₄ 1.5 mM, Na₂HPO₄ 9.1 mM y agua destilada.



2. Métodos:

2.1. Obtención de las muestras de semen.

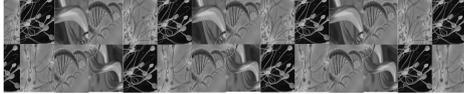
Las muestras para nuestro estudio proceden de muestras de semen de pacientes que acuden a la clínica de reproducción asistida por problemas de infertilidad. Las muestras seminales se obtuvieron del Laboratorio de Andrología y de Semen-FIV de la clínica IVI de Valencia.

Dadas las implicaciones éticas y relativas a los derechos de los pacientes, este proyecto fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Instituto Valenciano de Infertilidad.

Se utilizaron pequeñas alícuotas de muestras de semen de pacientes que iban a someterse a un ciclo de reproducción asistida. Los requisitos para seleccionar las muestras dependían del tratamiento de reproducción asistida al que se sometía la pareja.

Debemos tener en cuenta que el estudio de la infertilidad es complicado, desde el punto de vista que estamos estudiando un resultado (gestación o no) a partir del estudio de dos entes individuales, un hombre y una mujer o más concretamente un gameto femenino y otro masculino. En nuestro caso estamos estudiando el factor masculino y asociándolo a la consecución o no de una gestación, de modo que debemos estandarizar al máximo el factor femenino, para que interfiera lo mínimo en nuestro estudio. Sabemos que hay muchos factores que pueden causar esterilidad y que es prácticamente imposible controlarlos todos para ver cómo afecta de manera exclusiva el factor masculino, aunque intentamos minimizar este hecho ciñéndonos a unos criterios de inclusión que nos permitan reducir los otros factores que no sean el masculino.

Generalmente cuando una pareja va a someterse a un ciclo de alguna de las técnicas de reproducción asistida que se llevan a cabo en las clínicas IVI, el



hombre debe recoger mediante masturbación una muestra de semen ya sea en su casa o en las instalaciones de las clínicas designadas para tal uso, teniendo en cuenta que la muestra debe estar en las instalaciones del IVI, para procesarla, antes de una hora tras la recogida.

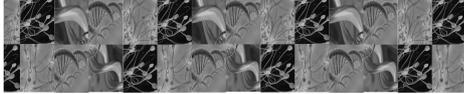
Una vez el paciente llegaba con su muestra de semen y accedía a participar en el estudio, del que previamente había sido informado en alguna de las primeras visitas previas al tratamiento, procedíamos a retirar una pequeña alícuota o porción de la muestra de semen (se trataba de un volumen muy pequeño que no comprometía las tasa de éxito del ciclo al que se sometían) que se iba a usar para el posterior TRA para el estudio de microarrays. Esta pequeña porción correspondía a los restos de la muestra de semen que se quedaban en el recipiente estéril donde el paciente había recogido su muestra una vez los andrólogos procesaban dicha muestra para el tratamiento de reproducción asistida correspondiente.

Las muestras se obtuvieron por masturbación de pacientes que acudían a someterse a algún tratamiento de reproducción asistida. Todos guardaron una abstinencia de 2-3 días y tras la recogida de la muestra hasta su posterior análisis no se sobrepasaron los 60 minutos.

Los eyaculados se licuaron a 37°C y al 5% de CO₂ durante 30 minutos, transcurridos los cuales, se realizó el espermograma obteniendo de este modo la información sobre el volumen seminal, la concentración de espermatozoides y la movilidad de estos.

El espermograma se realizó depositando 0,10 ml en una cámara *Macklery* contando bajo un microscopio a 400 aumentos.

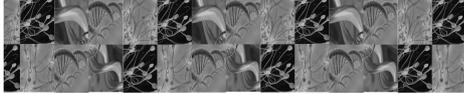
Posteriormente todas las muestras se procesaron por la técnica del *swim-up* o gradientes de densidad para llevar a cabo la pertinente TRA.



2.1.1. Inseminación Artificial Homóloga.

Se recogieron de manera sistemática alícuotas de entre 150 y 500 μ l de eyaculados de pacientes infértiles que se sometían a su primer ciclo de IAH. Las parejas acudían transcurrido mínimo un año manteniendo relaciones sexuales con asiduidad y sin usar ningún método anticonceptivo sin haber logrado un embarazo. Todos los pacientes presentaban parámetros seminales normales según la clasificación de la OMS y sus parejas eran todas menores de 37 años y no presentaban ninguna patología que pudiera explicar o asociarse a la infertilidad como las enumeradas a continuación:

- Síndrome del ovario poliquístico.
- Endometriosis.
- Fallo ovárico.
- Falta de permeabilidad tubárica (Ambas trompas de Falopio deben presentar permeabilidad).
- Perfiles hormonales alterados (Niveles altos de FSH, LH, testosterona o androstendiona).
- Anovulación.
- Problemas en el moco cervical (Moco cervical de característica antiestrogénicas que está deteriorado y puede afectar al transporte espermático).
- Malformaciones uterinas (Útero septado, bicorne, didelfo y unicorne.)
- Quistes o tumores ováricos.
- Enfermedad inflamatoria pélvica.
- Obesidad (Mujeres con un IMC>30).
- Enfermedad de tiroides.
- Diabetes mellitus.
- Enfermedad renal o suprarrenal.
- Hábitos tóxicos (tabaquismo, alcoholismo o drogadicción).
- Estrés tanto físico como psicológico (por ejemplo mujeres que esté bajo tratamiento psiquiátrico farmacológico (ansiolíticos y antidepresivos)).



Las muestras llegaban al laboratorio de andrología, se introducían en el incubador y tras su total licuefacción se procedía a retirar la pequeña alícuota que se utiliza para el estudio. El resto de la muestra se procesaba mediante el método de *swim-up* para posteriormente realizar la inseminación artificial a la paciente.

Se tomaron las alícuotas, se lavaron en 3 ml de PBS, se centrifugaron 10 minutos a 2200 rpm, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet (los espermatozoides) en 1 ml de Trizol. A continuación se congelaron las muestras resuspendidas en Trizol en un criotubo por inmersión directa en nitrógeno líquido, para después almacenarlas en un tanque seco de nitrógeno hasta su posterior extracción de ARNm.

En los ciclos de IAH se estimuló tanto con la hormona estimulante de folículos, FSH (*Follicle-stimulating hormone*) (*Gonal-F; Serono S.A., Spain*; *Puregon; Schering-Plough Española, Spain*) como con hMG (*human menopausegonadotropin*) (*Lepori; FarmaLaboratories, Spain; o Menopur; Ferring, Spain*). La estimulación se iniciaba en el día 3 del ciclo con dosis entre 75 y 150 UI. La foliculometría se monitorizaba vía ecografía vaginal y siguiendo los niveles de estradiol. Cuando el tamaño del folículo dominante era de alrededor de 18 milímetros la paciente recibía 10000 IU de hCG (*Human ChorionicGonadotropin*) (*Profasi 10 000 UI; Serono S.A., Spain*). La pacientes se inseminaron entre las 12 y 36 horas siguientes tras la inyección de hCG (Garrido *et al.*, 2007).

Periódicamente se comprobaban los resultados de la prueba de la β -hCG (denominada comúnmente como prueba de embarazo) seguido de la confirmación por ecografía del saco gestacional, para saber cuáles de las parejas de las que habíamos guardado parte de su eyaculado habían logrado dejar embarazadas a sus parejas y cuáles no.



2.1.2. Fecundación *In Vitro*.

Se recogieron de manera sistemática muestras de semen de pacientes que se sometían a una Fecundación *in Vitro* con ovocitos de donantes sanas y fértiles.

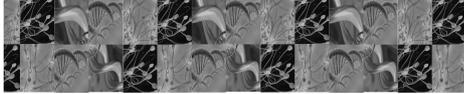
Se usan ovocitos procedentes del programa de ovodonación de mujeres jóvenes, sanas y que ya habían sido conseguido gestaciones anteriores. Usando estos ovocitos, que se suponían de máxima calidad, estandarizábamos al máximo el factor femenino.

El procesado y almacenaje de las muestras se realiza de igual manera que en el caso de las IAHS.

Las mujeres receptoras no debían presentar:

- Endometriosis.
- Malformaciones uterinas (Útero septado, bicorne, didelfo y unicorne.)
- Fallos previos de implantación.
- Quistes, pólipos o tumores uterinos.
- Enfermedad inflamatoria pélvica.
- Obesidad (Mujeres con un IMC>30)
- Enfermedad de tiroides.
- Diabetes mellitus.
- Enfermedad renal o suprarrenal,
- Hábitos tóxicos (tabaquismo, alcoholismo o drogadicción)
- Estrés tanto físico como psicológico (por ejemplo mujeres que esté bajo tratamiento psiquiátrico farmacológico (ansiolíticos y antidepresivos)).

En cuanto a las mujeres donantes de ovocitos debían ser menores de 30 años y que hubieran logrado una gestación previa, bien dentro del programa de ovodonación o por descendencia propia.



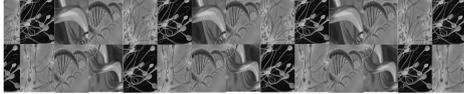
Para la estimulación de las donantes se utilizaron tanto antagonistas como agonistas de la *GnRH*. Para estos últimos se utilizó el protocolo largo (Diaz *et al.*, 2000). Este consiste en administrar 0,1 miligramos de *leuprolide* (*Procrin*; Abbott S.A., Spain) o *triptorelina* (*Decapeptyl*; IpsenPharma; Spain) a mitad de fase lútea del ciclo anterior. Una ecografía vía vaginal del ovario y unos niveles de estradiol determinados (niveles de estradiol en plasma <60 picogramos/mililitro (200 picomoles/litro)) nos indica que el ovario está en reposo. En este momento se reduce la dosis de análogo a 0,05 miligramos hasta el día de administración de la *hCG*.

Los antagonistas de la *GnRH* (*Gonadotropin-releasing hormone*) se usaron siguiendo el protocolo de dosis baja (Bosch *et al.*, 2003): a partir del día 6 de la estimulación se administró 0,25 miligramos de antagonista *Cetrotide* (*Cetrorelix*; Serono S.A., Spain) hasta el día de la administración de la *hCG*.

2.1.3. Inyección Intra-citoplasmática de espermatozoides (muestras en fresco).

En este caso, se recogieron de manera sistemática muestras de semen en casos en los que de una donante se obtenían suficientes ovocitos para donar a dos parejas diferentes, sometiéndose cada una de ellas a una ICSI con semen fresco de sus respectivas parejas, quedando una de ellas embarazada y la otra no. En estos casos, las muestras de semen pueden ser patológicas y generalmente no cumplen los criterios de normalidad de la OMS. El procesado y almacenamiento de las muestras se realizó de manera idéntica a las de las IAH y FIV.

Finalmente extrajimos el ARNm de aquellos casos en los que siendo ovocitos de la misma donante, una de las parejas lograba quedarse embarazada y otra no.



Las mujeres receptoras no debían padecer:

- Endometriosis.
- Malformaciones uterinas (Útero septado, bicorne, didelfo y unicornes).
- Fallos previos de implantación.
- Quistes, pólipos o tumores uterinos.
- Enfermedad inflamatoria pélvica.
- Obesidad (Mujeres con un IMC > 30).
- Enfermedad de tiroides.
- Diabetes mellitus.
- Enfermedad renal o suprarrenal.
- Hábitos tóxicos (tabaquismo, alcoholismo o drogadicción).
- Estrés tanto físico como psicológico (por ejemplo mujeres que estén bajo tratamiento psiquiátrico farmacológico (ansiolíticos y antidepresivos)).

En cuanto a las mujeres donantes de ovocitos debían ser menores de 30 años y que hubieran logrado una gestación previa, bien dentro del programa de ovodonación o por descendencia propia.

Para la estimulación ovárica de las donantes se usó el mismo protocolo descrito en el punto anterior en el caso de la FIV.

2.1.4. Inyección Intra-citoplasmática de espermatozoides (muestras crio-conservadas).

En este caso la, el diseño experimental y las indicaciones, son idénticas a las descritas en el punto anterior en el caso de muestras de semen fresco que se destinan para una ICSI, pero con muestras de semen de pacientes que habían sido previamente crio-conservadas.



2.1.4.1. Crio-conservación de semen.

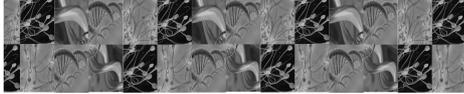
Una vez llega la muestra al laboratorio de andrología se deja licuar en el incubador. Una vez licuada, se retira una gota para realizar el espermiograma y el resto se lava con medio de cultivo. Una vez lavadas, se resuspenden en una solución crio-protectora. En el caso de la clínica IVI Valencia, donde se ha realizado la presente tesis doctoral, se utiliza un crio-protector compuesto de yema de huevo y la muestra se congela en forma de píldoras sobre una superficie de hielo seco y se almacenan en un banco de nitrógeno seco (**Figuras 1-MM y 2-MM**).

Figura 1-MM: Congelación de semen en forma de píldoras sobre superficie de una pastilla de nieve carbónica.



Figura 2-MM: Banco de nitrógeno seco.





2.2. Esquema de los experimentos de microarrays.

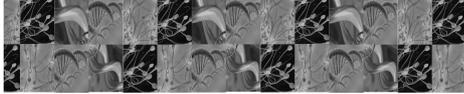
Los experimentos de microarrays son muy costosos y el contenido de ARNm de los espermatozoides es muy poco si lo comparamos con otros tipos celulares, de modo que no se analizaron de manera individualizada las muestras, sino que para cada TRA, procedimos a hacer una agrupación (comúnmente denominado *pool*) con las muestras que lograban embarazo y otro con las muestras que no lo alcanzaban y fue con cada uno de esos *pooles* con los se realizaron los experimentos de microarrays (Horcajadas *et al.*, 2007, Garcia-Herrero *et al.*, 2011, Garcia-Herrero *et al.*, 2009, Diaz-Gimeno *et al.*, 2011).

Resumiendo, para cada TRA realizamos 2 microarrays, uno con el *pool* de muestras que lograban embarazo, y que denominamos Grupo E y otro con el *pool* de muestras de las que no lo lograban y al que nos referiremos como grupo NE.

Para la realización de este estudio se utilizaron microarrays de expresión génica de genoma completo de Agilent (*Whole Human Genome Microarray, 4X44K*). Este microarray nos proporciona una visión general que representa todos los genes transcritos en el genoma humano.

El kit comercial nos proporciona una plataforma en un *slide* de cristal que contiene 4 microarrays de genoma completo. El tamaño del *slide* es de aproximadamente 75X25 milímetros. El tamaño de las sondas es de 60mer y estas fueron impresas mediante la tecnología *SurePrint*.

La realización de los microarrays se realizó como indica el manual del usuario que nos proporciona la casa comercial de Agilent. (http://www.chem.agilent.com/Library/usermanuals/Public/G4140-90040_GeneExpression_One-Color_v6.0.pdf).



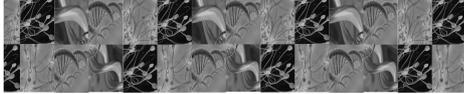
2.2.1. Extracción y cuantificación del ARNm.

De la muestra y antes de que esta se sometiera al proceso de *swim-up* o de gradientes de densidad, retirábamos una pequeña alícuota de entre 150 y 500µl, que es la cantidad que usábamos posteriormente para llevar a cabo los experimentos de microarrays, y lo depositábamos en un tubo cónico de plástico, lavábamos con 3 ml de PBS y centrifugábamos 10 minutos a 2200 rpm. Una vez centrifugado, descartábamos el sobrenadante y resuspendíamos el pellet en 1 ml de Trizol. Pasábamos a un criotubo de 1,8 ml y congelábamos por inmersión en nitrógeno. Finalmente almacenábamos en un banco seco de nitrógeno hasta la posterior extracción del ARNm.

El ARN mensajero se extrajo mediante el método del TRIZOL en campana extractora de flujo laminar vertical (**Figura 3-MM**):

Figura 3-MM: Campana de extracción de flujo laminar vertical, indicada para trabajar con productos tóxicos y volátiles como el trizol o el cloroformo.





Se añadían 200 μ l de cloroformo (relación 1:5 respecto a la cantidad inicial utilizada de Trizol), agitábamos fuertemente la mezcla con la ayuda de un vórtex y se incubaba a temperatura ambiente 3-4 minutos. Centrifugábamos 15 minutos a 12000 rpm a 4°C, descartábamos el sobrenadante y resuspendíamos el pellet en isopropanol dejándolo en incubación a -20°C durante toda una noche. Transcurridas las doce horas con el isopropanol, agitábamos y centrifugábamos 12 min a 12.000 rpm a 4°C, descartábamos sobrenadante y resuspendíamos en 0,5 ml de etanol en agua-DEPCal 70%. Centrifugábamos a 7500 rpm, 10 min a 4°C, descartábamos el sobrenadante y resuspendíamos el pellet en 15 μ l de agua-DEPC.

Congelábamos a -80°C en un tubo *ependorf* de 2 ml. Por lo tanto, al final obteníamos una suspensión del ARNm en 15 μ l de agua-DEPCC.

La cuantificación se realizó con un el espectofotómetro *NanoDrop* (**Figura 4-MM**) que es un potente espectofotómetro basado en el pipeteo de microvolúmenes (en nuestro caso de 1,5 μ l) directamente sobre un pedestal plano donde se encuentra el extremo de la fibra óptica.

Figura 4-MM: *Nanodrop*.





Con este aparatado no es necesario el uso de dispositivos como las cubetas, *NanoDrop* usa la tecnología de la fibra óptica y de la tensión superficial, las muestras son depositadas entre dos superficies ópticas (formado un puente de líquido por la tensión superficial) que definen la longitud de onda.

La eliminación de elementos como las cubetas nos permite que se mida la absorbancia cambiando la longitud de onda a tiempo real para una muestra dada.

Las concentraciones que miden van desde 0,2ng/μl hasta 3700ng/ μl, lo que nos evita llevar a cabo diluciones o hacer cualquier razonamiento acerca de la concentración inicial de la muestra antes de medirla. Además la exposición de la muestra directamente sobre las superficies ópticas eliminan las interferencias causadas por la luz que incide y es transmitida a lo largo de las paredes de las cubetas, por ejemplo.

La calidad se evaluó en un principio con el mismo espectrofotómetro que nos da un valor del ratio (260/280). Los ácidos nucleicos absorben la luz ultravioleta con un pico de absorción a 260 nm. Dentro del espectrofotómetro, la muestra se expone a una luz ultravioleta a 260nm y el fotodetector mide la luz que pasa a través de la muestra. A más luz absorbida mayor es la concentración de ácido nucleico (en este caso ARNm) que hay en la muestra.

Es muy común que los ácidos nucleicos estén contaminados por otra serie de moléculas como proteínas, fenoles u otros compuestos orgánicos, de ahí que se mida la absorción a 260nm. Normalmente estas moléculas tienen otros picos de absorción, por lo tanto comparamos la absorción de la muestra a 260 y se comparan con otros espectros de absorción a diferentes longitudes de onda para saber cuál es la contaminación por cada uno de los compuestos.



La contaminación más frecuente es la que se da por las proteínas que absorben a 280 nm, por eso se mide la absorción a 260, se compara con la absorción a 280 y podemos saber cuál es la contaminación por proteínas.

Este ratio deberá situarse entre 1,8-2,1.

También se midió el ratio 260/230, ya que compuestos fenólicos como el Trizol, absorben a esta longitud de onda.

2.2.2. Experimentos de microarrays en IAH.

Una vez identificadas la muestras que lograban o no un embarazo rescatamos sus correspondientes muestras de espermatozoides congeladas a -180°C en Trizol para proceder a su extracción de ARNm y se escogieron 10 por grupo (aquellas que presentaban la mejor calidad y cantidad de ARNm) para realizar los experimentos de microarrays.

Dividimos las muestras en dos grupos, Grupo E o el que logra embarazo y Grupo NE o los que no lo logran. Con las diez muestras de cada grupo procedimos a realizar un *pool* para obtener finamente 2 *pools* de muestras para hacer los microarrays, uno con las 10 muestras E y otro con las muestras NE. Cada una de las 10 muestras de cada *pool* contribuía con la misma cantidad de ARNm al *pool*. Por ejemplo, si para realizar el microarray necesitamos un cantidad total de 1000ng, cada muestra debería contribuir con 100ng, por lo que debía calcular el volumen que había que poner de cada una de las diez muestras de cada uno de los dos grupos (E y NE) para que fuera esa la cantidad aportada por cada una de las muestras seleccionadas para el estudio. Los microarrays se realizaron por duplicado técnico, esto es que con cada uno de los *pools* se hacían 2 microarrays, por lo tanto finalmente teníamos 2 microarrays para el grupo E y otros 2 para el grupo NE **(Figura 5-MM)**.

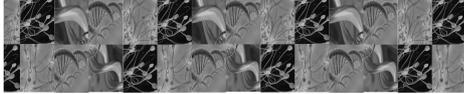
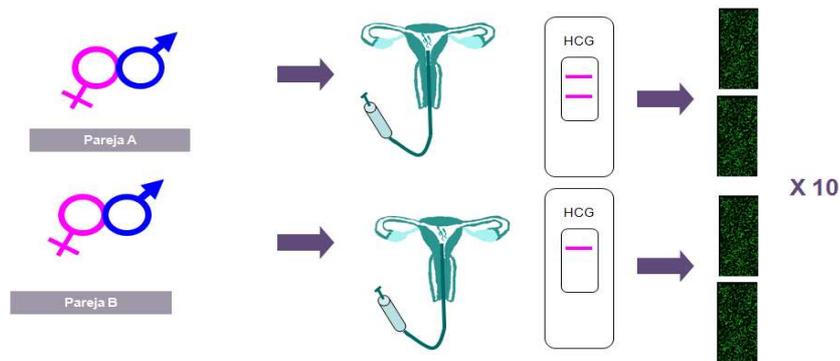


Figura 5-MM: Esquema del experimento de microarray con las muestras de pacientes que se someten a una IAH. La pareja A logra quedarse embarazada (Grupo E) y la B no (Grupo NE). Se utilizaron un total de 10 muestras por grupo, y con los pools de cada grupo se realizaron los microarrays por duplicado.



2.2.3. Experimentos de microarrays en FIV.

Dividimos las muestras en dos grupos, Grupo E o el que logra embarazo y Grupo NE o los que no lo logran.

Finalmente se escogieron 8 muestras, 4 que lograban el embarazo (Grupo E) y 4 que no (Grupo NE). Se procedió a hacer los *pools* con las muestras de cada grupo y se realizaron los microarrays (por duplicado técnico) (**Figura 6-MM**). Cada una de las 4 muestras de cada *pool* contribuye con la misma cantidad de ARNm en el *pool*.

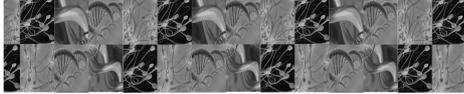
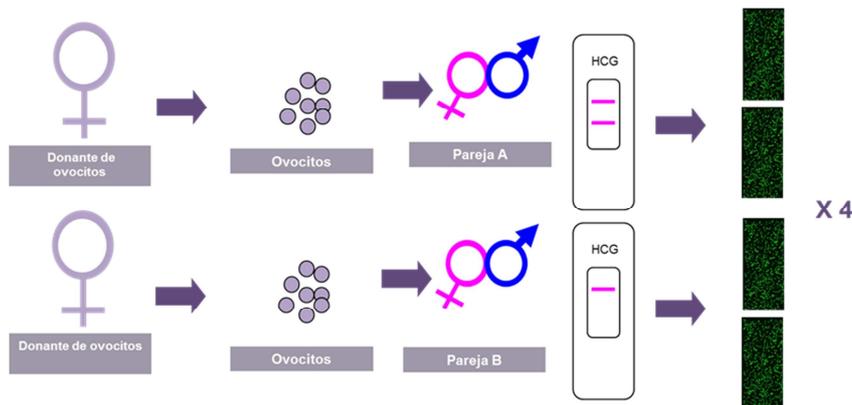


Figura 6-MM: Esquema del experimento de microarray con las muestras de pacientes que se someten a una FIV con ovocitos de donante. La pareja A logra quedarse embarazada (Grupo E) y la B no (Grupo NE). Se utilizaron un total de 4 muestras por grupo, y con los pools de cada grupo se realizaron los microarrays por duplicado.



2.2.4. Experimentos de microarrays en ICSI semen fresco.

Dividimos las muestras en dos grupos, Grupo E o el que logra embarazo y Grupo NE o los que no lo logran. Finalmente se consiguieron 5 casos, 5 muestras que lograron embarazo (Grupo E) y otras 5 que no (Grupo NE) y con cada uno de los grupos se realizaron 2 *pools* uno con el grupo E y otro con el grupo NE, y con esos dos *pools* se realizaron los microarrays (al igual que en el caso de las IAHs y las FIV, los microarrays se realizaron por duplicado técnico) (**Figura 7-MM**).

2.2.5. Experimentos de microarrays en ICSI con semen crio-conservado.

El diseño experimental y el número de muestras empleadas son idénticos al utilizado en el caso de las comparaciones realizadas con las muestras de semen en fresco para la ICSI (**Figura 7-MM**).

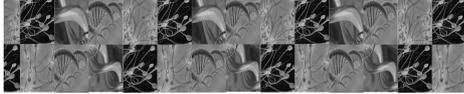
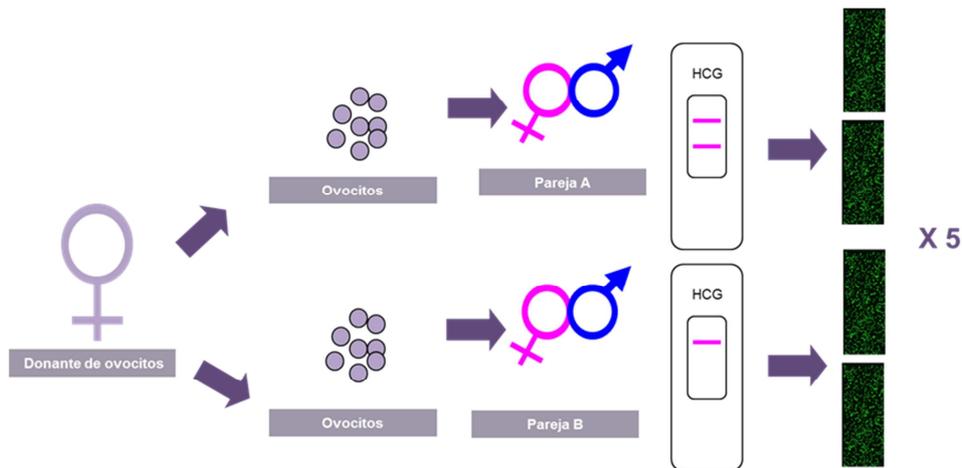


Figura 7-MM: Esquema de experimento de microarray con las muestras de pacientes que se someten a una ICSI con ovocitos de donante. La pareja A logra quedarse embarazada (Grupo E) y la B no (Grupo NE). Se utilizaron un total de 5 muestras por grupo, y con los pools de cada grupo se realizaron los microarrays por duplicado.

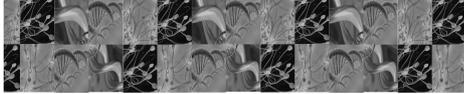


2.3. Experimentos de microarrays (Procesado, escaneado y análisis de los datos).

Todas las muestras se hibridaron en el *WholegenomeOligo Microarray* (Agilent technologies, Madrid, Spain) en el que hay más de 40.000 sondas de ADN humano.

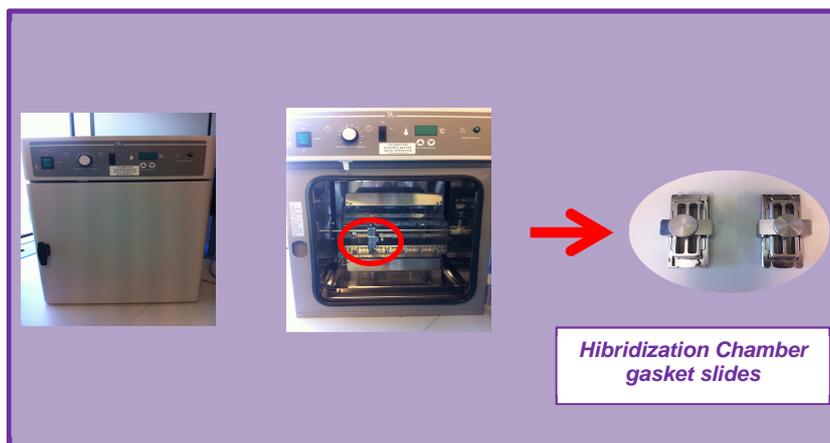
El protocolo para la preparación y la hibridación de las muestras de semen fue adaptado del manual del usuario.

En primer lugar se generaron sondas de ADN complementarios (ADNc) de una sola cadena incubándolo con retrotranscriptasa reversa dos horas a 42°C y la



segunda cadena a 16°C durante otras dos horas. Los oligonucleótidos que se utilizan en la primera cadena contienen las secuencias del promotor de la T7 ARN polimerasa por lo que posteriormente se realizará la transcripción *in vitro* y el marcaje con el Cy3 por medio de la T7 ARN polimerasa a 37°C durante 14 horas (todo incluido en el *kit* de marcaje de *Quick-AMP* de *Agilent Technologies*). La síntesis de ARNc suele alcanzar los 4,5 µg. A continuación purificábamos el ARNc mediante columnas (*QIAGEN*, Barcelona, Spain), entonces el ARNc se fragmentaba a 94°C durante 20 minutos, en fragmentos más pequeños que iban desde las 35 a las 200 pares de bases. Los fragmentos de ARNc se hibridaron en el microarray durante 17 horas de incubación en constante rotación en el horno a 65°C (**Figura 8-MM**). Transcurridas las 17h se lavaron en dos pasos de un minuto con 2 búferes de lavado (**Figura 9-MM**). Los microarrays se escanearon con el *GenePix 4100A Microarray Scanner* (**Figura 10-MM**) (*Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA*) y los datos fueron analizados con el programa de software *GenePix Pro 6.0* (*Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA*).

Figura 8-MM: Horno de hibridación.



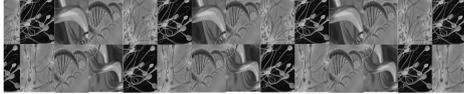


Figura 9-MM: Los lavados del microarray se realizan con un agitador magnético.

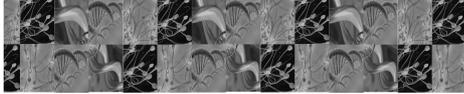


Figura 10-MM: GenePix 4100A Microarray Scanner.



2.4. Perfiles de expresión.

El perfil de expresión diferencial se determinó mediante la comparación del grupo E y NE, para cada una de TRAs estudiados en esta tesis, usando test no paramétricos con dos criterios para definir los genes que presentaban una cantidad de ARNm para un transcrito o ARN determinado alterada en un grupo respecto del otro, y los definimos como Genes Diferencialmente Expresados (GDE).



Además de los GDE, también se definieron aquellos genes que sólo se expresaban en uno de los grupos (Grupo E o NE) para cada una de las TRA estudiadas.

Debemos de tener en cuenta que en la expresión génica, no sólo cuentan aquellos genes que, expresándose tanto en el Grupo E como el NE, lo hacen en diferente proporción (GDE), también son importantes aquellos genes que expresándose en uno de los grupos está ausente en el otro (GE).

2.4.1. Genes diferencialmente expresados.

Para definir a un gen como GDE debía cumplir los siguientes requisitos: expresarse en ambas situaciones biológicas (esto es tanto en el grupo E como en el grupo NE), presentar una tasa de cambio (TC) absoluta de 2 o más veces (esto es que la expresión de un gen sea el doble o más en un grupo que en el otro) y tener un p-valor menor de 0,05.

2.4.2. Genes exclusivos.

Son genes que solo se expresan en uno de los grupos (Grupo E o Grupo NE) y que deben presentar un nivel de señal en el microarray superior a la señal correspondiente del ruido de fondo, que es diferente para cada uno de los experimentos y que es el resultado de la media de la señal correspondiente a los controles negativo más dos veces la desviación estándar.

2.4.3. Genes descritos en procesos reproductivos.

Se realizó una búsqueda sistemática con ayuda del *Gene Ontology* de procesos biológicos relacionados con la reproducción, y se hicieron listas de los genes que estaban descritos en ellos. Posteriormente, comparábamos los listados de tanto de GDE como de GE de cada uno de nuestros experimentos con estos



listados elaborados a partir del Gene Ontology, para encontrar los GDE y GE que estuvieran previamente descritos en alguno de los siguientes procesos relacionados con la reproducción:

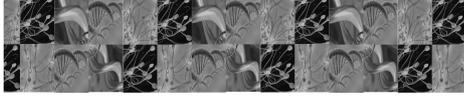
Acrosoma (GO:0001669), Reacción del acrosoma (GO:0007340), Unión del espermatozoide a la zona pelúcida (GO:0007339), Proceso reproductivo (GO:0022414) , Generación de gametos masculinos (GO:0048449), Cópula (GO:0007620), Implantación embrionaria (GO:0007566), Desarrollo embrionario (GO:0009790), Embarazo (GO:0007565), Fecundación (GO:0009566), Desarrollo de los genitales (GO:0048806), Desarrollo para las células germinales (GO:0007281), Desarrollo de las gónadas (GO:0008406), Inseminación (GO:0007320), Desarrollo de la placenta (GO:0001890), Reproducción (GO:0000003), Reproducción Sexual (GO:0019953), Movilidad espermática (GO:0030317), Desarrollo de las espermátidas (GO:0007286) y Espermatogénesis (GO:0007283) (Entre paréntesis el código de ese proceso dentro del *Gene Ontology*).

Como ya se advertía en la introducción, el análisis ontológico de los datos expuestos en esta tesis pueden variar ligeramente, ya que estas bases de datos se actualizan constantemente y nuestros datos fueron analizados por última vez en febrero de 2012. Sin embargo por las constantes búsquedas que se han hecho durante la realización de la presente tesis sabemos que los datos apenas pueden variar.

2.4.5. Análisis ontológico.

La búsqueda de información también se realizó en el sentido inverso, buscar aquellos términos ontológicos que estaban estadísticamente afectados según nuestros listados de GDE y GE obtenidos tras los experimentos de

Estos listados se analizan con la herramienta bioinformática de *DAVID genes* (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>), que nos proporcionará, para cada lista introducida una serie de términos ontológicos (Procesos Biológicos, Componentes



Celulares y Funciones Moleculares) estadísticamente afectados, así como una serie de rutas metabólicas.

Tras todos los experimentos de microarrays obtenemos un total de 8 listados de GDE (GDE E y NE para cada una de las comparaciones realizadas) y otras 8 listas de GE. A la hora de estudiar aquellos términos ontológicos estadísticamente afectados, los listados de GDE de los grupos E y NE de cada experimento se analizan conjuntamente, ya que son genes presentes en ambos grupos y que esté sobre o infra-expresado afecta a ambos grupos (el hecho de que un gen esté sobre-expresado en un grupo respecto a otro puede significar que verdaderamente lo esté o que en el otro grupo esté infra-expresado, por ello se analizarán conjuntamente los listados de GDE de los grupos E y NE para cada experimento de microarrays), sin embargo los listados de GE se tratan de manera individual, por un lado los del grupo que embaraza y por el otro el que no, ya que estos genes sólo se presentan en ese grupo determinado y sólo afectan a ese determinado grupo. El esquema del análisis de los datos se representa en la **figura 11-MM**.

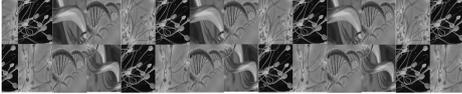
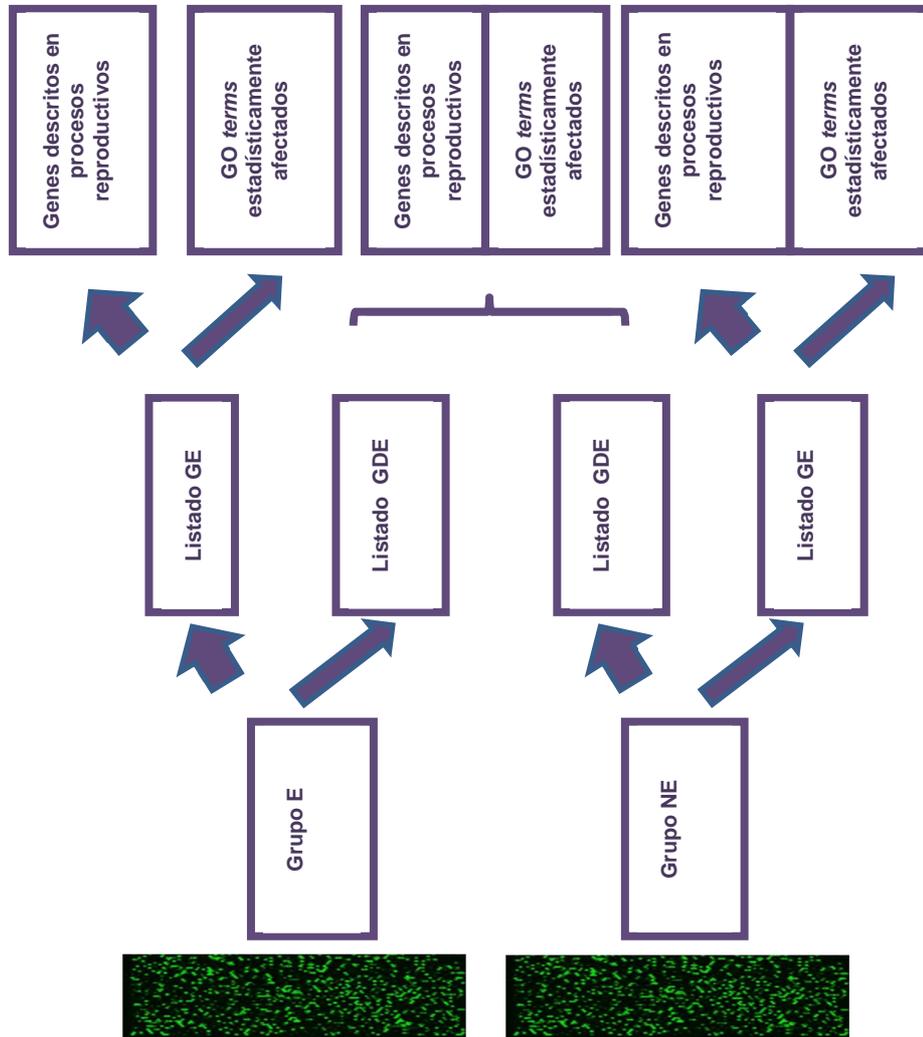


Figura 11-MM: Esquema del análisis de los listados de GDE y GE de los grupos E y NE para cada una de las comparaciones realizadas.





2.5. Validación de los microarrays.

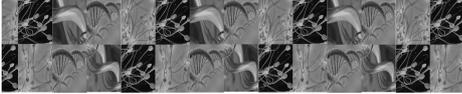
Los resultados de los microarrays se validaron mediante la técnica de la PCR cuantitativa.

2.5.1. Diseño cebadores.

Se utilizaron herramientas en línea para generar los cebadores específicos para los genes seleccionados. En un primer lugar se buscó la secuencia completa del gen (<http://www.ensembl.org/index.html>), y se escogió el fragmento del gen sobre el que queríamos diseñar el cebador. Si el gen presentaba diferentes variantes, debíamos buscar aquellos fragmentos que eran comunes a todas ellas para poder diseñarlo sobre este fragmento en común. Para la confección del cebador utilizamos la herramienta en línea *Gene Fisher* (<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/genefisher/old.html>).

Las condiciones de diseño de los cebadores fueron las siguientes: La longitud del *cebador* debía estar entre 19 y 21 pares de bases (pb), con una temperatura de *melting* (tm) que oscilara entre 59-61°C y con un producto de PCR de entre 200 y 220 pb con un contenido de G-C de 45-55%.

El programa *GeneFisher*, generaba entonces un determinado número de pares de *cebadores* según nuestras condiciones de diseño y es en este momento en el que los iremos sometiendo a un BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Esto consiste en ver hasta qué punto son específicos respecto del gen que hemos elegido ya que a veces un cebador puede amplificar tanto el fragmento del gen lo hemos diseñado, como fragmentos de otros genes.



Finalmente analizamos características bioquímicas físico-químicas de los cebadores como la probabilidad de que formen heterodímeros u homodímeros (<http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/Default.aspx>).

2.5.2. PCR cuantitativa.

Los cebadores se pidieron a la casa comercial de *Invitrogen* y estos nos llegaban liofilizados en viales de plástico.

Debíamos prestar atención a las especificaciones físico-químicas que nos proporciona el fabricante. Generalmente llegaban en concentraciones Mol/L y había que dejarlos en 100µM.

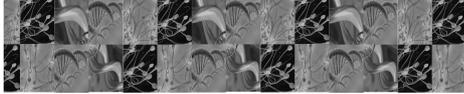
Por ejemplo, si teníamos una concentración de 39,3 nmoles, le añadíamos 393 µl de agua-DEPC y lo manteníamos 10 minutos a temperatura ambiente. Transcurridos estos 10 minutos se almacenaba a una temperatura de -20°C.

Para realizar las PCR cuantitativas los utilizamos en diluciones 1/10.

1. Síntesis de ADNc:

1 microgramo de ARN de cada una de las muestras se usó para sintetizar la cadena de ADN complementaria (ADNc).

Para la preparación del ADNc, ponemos en un tubo *ependorf* de PCR el volumen de muestra para tener 1 microgramo de ARN, 1 microlitro de cebador, *Oligodty* agua-DEPC tratada hasta completar un volumen de 12,5 µl e incubamos 2 minutos a 70°C, luego se dejaba en hielo hasta el siguiente paso, que consistía en añadir a cada muestra un *mix* compuesto (*Clonctech*) de un búfer de reacción (4 µl/muestra), desoxirribonucleótidostrifosfato (dNTPs) (1 µl/muestra), inhibidor recombinante de la RNasa (0,5 µl/muestra) y la transcriptasa reversa MMLV

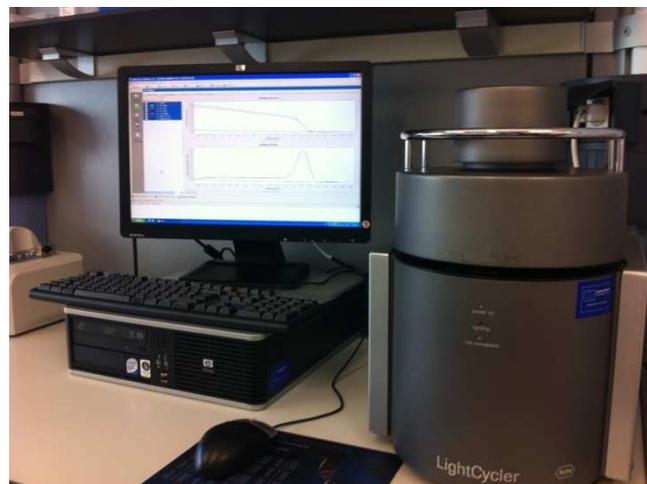


(*MoloneyMurineLeukemia Virus*))(1 μ l/muestra). Finalmente esta mezcla se incubaba a 42°C, 60 minutos y una vez transcurrida esa hora se dejaba 4 minutos a 94°C.

2. Condiciones de ensayo de la PCR cuantitativa.

Cada reacción (10 μ l) contenía 2 μ l de la respectiva dilución de ADNc y 8 μ l de ADN *Master SYBR Green I mix (ROCHE)* que contiene 1 μ l de cebadores a 10 μ M, 0,6 μ l de μ l de $MgCl_2$ a una concentración de 25mM, 5,8 μ l de agua-DEPCy 1 μ l de *Syber Green*. El programa de amplificación consistía en un ciclo a 95°C (“hotstart”), seguido de 45 ciclos a 95°C (10 segundos), 60°C (8 segundos) y 72°C (9 segundos). La amplificación era seguida de un análisis de curvas de *melting* usando el programa de un solo ciclo a 95°C (2 segundos), 55°C (10 segundos) y 95°C. Para todos los experimentos de PRC llevados a cabo se puso un control negativo para evaluar la especificidad de las reacciones (**Figura 12-MM**).

Figura 12-MM: *LightCycler* de Roche para la realización de PCRs cuantitativas.





Los cebadores se diseñaron para los siguientes genes: **CTSZ** (*Homo sapiens* cathepsin Z, NM_001336), **S100A6** (*Homo sapiens* S100 calcium-binding protein A6, NM_014624), **IFI30** (*Homo sapiens* interferon, gamma-inducible protein, NM_006332), todos ellos sobre-expresados en los grupos que lograban el E para las tres TRA estudiadas, **IL8** (*Homo sapiens* interleukin 8, NM_000584) sobre-expresado en el grupo E en las muestras de IAH y **CYLC2** (*Homo sapiens* cyclin, basic protein of sperm head cytoskeleton 2, NM_001340), **PLA2G2A** (*Homo sapiens* phospholipase A2, group IIA (platelets, synovial fluid) NM_000300 y **COX7B2** (*Homo sapiens* cytochrome c oxidase subunit VIIb2 NM_130902) que están sobre-expresados en los grupos NE de IAH, FIV e ICSI semen fresco respectivamente.

La secuencia de los cebadores está reflejada en la tabla **1-MM**.



Tabla 1-MM: Secuencia de los cebadores utilizados para realizar las validaciones mediante qPCRs.

	FORWARD	REVERSE
COX7B2	TTTCCCTTGGCCAGAAATGCA	GCTGTAAACACCCATGTAGCA
CTSZ	TGCCGAATACCAGGACACCA	CCTTATAGGTGCTGGTCACGA
CYLC2	AGCCTCTCAAACCAACTCGTA	GAGTCTTTGCCCTTGTCTGCA
IFI30	CCTTCCTGACCATTGTCTGCA	GGGTTTCCCATTGACGGTGA
IL8	CTTCTAGGACAAGAGCCAGGA	TTGGGGTGAAAGGTTTGGA
PLA2G2A	GATCGCTGCTGTGTCCTCA	TAGCAAAACAGGTGGCAGCA
S100A6	GACAAGCACACCCTGAGCAA	GTTCCGGTCCAAGTCTTCCA



Transcriptómica de la infertilidad masculina

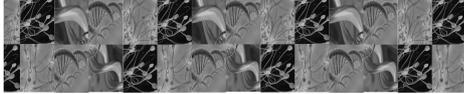
Material y Métodos

Sandra García Herrero. 2012



Resultados

*Y cuando vuelves hay fiesta
en la cocina
y bailes sin orquesta
y ramos de rosas con espinas,
pero dos no es igual que uno más uno*
(Y sin embargo. Yo, mí, me, conmigo. Joaquín sabina)



1. **Valores seminales.**
 - 1.1. **Muestras de semen de IAH.**
 - 1.2. **Muestras de semen de FIV.**
 - 1.3. **Muestras de semen ICSI (muestras en fresco).**
 - 1.4. **Muestras de semen ICSI (muestras crio-conservadas).**
2. **Extracción ARNm muestras de semen.**
3. **Microarrays muestras de semen de IAH.**
 - 3.1. **Listado de GDE y EG.**
 - 3.2. **Genes descritos en procesos biológicos relacionados con el proceso reproductivo.**
 - 3.3. **Análisis ontológico.**
4. **Microarrays muestras de semen de FIV.**
 - 4.1. **Listado de GDE y EG.**
 - 4.2. **Genes descritos en procesos biológicos relacionados con el proceso reproductivo.**
 - 4.3. **Análisis ontológico.**
5. **Microarrays muestras de semen de ICSI (muestras en fresco):**
 - 5.1. **Listado de GDE y EG.**
 - 5.2. **Genes descritos en procesos biológicos relacionados con el proceso reproductivo.**
 - 5.3. **Análisis ontológico.**
6. **Microarrays muestras de semen de ICSI (muestras crio-conservadas).**
 - 6.1. **Listado de GDE y EG.**
 - 6.2. **Genes descritos en procesos biológicos relacionados con el proceso reproductivo.**
 - 6.3. **Análisis ontológico.**
7. **Validación resultados.**
8. **Comparaciones entre técnicas.**
 - 8.1. **GDE.**



8.2. GE.

8.3. Totales.



1. Valores seminales.

1.1. Muestras de semen de IAH.

En la **tabla 1-R (MA)**, mostramos las principales características de las muestras de semen escogidas para la realización de los microarrays (Ver apéndice I).

1.2. Muestras de semen de FIV.

En la **tabla 2-R (MA)**, mostramos las principales características de las muestras de semen escogidas para la realización de los microarrays así como las indicaciones de los pacientes (Ver apéndice I).

1.3. Muestras de semen de ICSI fresco.

En la **tabla 3-R (MA)**, mostramos las principales características de las muestras de semen escogidas para la realización de los microarrays así como las indicaciones de los pacientes (Ver apéndice I).

1.3. Muestras de semen de ICSI crio-conservado.

En la **tabla 4-R (MA)**, mostramos las principales características de las muestras de semen escogidas para la realización de los microarrays así como las indicaciones de los pacientes (Ver apéndice I).



2. Extracción de ARNm.

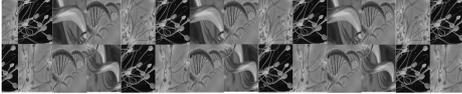
Los resultados de las extracciones de ARNm figuran en la [tabla 5-R](#).

Tabla 5-R: Cantidades y calidades de ARN mensajero de cada uno de los pacientes seleccionados en la diversas TRAs, medidas con Nanodrop®.

		Paciente	ARN [ng/µl]	Ratio 260/280	Ratio 260/230
INSEMINACIÓN ARTIFICIAL HOMÓLOGA	GRUPO E	C1	392,3	1,57	0,59
		X1	49,9	1,50	0,61
		Y1	338,1	1,78	1,11
		Z1	139,8	1,03	0,10
		CA	109,4	1,14	0,92
		FA	104,4	1,64	0,30
		GA	59,4	1,79	0,20
		LA	231,9	1,61	0,59
		MA	193,2	1,45	0,14
	OA	99,5	1,73	0,61	
	GRUPO NE	Q1	267,3	1,39	0,60
		R1	234,5	1,47	0,46
		S1	273,3	1,60	0,26
		U1	153,4	1,57	0,26
		W1	175,3	1,45	0,20
		BA	138,5	1,51	0,54
		IA	184,2	1,57	0,32
		JA	122,3	1,50	0,60
		KA	125,3	1,28	0,29
NA	258,6	1,44	0,56		
FECUNDACIÓN IN VITRO	GRUPO E	WN1	127,6	1,42	0,28
		WQ1	247,6	1,67	0,23
		WS1	609,0	1,64	0,17
	GRUPO NE	WO1	549,3	1,60	0,25
		WA1	59,9	1,82	0,15
		WR1	320,2	1,53	0,22
		WL1	49,1	1,97	0,55



ICSI SEMEN FRESCO	GRUPO E	WV1	437,2	1,58	0,27
		XA1	113,7	1,47	0,29
	GRUPO NE	XD1	1217,1	1,62	0,60
		XH1	63,8	1,00	0,25
		XK1	48,8	1,71	0,57
		XO1	137,0	1,42	0,21
		XB1	46,0	1,85	0,46
		XC1	187,2	1,67	0,15
		XG1	68,1	1,46	0,43
		XL1	139,3	1,19	0,17
		XP1	51,6	1,56	0,62
ICSI SEMEN CRIOPRESERVADO	GRUPO E	OA1	106,0	1,63	0,34
		OE1	61,0	1,64	0,36
		OI1	47,5	1,64	0,25
		OQ1	530,1	1,46	0,58
		OX1	113,8	1,12	0,47
	GRUPO NE	OB1	96,0	1,48	0,40
		OF1	231,7	1,52	0,55
		OJ1	173,3	1,49	0,63
		OP1	120,1	1,44	0,23
		OY1	247,7	1,41	0,27

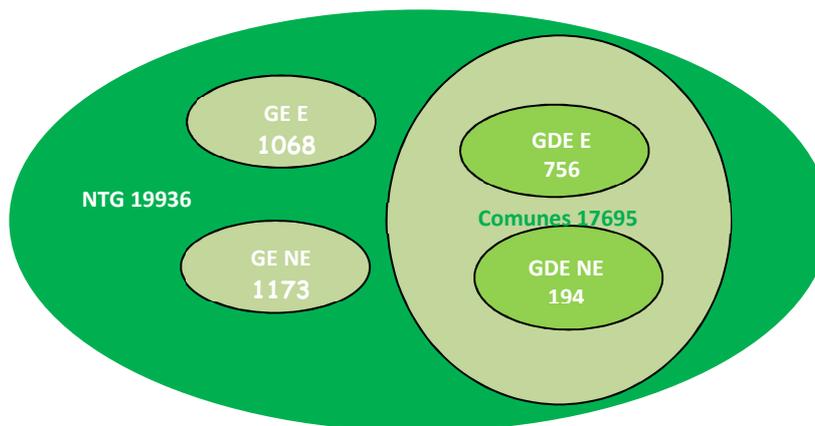


3. Microarrays muestras de semen de IAH.

3.1. Listado de GDE y EG.

El número total de genes que daban señal en el microarray de IAH era de 19936 genes. De ellos, 17695 (**Figura 1-R**), se expresaban en ambos grupos, tanto en el E como en el NE aunque una vez analizados los datos sólo 950 de ellos presentaban una expresión diferencial entre los 2 grupos. Finalmente se detectaron un total de 756 GDE en el grupo que lograba el embarazo (grupo E) y 194 presentaban una expresión diferencial en el grupo que no lo lograba (grupo NE) (**Tablas 6-R y 7-R Material adicional (MA)**). Como las tablas 6 y 7 son muy extensas, en las **6.1-R** y en la **7.1-R** ponemos sólo aquellos 10 genes con una mayor tasa de cambio en ambos grupos (grupo E y NE respectivamente).

Figura 1-R: NTG, número total de genes expresados; GE, genes exclusivos; GDE, genes diferencialmente expresados.



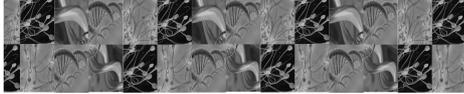


Tabla 6.1-R: Los 10 genes diferencialmente expresados con una mayor tasa de cambio en el grupo que logra un embarazo tras una IAH. En la columna 1 se indica en nombre del gen, en la columna 2 el número de acceso de GenBank, en la columna 3 la tasa de cambio y en la columna 4 el p-valor.

	Número de acceso <i>GenBank</i>	Tasa de cambio	p-valor
FCGR3A	NM_000569	20,71	0,0000
OSM	NM_020530	19,60	0,0000
FPR1	NM_002029	18,49	0,0000
CXCL1	NM_001511	17,83	0,0000
AQP9	NM_020980	17,75	0,0000
TMEM154	NM_152680	16,21	0,0005
PI3	NM_002638	15,96	0,0007
LILRB2	NM_005874	15,35	0,0000
VNN2	NM_004665	15,22	0,0000
APOBEC3A	NM_145699	14,10	0,0040



Tabla 7.1-R: Los 10 Genes diferencialmente expresados con una mayor tasa de cambio en el grupo que no logra un embarazo tras una IAH. En la columna 1 se indica en nombre del gen, en la columna 2 el número de acceso de GenBank, en la columna 3 la tasa de cambio y en la columna 4 el p-valor.

Nombre	Número de acceso GenBank	Tasa de cambio	p-valor
AK000872	AK000872	5,42	0,0254
ENST00000303697	ENST00000303697	5,13	0,0266
ZNF224	BC002889	4,68	0,0000
FLJ20581	ENST00000331849	4,55	0,0133
CAMK2N2	NM_033259	4,45	0,0097
CGB1	NM_033377	4,26	0,0166
THC2541992	THC2541992	3,98	0,0135
THC2609820	THC2609820	3,87	0,0150
LCE2D	NM_178430	3,75	0,0082
VPS18	NM_020857	3,70	0,0101

Cuando se analizaron los genes que sólo se expresaban en uno de los grupos se detectaron 1068 (Tabla 8-R MA) en el grupo que embarazaba y 1173 en el que no lo conseguía (Tabla 9-R MA) Como las tablas 8 y 9 son muy extensas, en las 8.1-R y en la 9.1-R ponemos sólo aquellos 10 genes con una mayor señal de fluorescencia en ambos grupos (grupo E y NE respectivamente). El valor de corte para considerar una expresión positiva se estableció en 6,789 unidades de fluorescencia.

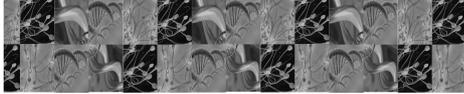


Tabla 8.1-R: Los 10 genes exclusivos expresados en el grupo que logra un embarazo (grupo E) tras una IAH con un mayor valor de intensidad de fluorescencia. En la columna 1 se indica en nombre del gen, en la columna 2 el número de acceso de GenBank y en la columna 3 el valor de fluorescencia.

Nombre	Número de acceso de GenBank	Valor de fluorescencia
IL8RA	NM_000634	9,916
CYSLTR2	NM_020377	9,732
AK055428	AK055428	9,647
P2RY14	NM_014879	9,517
C8orf39	AF116672	9,500
PRG1	NM_002727	9,372
IFIT2	NM_001547	9,344
BTNL8	NM_001040462	9,218
STK4	NM_006282	9,175
SIKE	NM_025073	9,054



Tabla 9.1-R: Los 10 genes exclusivos expresados en el grupo que no logra un embarazo (grupo NE) tras una IAH con un mayor valor de intensidad de fluorescencia. En la columna 1 se indica en nombre del gen, en la columna 2 el número de acceso de GenBank y en la columna 3 el valor de fluorescencia.

Nombre	Número de acceso de GenBank	Valor de fluorescencia
THC2638360	THC2638360	10,428
CDC37L1	NM_017913	10,382
THC2547195	THC2547195	9,875
NOX1	NM_007052	9,461
CLCNKB	NM_000085	9,147
THC2555234	THC2555234	9,069
THC2648250	THC2648250	9,022
NETO1	NM_138966	8,873
THRSP	NM_003251	8,815
AADAC	NM_001086	8,264

3.2. Genes descritos en procesos biológicos relacionados con el proceso reproductivo.

Una vez se obtuvieron los listados de GDE y GE de ambos grupos, los comparamos con la matriz de genes descritos en procesos biológicos relacionados con la reproducción según el *Gene Ontology* de todos los genes de nuestro listado (Ver apartado 2.4.3 de Materiales y Métodos).

38 GDE (Tabla 10-R), 52 GE del grupo E (Tabla 11-R) y 9 GDE (Tabla 12-R) y 59 del GE NE (Tabla 13-R), estaban descritos en algunos de esos procesos.

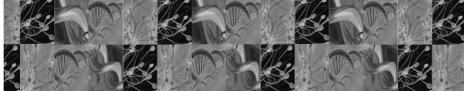


Tabla 10-R: Genes diferencialmente expresados en el grupo E de las IAHS, previamente descritos en algún proceso biológico relacionado con la reproducción.

Nombre	Procesos biológicos relacionados con la reproducción
ADA	Apareamiento, Cópula, Desarrollo embrionario, Desarrollo placentario, Reproducción, Proceso reproductivo
ADAM10	Desarrollo embrionario
B4GALT1	Fecundación, Reacción del acrosoma, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Unión del espermatozoide a la zona pelúcida, Penetración de la zona pelúcida
BCL6	Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
BMF	Vesícula acrosomal
CCL3	Reproducción, Proceso reproductivo
CCL4	Reproducción, Proceso reproductivo
CHST11	Desarrollo embrionario
FCGRT	Reproducción, Proceso reproductivo
FOS	Reproducción, Proceso reproductivo
GRN	Desarrollo embrionario, Reproducción, Proceso reproductivo, Implantación embrionaria
IGFBP7	Reproducción, Proceso reproductivo, Implantación embrionaria
IL8	Reproducción, Proceso reproductivo
LFNG	Desarrollo de las gónadas, Reproducción, Proceso reproductivo
LY6E	Desarrollo embrionario
MAFB	Desarrollo embrionario
MBNL1	Desarrollo embrionario
NFE2L2	Desarrollo embrionario
NIPBL	Desarrollo de los genitales, Desarrollo embrionario, Reproducción, Proceso reproductivo
NOTCH2	Desarrollo embrionario
NR4A3	Desarrollo embrionario
P2RY2	Apareamiento, Cópula, Desarrollo embrionario, Reproducción, Proceso reproductivo
PI3	Apareamiento, Cópula, Reproducción, Proceso reproductivo
PROK2	Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
RGS2	Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis



SKI	Desarrollo embrionario
SLC2A14	Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
SLC30A1	Desarrollo embrionario
SP100	Reproducción, Proceso reproductivo
SP3	Desarrollo embrionario Desarrollo placentario Reproducción Proceso reproductivo
SPHK1	Reproducción, Proceso reproductivo
TAP1	Reproducción, Proceso reproductivo
TFEB	Desarrollo embrionario, Desarrollo placentario
THBD	Desarrollo embrionario, Reproducción, Proceso reproductivo
UBR2	Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
VASP	Desarrollo embrionario
ZFP41	Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
ZMIZ1	Desarrollo embrionario, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo

Tabla 11-R: Genes exclusivos en el grupo E de las IAHS, previamente descritos en algún proceso biológico relacionado con la reproducción.

Nombre	Procesos biológicos
ADAM28	Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
APAF1	Desarrollo embrionario
APBA3	Desarrollo embrionario
APC	Reproducción, Proceso reproductivo
APOBEC3G	Reproducción, Proceso reproductivo
B4GALNT1	Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
BCL10	Desarrollo embrionario
CEP290	Desarrollo embrionario
CUL3	Desarrollo embrionario
CXXC4	Desarrollo embrionario
DAZ2	Fecundación, Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
ECE1	Desarrollo embrionario



EDN2	Desarrollo de las gónadas, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo
EN1	Desarrollo embrionario
EREG	Desarrollo de las células germinales, Desarrollo de las gónadas, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo
ESR1	Desarrollo de las gónadas, Embarazo femenino, Reproducción, Proceso reproductivo
FANCA	Desarrollo de las gónadas, Reproducción, Proceso reproductivo
FOXD2	Desarrollo embrionario
FURIN	Reproducción, Proceso reproductivo
FUT10	Desarrollo embrionario, Fecundación, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo
GLRA1	Fecundación, Reacción del acrosoma, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo
GNAS	Desarrollo embrionario, Embarazo femenino, Reproducción, , Proceso reproductivo
HCFC1	Reproducción, Proceso reproductivo
HESX1	Desarrollo embrionario
HTR2B	Desarrollo embrionario
ICMT	Desarrollo embrionario
ITGA4	Desarrollo embrionario, Desarrollo placentario
MACF1	Desarrollo embrionario
MORC1	Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
NCOA3	Reproducción, Proceso reproductivo
NOTCH1	Desarrollo embrionario, Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Vesícula acrosomal, Vesícula acrosomal , Espermatogénesis
OTOP1	Desarrollo embrionario
PDPN	Desarrollo embrionario
PLXNA2	Desarrollo embrionario
POU2F1	Desarrollo embrionario
SP8	Desarrollo embrionario
SPIN3	Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo
STAT3	Reproducción, Reproducción sexual
STRA8	Desarrollo de las células germinales, Desarrollo de las gónadas, Fecundación, Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo , Espermatogénesis
TAF4	Desarrollo de las gónadas, Reproducción, Proceso reproductivo
TBX6	Desarrollo embrionario
TDRD1	Desarrollo de las células germinales, Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo , Espermatogénesis



TGFB2	Desarrollo embrionario, Reproducción, Proceso reproductivo
TMIE	Desarrollo embrionario
UCN	Embarazo femenino, Reproducción, Proceso reproductivo
USF1	Reproducción, Proceso reproductivo
USF2	Reproducción, Proceso reproductivo
UTP14C	Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
VCAM1	Desarrollo embrionario, Desarrollo placentario
WT1	Desarrollo de las células germinales, Desarrollo de las gónadas, Desarrollo de los genitales, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo
WWP2	Reproducción, Proceso reproductivo
ZSCAN2	Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis

Tabla 12-R: Genes diferencialmente expresados en el grupo NE de las IAHS, previamente descritos en algún proceso biológico relacionado con la reproducción.

Nombre	Procesos biológicos relacionados con la reproducción
ALDH1A3	Desarrollo embrionario
ALOX15B	Reproducción, Proceso reproductivo
CDO1	Reproducción, Proceso reproductivo
CFC1	Desarrollo embrionario
CHEK1	Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo
CYLC2	Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
GPX3	Reproducción, Proceso reproductivo
HOXB6	Desarrollo embrionario
SHROOM3	Desarrollo embrionario

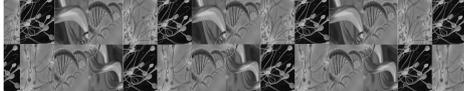
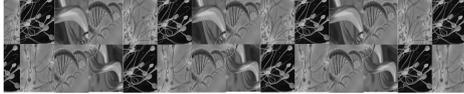
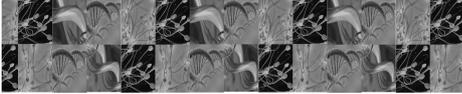


Tabla 13-R: Genes exclusivos en el grupo NE de las IAHs, previamente descritos en algún proceso biológico relacionado con la reproducción.

Nombre	Procesos biológicos relacionados con la reproducción
ACE2	Reproducción, Proceso reproductivo
ADAMTS1	Desarrollo de las gónadas, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo
ADCYAP1	Embarazo femenino, Reproducción, Proceso reproductivo
AXIN2	Desarrollo embrionario
BCL2L1	Desarrollo de las células germinales, Desarrollo de las gónadas, Desarrollo embrionario, Fecundación, Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
BCL2L10	Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
BMP5	Desarrollo de los genitales, Reproducción, Proceso reproductivo
BMP7	Desarrollo embrionario, Reproducción, Proceso reproductivo
C15orf2	Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
CALCR	Vesícula acrosomal, Vesícula acrosomal
CDX2	Desarrollo embrionario, Desarrollo placentario
CEP57	Desarrollo de las células germinales, Desarrollo de las espermátidas, Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
COL1A1	Desarrollo embrionario
CSF1	Reproducción, Proceso reproductivo
DCN	Desarrollo placentario
DLC1	Desarrollo embrionario
DLX5	Desarrollo embrionario
FBN2	Desarrollo embrionario
FGF2	Desarrollo embrionario
FOXL2	Desarrollo de las gónadas, Desarrollo embrionario, Reproducción, Proceso reproductivo
FZD6	Desarrollo embrionario
GDNF	Desarrollo embrionario
GJA1	Desarrollo embrionario
HOXA3	Desarrollo embrionario
IFNB1	Reproducción, , Proceso reproductivo



KIT	Desarrollo de las células germinales, Desarrollo de las espermátidas, Desarrollo de las gónadas, Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Vesícula acrosomal, Vesícula acrosomal, Espermatogénesis
KLF1	Desarrollo embrionario
LAMA1	Desarrollo embrionario
LAMA3	Desarrollo embrionario
LEP	Desarrollo de las gónadas, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo
LNPEP	Embarazo femenino, Reproducción, Proceso reproductivo
LRP5	Desarrollo embrionario
NDST1	Desarrollo embrionario
NRG2	Desarrollo embrionario
OR2H2	Apareamiento, Reproducción, Proceso reproductivo
OSR2	Desarrollo embrionario
PAQR7	Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo
PLAC1	Desarrollo placentario
POU2F3	Reproducción, Proceso reproductivo
POU4F3	Desarrollo embrionario
PRDX3	Desarrollo placentario
PRLR	Embarazo femenino, Reproducción, Proceso reproductivo, Implantación embrionaria
PRMT7	Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo
PSG1	Embarazo femenino, Reproducción, Proceso reproductivo
PSG11	Embarazo femenino, Reproducción, Proceso reproductivo
PSG2	Embarazo femenino, Reproducción, Proceso reproductivo
PTCH1	Desarrollo embrionario
SATB2	Desarrollo embrionario
SEMA3C	Desarrollo embrionario
SIX4	Desarrollo embrionario
SLC34A2	Desarrollo embrionario
SLIT2	Desarrollo de las gónadas, Desarrollo embrionario, Reproducción, Proceso reproductivo
SMAD6	Desarrollo embrionario
SYT6	Fecundación, Reacción del acrosoma, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo
TBX5	Desarrollo embrionario
TCF7L1	Desarrollo embrionario
USP22	Desarrollo embrionario



WDR33	Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
WNT2B	Desarrollo de las gónadas, Desarrollo embrionario, Reproducción, Proceso reproductivo

3.3. Análisis ontológico.

El análisis ontológico se hizo conforme se explica en la sección de material y métodos.

Una vez realizado el análisis bioinformático conjunto de los listados de los GDE tanto en el grupo E como NE en el caso de las IAHS, nos muestra un total de 263, 29, 45 y 21 procesos biológicos, componentes celulares, funciones moleculares y rutas metabólicas estadísticamente afectadas **Tablas 14-R, 15-R, 16-R y 17-R** respectivamente (**MA**). En las **figuras 2-R, 3-R y 4-R** mostramos los 10 términos ontológicos con un p-valor más significativo, exponiendo a su vez qué porcentaje representan el número de GDE de nuestros listados descritos en cada término ontológico respecto al número total de genes descritos para dicho término ontológico en la especie *Homo sapiens*.

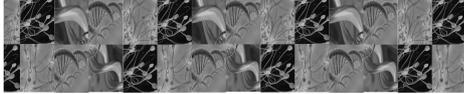


Figura 2-R: Los 10 procesos biológicos con un p-valor más significativo tras el análisis conjunto de los listados de GDE en el grupo de las IAHs. Entre paréntesis está indicado el número de GDE de nuestros listados descritos en el término ontológico y la barra verde representa el porcentaje de estos respecto al total de genes descritos para dicho proceso biológico en *Homo sapiens*.

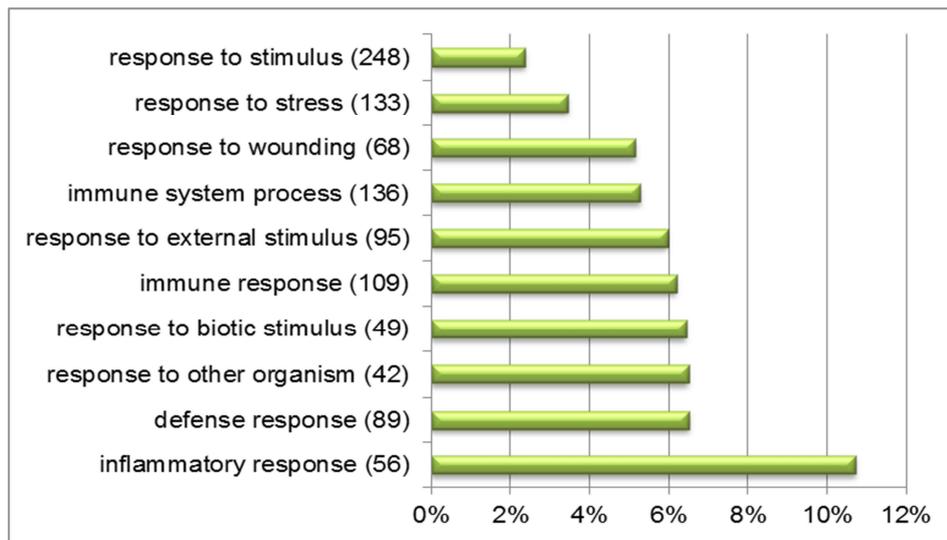




Figura 3-R: Los 10 componentes celulares con un p-valor más significativo tras el análisis conjunto de los listados de GDE en el grupo de las IAHS. Entre paréntesis está indicado el número de GDE de nuestros listados descritos en el término ontológico y la barra verde representa el porcentaje de estos respecto al total de genes descritos para dicho componente celular en *Homo sapiens*.

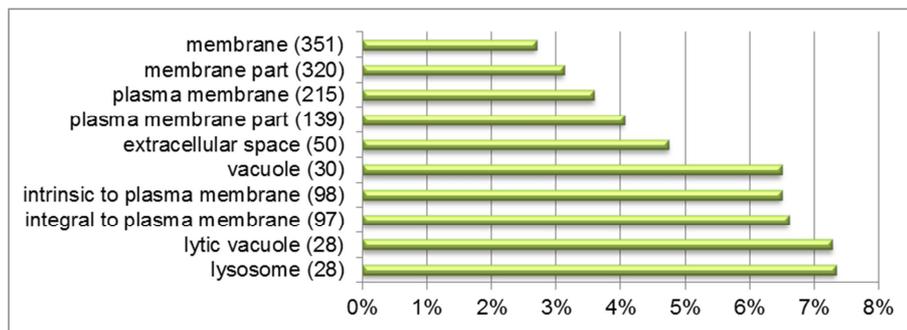
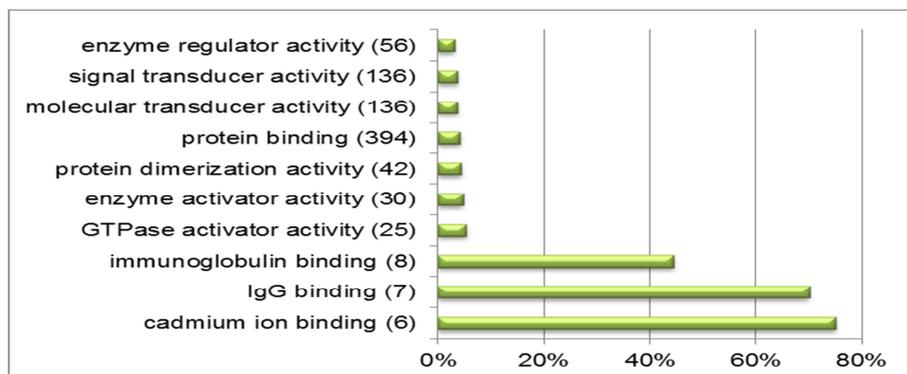


Figura 4-R: Las 10 funciones moleculares con un p-valor más significativo tras el análisis conjunto de los listados de GDE en el grupo de las IAHS. Entre paréntesis está indicado el número de GDE de nuestros listados descritos en el término ontológico y la barra verde representa el porcentaje de estos respecto al total de genes descritos para dicha función molecular en *Homo sapiens*.





También se realizó el análisis de los listados de genes exclusivos tanto del grupo E como el NE, por separado y una vez realizado el análisis de estos, nos muestra un total de 137, 12, 29 y 4 procesos biológicos, componentes celulares, funciones moleculares y rutas metabólicas estadísticamente afectadas en el grupo E, **Tablas 18-R, 19-R, 20-R y 21-R** respectivamente (**MA**) y 46, 22, 22 y 7 procesos biológicos, componentes celulares, funciones moleculares y rutas metabólicas estadísticamente afectadas en el grupo NE, **Tablas 22-R, 23-R, 24-R y 25-R** respectivamente (**MA**). En las **figuras 5-R, 6-R, 7-R, 8-R, 9-R y 10-R** mostramos los 10* términos ontológicos con un p-valor más significativo, tanto para el grupo E como NE, exponiendo a su vez qué porcentaje representan el número de GE de nuestros listados descritos en cada término ontológico respecto al número total genes descritos para dicho término ontológico en la especie *Homo sapiens*. **En el caso de los componentes celulares estadísticamente afectados tras el análisis de los GE del grupo E en la figura hemos incluido la totalidad de estos.*

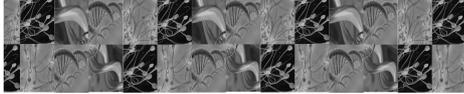


Figura 5-R: Los 10 procesos biológicos con un p-valor más significativo tras el análisis del listado GE en el grupo E de las IAHs. Entre paréntesis está indicado el número de GE de nuestro listado descritos en el término ontológico y la barra verde representa el porcentaje de estos respecto al total de genes descritos para dicho proceso biológico en *Homo sapiens*.

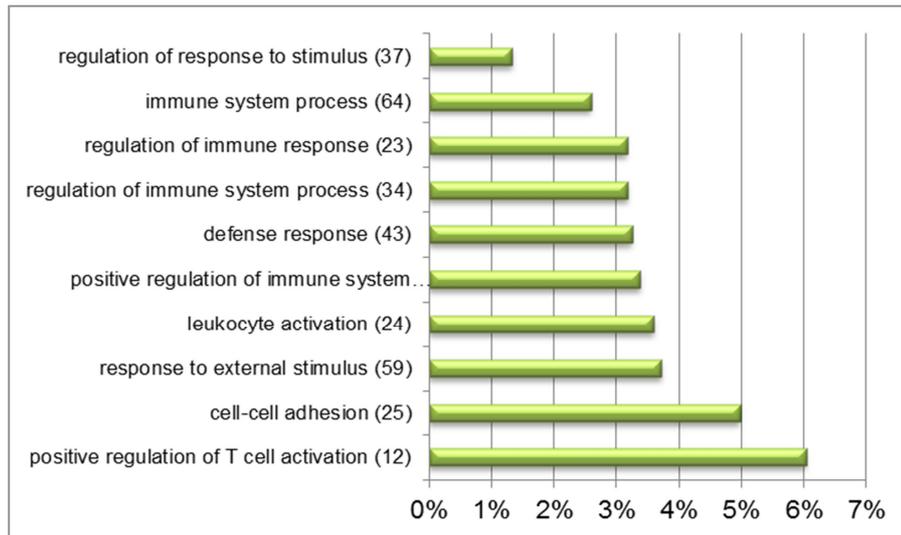
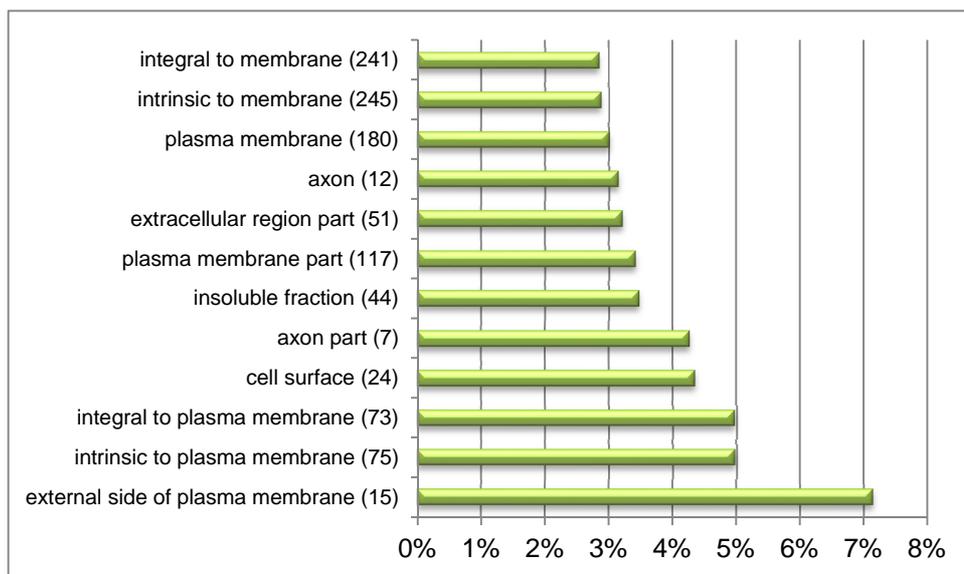




Figura 6-R: Los componentes celulares estadísticamente afectados tras el análisis del listado de GE en el grupo E de las IAHs. Entre paréntesis está indicado el número de GE de nuestros listados descritos en el término ontológico y la barra verde representa el porcentaje de estos respecto al total de genes descritos para dicho componente celular en *Homo sapiens*.



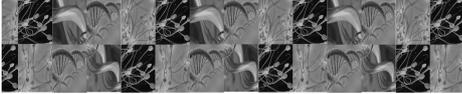
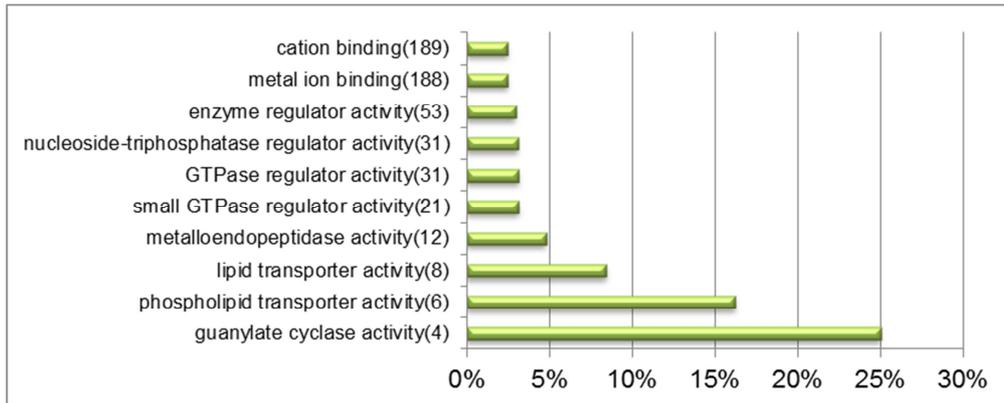


Figura 7-R: Las 10 funciones moleculares con un p-valor más significativo tras el análisis del listado del grupo GE en el grupo E de las IAHS. Entre paréntesis está indicado el número de GE de nuestros listados descritos en el término ontológico y la barra verde representa el porcentaje de estos respecto al total de genes descritos para dicha función molecular en *Homo sapiens*.



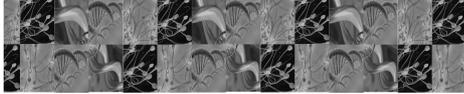
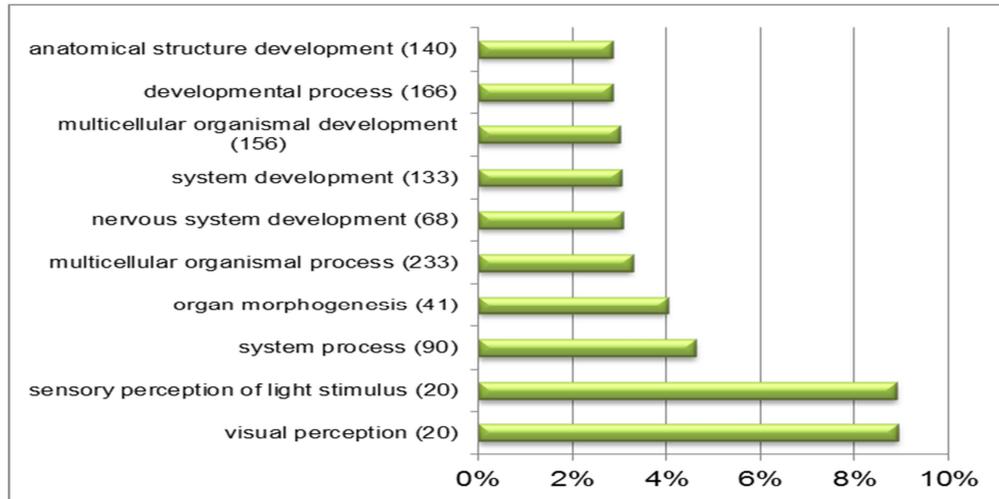


Figura 8-R: Los 10 procesos biológicos con un p-valor más significativo tras el análisis del listado GE en el grupo NE de las IAHs. Entre paréntesis está indicado el número de GE de nuestro listado descritos en el término ontológico y la barra verde representa el porcentaje de estos respecto al total de genes descritos para dicho proceso biológico en *Homo sapiens*.



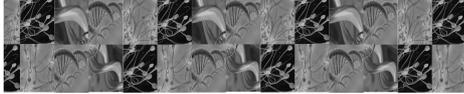
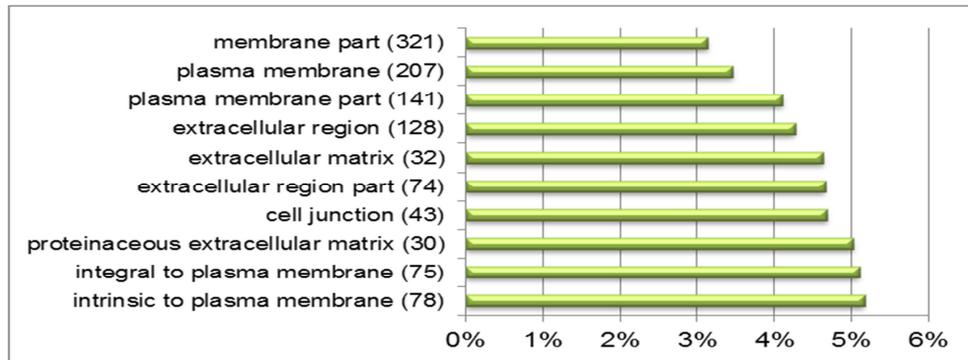


Figura 9-R: Los 10 componentes celulares con un p-valor más significativo tras el análisis del listado de GE en el grupo E de las IAHs. Entre paréntesis está indicado el número de GE de nuestros listados descritos en el término ontológico y la barra verde representa el porcentaje de estos respecto al total de genes descritos para dicho componente celular en *Homo sapiens*.



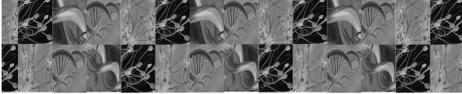
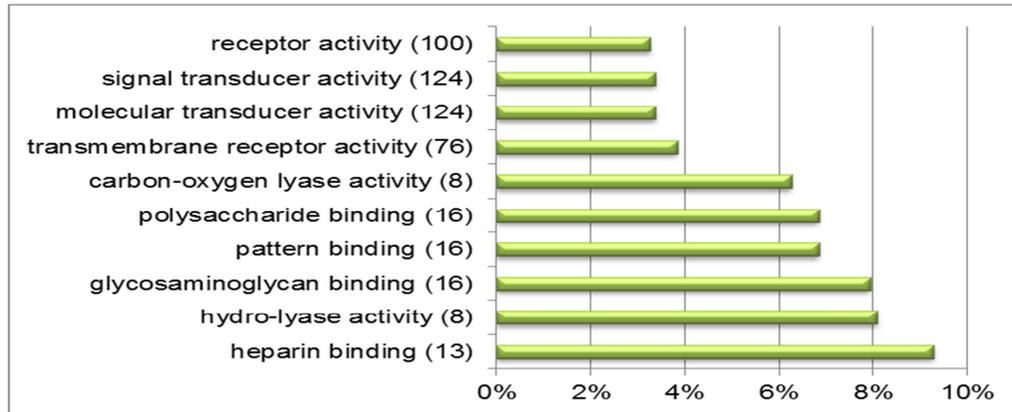
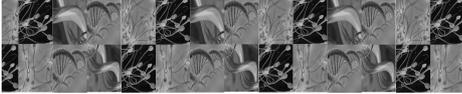


Figura 10-R: Las 10 funciones moleculares con un p-valor más significativo tras el análisis del listado del grupo GE en el grupo E de las IAHS. Entre paréntesis está indicado el número de GE de nuestros listados descritos en el término ontológico y la barra verde representa el porcentaje de estos respecto al total de genes descritos para dicha función molecular en *Homo sapiens*.



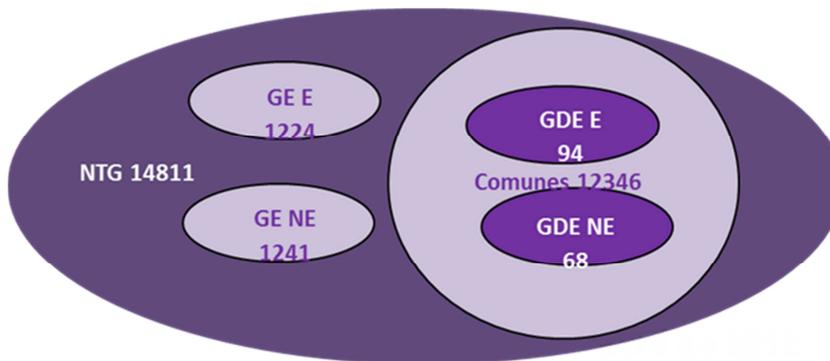


4. Microarrays muestras de semen de FIV.

4.1. Listado de GDE y EG.

El número total de genes que daban señal en el microarray de FIV era de 14811 genes. De ellos, 12346 (**Figura 11-R**), se expresaban en ambos grupos, tanto en el E como en el NE aunque una vez analizados los datos sólo 162 de ellos presentaban una expresión diferencial entre los 2 grupos.

Figura 11-R: NTG, número total de genes expresados; GE, genes exclusivos; GDE, genes diferencialmente expresados.



Una vez analizados los datos de los microarrays se detectaron un total de 94 GDE en el grupo que lograba el embarazo (grupo E) y 68 presentaban una expresión diferencial en el grupo que no lo lograba (**Tabla 26-R y Tabla 27-R (MA)**). La **tablas 26.1-R y 27.1-R** muestran sólo los 10 genes diferencialmente expresados con una mayor tasa de cambio tanto en el grupo E como el NE respectivamente.



Tabla 26.1-R: Los 10 genes diferencialmente expresados con una mayor tasa de cambio en el grupo que logra un embarazo (grupo E) tras una FIV. En la columna 1 se indica en nombre del gen, en la columna 2 el número de acceso de GenBank, en la columna 3 la tasa de cambio y en la columna 4 el p-valor.

Nombre	Número de acceso GenBank	Tasa de cambio	p-valor
C10orf119	NM_024834	34,27	0,0060
SPP1	NM_001040058	32,72	0,0100
TGFBI	NM_000358	17,44	0,0050
CD163	NM_004244	15,24	0,0033
ADM	NM_001124	14,34	0,0025
RGS2	NM_002923	13,98	0,0020
MMP9	NM_004994	13,66	0,0050
CTSL	NM_001912	13,56	0,0043
MT1M	NM_176870	12,91	0,0038
IFI30	NM_006332	12,82	0,0030



Tabla 27.1-R: Los 10 genes diferencialmente expresados con una mayor tasa de cambio en el grupo que no logra un embarazo (grupo NE) tras una FIV. En la columna 1 se indica en nombre del gen, en la columna 2 el número de acceso de GenBank, en la columna 3 la tasa de cambio y en la columna 4 el p-valor.

Nombre	Número de acceso GenBank	Tasa de cambio	p-valor
PLA2G2A	NM_000300	42,31	0,0194
SH3RF2	NM_152550	8,05	0,0000
LLEP1	NM_001010857	7,67	0,0050
HSPA1L	NM_005527	5,76	0,0125
DUSP21	NM_022076	5,50	0,0100
TSPAN16	NM_012466	5,42	0,0100
C10orf62	NM_001009997	5,40	0,0078
SMAD9	NM_005905	5,33	0,0363
SPATA20	NM_022827	5,15	0,0088
C16orf78	NM_144602	5,14	0,0117

Cuando lo que se analizó eran los genes que sólo se expresaban en uno de los grupos se detectaron 1224 (Tabla 28-R MA) en el grupo que embarazaba y 1241 en el que no lo conseguía (Tabla 29-R MA). El valor de corte se estableció en 5,856 unidades de fluorescencia.

La tablas 28.1-R y 29.1-R muestran sólo los 10 genes diferencialmente expresados que muestran un mayor valor de fluorescencia, tanto en el grupo E como el NE respectivamente.



Tabla 28.1-R: Los 10 genes exclusivos expresados en el grupo que logra un embarazo (grupo E) tras una FIV con un mayor valor de intensidad de fluorescencia. En la columna 1 se indica en nombre del gen, en la columna 2 el número de acceso de GenBank y en la columna 3 el valor de fluorescencia.

Nombre	Número de acceso de <i>GenBank</i>	Valor de fluorescencia
MMP12	NM_002426	9,276
C10orf119	NM_024834	9,252
CLEC4E	NM_014358	8,602
ADAMDEC1	NM_014479	8,526
PTPN12	NM_002835	8,248
PLEK	NM_002664	8,018
CXCR7	NM_001047841	7,870
MAP3K8	NM_005204	7,805
LYZ	NM_000239	7,788
INDO	NM_002164	7,734



Tabla 29.1-R: Los 10 genes exclusivos expresados en el grupo que no logra un embarazo (grupo NE) tras una FIV con un mayor valor de intensidad de fluorescencia. En la columna 1 se indica en nombre del gen, en la columna 2 el número de acceso de GenBank y en la columna 3 el valor de fluorescencia.

Nombre	Número de acceso de GenBank	Valor de fluorescencia
C10orf64	BC034937	8,369
MSH4	NM_002440	7,969
DCC	NM_005215	7,106
MYH7	NM_000257	7,031
INPP5F	NM_014937	7,008
C4orf6	NM_005750	6,952
ENST00000359466	ENST00000359466	6,926
TGM4	NM_003241	6,920
WDR87	ENST00000303868	6,909
HSFX1	NM_016153	6,772

4.2. Genes descritos en procesos biológicos relacionados con el proceso reproductivo.

Una vez se obtuvieron los listados de GDE y GE de ambos grupos, los comparamos con la matriz de genes descritos en procesos biológicos relacionados con la reproducción según el *Gene Ontology* de todos los genes de nuestro listado (Ver apartado 2.4.3 de Material y Métodos).

13 GDE (Tabla 30-R), 72 EG del grupo E (Tabla 31-R) y 9 GDE (Tabla 32-R) y 87 del GE NE (Tabla 33-R), estaban descritos en algunos de esos procesos.



Tabla 30-R: Genes diferencialmente expresados en el grupo E de las FIVs, previamente descritos en algún proceso biológico relacionado con la reproducción.

Nombre	Procesos biológicos relacionados con la reproducción
ADM	Desarrollo embrionario, Desarrollo placentario, Reproducción, Proceso reproductivo
CCL2	Reproducción, Proceso reproductivo
CCL3	Reproducción, Proceso reproductivo
CD44	Reproducción, Proceso reproductivo
CEBPB	Desarrollo embrionario, Desarrollo placentario
CXCR4	Reproducción, Proceso reproductivo
FOS	Reproducción, Proceso reproductivo
GRN	Desarrollo embrionario, Reproducción, Proceso reproductivo, Implantación embrionaria
HEXB	Apareamiento, Fecundación, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Vesícula acrosomal, Penetración de la zona pelúcida
IL1B	Desarrollo embrionario, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Implantación embrionaria
MAFB	Desarrollo embrionario
RGS2	Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
SPP1	Desarrollo placentario, Reproducción, Proceso reproductivo, Implantación embrionaria

Tabla 31-R: Genes exclusivos en el grupo E de las FIVs, previamente descritos en algún proceso biológico relacionado con la reproducción.

Nombre	Procesos biológicos relacionados con la reproducción
ACVR1	Desarrollo de las células germinales, Desarrollo embrionario, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo
ADAM10	Desarrollo embrionario
ADAM28	Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
ALDH1A2	Desarrollo embrionario
AMOT	Desarrollo embrionario
APOBEC3G	Reproducción, Proceso reproductivo



ARNT	Desarrollo embrionario, Desarrollo placentario
BIRC3	Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
BMP4	Desarrollo de las células germinales, Desarrollo de las gónadas, Desarrollo embrionario, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo
BMPR1A	Desarrollo embrionario, Reproducción, Proceso reproductivo
C5	Desarrollo embrionario
CD28	Reproducción, Proceso reproductivo
CDYL	Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
CHST11	Desarrollo embrionario
CRH	Embarazo femenino, Reproducción, Proceso reproductivo
CRTAP	Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
CYP27B1	Desarrollo placentario, Embarazo femenino, Reproducción, Proceso reproductivo
DLL1	Desarrollo embrionario
DMRTA1	Reproducción, Proceso reproductivo
EIF2AK3	Reproducción, Proceso reproductivo
EPOR	Desarrollo embrionario, Desarrollo placentario, Embarazo femenino, Reproducción, Proceso reproductivo
ESX1	Desarrollo embrionario, Desarrollo placentario
FGF4	Desarrollo embrionario
FO XK1	Desarrollo embrionario
HHEX	Desarrollo embrionario
HOXB4	Desarrollo embrionario
HOXD1	Desarrollo embrionario
HTR2B	Desarrollo embrionario
IFT52	Desarrollo embrionario
IGFBP7	Embarazo femenino, Reproducción, Proceso reproductivo, Implantación embrionaria
LNPEP	Embarazo femenino, Reproducción, Proceso reproductivo
LY6E	Desarrollo embrionario
MAFF	Desarrollo embrionario, Reproducción, Proceso reproductivo
MAP3K1	Reproducción, Proceso reproductivo
MEN1	Desarrollo embrionario, Embarazo femenino, Reproducción, Proceso reproductivo
MKL2	Desarrollo embrionario
NDST1	Desarrollo embrionario
NLRP14	Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis



NPY5R	Reproducción, Proceso reproductivo
OCA2	Desarrollo de las células germinales, Desarrollo de las espermátidas, Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
OXTR	Apareamiento, Cópula, Embarazo femenino, Reproducción, Proceso reproductivo, Inseminación, Eyaculación
PAQR8	Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo
PAX1	Desarrollo embrionario
PBX2	Desarrollo embrionario
PDPN	Desarrollo embrionario
PIK3CB	Desarrollo embrionario
PLA2G4C	Reproducción, Proceso reproductivo
PRPF19	Desarrollo embrionario
RAB23	Desarrollo embrionario
RBM19	Desarrollo embrionario
RLN1	Embarazo femenino, Reproducción, Proceso reproductivo
SFRP1	Desarrollo embrionario, Reproducción, Proceso reproductivo
SGPL1	Desarrollo de las gónadas, Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
SH2B3	Desarrollo embrionario
SKI	Desarrollo embrionario
SMARCA5	Desarrollo embrionario
SOHLH1	Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
SPIN1	Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo
SRD5A1	Reproducción, Proceso reproductivo
SYT6	Fecundación, Reacción del acrosoma, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo
TCF7L2	Desarrollo de los genitales, Desarrollo embrionario, Reproducción, Proceso reproductivo
TDGF1	Desarrollo embrionario
TGFB1	Desarrollo embrionario, Embarazo femenino, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo
THOC2	Reproducción, Proceso reproductivo
TOP2A	Reproducción, Proceso reproductivo
TSC1	Desarrollo embrionario
TSHZ3	Desarrollo embrionario
TSNAX	Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
TXNRD3	Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis



USP22	Desarrollo embrionario
XDH	Reproducción, Proceso reproductivo
ZP2	Fecundación, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Unión del espermatozoide a la zona pelúcida

Tabla 32-R: Genes diferencialmente expresados en el grupo NE de las FIVs, previamente descritos en algún proceso biológico relacionado con la reproducción.

Nombre	Procesos biológicos relacionados con la reproducción
CFC1	Desarrollo embrionario
DNAH9	Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
OAZ3	Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
ODF1	Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
SMAD9	Reproducción, Proceso reproductivo
SPANXA1	Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
SPATA20	Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
SPATA3	Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
TNP2	Fecundación, Generación de gametos masculinos, Reacción del acrosoma, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Unión del espermatozoide a la zona pelúcida, Movilidad espermática, Espermatogénesis, Penetración de la zona pelúcida



Tabla 33-R: Genes exclusivos en el grupo NE de las FIVs, previamente descritos en algún proceso biológico relacionado con la reproducción.

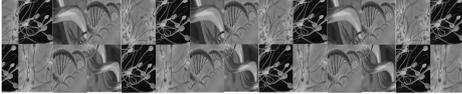
Nombre	Procesos biológicos relacionados con la reproducción
AMH	Desarrollo de las gónadas, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo
APBA1	Desarrollo embrionario
AXIN1	Desarrollo embrionario
B4GALNT1	Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
BCL10	Desarrollo embrionario
CALCA	Embarazo femenino, Reproducción, Proceso reproductivo, Implantación embrionaria
CAPN11	Vesícula acrosomal, Vesícula acrosomal
CCL5	Reproducción, Proceso reproductivo
CDY2A	Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
CELSR1	Desarrollo embrionario
CLIC5	Desarrollo embrionario, Embarazo femenino, Reproducción, Proceso reproductivo
COL1A1	Desarrollo embrionario
CREB1	Reproducción, Proceso reproductivo
DKK1	Desarrollo embrionario
DLK1	Desarrollo embrionario
DLX5	Desarrollo embrionario
DMC1	Desarrollo de las células germinales, Desarrollo de las espermátidas, Desarrollo de las gónadas, Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
DNMT3L	Desarrollo embrionario, Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
ECE1	Desarrollo embrionario
EDA2R	Desarrollo embrionario
EDNRA	Desarrollo embrionario
ELF3	Desarrollo embrionario
ESR2	Desarrollo de las gónadas, Reproducción, Proceso reproductivo
FBN2	Desarrollo embrionario
FOXA2	Desarrollo embrionario
FOXF1	Desarrollo embrionario



FOX11	Desarrollo embrionario
FOXL2	Desarrollo de las gónadas, Desarrollo embrionario, Reproducción, Proceso reproductivo
FOXP3	Desarrollo embrionario
FSHR	Desarrollo de las gónadas, Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
GAL3ST1	Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
GLI3	Desarrollo embrionario
HAND1	Desarrollo embrionario, Desarrollo placentario
HOXA10	Desarrollo embrionario, Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
HOXB7	Desarrollo embrionario
HOXC6	Desarrollo embrionario
HSD11B2	Embarazo femenino, Reproducción, Proceso reproductivo
ITGA1	Vesícula acrosomal, Vesícula acrosomal
KDR	Desarrollo de las gónadas, Reproducción, Proceso reproductivo
KLF1	Desarrollo embrionario
LAMA2	Desarrollo embrionario
LIF	Desarrollo embrionario, Desarrollo placentario, Embarazo femenino, Reproducción, Proceso reproductivo, Implantación embrionaria
LRP6	Desarrollo embrionario
MFGE8	Fecundación, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo
MLL2	Desarrollo de las células germinales, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo
MSH4	Desarrollo de las gónadas, Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
NOG	Desarrollo embrionario, Reproducción, Proceso reproductivo
NR6A1	Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
ODF3	Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
OSR1	Desarrollo de las gónadas, Desarrollo embrionario, Reproducción, Proceso reproductivo
PCSK1	Desarrollo embrionario
PCYT1B	Desarrollo de las gónadas, Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
PDGFRA	Desarrollo de las gónadas, Desarrollo de los genitales, Desarrollo embrionario, Reproducción, Proceso reproductivo
PGAP1	Desarrollo embrionario
PIWIL1	Desarrollo de las células germinales, Desarrollo de las espermátidas Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
POU2F3	Reproducción, Proceso reproductivo



PSG11	Embarazo femenino, Reproducción, Proceso reproductivo
PSG4	Embarazo femenino, Reproducción, Proceso reproductivo
PSG7	Embarazo femenino, Reproducción, Proceso reproductivo
PTCH1	Desarrollo embrionario
PTGDR	Reproducción, Proceso reproductivo
RARG	Desarrollo embrionario, Reproducción, Proceso reproductivo
REN	Desarrollo de las gónadas, Reproducción, Proceso reproductivo
SEMA3C	Desarrollo embrionario
SERPINB5	Reproducción, Proceso reproductivo
SHH	Apareamiento, Cópula, Desarrollo de los genitales, Desarrollo embrionario, Reproducción, Proceso reproductivo
SOX10	Desarrollo embrionario
SOX15	Desarrollo de las gónadas, Reproducción, Proceso reproductivo
SOX2	Desarrollo de los genitales, Desarrollo embrionario, Reproducción, Proceso reproductivo
SPATA2	Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
SPINT1	Desarrollo embrionario, Desarrollo placentario
STRA8	Desarrollo de las células germinales, Desarrollo de las gónadas, Fecundación, Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
SUFU	Desarrollo embrionario
TAC3	Embarazo femenino, Reproducción, Proceso reproductivo
TBX6	Desarrollo embrionario
TFAP2C	Desarrollo de las gónadas, Reproducción, Proceso reproductivo
TGFB11	Desarrollo embrionario
THOC6	Reproducción, Proceso reproductivo
TIMP4	Reproducción, Proceso reproductivo
TUBD1	Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
TULP3	Desarrollo embrionario
UCN	Embarazo femenino, Reproducción, Proceso reproductivo
VEGFC	Desarrollo embrionario
WNT2	Desarrollo embrionario, Desarrollo placentario
WNT3A	Desarrollo embrionario
XAB2	Desarrollo embrionario
ZFP41	Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis

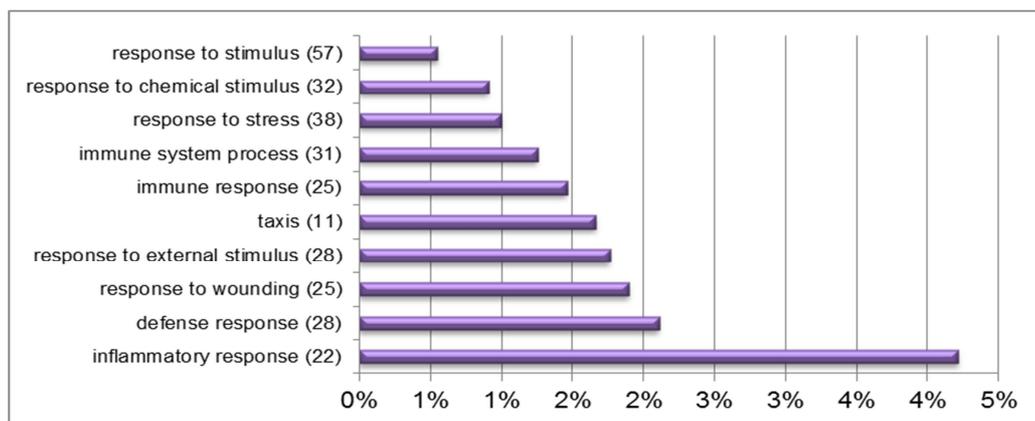


4.3. Análisis ontológico.

El análisis ontológico se hizo conforme se explica en la sección de material y métodos.

Una vez realizado el análisis bioinformático conjunto de los listados de los GDE tanto en el grupo E como NE en el caso de las FIVs, nos muestra un total de 168, 19, 17 y 16 procesos biológicos, componentes celulares, funciones moleculares y rutas metabólicas estadísticamente afectadas (**Tablas 34-R, 35-R, 36-R y 37-R** respectivamente (**MA**)). En las **figuras 12-R, 13-R y 14-R** mostramos los 10 términos ontológicos con un p-valor más significativo, exponiendo a su vez qué porcentaje representan el número de GDE de nuestros listados descritos en cada término ontológico respecto al número total de genes descritos para dicho término ontológico en la especie *Homo sapiens*.

Figura 12-R: Los 10 procesos biológicos con un p-valor más significativo tras el análisis conjunto de los listados de GDE en el grupo de las FIVs. Entre paréntesis está indicado el número de GDE de nuestros listados descritos en el término ontológico y la barra morada representa el porcentaje de estos respecto al total de genes descritos para dicho proceso biológico en *Homo sapiens*.



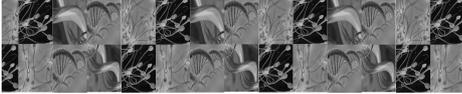


Figura 13-R: Los 10 componentes celulares con un p-valor más significativo tras el análisis conjunto de los listados de GDE en el grupo de las FIVs. Entre paréntesis está indicado el número de GDE de nuestros listados descritos en el término ontológico y la barra morada representa el porcentaje de estos respecto al total de genes descritos para dicho componente celular en *Homo sapiens*.

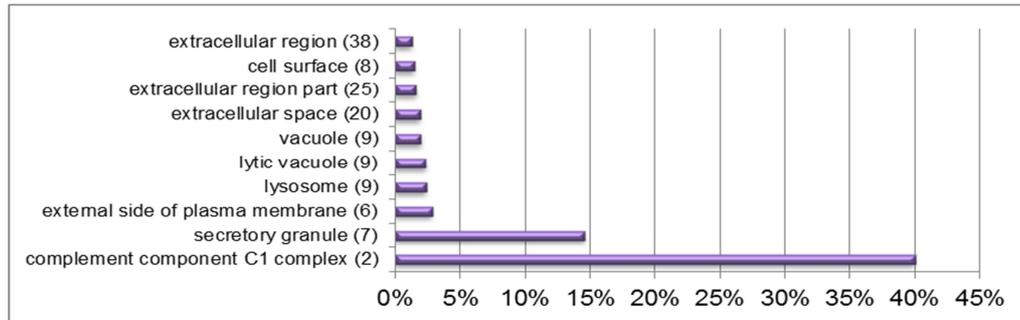
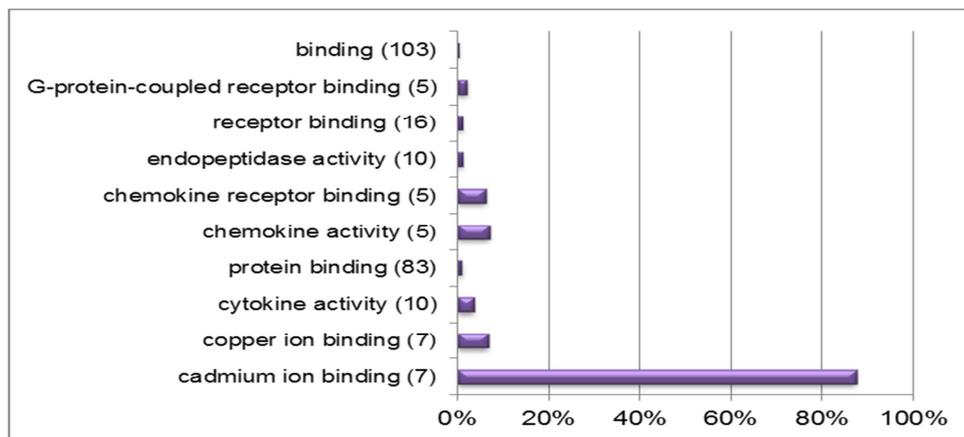


Figura 14-R: Las 10 funciones moleculares con un p-valor más significativo tras el análisis conjunto de los listados de GDE en el grupo de las FIVs. Entre paréntesis está indicado el número de GDE de nuestros listados descritos en el término ontológico y la barra morada representa el porcentaje de estos respecto al total de genes descritos para dicha función molecular en *Homo sapiens*.

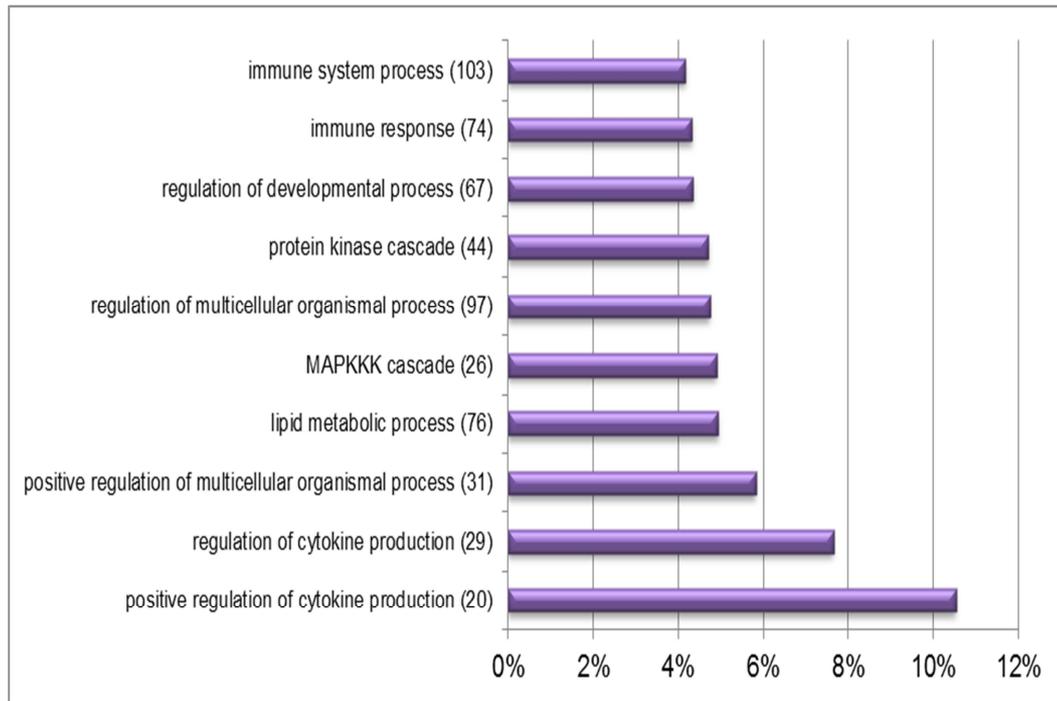




También se realizó el análisis de los listados de genes exclusivos tanto del grupo E como el NE, por separado y una vez realizado el análisis de estos, nos muestra un total de 201, 35, 16 y 9 procesos biológicos, componentes celulares, funciones moleculares y rutas metabólicas estadísticamente afectadas en el grupo E (**Tablas 38-R, 39-R, 40-R y 41-R** respectivamente **(MA)**) y 109, 31,45 y 9 procesos biológicos, componentes celulares, funciones moleculares y rutas metabólicas estadísticamente afectadas en el grupo NE (**Tablas 42-R, 43-R, 44-R y 45-R** respectivamente **(MA)**). En las **figuras 15-R, 16-R, 17-R, 18-R, 19-R y 20-R** mostramos los 10 términos ontológicos con un p-valor más significativo, tanto para el grupo E como NE, exponiendo a su vez qué porcentaje representan el número de GE de nuestros listados descritos en cada término ontológico respecto al número total genes descritos para dicho término ontológico en la especie *Homo sapiens*.



Figura 15-R: Los 10 procesos biológicos con un p-valor más significativo tras el análisis del listado GE en el grupo E de las FIVs. Entre paréntesis está indicado el número de GE de nuestro listado, descritos en el término ontológico y la barra morada representa el porcentaje de estos respecto al total de genes descritos para dicho proceso biológico en *Homo sapiens*.



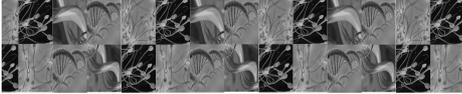
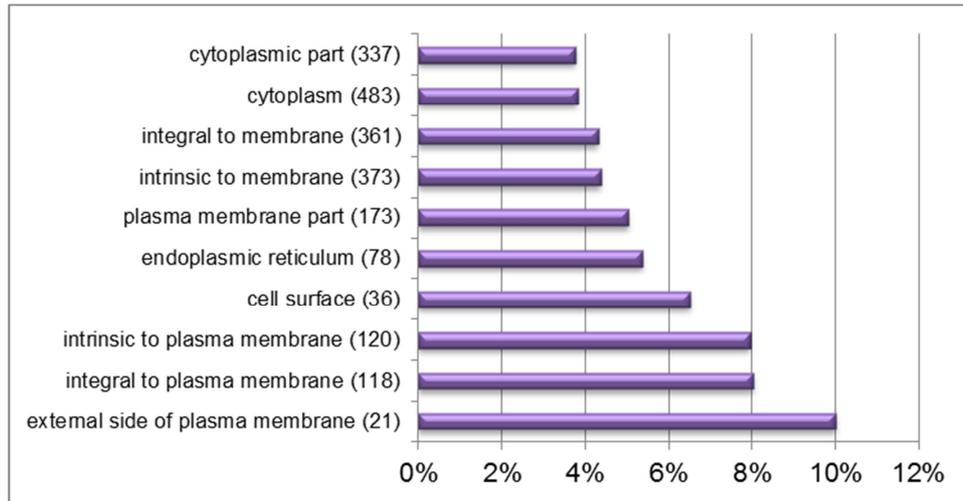


Figura 16-R: Los 10 componentes celulares con un p-valor más significativo tras el análisis del listado de GE en el grupo E de las FIVs. Entre paréntesis está indicado el número de GE de nuestros listados descritos en el término ontológico y la barra morada representa el porcentaje de estos respecto al total de genes descritos para dicho componente celular en *Homo sapiens*.



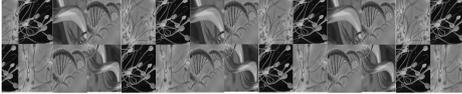
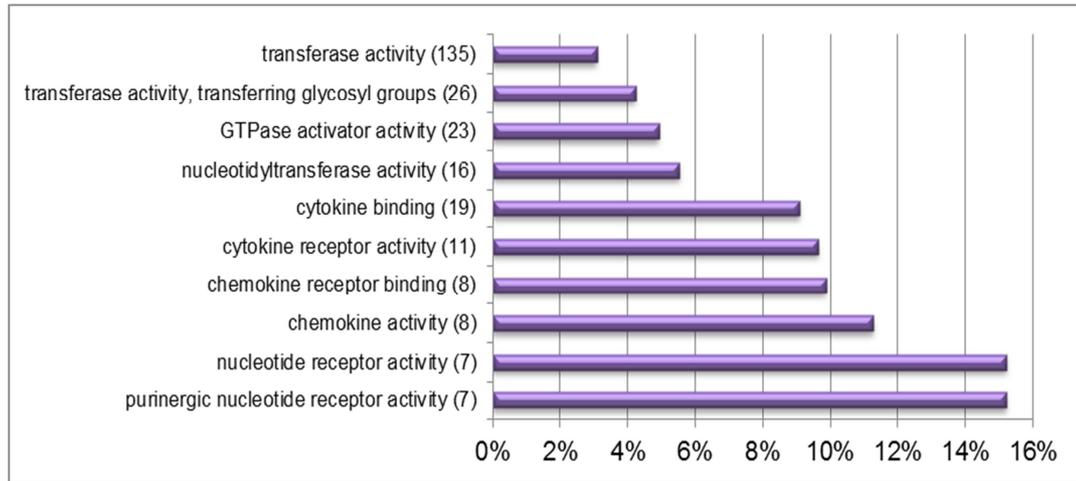


Figura 17-R: Las 10 funciones moleculares con un p-valor más significativo tras el análisis del listado del grupo GE en el grupo E de las FIVs. Entre paréntesis está indicado el número de GE de nuestros listados descritos en el término ontológico y la barra morada representa el porcentaje de estos respecto al total de genes descritos para dicha función molecular en *Homo sapiens*.



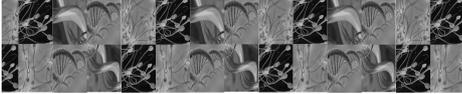
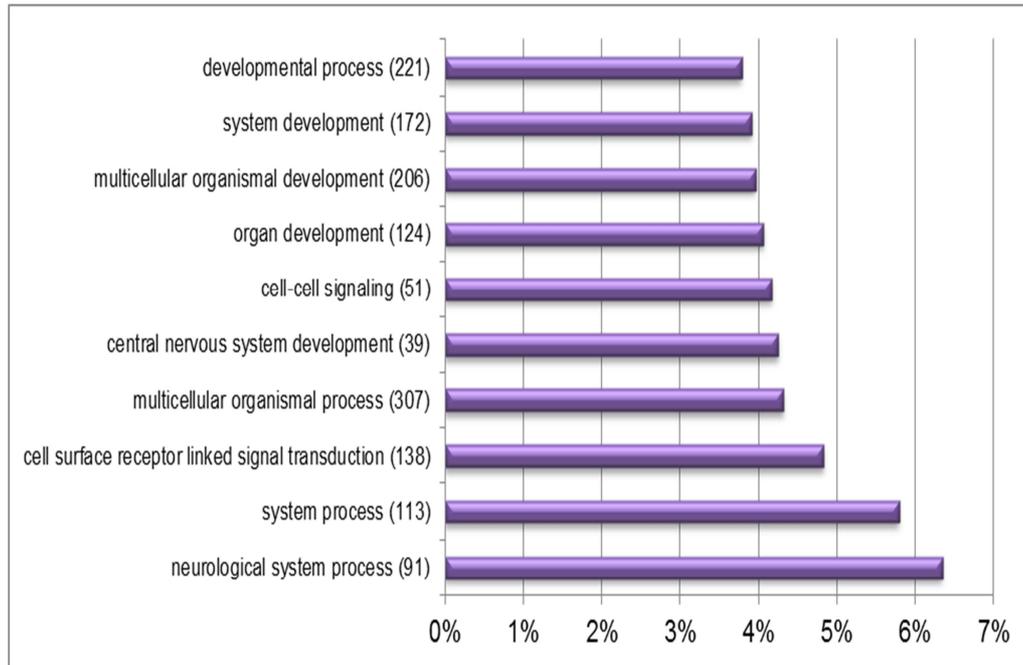


Figura 18-R: Los 10 procesos biológicos con un p-valor más significativo tras el análisis del listado GE en el grupo NE de las FIVs. Entre paréntesis está indicado el número de GE de nuestro listado, descritos en el término ontológico y la barra morada representa el porcentaje de estos respecto al total de genes descritos para dicho proceso biológico en *Homo sapiens*.



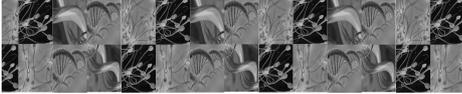
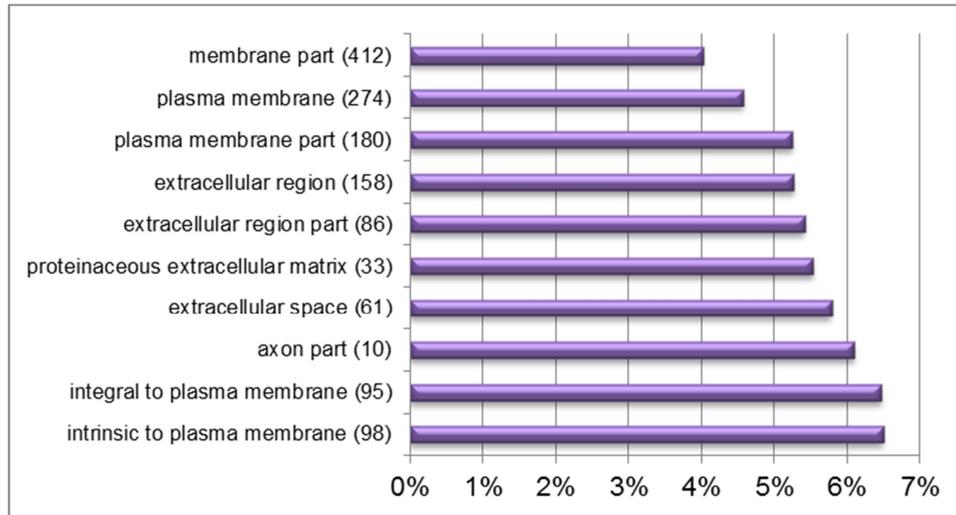


Figura 19-R: Los 10 componentes celulares con un p-valor más significativo tras el análisis del listado de GE en el grupo NE de las FIVs. Entre paréntesis está indicado el número de GE de nuestros listados descritos en el término ontológico y la barra morada representa el porcentaje de estos respecto al total de genes descritos para dicho componente celular en *Homo sapiens*.



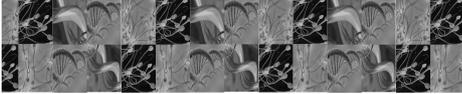
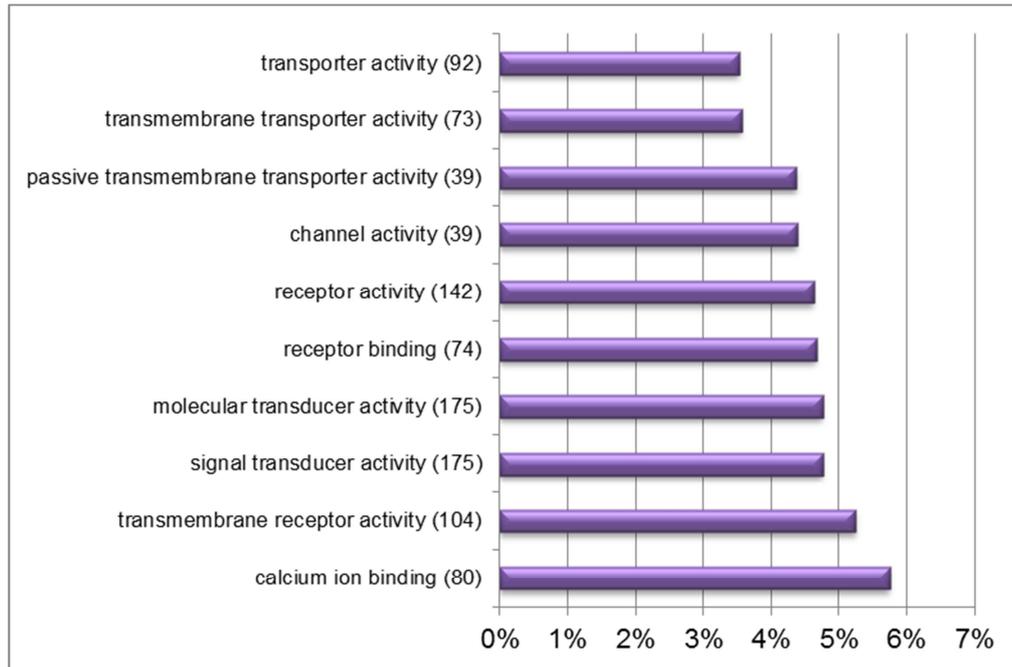


Figura 20-R: Las 10 funciones moleculares con un p-valor más significativo tras el análisis del listado del grupo GE en el grupo NE de las FIVs. Entre paréntesis está indicado el número de GE de nuestros listados descritos en el término ontológico y la barra morada representa el porcentaje de estos respecto al total de genes descritos para dicha función molecular en *Homo sapiens*.





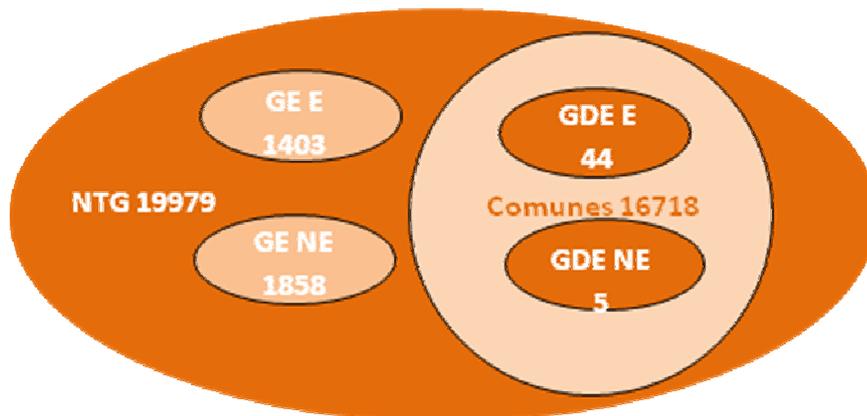
4. Microarrays muestras de semen de ICSI fresco:

4.1. Listado de GDE y EG:

El número total de genes que daban señal en el microarray de ICSI con semen fresco de era de 199279 genes. De ellos, 16718 (**Figura 21-R**), se expresaban en ambos grupos, tanto en el E como en el NE, aunque una vez analizados los datos sólo 49 de ellos presentaban una expresión diferencial entre los 2 grupos, en concreto se detectaron un total de 44 GDE en el grupo que lograba el embarazo (grupo E) y sólo 5 presentaban una expresión diferencial en el grupo que no lo lograba (**Tablas 46-R (MA)**).

La **tabla 46.1-R** muestra sólo aquellos 10 GDE con una mayor tasa de cambio del grupo E y la **tabla 47-R** los 5 GDE del grupo NE.

Figura 21-R: NTG, número total de genes expresados; GE, genes exclusivos; GDE, genes diferencialmente expresados.



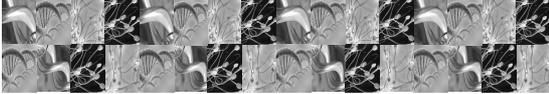


Tabla 46.1-R: Los 10 genes diferencialmente expresados con una mayor tasa de cambio en el grupo que logra un embarazo (grupo E) tras una ICSI con semen fresco. En la columna 1 se indica en nombre del gen, en la columna 2 el número de acceso de GenBank, en la columna 3 la tasa de cambio y en la columna 4 el p-valor

Nombre	Número de acceso GenBank	Tasa de cambio	p-valor
APOE	NM_000041	28,27	0,0000
APOC1	NM_001645	27,90	0,0000
CFD	NM_001928	7,74	0,0067
CTSZ	NM_001336	6,85	0,0150
HMOX1	NM_002133	6,58	0,0120
FTL	NM_000146	6,35	0,0183
TGFBI	NM_000358	6,06	0,0157
CTSL	NM_001912	5,93	0,0163
LGALS3	NM_002306	5,60	0,0170
CD63	NM_001780	5,48	0,0183

Tabla 47-R: Los 5 genes diferencialmente expresados en el grupo que no logra un embarazo (grupo NE) tras una ICSI con semen fresco. En la columna 1 se indica en nombre del gen, en la columna 2 el número de acceso de GenBank, en la columna 3 la tasa de cambio y en la columna 4 el p-valor.

Nombre	Número de acceso GenBank	Tasa de cambio	p-valor
ENST00000317633	ENST00000317633	4,09	0,0456
COX7B2	NM_130902	3,82	0,0490
C19orf36	NM_001039846	3,8	0,0464
ANKRD7	NM_001077708	3,79	0,0467
CDKN2D	NM_001800	3,70	0,0492



Cuando lo que se analizó eran los genes que sólo se expresaban en uno de los grupos se detectaron 1403 (**Tabla 48-R (MA)**) en el grupo que embarazaba y 1858 en el que no lo conseguía (**Tabla 49-R (MA)**). Como las tablas 48 y 49 son muy extensas, en las **48.1-R** y en la **49.1-R** ponemos sólo aquellos 10 genes con una mayor señal de fluorescencia en ambos grupos (grupo E y NE respectivamente). El valor de corte se estableció en 6,990 unidades de fluorescencia.

Tabla 48.1-R: Los 10 genes exclusivos expresados en el grupo que logra un embarazo (grupo E) tras una ICSI con semen fresco con un mayor valor de intensidad de fluorescencia. En la columna 1 se indica en nombre del gen, en la columna 2 el número de acceso de GenBank y en la columna 3 el valor de fluorescencia.

Nombre	Número de acceso de GenBank	Valor de fluorescencia
FSTL4	NM_015082	10,636
TNMD	NM_022144	10,430
LOC646808	XR_017339	9,793
C22orf26	NM_018280	9,756
CXorf34	NM_024917	9,446
MBOAT4	AF359269	9,378
UBQLN4	NM_020131	9,361
ALDOC	NM_005165	9,136
ANGPTL4	NM_139314	8,869
SHFM3P1	AF174606	8,741



Tabla 49.1-R: Los 10 genes exclusivos expresados en el grupo que no logra un embarazo (grupo NE) tras una ICSI con semen fresco con un mayor valor de intensidad de fluorescencia. En la columna 1 se indica en nombre del gen, en la columna 2 el número de acceso de GenBank y en la columna 3 el valor de fluorescencia.

Nombre	Número de acceso de GenBank	Valor de fluorescencia
DSG1	NM_001942	9,996
RPGR	NM_001023582	9,053
KLRC3	NM_007333	8,902
CYP3A7	NM_000765	8,794
ERN2	NM_033266	8,744
RP11-327P2.4	AK124707	8,670
GFM1	NM_024996	8,658
TMEM144	NM_018342	8,528
INSM2	NM_032594	8,528
C1orf74	NM_152485	8,474

4.2. Genes descritos en procesos biológicos relacionados con el proceso reproductivo.

Una vez se obtuvieron los listados de GDE y GE de ambos grupos, los comparamos con la matriz de genes descritos en procesos biológicos relacionados con la reproducción según el *Gene Ontology* de todos los genes de nuestro listado (Ver apartado 2.4.3 de Material y Métodos).

3 GDE (Tabla 50-R), 105 GE del grupo E (Tabla 51-R) y 1 GDE (Tabla 52-R) y 109 del GE NE (Tabla 53-R), estaban descritos en algunos de esos procesos.



Tabla 50-R: Genes diferencialmente expresados en el grupo E de las ICSIs con semen fresco, previamente descritos en algún proceso biológico relacionado con la reproducción.

Gen	Procesos biológicos relacionados con la reproducción
CXCR4	Reproducción, Proceso reproductivo
GRN	Desarrollo embrionario, Reproducción, Proceso reproductivo, Implantación embrionaria
SPP1	Desarrollo placentario, Reproducción, Proceso reproductivo, Implantación embrionaria

Tabla 51-R: Genes exclusivos en el grupo E de las ICSIs con semen fresco, previamente descritos en algún proceso biológico relacionado con la reproducción.

Nombre	Procesos biológicos relacionados con la reproducción
AATF	Desarrollo embrionario
ACOX1	Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
ACVRL1	Desarrollo embrionario
ADAM15	Vesícula acrosomal, Vesícula acrosomal
AFF4	Desarrollo de las células germinales, Desarrollo de las espermátidas , Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
AFP	Desarrollo de las gónadas, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo
ANG	Desarrollo de las células germinales, Desarrollo de las gónadas, Desarrollo placentario , Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo
AR	Desarrollo de las gónadas, Desarrollo embrionario, Embarazo femenino , Reproducción, Proceso reproductivo
ARC	Vesícula acrosomal, Vesícula acrosomal
ARNT2	Desarrollo embrionario
ASCL2	Desarrollo embrionario, Desarrollo placentario
ASZ1	Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
BAT1	Reproducción, Proceso reproductivo



Transcriptómica de la infertilidad masculina

Resultados

Sandra García Herrero. 2012

BCL10	Desarrollo embrionario
BMF	Vesícula acrosomal, Vesícula acrosomal
BMP2	Desarrollo embrionario, Reproducción, , Proceso reproductivo
C19orf20	Desarrollo de las células germinales, Desarrollo de las espermatidas, Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
CALCA	Embarazo femenino, Reproducción, , Proceso reproductivo, Implantación embrionaria
CATSPER4	Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Vesícula acrosomal, Vesícula acrosomal, Movilidad espermática, Espermatogénesis
CCL5	Reproducción, Proceso reproductivo
CRISP1	Fecundación, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo
CXXC4	Desarrollo embrionario
CYLC1	Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Vesícula acrosomal, Vesícula acrosomal, Espermatogénesis
DIAPH2	Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo
DMRT2	Desarrollo de las gónadas, Reproducción, Proceso reproductivo
ECE1	Desarrollo embrionario
EDA2R	Desarrollo embrionario
EFNA1	Desarrollo embrionario
ELSPBP1	Fecundación, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo
ENG	Desarrollo embrionario
EOMES	Desarrollo embrionario, Desarrollo placentario
EPAS1	Desarrollo embrionario, Desarrollo placentario
ERCC2	Desarrollo embrionario
ESX1	Desarrollo embrionario, Desarrollo placentario
FAM50A	Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
FNDC3A	Desarrollo de las células germinales, Desarrollo de las espermatidas, Desarrollo de las gónadas, Fecundación, Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Vesícula acrosomal, Vesícula acrosomal, Espermatogénesis
FOXC1	Desarrollo de las gónadas, Desarrollo embrionario, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo
FOXD2	Desarrollo embrionario
FOXF1	Desarrollo embrionario
GATM	Desarrollo embrionario
GJA5	Desarrollo embrionario
GLI3	Desarrollo embrionario
GNA12	Desarrollo embrionario
GNA13	Desarrollo embrionario



Transcriptómica de la infertilidad masculina

Resultados

Sandra García Herrero. 2012

HFE	Embarazo femenino, Reproducción, Proceso reproductivo
HMGCR	Desarrollo de las gónadas, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo
HMX2	Desarrollo embrionario
HOXA2	Desarrollo embrionario
HOXB1	Desarrollo embrionario
HOXB8	Desarrollo embrionario
HSD11B2	Embarazo femenino, Reproducción, , Proceso reproductivo
HUS1	Desarrollo embrionario
IGF2R	Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
IGFBP7	Embarazo femenino, Reproducción, , Proceso reproductivo, Implantación embrionaria
ITGA4	Desarrollo embrionario, Desarrollo placentario
ITGA8	Desarrollo embrionario
KRT9	Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
LEP	Desarrollo de las gónadas, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo
LMO4	Desarrollo embrionario
LRP6	Desarrollo embrionario
MACF1	Desarrollo embrionario
MADCAM1	Desarrollo embrionario
MBNL1	Desarrollo embrionario
MGST1	Desarrollo de las gónadas, Reproducción, Proceso reproductivo
MSX1	Desarrollo embrionario
MSX2	Desarrollo embrionario
MYF6	Desarrollo embrionario
MYH9	Desarrollo embrionario
NCOA3	Reproducción, Proceso reproductivo
NLE1	Desarrollo embrionario
NRG2	Desarrollo embrionario
P2RX1	Apareamiento, Cópula, Reproducción, Proceso reproductivo, Inseminación
PAX5	Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
PDGFRB	Desarrollo embrionario
PGF	Embarazo femenino, Reproducción, , Proceso reproductivo
PIWIL4	Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis



Transcriptómica de la infertilidad masculina

Resultados

Sandra García Herrero. 2012

PLCG1	Desarrollo embrionario
POU2F1	Desarrollo embrionario
PPAP2B	Desarrollo embrionario, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo
PPARD	Desarrollo placentario, Embarazo femenino, Reproducción, Proceso reproductivo, Implantación embrionaria
PRDM1	Desarrollo embrionario, Desarrollo placentario
PRDX3	Desarrollo placentario
PRLHR	Embarazo femenino, Reproducción, Proceso reproductivo
PTF1A	Desarrollo embrionario
PTPN11	Reproducción, Proceso reproductivo
RBP4	Desarrollo de las células germinales, Desarrollo de las gónadas, Desarrollo de los genitales, Desarrollo embrionario, Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
RUVBL1	Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
RXFP2	Desarrollo de las células germinales, Desarrollo de las gónadas, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo
SEMA3C	Desarrollo embrionario
SIX1	Desarrollo embrionario
SKI	Desarrollo embrionario
SMAD5	Desarrollo embrionario
STAT5B	Desarrollo de las gónadas, Embarazo femenino, Reproducción, Proceso reproductivo
SYT8	Vesícula acrosomal, Vesícula acrosomal
TAC3	Embarazo femenino, Reproducción, Proceso reproductivo
TACR1	Apareamiento, Cópula, Reproducción, Proceso reproductivo, Inseminación, TACR1
TGFBR2	Desarrollo embrionario
THOC1	Reproducción, Proceso reproductivo
TIMELESS	Desarrollo embrionario
TOB2	Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo
TUBD1	Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
UBP1	Reproducción, Proceso reproductivo
VEZT	Vesícula acrosomal, Vesícula acrosomal
WNT1	Desarrollo embrionario
ZP4	Fecundación, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo



Tabla 52-R: Genes diferencialmente expresados en el grupo NE de las ICSIs con semen fresco, previamente descritos en algún proceso biológico relacionado con la reproducción.

Nombre	Procesos biológicos relacionados con la reproducción
ANKRD7	Desarrollo de las gónadas, Reproducción, Proceso reproductivo

Tabla 53-R: Genes exclusivos en el grupo NE de las ICSIs con semen fresco, previamente descritos en algún proceso biológico relacionado con la reproducción.

Nombre	Procesos biológicos relacionados con la reproducción
ACD	Desarrollo embrionario
ADAM20	Fecundación, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo
ADAMTS2	Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
AGPAT6	Reproducción, Proceso reproductivo
ALDH1A2	Desarrollo embrionario
AMBP	Embarazo femenino, Reproducción, Proceso reproductivo
APBA1	Desarrollo embrionario
ARFRP1	Desarrollo embrionario
ATP6V0A2	Vesícula acrosomal, Vesícula acrosomal
AXIN2	Desarrollo embrionario
BOLL	Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
CCNB1	Desarrollo de las células germinales, Desarrollo embrionario, Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
CEP57	Desarrollo de las células germinales, Desarrollo de las espermátidas, Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
CETN2	Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
CHEK1	Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo
CHUK	Reproducción, Proceso reproductivo



Transcriptómica de la infertilidad masculina

Resultados

Sandra García Herrero. 2012

CLEC4M	Reproducción, Proceso reproductivo
COQ7	Desarrollo embrionario
CRTAP	Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
CSRP2BP	Desarrollo embrionario
CUBN	Desarrollo embrionario
DAZL	Desarrollo de las células germinales, Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
DDX25	Desarrollo de las células germinales, Desarrollo de las espermátidas, Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
DLK1	Desarrollo embrionario
DNAJA3	Desarrollo embrionario
ELL3	Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
FAM48A	Desarrollo embrionario
FBXW4	Desarrollo embrionario
FOXA1	Desarrollo embrionario, Reproducción, Proceso reproductivo
FOXI1	Desarrollo embrionario
FSHR	Desarrollo de las gónadas, Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
FUT10	Desarrollo embrionario, Fecundación, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo
FUT8	Desarrollo embrionario
GAPDHS	Desarrollo de las células germinales, Desarrollo de las espermátidas, Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Movilidad espermática, Espermatogénesis
GIP	Embarazo femenino, Reproducción, Proceso reproductivo
GOPC	Desarrollo de las células germinales, Desarrollo de las espermátidas, Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Diferenciación del núcleo de la espermátida, Espermatogénesis
HERC4	Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
HOXB5	Desarrollo embrionario
HOXD9	Desarrollo embrionario
HSF2	Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
HSP90AB1	Desarrollo placentario
INHA	Desarrollo de las gónadas, Reproducción, Proceso reproductivo
JAG2	Desarrollo de las gónadas, Desarrollo embrionario, Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
KDR	Desarrollo de las gónadas, Reproducción, Proceso reproductivo
LAMA5	Desarrollo embrionario
LIG3	Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo,



	Espermatogénesis
LRSAM1	Reproducción, Proceso reproductivo
MAFF	Desarrollo embrionario, Reproducción, Proceso reproductivo
MAK	Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
MAPK1	Desarrollo embrionario, Desarrollo placentario
MKKS	Desarrollo de las células germinales, Desarrollo de las espermátidas, Desarrollo de las gónadas, Desarrollo embrionario, Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
MLL	Desarrollo embrionario
MLL2	Desarrollo de las células germinales, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo
MORC1	Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
MST1R	Fecundación, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo
MTL5	Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
NANOS3	Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
NAT8B	Desarrollo embrionario
NF2	Desarrollo embrionario
NRG1	Desarrollo embrionario
NSD1	Desarrollo embrionario
OTOP1	Desarrollo embrionario
OVOL1	Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
PAPPA	Embarazo femenino, Reproducción, Proceso reproductivo
PAX7	Desarrollo embrionario
PBX2	Desarrollo embrionario
PCDH12	Desarrollo embrionario, Desarrollo placentario
PGR	Desarrollo de las gónadas, Embarazo femenino, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo
PKDREJ	Fecundación, Reacción del acrosoma, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo
POLR1B	Desarrollo embrionario, Embarazo femenino, Reproducción, Proceso reproductivo, Implantación embrionaria
PRKAR1A	Desarrollo embrionario
PRL	Embarazo femenino, Reproducción, Proceso reproductivo
PRMT7	Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo
PROX1	Desarrollo embrionario, Reproducción, Proceso reproductivo
PSG1	Embarazo femenino, Reproducción, Proceso reproductivo
PSG4	Embarazo femenino, Reproducción, Proceso reproductivo



Transcriptómica de la infertilidad masculina

Resultados

Sandra García Herrero. 2012

PSG5	Embarazo femenino, Reproducción, Proceso reproductivo
PSG7	Embarazo femenino, Reproducción, Proceso reproductivo
PSMC3	Desarrollo embrionario
PSMC4	Desarrollo embrionario
PSME4	Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
PVRL1	Reproducción, Proceso reproductivo
PYGO2	Desarrollo embrionario
RAD23A	Reproducción, Proceso reproductivo
RARG	Desarrollo embrionario, Reproducción, Proceso reproductivo
RASA1	Desarrollo embrionario
RNF17	Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
SCEL	Desarrollo embrionario
SIAH1	Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
SIX2	Desarrollo embrionario
SLC22A16	Fecundación, Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Movilidad espermática, Espermatogénesis
SPAG6	Desarrollo de las células germinales, Desarrollo de las espermátidas, Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
SPIN2B	Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo
SPO11	Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
SYCP3	Desarrollo de las células germinales, Desarrollo de las espermátidas, Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Diferenciación del núcleo de la espermátida, Espermatogénesis
TBP	Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
TCF7L1	Desarrollo embrionario
TDGF1	Desarrollo embrionario
TERF2	Desarrollo embrionario
TESK2	Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
TH	Apareamiento, Desarrollo embrionario, Reproducción, Proceso reproductivo
THOC6	Reproducción, Proceso reproductivo
TNF	Desarrollo embrionario, Reproducción, Proceso reproductivo
TRAF6	Desarrollo embrionario
TUBGCP3	Fecundación, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo
ZBTB16	Desarrollo de las células germinales, Desarrollo embrionario, Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis



ZP1	Fecundación, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo
ZP3	Fecundación, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Unión del espermatozoide a la zona pelúcida
ZPBP2	Fecundación, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Unión del espermatozoide a la zona pelúcida

4.3. Análisis ontológico.

El análisis ontológico se hizo conforme se explica en la sección de material y métodos.

Una vez realizado el análisis bioinformático conjunto de los listados de los GDE tanto en el grupo E como NE en el caso de las ICSIs con semen en fresco, nos muestra un total de 107, 11, 12 y 3 procesos biológicos, componentes celulares, funciones moleculares y rutas metabólicas estadísticamente afectadas (**Tablas 54-R, 55-R, 56-R y 57-R** respectivamente (**MA**)). En la **figura 22-R**, mostramos los 10 procesos biológicos con un p-valor más significativo, exponiendo a su vez qué porcentaje representan el número de GDE de nuestros listados descritos en cada proceso biológico respecto al número total de genes descritos para dicho proceso en la especie *Homo sapiens*. Y en las **figuras 23-R y 24-R** mostramos todos los términos ontológicos (componentes celulares y funciones moleculares) exponiendo qué porcentaje representan el número de GDE de nuestros listados descritos en cada término ontológico respecto al número total de genes descritos para dicho término ontológico en la especie *Homo sapiens*.



Figura 22-R: Los 10 procesos biológicos estadísticamente afectados con un p-valor más significativo tras el análisis conjunto de los listados de GDE en el grupo de las ICSIs con semen fresco. Entre paréntesis está indicado el número de GDE de nuestros listados descritos en el término ontológico y la barra naranja representa el porcentaje de estos respecto al total de genes descritos para dicho proceso biológico en *Homo sapiens*.

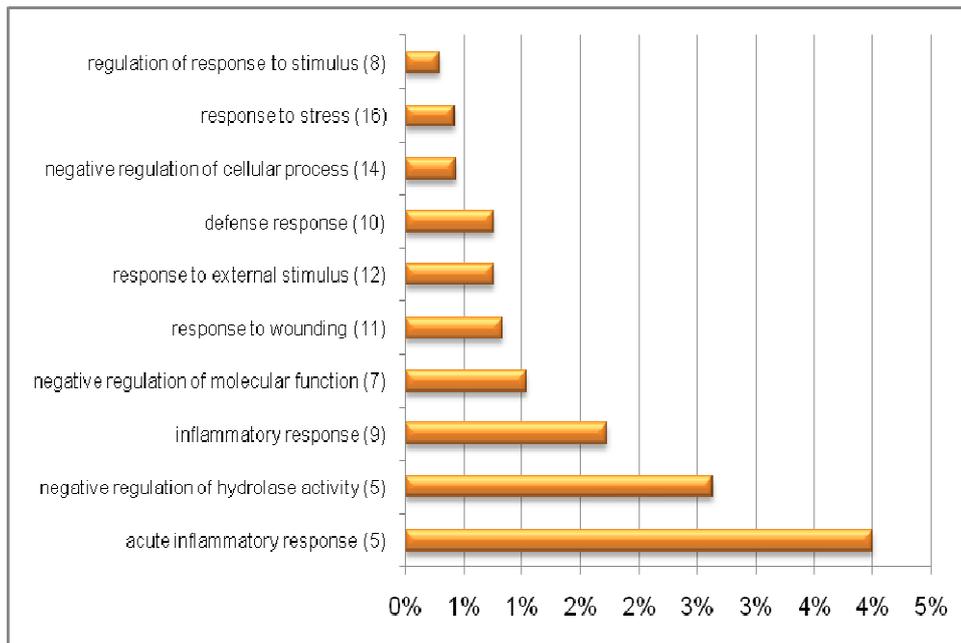




Figura 23-R: Los componentes celulares estadísticamente afectados tras el análisis conjunto de los listados de GDE en el grupo de las ICSIs con semen en fresco. Entre paréntesis está indicado el número de GDE de nuestros listados descritos en el término ontológico y la barra naranja representa el porcentaje de estos respecto al total de genes descritos para dicho componente celular en *Homo sapiens*.

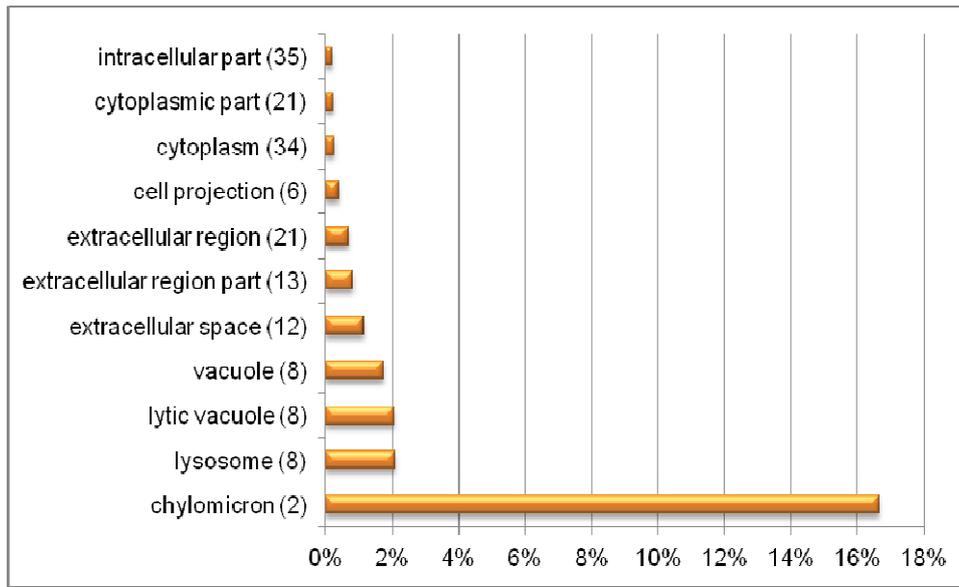
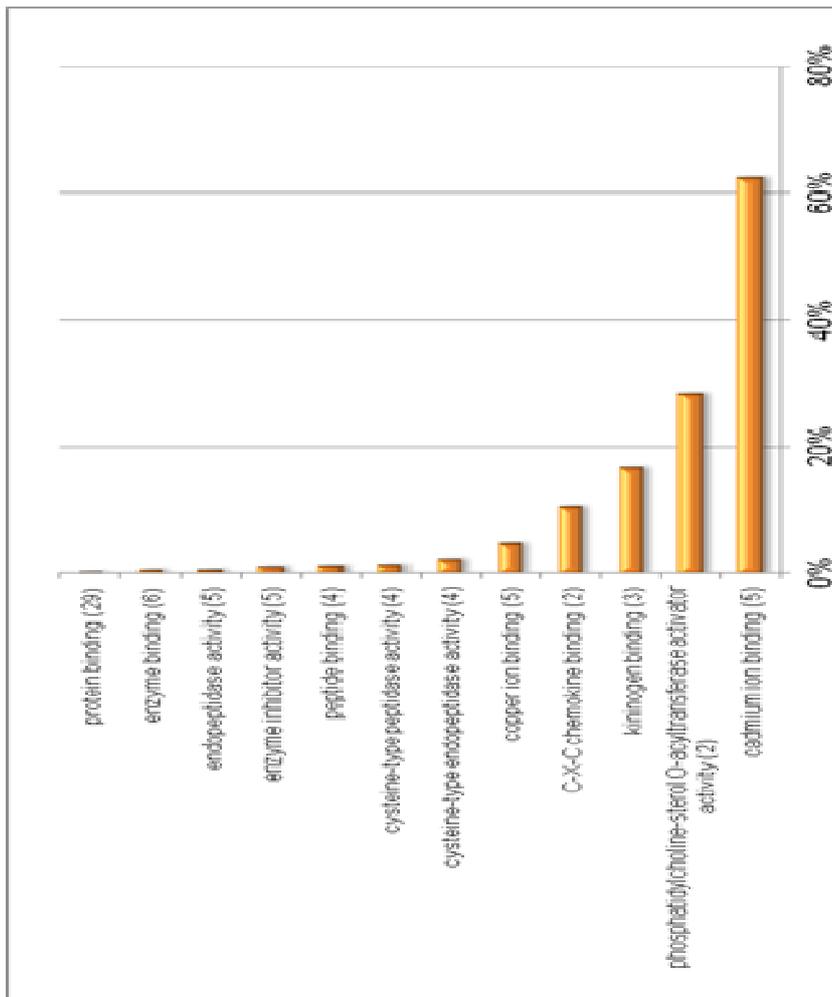




Figura 24-R: Las funciones moleculares estadísticamente afectadas tras el análisis conjunto de los listados de GDE en el grupo de las ICSIs con semen en fresco. Entre paréntesis está indicado el número de GDE de nuestros listados descritos en el término ontológico y la barra naranja representa el porcentaje de estos respecto al total de genes descritos para dicha función molecular en *Homo sapiens*.





También se realizó el análisis de los listados de genes exclusivos tanto del grupo E como el NE, por separado y una vez realizado el análisis de estos, nos muestra un total de 165, 25, 26 y 1 procesos biológicos, componentes celulares, funciones moleculares y rutas metabólicas estadísticamente afectadas en el grupo E (**Tablas 58-R, 59-R, 60-R y 61-R** respectivamente (**MA**)) y 59, 33, 27 y 5 procesos biológicos, componentes celulares, funciones moleculares y rutas metabólicas estadísticamente afectadas en el grupo NE (**Tablas 62-R, 63-R, 64-R y 65-R** respectivamente (**MA**)). En las **figuras 25-R, 26-R, 27-R, 28-R, 29-R y 30-R** mostramos los 10 términos ontológicos con un p-valor más significativo, tanto para el grupo E como NE, exponiendo a su vez qué porcentaje representan el número de GE de nuestros listados descritos en cada término ontológico respecto al número total genes descritos para dicho término ontológico en la especie *Homo sapiens*.

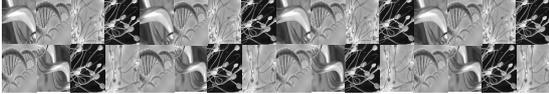


Figura 25-R: Los 10 procesos biológicos con un p-valor más significativo tras el análisis del listado GE en el grupo E de las ICSIs con semen fresco. Entre paréntesis está indicado el número de GE de nuestros listados descritos en el término ontológico y la barra naranja representa el porcentaje de estos respecto al total de genes descritos para dicho proceso biológico en *Homo sapiens*.

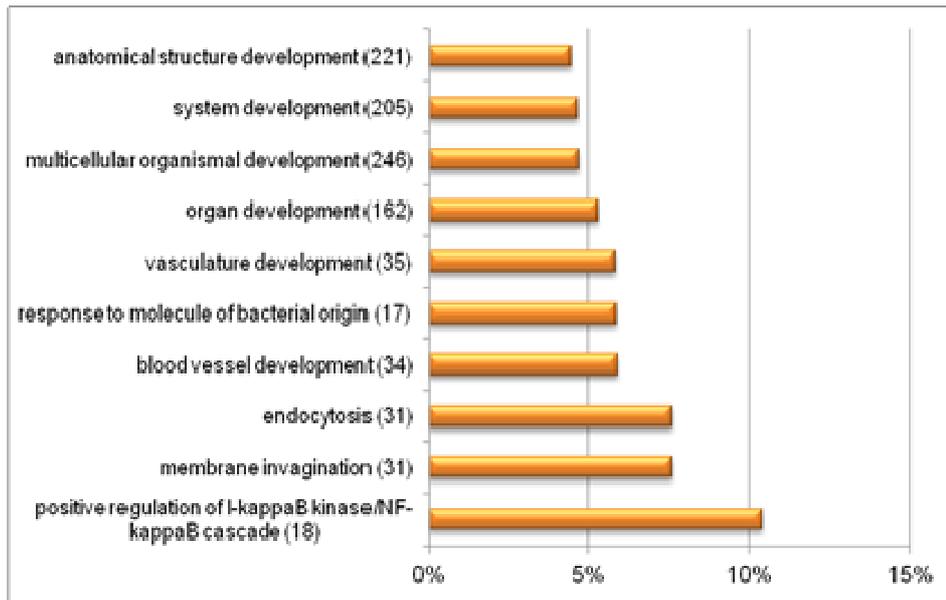




Figura 26-R: Los 10 componentes celulares con un p-valor más significativo tras el análisis del listado de GE en el grupo E de las ICSIs con semen fresco. Entre paréntesis está indicado el número de GE de nuestros listados descritos en el término ontológico y la barra naranja representa el porcentaje de estos respecto al total de genes descritos para dicho componente celular en *Homo sapiens*.

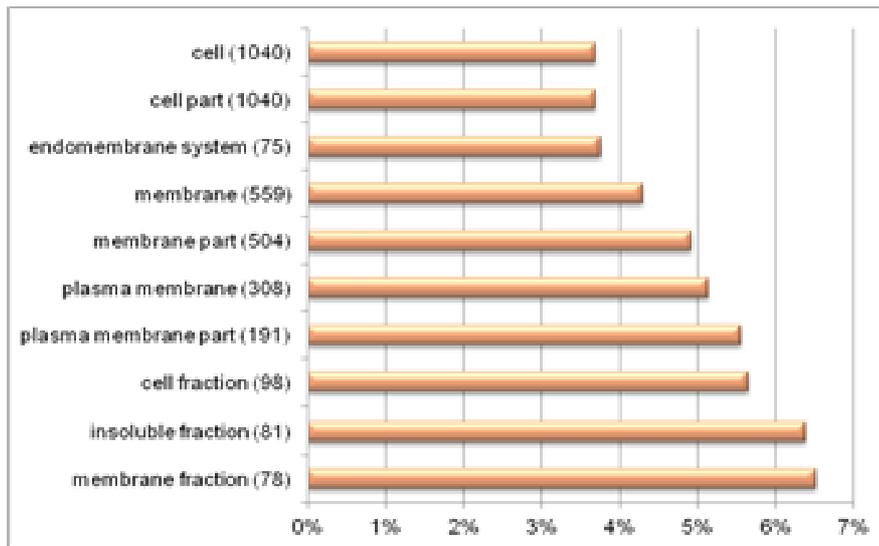




Figura 27-R: Las 10 funciones moleculares con un p-valor más significativo tras el análisis del listado del grupo GE en el grupo E de las ICSIs con semen fresco. Entre paréntesis está indicado el número de GE de nuestros listados descritos en el término ontológico y la barra naranja representa el porcentaje de estos respecto al total de genes descritos para dicha función molecular en *Homo sapiens*.

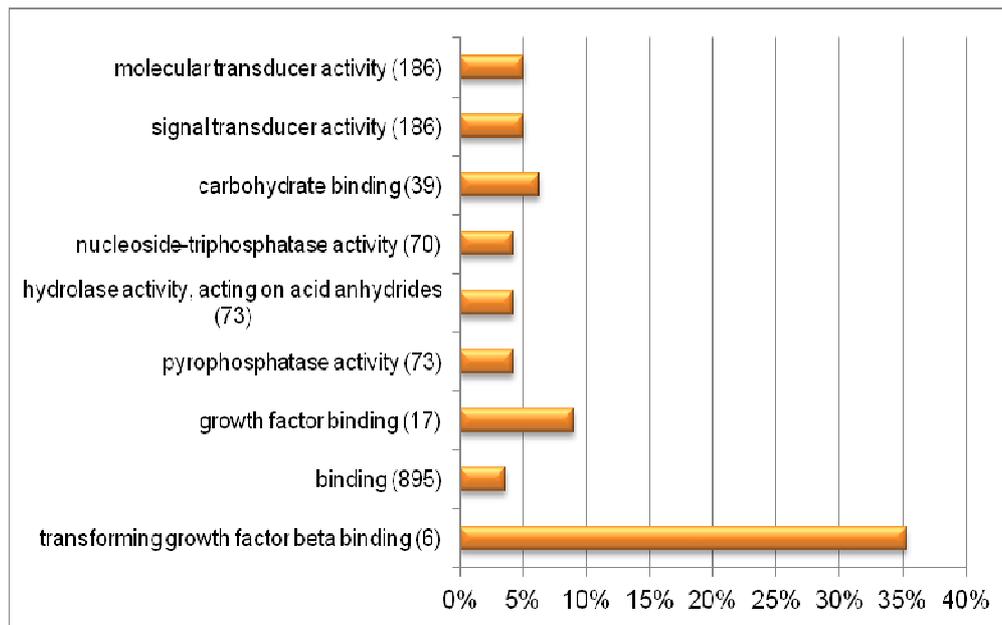




Figura 28-R: Los 10 procesos biológicos con un p-valor más significativo tras el análisis del listado GE en el grupo NE de las ICSIs con semen fresco. Entre paréntesis está indicado el número de GE de nuestro listado descritos en el término ontológico y la barra naranja representa el porcentaje de estos respecto al total de genes descritos para dicho proceso biológico en *Homo sapiens*.

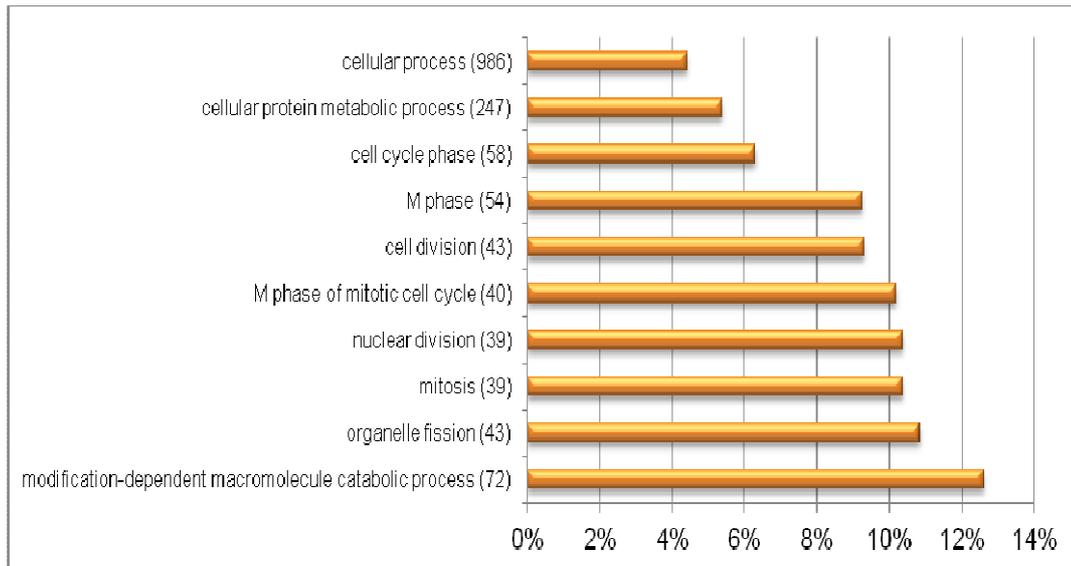




Figura 29-R: Los 10 componentes celulares con un p-valor más significativo tras el análisis del listado de GE en el grupo NE de las ICSIs con semen fresco. Entre paréntesis está indicado el número de GE de nuestros listados descritos en el término ontológico y la barra naranja representa el porcentaje de estos respecto al total de genes descritos para dicho componente celular en Homo sapiens.

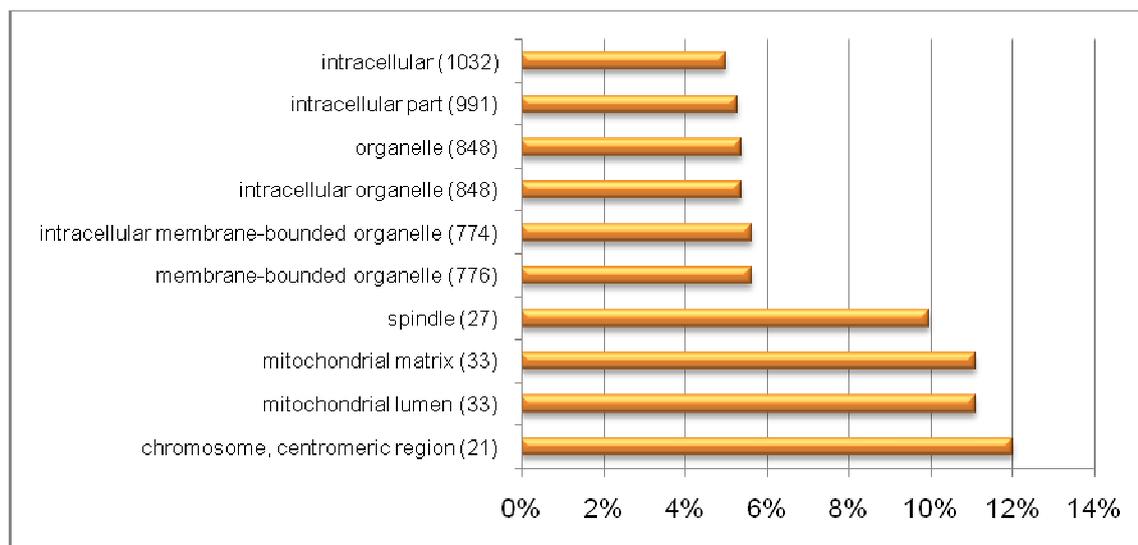
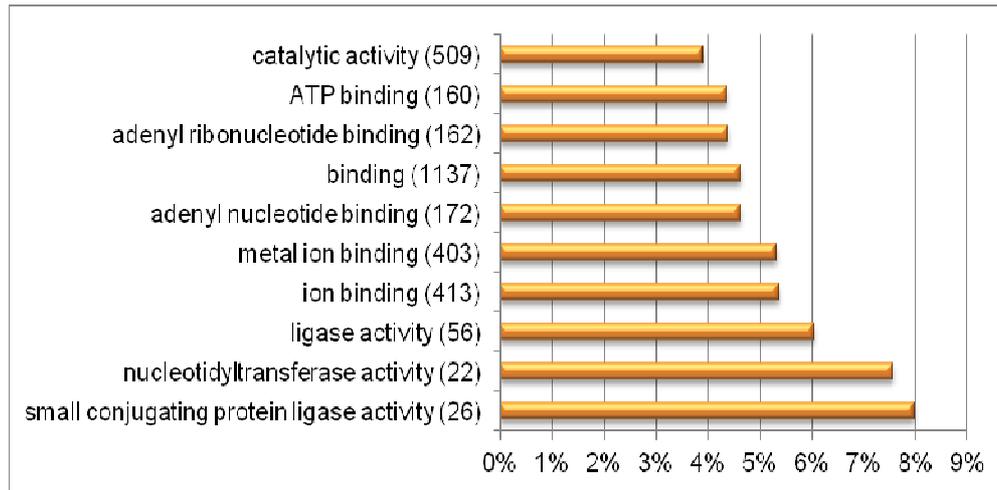
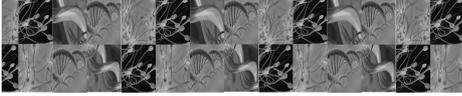




Figura 30-R: Las 10 funciones moleculares con un p-valor más significativo tras el análisis del listado del grupo GE en el grupo NE de las ICSIs con semen fresco. Entre paréntesis está indicado el número de GE de nuestros listados descritos en el término ontológico y la barra naranja representa el porcentaje de estos respecto al total de genes descritos para dicha función molecular en *Homo sapiens*.



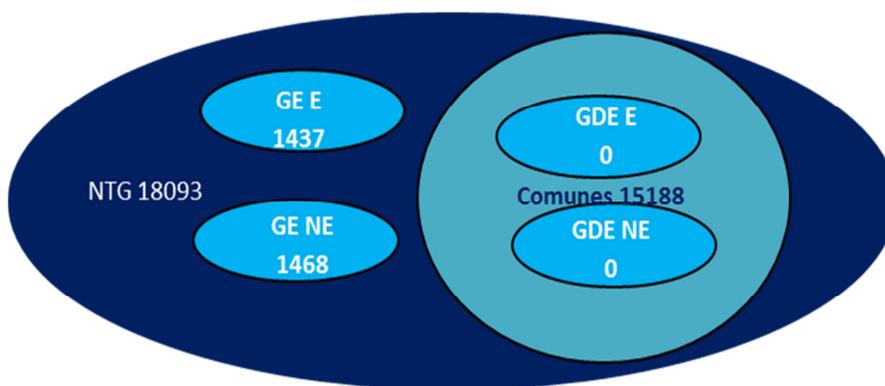


4 Microarrays muestras de semen de ICSI congelado.

4.1 Listado de GE.

El número total de genes que daban señal en el microarray de ICSI con semen previamente crio-conservado era de 18095 genes. De ellos, 15188 (**Figura 31-R**), se expresaban en ambos grupos, tanto en el E como en el NE y una vez analizados los datos ninguno de ellos presentaban una expresión diferencial entre los 2 grupos.

Figura 31-R: NTG, número total de genes expresados; GE, genes exclusivos; GDE, genes diferencialmente expresados.



Cuando lo que se analizó eran los genes que sólo se expresaban en uno de los grupos se detectaron 1439((**Tabla 66-R**) (**MA**)) en el grupo que embarazaba y 1468 en el que no lo conseguía ((**Tabla 67-R**) (**MA**)). El valor de corte se estableció en 2,983 unidades de fluorescencia. Las **tablas 66.1-R** y **67.1-R** reflejan sólo los 10 GE con un mayor valor de fluorescencia tanto en el grupo E como el NE.



Tabla 66.1-R: Los 10 genes exclusivos expresados en el grupo que logra un embarazo (grupo E) tras una ICSI con semen previamente crio-conservado con un mayor valor de intensidad de fluorescencia. En la columna 1 se indica en nombre del gen, en la columna 2 el número de acceso de GenBank y en la columna 3 el valor de fluorescencia.

Nombre	Número de acceso de GenBank	Valor de fluorescencia
CHRNA4	NM_000750	8,105
PLCB3	NM_000932	7,722
FLJ23049	NM_024687	7,511
C3orf37	NM_001006109	7,162
INCENP	NM_001040694	7,133
TBX21	NM_013351	7,100
RORA	NM_134260	7,008
MEOX2	NM_005924	6,544
FLJ16542	NM_001004301	6,383
CHD1	NM_001270	6,070



Tabla 67.1-R: Los 10 genes exclusivos expresados en el grupo que no logra un embarazo (grupo NE) tras una ICSI con semen previamente crio-conservado con un mayor valor de intensidad de fluorescencia. En la columna 1 se indica en nombre del gen, en la columna 2 el número de acceso de GenBank y en la columna 3 el valor de fluorescencia.

Nombre	Número de acceso de GenBank	Valor de fluorescencia
ZNF193	NM_006299	8,952
NAP1L2	NM_021963	7,273
HEYL	NM_014571	6,564
TCTEX1D1	NM_152665	6,508
CASQ2	NM_001232	5,288
THOC6	NM_024339	5,225
LOC399900	NM_001013667	5,127
CYP4B1	NM_000779	5,126
SERINC1	NM_020755	5,039
PRPSAP1	NM_002766	4,977

4.2. Genes descritos en procesos biológicos relacionados con el proceso reproductivo.

Una vez se obtuvieron los listados de GE de ambos grupos, los comparamos con la matriz de genes descritos en procesos biológicos relacionados con la reproducción según el *Gene Ontology* de todos los genes de nuestro listado.

92 GE del grupo E (Tabla 68-R) y 92 del GE NE (Tabla 69-R), estaban descritos en algunos de esos procesos.



Tabla 68-R: Genes exclusivos en el grupo E de las ICSIs con semen previamente crio-conservado previamente descritos en algún proceso biológico relacionado con la reproducción.

Nombre	Procesos biológicos relacionados con la reproducción
ACVR2A	Apareamiento, Cópula, Desarrollo de las gónadas, Desarrollo embrionario, Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Inseminación, Espermatogénesis, Eyaculación
ADIPOR2	Embarazo femenino, Reproducción, Proceso reproductivo
ANGPT2	Desarrollo de las células germinales, Embarazo femenino, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo
BCL10	Desarrollo embrionario
BIK	Desarrollo de las gónadas, Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
BUB1	Desarrollo embrionario
C5	Desarrollo embrionario
C6	Desarrollo embrionario
CATSPER1	Fecundación, Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Movilidad espermática, Espermatogénesis
CCNB1	Desarrollo de las células germinales, Desarrollo embrionario, Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
CD38	Embarazo femenino, Reproducción, Proceso reproductivo
CDO1	Reproducción, Proceso reproductivo
CITED1	Desarrollo embrionario, Desarrollo placentario
COL2A1	Desarrollo embrionario
CREB1	Reproducción, Proceso reproductivo
CRISP1	Fecundación, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo,
CTCF	Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo
CUBN	Desarrollo embrionario
CUL3	Desarrollo embrionario
CYLC1	Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Vesícula acrosomal, Vesícula acrosomal, Espermatogénesis
CYLC2	Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
DAD1	Desarrollo embrionario
DAZAP1	Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
DDO	Apareamiento, Cópula, Reproducción, Proceso reproductivo, Inseminación



DDX25	Desarrollo de las células germinales, Desarrollo de las espermátidas, Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
DEDD	Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
DLX2	Desarrollo embrionario
DMRT1	Desarrollo de las gónadas, Reproducción, Proceso reproductivo
DMRTA1	Reproducción, Proceso reproductivo
DNAJA3	Desarrollo embrionario
DNMT3L	Desarrollo embrionario, Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
EOMES	Desarrollo embrionario, Desarrollo placentario
EP300	Desarrollo embrionario
ESX1	Desarrollo embrionario, Desarrollo placentario
FAM48A	Desarrollo embrionario
FBXO5	Desarrollo de las células germinales, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo
FGF10	Desarrollo de los genitales, Desarrollo embrionario, Reproducción, Proceso reproductivo
FOXR1	Desarrollo embrionario
FSHB	Desarrollo de las gónadas, Embarazo femenino, Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
FURIN	Reproducción, Proceso reproductivo
FZD7	Desarrollo embrionario
GJA10	Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo
GPR64	Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
HESX1	Desarrollo embrionario
HOXC10	Desarrollo embrionario
HPGD	Embarazo femenino, Reproducción, Proceso reproductivo
IGFBP7	Embarazo femenino, Reproducción, Proceso reproductivo, Implantación embrionaria
IMMP2L	Desarrollo de las gónadas, Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
IZUMO1	Fecundación, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo,
LAMA4	Desarrollo embrionario
LEF1	Desarrollo embrionario, Desarrollo placentario
LHCGR	Desarrollo de las gónadas, Desarrollo de los genitales, Reproducción, Proceso reproductivo
MEOX1	Desarrollo embrionario
MEOX2	Desarrollo embrionario
MICALCL	Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis



MOV10L1	Desarrollo de las células germinales, Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
MSH2	Desarrollo de las células germinales, Desarrollo de las gónadas, Desarrollo embrionario, Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
MYST3	Desarrollo embrionario
OR10J1	Fecundación, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo,
OVOL1	Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
PDILT	Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
PGM3	Desarrollo embrionario, Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
POLR1B	Desarrollo embrionario, Embarazo femenino, Reproducción, Proceso reproductivo, Implantación embrionaria
POU2F1	Desarrollo embrionario
PPARG	Desarrollo placentario
PSG5	Embarazo femenino, Reproducción, Proceso reproductivo
PTGFR	Reproducción, Proceso reproductivo
RPS6KB1	Desarrollo de las células germinales, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo
SBDS	Desarrollo embrionario
SHH	Apareamiento, Cópula, Desarrollo de los genitales, Desarrollo embrionario, Reproducción, Proceso reproductivo
SLC26A8	Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
SLC9A10	Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Movilidad espermática, Espermatogénesis
SMARCA5	Desarrollo embrionario
SPATA5	Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
TAC1	Apareamiento, Cópula, Reproducción, Proceso reproductivo, Inseminación
TBX5	Desarrollo embrionario
TDRD1	Desarrollo de las células germinales, Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis,
TDRD9	Fecundación, Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
THOC5	Reproducción, Proceso reproductivo
THOC7	Reproducción, Proceso reproductivo
TIPARP	Desarrollo de las gónadas, Reproducción, Proceso reproductivo
TSC1	Desarrollo embrionario
TSSK2	Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
TUBD1	Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis



UBE3A	Desarrollo de las gónadas, Fecundación, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo
USF2	Reproducción, Proceso reproductivo
VEGFC	Desarrollo embrionario
WBP2NL	Fecundación, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo,
WNT2	Desarrollo embrionario, Desarrollo placentario
WNT5A	Desarrollo de las gónadas, Desarrollo de los genitales, Desarrollo embrionario, Reproducción, Proceso reproductivo
WNT8B	Desarrollo embrionario
ZP2	Fecundación, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Unión del espermatozoide a la zona pelúcida

Tabla 69-R: Genes exclusivos el grupo NE de las ICSIs con semen previamente crio-conservado, previamente descritos en algún proceso biológico relacionado con la reproducción.

Nombre	Procesos biológicos relacionados con la reproducción
AATF	Desarrollo embrionario
ACE2	Reproducción, Proceso reproductivo
ADAMTS1	Desarrollo de las gónadas, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo
AFP	Desarrollo de las gónadas, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo
ALDH1A2	Desarrollo embrionario
ALX4	Desarrollo embrionario
AMH	Desarrollo de las gónadas, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo
AMOT	Desarrollo embrionario
APOB	Desarrollo embrionario, Fecundación, Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Movilidad espermática, Espermatogénesis
ATP6V0A2	Vesícula acrosomal, Vesícula acrosomal
BIRC3	Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
BIRC6	Desarrollo embrionario, Desarrollo placentario
BMP4	Desarrollo de las células germinales, Desarrollo de las gónadas, Desarrollo embrionario, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo
CBX2	Reproducción, Proceso reproductivo



CCNF	Desarrollo placentario
CD28	Reproducción, Proceso reproductivo
CDKL2	Reproducción, Proceso reproductivo
CEP290	Desarrollo embrionario
CHD7	Desarrollo de los genitales, Desarrollo embrionario, Reproducción, Proceso reproductivo
COL16A1	Reproducción, Proceso reproductivo
CRH	Reproducción, Proceso reproductivo
CRYAA	Desarrollo embrionario
CSRP2BP	Desarrollo embrionario
DLX6	Desarrollo embrionario
DNAJC19	Desarrollo de los genitales, Reproducción, Proceso reproductivo
EDN2	Desarrollo de las gónadas, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo
EGFR	Desarrollo embrionario, Desarrollo placentario, Reproducción, Proceso reproductivo
EIF2B4	Desarrollo de las gónadas, Reproducción, Proceso reproductivo
EYA1	Desarrollo embrionario
FOS	Reproducción, Proceso reproductivo
FOXF2	Desarrollo de los genitales, Desarrollo embrionario, Reproducción, Proceso reproductivo
FRAT1	Desarrollo embrionario
FZD3	Desarrollo embrionario
GAS8	Movilidad espermática
GBX2	Desarrollo embrionario
GDF10	Reproducción, Proceso reproductivo
GRIN2B	Desarrollo embrionario
GRSF1	Desarrollo embrionario
H2AFX	Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
HECTD1	Desarrollo embrionario
HOXA11	Desarrollo embrionario
HOXC6	Desarrollo embrionario
HOXD4	Desarrollo embrionario
HSD17B3	Desarrollo de los genitales, Reproducción, Proceso reproductivo,
IMPAD1	Desarrollo embrionario
ITGA4	Desarrollo embrionario, Desarrollo placentario
LAMA3	Desarrollo embrionario



LEFTY2	Desarrollo de las células germinales, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo
LIG4	Desarrollo embrionario, Reproducción, Proceso reproductivo
MBNL1	Desarrollo embrionario
MDFIC	Reproducción, Proceso reproductivo
NDP	Desarrollo placentario
ODZ4	Desarrollo embrionario
PAQR5	Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo
PCYT1B	Desarrollo de las gónadas, Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis,
PKDREJ	Fecundación, Reacción del acrosoma, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo
PLAC1	Desarrollo placentario
PLK4	Desarrollo embrionario, Desarrollo placentario
PMCH	Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
PRL	Reproducción, Proceso reproductivo
PRRX2	Desarrollo embrionario
RAB23	Desarrollo embrionario
RUVBL1	Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
SALL1	Desarrollo de las gónadas, Desarrollo embrionario, Reproducción, Proceso reproductivo
SATB2	Desarrollo embrionario
SEMA3C	Desarrollo embrionario
SFRP4	Reproducción, Proceso reproductivo
SH2B3	Desarrollo embrionario
SHROOM3	Desarrollo embrionario
SKIL	Desarrollo embrionario
SOHLH2	Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
SOX15	Desarrollo de las gónadas, Reproducción, Proceso reproductivo
SOX6	Desarrollo embrionario
SP8	Desarrollo embrionario
SPAG16	Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
SPAG6	Desarrollo de las células germinales, Desarrollo de las espermátidas, Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
SPINT1	Desarrollo embrionario, Desarrollo placentario
SYCP2	Desarrollo de los genitales, Fecundación, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo



TAF4	Desarrollo de las gónadas, Reproducción, Proceso reproductivo
TBX15	Desarrollo embrionario
TCFL5	Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
TDRD6	Desarrollo de las células germinales, Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
TEX15	Desarrollo de los genitales, Fecundación, Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
TFAP2A	Desarrollo embrionario
TFCP2L1	Reproducción, Proceso reproductivo
THOC6	Reproducción, Proceso reproductivo
TIE1	Desarrollo embrionario
VCAM1	Desarrollo embrionario, Desarrollo placentario
VEZT	Vesícula acrosomal, Vesícula acrosomal
WDR33	Generación de gametos masculinos, Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Espermatogénesis
WWP1	Reproducción, Proceso reproductivo
XRCC2	Desarrollo embrionario

4.3. Análisis ontológico

Se realizó el análisis de los listados de genes exclusivos tanto del grupo E como el NE, por separado y una vez realizado el análisis de estos, nos muestra un total de 51, 15, 35 y 3 procesos biológicos, componentes celulares, funciones moleculares y rutas metabólicas estadísticamente afectadas en el grupo E (**Tablas 70-R, 71-R, 72-R y 73-R** respectivamente (**MA**)) y 46, 5, 10 y 6 procesos biológicos, componentes celulares, funciones moleculares y rutas metabólicas estadísticamente afectadas en el grupo NE (**Tablas 74-R, 75-R, 76-R y 77-R** respectivamente (**MA**)). En las **figuras 32-R, 33-R, 34-R, 35-R, 36-R y 37-R** mostramos los 10 términos ontológicos * con un p-valor más significativo, tanto para el grupo E como NE, exponiendo a su vez qué porcentaje representan el número de GE de nuestros listados descritos en cada términos ontológicos respecto al número total genes descritos para dicho términos ontológicos en la especie *Homo sapiens*. *En el caso



de los componentes celulares y funciones moleculares del grupo NE, se muestran todos los términos ontológicos.

Figura 32-R: Los 10 procesos biológicos con un p-valor más significativo tras el análisis del listado GE en el grupo E de las ICSIs con semen previamente crio-conservado. Entre paréntesis está indicado el número de GE de nuestro listado descritos en el término ontológico y la barra azul representa el porcentaje de estos respecto al total de genes descritos para dicho proceso biológico en Homo sapiens.

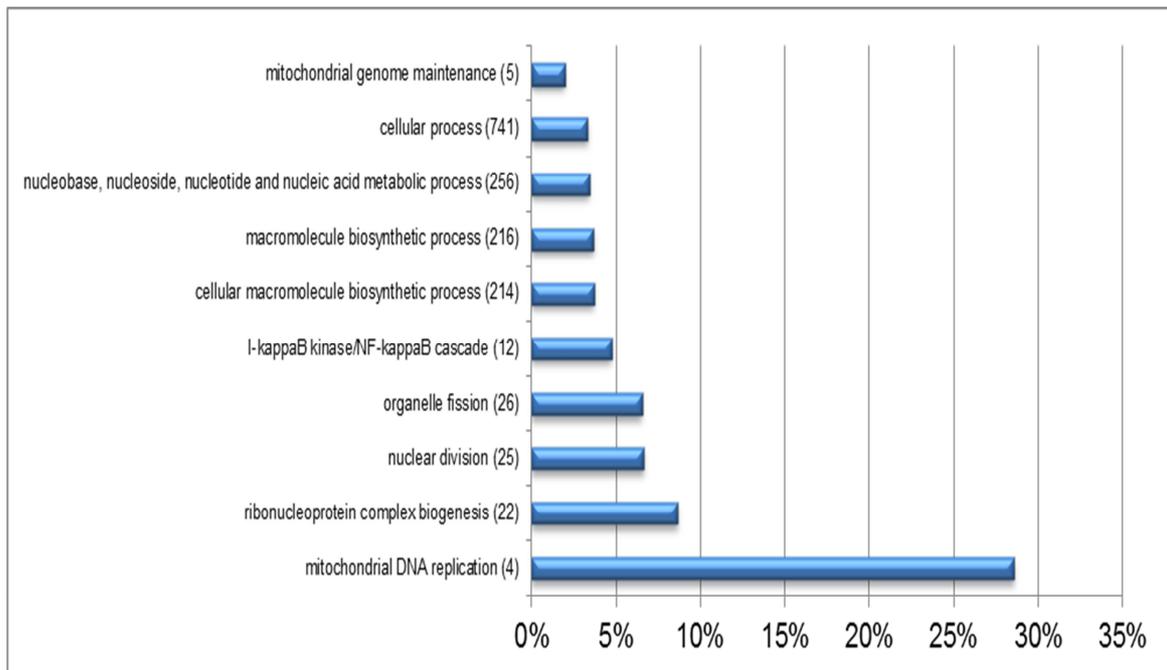




Figura 33-R: Los 10 componentes celulares con un p-valor más significativo tras el análisis del listado de GE en el grupo E de las ICSIs con semen previamente crio-conservado. Entre paréntesis está indicado el número de GE de nuestros listados descritos en el término ontológico y la barra azul representa el porcentaje de estos respecto al total de genes descritos para dicho componente celular en *Homo sapiens*.

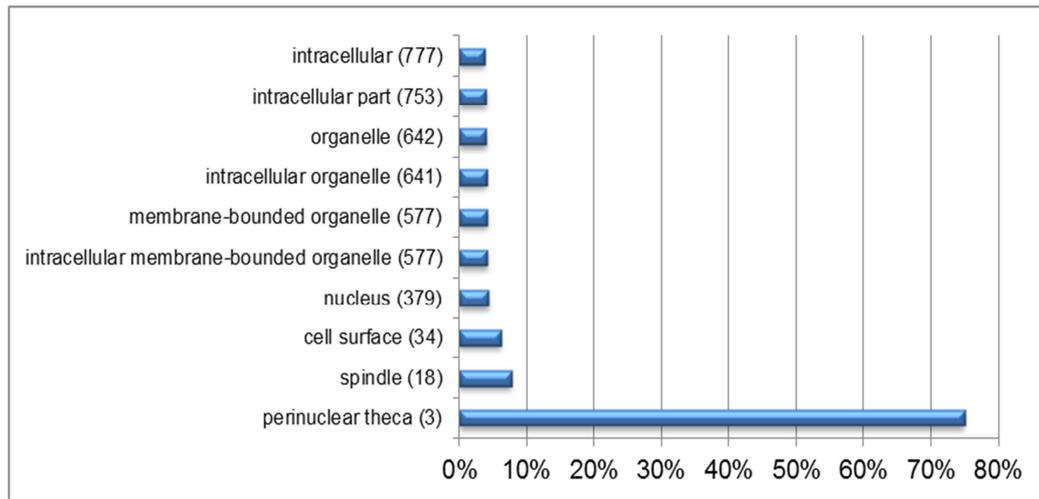




Figura 34-R: Las 10 funciones moleculares con un *p*-valor más significativo tras el análisis del listado del grupo GE en el grupo E de las ICSIs con semen previamente crio-conservado. Entre paréntesis está indicado el número de GE de nuestros listados descritos en el término ontológico y la barra azul representa el porcentaje de estos respecto al total de genes descritos para dicha función molecular en *Homo sapiens*.

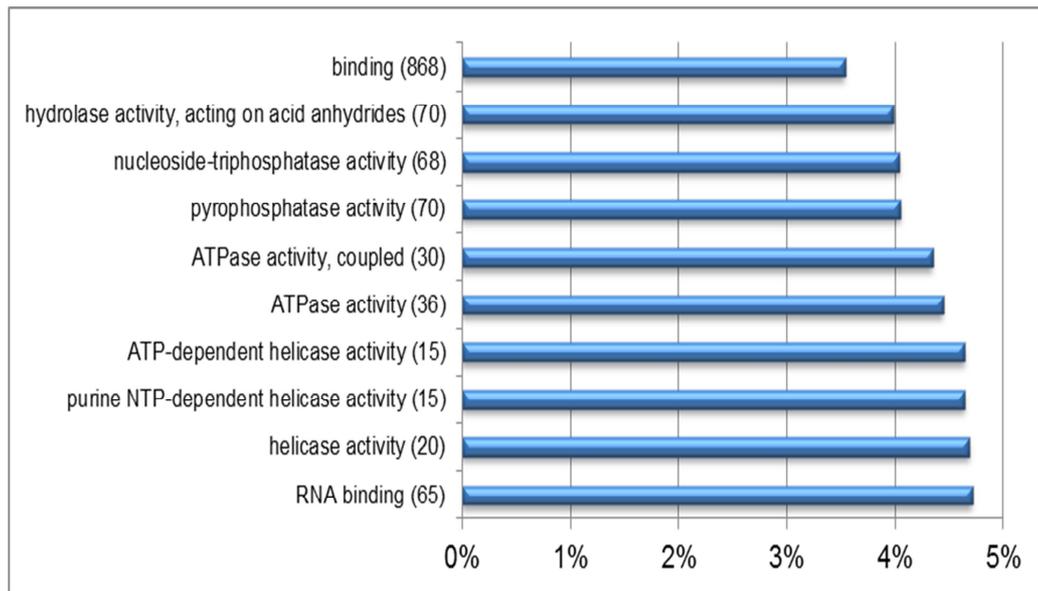




Figura 35-R: Los 10 procesos biológicos con un p-valor más significativo tras el análisis del listado GE en el grupo NE de las ICSIs con semen previamente crio-conservado. Entre paréntesis está indicado el número de GE de nuestro listado descritos en el término ontológico y la barra azul representa el porcentaje de estos respecto al total de genes descritos para dicho proceso biológico en *Homo sapiens*.

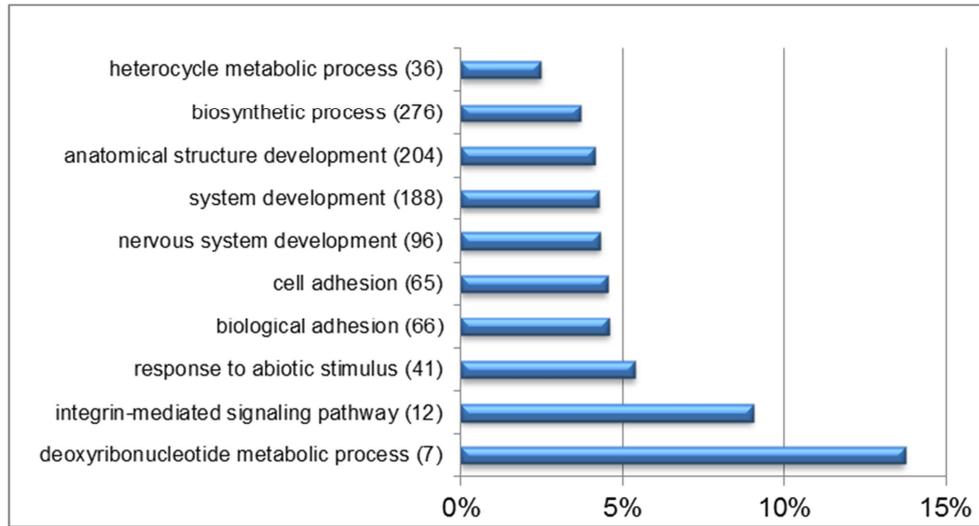




Figura 36-R: Componentes celulares tras el análisis del listado de GE en el grupo NE de las ICSIs con semen previamente crio-conservado. Entre paréntesis está indicado el número de GE de nuestros listados descritos en el término ontológico y la barra azul representa el porcentaje de estos respecto al total de genes descritos para dicho componente celular en *Homo sapiens*.

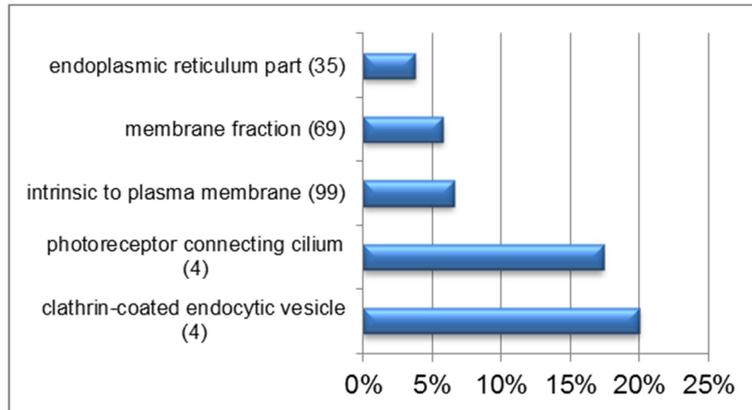
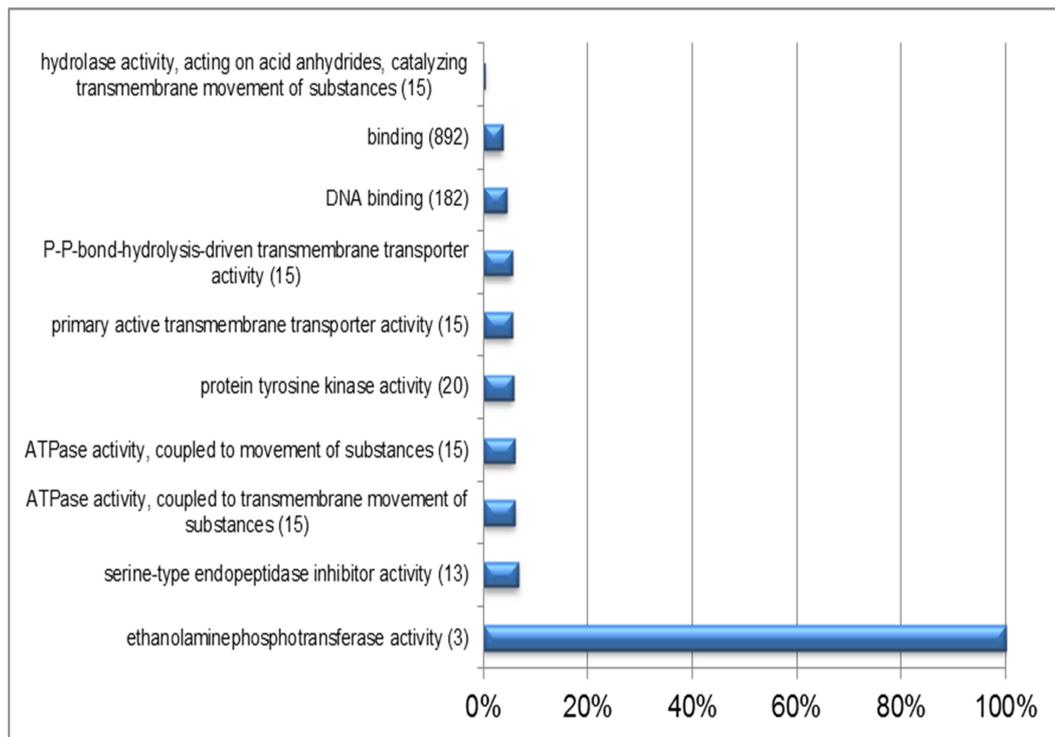
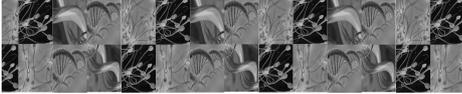




Figura 37-R: Funciones moleculares estadísticamente afectadas tras el análisis del listado del grupo GE en el grupo NE de las ICSIs con semen previamente crio-conservado. Entre paréntesis está indicado el número de GE de nuestros listados descritos en el término ontológico y la barra azul representa el porcentaje de estos respecto al total de genes descritos para dicha función molecular en *Homo sapiens*.



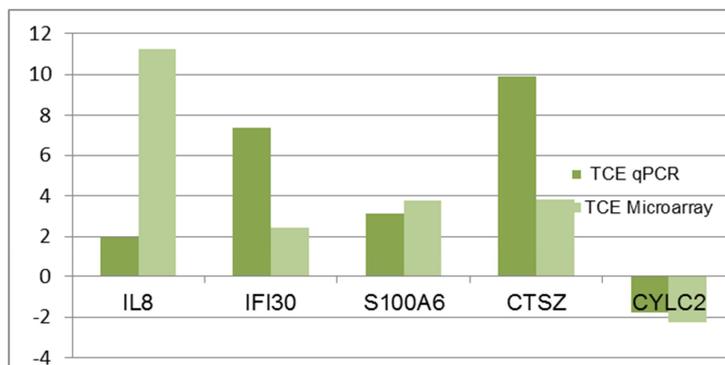


7. Validación resultados

La expresión diferencial de los microarrays se validó con el método de PCR cuantitativa (*qPCR (quantitative polymerase chain reaction)*).

Se validaron 4 genes por microarray (descritos previamente en el punto 2.5 del apartado de Material y Métodos) y se validaron sobre los *pools* de las muestras con las que se realizaron los experimentos de microarrays. Esto es, con los *pools* de las muestras tanto del grupo E como NE de todas las técnicas estudiadas. Los resultados están representados en las tablas (**Figuras 38-R, 39-R y 40-R**). No se procedió a hacer ninguna validación en el semen en congelado porque no teníamos expresión diferencial.

Figura 38-R: Validaciones en las muestras de las IAHS. Las validaciones se hacen sobre los *pools* que se utilizan para realizar los microarrays. TCE: Tasa de cambio de expresión. La barra verde oscuro representa TCE obtenida por qPCR y la verde claro la obtenida en el microarray. La TC se expresa en positivo cuando el gen está sobre-expresado en el grupo E respecto al NE, y en negativo cuando esa situación se da a la inversa.



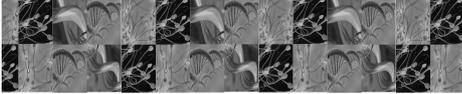
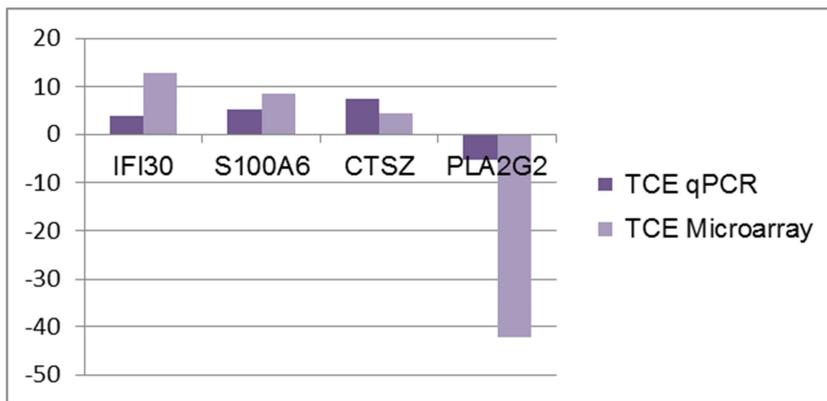


Figura 39-R: Validaciones en las muestras de las FIVs. Las validaciones se hacen sobre los pools que se utilizan para realizar los microarrays. TCE: Tasa de cambio de expresión. La barra morada oscura representa TCE obtenida por qPCR y la morada clara la obtenida en el microarray. La TC se expresa en positivo cuando el gen está sobre-expresado en el grupo E respecto al NE, y en negativo cuando esa situación se da a la inversa.



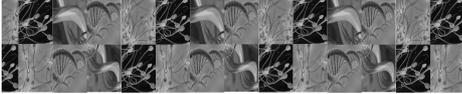
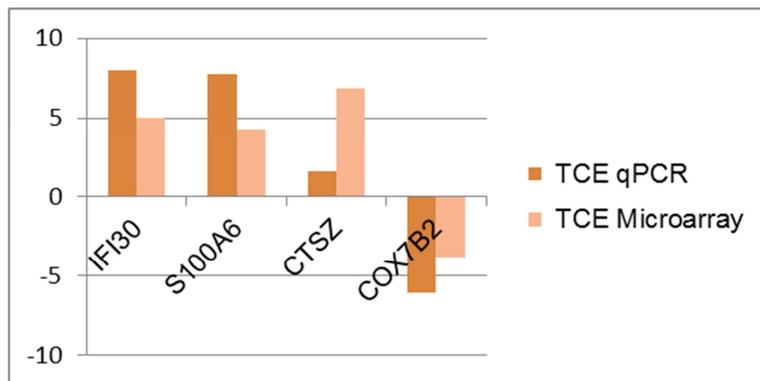


Figura 40-R: Validaciones en las muestras de las ICSIs con semen fresco. Las validaciones se hacen sobre los pools que se utilizan para realizar los microarrays. TCE: Tasa de cambio de expresión. La barra naranja oscura representa TCE obtenida por qPCR y la naranja clara la obtenida en el microarray. La TC se expresa en positivo cuando el gen está sobre-expresado en el grupo E respecto al NE, y en negativo cuando esa situación se da a la inversa.



8. Comparaciones entre técnicas.

8.1. GDE.

Una vez obtenidos los listados de GDE, se compararon todos los listados de los GDE en busca de genes comunes tanto entre los grupos E (GDE grupos E tanto de IAH, FIV e ICSI semen fresco) como de los NE (GDE grupos NE de IAH, FIV e ICSI semen fresco). Los resultados de estas comparaciones se muestran en las figuras **figura 41-R** y **figura 42-R** y en las **tablas 78-R (MA)** y **79-R (MA)**.

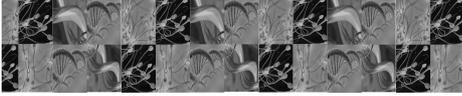


Figura 41: GDE comunes entre los grupos que logran el embarazo (Grupos E) entre todas las técnicas.

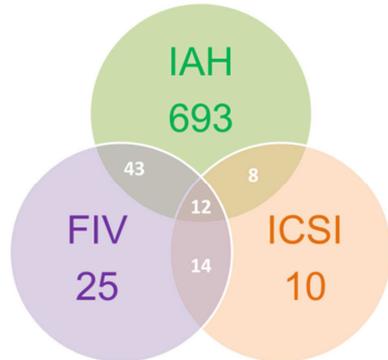
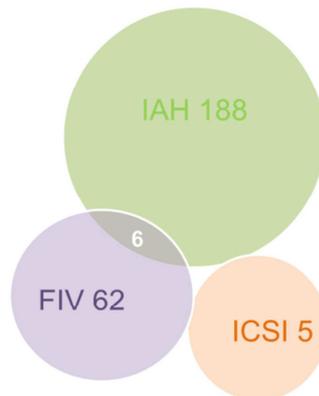
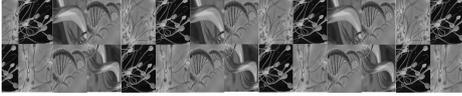


Figura 42: GDE comunes entre los grupos que no logran el embarazo (Grupos NE) entre todas las técnicas.

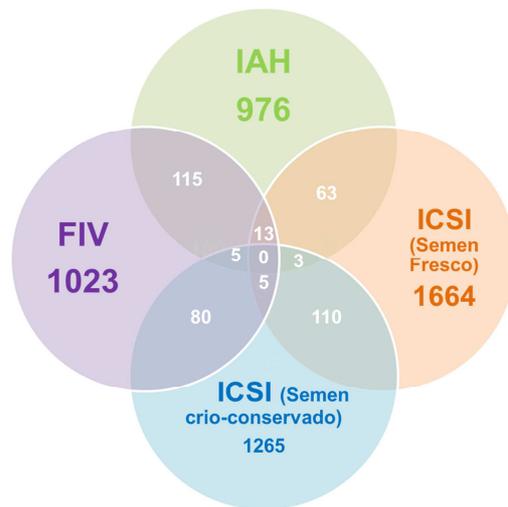




8.2. GE.

Una vez obtenidos los listados de GE, se compararon todos los listados de los GE en busca de genes comunes tanto entre los grupos E (GE grupos E tanto de IAH, FIV, ICSI semen fresco e ICSI semen crio-conservado) como de los NE (GE grupos NE de IAH, FIV, ICSI semen fresco e ICSI semen crio-conservado). Los resultados de estas comparaciones se muestran en las **figuras 43 y 44** las **tablas 80-R (MA) y 81-R (MA)**.

Figura 43: GE comunes entre los grupos que logran el embarazo (Grupos E) entre todas las técnicas.



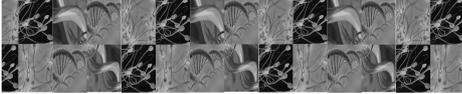
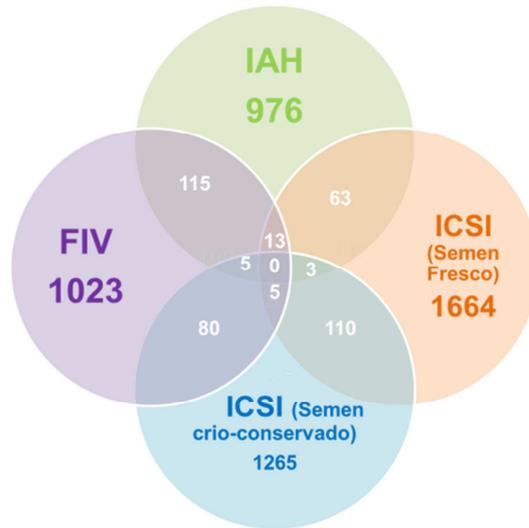


Figura 44: GE comunes entre los grupos que no logran el embarazo (Grupos NE) entre todas las técnicas.

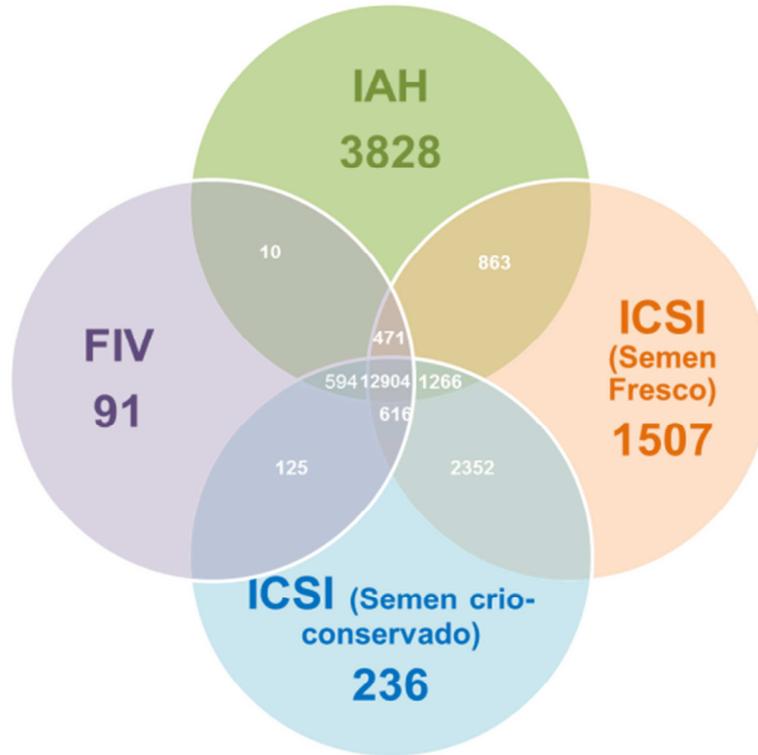


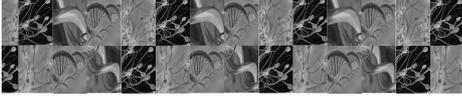
8.3. Totales.

También hemos comparado el número total de genes que se expresan en cada uno de los experimentos de microarrays (IAH, FIV, ICSI semen fresco e ICSI semen crio-conservado). Los resultados están reflejados en la **Figura 45-R**.



Figura 45: Genes totales comunes entre todos los grupos y entre todas las técnicas.

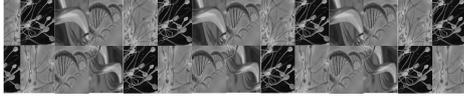




Discusión

*Yo le quería decir la verdad por amarga que fuera
contarle que el universo era más ancho que sus caderas.
Le dibujaba un mundo real no uno color de rosa,
pero ella prefería escuchar mentiras piadosas.*

(Mentiras piadosas. Mentiras Piadosas. Joaquín Sabina)



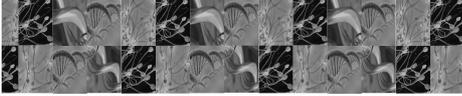
Discusión

Los datos obtenidos en esta tesis nos muestran que hay diferencias entre los grupos que logran un embarazo vs. aquellos que no, en las tres técnicas de reproducción asistida estudiadas, en cuanto a su contenido de ARNm, y que esas diferencias podrían explicar, al menos en parte, el éxito en referencia a la consecución o no de un embarazo.

Los microarrays son herramientas de análisis masivo muy útiles, que en los últimos años han logrado alcanzar gran relevancia. Se describieron por primera vez a mitad de los años noventa (Schena *et al.*, 1995). El hecho de pasar de analizar sólo dos o tres parámetros con técnicas analíticas convencionales como por ejemplo los *western* o *northern blot* o *PCRs* a poder analizar miles de ellos simultáneamente, ha supuesto un gran paso cuantitativo aunque no tanto cualitativo. Y es que la gran ventaja de estos sistemas de análisis masivo, también es su principal hándicap: el análisis de esa proporción de datos de manera conjunta es muy complejo, y nos tenemos que ayudar de programas bioinformáticos para poder extraer conclusiones.

Una de las cuestiones fundamentales es que el hecho de que haya 950 genes diferencialmente expresados en las muestras de semen que logran un embarazo frente a aquellas que no, sólo quiere decir que su contenido de ARNm es diferente pero ¿cuál es el significado biológico de estas cientos de diferencias? Analizar un problema de manera pormenorizada, que contempla 950 variables es algo, hoy por hoy, imposible. Por este motivo en esta tesis se ha intentado hacer una aproximación funcional y una interpretación biológica de estas diferencias mediante la ontología génica.

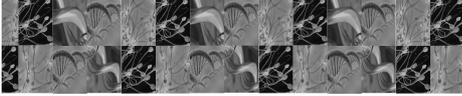
En líneas generales, cuando los listados de GDE son analizados, no hallamos términos ontológicos estadísticamente significativos claramente relacionados con la función reproductiva humana excepto cuando se analiza el



listado de GDE obtenido al analizar las muestras que se someten a una FIV dónde si se observan términos ontológicos estadísticamente significativos relacionados de una forma explícita con la función reproductiva, como por ejemplo **Proceso Reproductivo, Reproducción, Embarazo, Generación de Gametos, Reproducción Sexual, Implantación Embrionaria, Generación de Gametos Masculinos, Espermatogénesis y Penetración de la Zona Pelúcida.**

Como resultado excepcional y que merece una reflexión particular, es aquel obtenido cuando el análisis se realiza sobre muestras de semen que se sometieron previamente a un proceso de crio-preservación convencional como medida de carácter logístico asociado al tratamiento de reproducción asistida aplicado. Los daños que produce la crio-preservación espermática en la composición de la membrana, en los mecanismos de señalización celular o en la actividad mitocondrial han sido extensamente descritos (Meseguer *et al.*, 2004b), también la alteración en la expresión y actividad de determinados genes relacionados con el estrés oxidativo (Meseguer *et al.*, 2004c). En nuestro caso no encontramos GDE en los grupos comparados de pacientes que consiguen o no embarazo. Es posible que los daños producidos por la crio-preservación se hagan extensibles a la integridad del ARNm espermático que se vea claramente afectado, o que el mismo proceso afecte selectivamente a los espermatozoides homogeneizando el nivel de expresión génica que correspondería con la de los espermatozoides que sobreviven al tratamiento de crio-preservación.

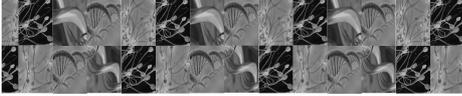
El análisis ontológico nos proporciona una interpretación funcional, sin embargo no nos indica en qué dirección se da esta. En otras palabras, la ontología génica nos proporciona un listado de aquellos términos ontológicos estadísticamente significativos según un listado de genes dados, pero no podemos saber si eso va en detrimento o no de dicho proceso biológico, componente celular o función molecular. Resumiendo, si la espermatogénesis aparece como proceso biológico estadísticamente afectado, no se puede afirmar, de manera rotunda, si



esto significa que está perjudicada o por el contrario, que sea un proceso que funcione mejor en ese grupo, sólo puedo enunciar que está afectada, pero no en qué dirección, sólo podemos hacer suposiciones y conjeturas respecto a lo que pudiera significar esto a nivel funcional.

Otros términos ontológicos con una relación no tan clara con la función reproductiva, estadísticamente significativos cuando analizamos los listados de GDE en cada una de las técnicas, pero que pueden estar correlacionados en cierto grado con el éxito reproductivo y que son comunes en las tres técnicas utilizadas, entre otros muchos, podrían ser la ruta metabólica y componente celular **Lisosoma** y las funciones moleculares de **ión de unión al Cadmio y al Cobre**. Estas podrían estar relacionadas con la vesícula acrosomal, cuyo interior alberga las proteínas proteolíticas que se encargan de degradar la zona pelúcida del ovocito, paso previo e indispensable para su fecundación y que deriva del lisosoma. Por otro lado la presencia de metales pesados, como el cadmio o el cobre, pueden resultar perjudiciales para la fertilidad masculina, por ejemplo, influyendo de manera negativa en la espermatogénesis, de modo que el hecho de que los procesos de detoxificación de estos estén más o menos operativos, puede redundar en la fertilidad de un individuo (Kusakabe *et al.*, 2008a y Kusakabe *et al.*, 2008b).

Por otra parte, al estudiar el análisis ontológico de los listados de los genes exclusivos tanto para el grupo E como el NE para cada una de las técnicas, sólo una minoría de los términos ontológicos que están estadísticamente afectados tienen una relación con el proceso reproductivo humano, como por ejemplo la función molecular de **unión al ácido hialurónico**, estadísticamente afectada cuando analizamos el listado de GE en el grupo E de las IAHs. Durante el proceso de fecundación en humanos las células del cúmulus que rodean al ovocito después del pico de hormona luteinizante, secretan ácido hialurónico, responsable de la expansión o mucificación del mismo y que los espermatozoides tienen receptores de dicha sustancia en la superficie para unirse a él y degradarlo con el fin de



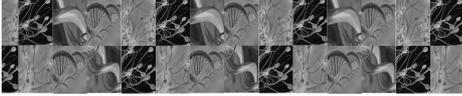
atravesar finalmente las células de la granulosa y contactar con la zona pelúcida. Además la presencia de receptores de ácido hialurónico se constituye como un marcador de madurez espermática y baja tasa de fragmentación de ADN (Kovacs *et al.*, 2011, Nasr-Esfahani *et al.*, 2008) . Algunos procesos relacionados con el desarrollo embrionario están afectados al analizar los GE tanto del grupo que no logra la gestación en las FIVs y las ICSIs con muestras previamente criopreservadas, como de aquel que si la alcanza tras someterse a un tratamiento de ICSI con semen fresco.

Una vez realizado el análisis ontológico de los listados de genes, también efectuamos el análisis de forma inversa, como ya explicábamos en la sección de material y métodos (esto es, cuáles de nuestros genes estaban descritos en algún proceso relacionado con la reproducción y no que términos ontológicos están estadísticamente afectados dados nuestros listados de genes).

En el caso de las IAHS, dentro de los genes descritos en procesos reproductivos entre aquellos diferencialmente expresados entre el grupo que embaraza frente al que no, podíamos resaltar la *PROKC2*, (GDE del grupo E) cuya deficiencia puede ser causante del Síndrome de Kallman (tipo 4), el cual cursa con infertilidad masculina por hipogonadismo secundario (Martin *et al.*, 2011).

Ninguno de los GDE estaba descrito en movilidad espermática, función que se podría presumir más desarrollada o más importante en los espermatozoides que son exitosos en la consecución de un embarazo tras una IAH (o al menos más que en aquellos destinados a una FIV o a una ICSI, donde el recorrido a realizar por el espermatozoide es mucho menor o inexistente en el caso de una ICSI) aunque sí que hallamos uno implicado en la unión y penetración de la zona pelúcida (*B4GALT1*).

Algunos estudios sostienen que los ARNm de los espermatozoides son remanentes que se originaron tras el procesos de espermatogénesis y que en sí



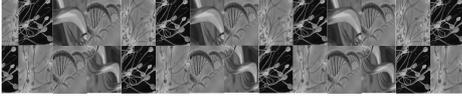
mismos pueden reflejar un monitoreo o seguimiento de este proceso en concreto. Seis de los GDE en el grupo E de las IAHS están descritos en espermatogénesis (*BCL6*, *PROK2*, *RGS2*, *SLC2A14*, *UBR2* y *ZFP41*) y podrían ser susceptibles de ser empleados para el chequeo de este proceso, imprescindible para la fertilidad masculina (Lalancette *et al.*, 2008, Miller and Ostermeier., 2006a, Miller and Ostermeier., 2006b, Miller *et al.*, 2005, Ostermeier *et al.*, 2002, Miller *et al.*, 1999)

La mayoría de genes descritos en procesos biológicos relacionados con la reproducción, responden a procesos más generales como **Reproducción, Proceso Reproductivo, Reproducción sexual, Generación de gametos masculinos o Desarrollo Embrionario**. Esto mismo se repite al analizar los genes diferencialmente expresados en grupo que no logra la gestación tras una IAHS, así como al analizar los listados exclusivos genes exclusivos de ambos grupos (E y NE).

En el caso de la FIV tenemos 8 GDE descritos en la espermatogénesis, 7 en el grupo NE (*TNP2*, *SPATA20*, *OAZ3*, *ODF1*, *SPATA3*, *SPANXA1*, *DNAH9*) y 1 en el grupo E (*RGS2*). Cabe destacar que sólo encontramos un gen implicado en movilidad espermática (*TNP2*) y 2 en penetración de la zona pelúcida, uno en cada grupo (*HEXB* en el E y *TNP2* en el NE).

El gen *TNP2* además está descrito en fecundación y en el proceso de reacción del acrosoma (paso previo e indispensable para la penetración del espermatozoide en el ovocito).

El resto de GDE tanto del grupo E como del NE de las FIVs mayormente están descritos en procesos más generales relacionados con la reproducción como **Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Generación de gametos o Desarrollo Embrionario** (como ya se ha descrito anteriormente en las IAHS).

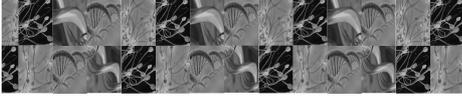


Analizando los listados de genes exclusivos en el caso de las FIV, nos encontramos con lo citado anteriormente, que el conjunto de estos estaba principalmente descrito en **Reproducción, Reproducción sexual, Proceso reproductivo, Generación de gametos o Desarrollo Embrionario**, aunque caben destacar 3 genes entre los GE del grupo E descritos en **Implantación Embrionaria (IGFBP7)** ; **Fecundación (SYT6)** y **Unión del espermatozoide a la zona pelúcida (ZP2)** y otros 2 GE del grupo NE implicados en **Implantación Embrionaria (CALCA y LIF)**.

Cuando estudiamos los GDE previamente descritos en procesos reproductivos en el caso de la técnica ICSI con semen fresco, ninguno de ellos lo está en procesos tales como de movilidad espermática o penetración de la zona pelúcida. Según este análisis ontológico, podemos pensar que las muestras destinadas para ICSI realmente no requieren ni movilidad, ni penetrar la zona pelúcida ya que el espermatozoide es inyectado directamente al ovocito así que por ello no encontramos diferencias en este tipo de genes en las muestras E y NE.

Además, entre los 44 GDE del grupo E identificamos 2 grupos que podrían influir a la hora de lograr el embarazo: registramos 4 catepsinas y 6 metalotioninas. Las catepsinas conforman una familia de proteasas de cisteína que han sido ampliamente descritas en procesos proteolíticos y desempeñan un papel importante en la remodelación de los epitelios seminíferos de los testículos, aunque esto de momento se ha descrito mayormente en modelos animales como de roedores (Anway *et al.*, 2004 y Jervis and Robaire , 2001).

En esta línea de evidencias, el cadmio puede ser causante de diversos trastornos en los testículos, y metalotioneína es conocida como una proteína que tiene una función de la desintoxicación de metales pesados. Algunos estudios proponen que la metalotioneína es inducida por el cadmio en espermatogonias, espermaticitos y células de Sertoli, y está implicada en la resistencia al daño tisular



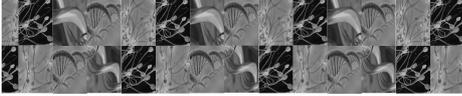
inducido por este metal pesado, así que puede jugar un papel en la función reproductiva masculina (Kusakabe *et al.*, 2008a y Kusakabe *et al.*, 2008b).

Cuando estudiamos los listados de GE, tanto en el grupo E como el NE, observamos la misma tendencia referida ya anteriormente en el caso de las IAHs y las FIVs, esto es que la mayoría de los genes están descritos, nuevamente, en **Reproducción, Proceso Reproductivo, Desarrollo embrionario o Generación de gametos masculinos.**

Hasta el momento, en todas las técnicas estudiadas, hemos encontrado tanto diferencias en cuanto a la expresión diferencial, como aquella que hemos denominado exclusiva, sin embargo, cuando lo que analizamos es la expresión diferencial cuando los que se analizan son los microarrays de muestras de semen previamente crio-conservadas que logran o no gestación no observamos ninguna diferencia, el posible origen de estas ausencias ha sido comentado previamente. No obstante, sí que se ven diferencias en cuanto a la expresión exclusiva y son estas variaciones las que podrían explicar, en parte el mayor o menor éxito reproductivo de estas muestras y como pasa en los casos anteriores están mayormente descritos en los procesos de **Desarrollo Embrionario, Reproducción o Proceso Reproductivo.**

Analizando los GDE en los grupos que logran el embarazo y que son comunes a las tres técnicas, observamos que hay más genes comunes entre IAH y FIV (55 genes) que entre IAH e ICSI (20 genes), esto es totalmente comprensible, porque hay más semejanzas entre las acciones que debe realizar el espermatozoide para conseguir una fecundación exitosa entre la IAH y el FIV que entre la IAH y el ICSI.

Al comparar finalmente todos los GDE del grupo que logra la gestación encontramos que 12 son comunes a las 3 técnicas, lo que hemos denominado para estas muestras como el "paquete molecular básico de fertilidad". De esos 12 genes,



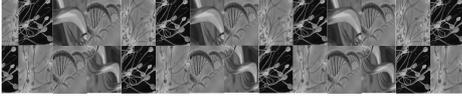
sólo la *GRN* estaba previamente descrita en procesos relacionados con la reproducción tales como **Desarrollo de los genitales, Reproducción, Proceso Reproductivo e Implantación Embrionaria**.

Cuando lo que comparamos son los GDE correspondientes a los grupos que no embarazan en las tres técnicas estudiadas, sólo hallamos genes comunes entre las IAH y el FIV (*CFC1, CGB1, CHRDL1, FDPSL4, VPS18* y *WDR21C*).

Una gran parte de los GDE están implicados (tanto de los grupos E como NE en las 3 técnicas) en el desarrollo embrionario, lo que sustentaría la hipótesis de autores como Miller, Krawet y Ostermeier que mantienen que algunos ARNm están implicados en el desarrollo embrionario (Lalancette *et al.*, 2008, Miller and Ostermeier., 2006a, Miller and Ostermeier., 2006b, Miller *et al.*, 2005).

También se observa una tendencia a la baja en cuanto al número de GDE entre las técnicas, ya que este va disminuyendo conforme mayor es la intervención por parte del embriólogo, lo que podría suponer una menor exigencia en cuanto a los requerimientos a cumplir por parte del espermatozoide para llevar a cabo la fecundación, desarrollo embrionario y finalmente la consecución de un embarazo cuanto más invasiva es la técnica,

Un hecho que nos llamó la atención una vez analizados los datos fue que en la expresión exclusiva, a pesar de suponer una mayor cantidad de genes que aquellos que están diferencialmente expresados, no encontramos ninguno común a las tres técnicas, tanto en el grupo E como el NE. Este hecho, unido a que muchos de los genes exclusivos de los grupos NE estaban descritos en procesos con una clara función reproductiva, nos hace considerar que las diferencias halladas a nivel de expresión exclusiva podrían tener un menor peso que aquellas que expresándose en los dos grupos, lo hace de diferente manera (esto es la expresión diferencial). Y lo pensamos porque si en la expresión exclusiva, hay genes relacionados con funciones reproductivas tanto en los grupos E y NE como por



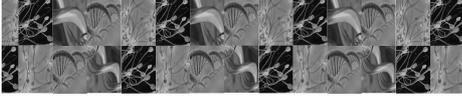
ejemplo, el desarrollo embrionario o con embarazo, bien puede ser que este gen no tenga tanto valor en dichos procesos o que sea una combinación de genes exclusivos la que confiera una mayor probabilidad de lograr o no un embarazo, que se puede dar o no, y que desconocemos cual podría ser.

Otros aspectos a tener en cuenta es que los datos obtenidos en esta tesis, aunque reveladores e innovadores en cuanto al modelo experimental, son difícilmente reproducibles de una manera exacta, ya que estamos hablando de datos obtenidos por *pools* y que además si estos experimentos se hubieran realizado con diferentes poblaciones, probablemente los resultados hubieran sido diferentes, no en cuanto a la conclusión de que el contenido de ARNm difiere en las muestras se semen que logran o no una gestación sino en cuanto a cuáles son esos genes y su función biológica.

El conjunto de ARNm presentes en el espermatozoide, es una población altamente heterogénea, difícilmente caracterizable y que además puede estar supeditada a la maquinaria de reparación del ovocito.

Las limitaciones de nuestro estudio nos hacen ser cautelosos en cuanto a los resultados obtenidos, ya que para la consecución de un embarazo influyen innumerables factores que nosotros no podemos controlar. Lo único que hemos podido hacer es estandarizar al máximo todos los factores posibles para que fuera el factor masculino el de mayor peso para cada una de las técnicas estudiadas. Por lo tanto, lo más innovador de esta tesis es su diseño experimental, totalmente novedoso dentro de la literatura científica, que ha supuesto una extremadamente cuidadosa selección y recolección de las muestras estudiadas en esta tesis.

Para hacernos una idea de la delicada recolección de las muestras necesarias para este estudio, en la clínica IVI Valencia, donde se han recogido las muestras, según datos de 2010, se realizaron alrededor de 3000 ciclos de IAH al año, sin embargo, alrededor de 50 IAHs fueron las que cumplían los criterios de

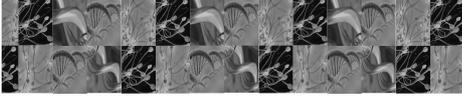


inclusión requeridos para el estudio, lo que supone aproximadamente el 1,6% del total que se hacen al año, si a esto sumamos que sólo el 20% de las parejas que se someten a una IAH se quedan embarazadas en su primer intento y que además, cuando se hace la extracción de ARNm de estas no siempre este es de calidad óptima para realizar los microarrays, para conseguir las 10 muestras que lograban el embarazo se tardó algo más de un año.

En cuanto a la recolección de las muestras de FIV, el problema era que esta técnica funcionaba extremadamente bien, si en el caso de las IAHs era difícil conseguir aquellas que lograban alcanzar una gestación, aquí fue complejo conseguir aquellas que no lo lograban tras someterse a una FIV, además de ser la técnica que menos se empleaba en la rutina clínica (aproximadamente unos 450 ciclos, frente a los 3300 que se realizaron de ICSI). En este caso se tardó aproximadamente 2 años y medio en conseguir las muestras para realizar los experimentos de microarrays. En un principio, se intentaron recoger muestras de FIVs siguiendo el mismo modelo que se usó en las ICSIs (donante para 2 receptoras, logrando sólo una de ellas la gestación), sin embargo, el bajo número de ciclos de FIVs frente a los de ICSIs no lo hizo viable.

En el caso de los procedimientos de ICSI (se realizan unos 3300 ciclos de ICSI por año), lo que hay que tener en cuenta es que necesitábamos un proceso en el que una sola donante donara sus ovocitos a dos receptoras distintas que se sometieran al mismo procedimiento y con el mismo tipo de semen (esto es en fresco o con semen crio-conservado) y que además una de estas receptoras quedara embarazada y la otra no. La mayoría de veces, una donante sólo tiene una receptora y cuando le da a más pueden tratarse de procedimientos o tipos de semen distintos.

Finalmente, los modelos experimentales descritos en este trabajo de tesis doctoral, para cada una de las técnicas estudiadas, son los que nos han permitido una mayor estandarización del factor femenino, sin embargo este no ha podido ser



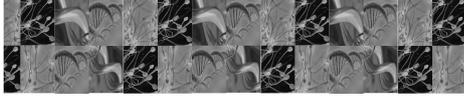
completamente anulado como factor de distorsión. Está claro que lo ideal para hacer este estudio hubiera sido poder analizar el espermatozoide que individualmente conseguía la gestación, cosa que evidentemente, era imposible.

Otro dato a tener en cuenta es que, a pesar de encontrar grandes diferencias entre las poblaciones de espermatozoides que lograban o no una gestación para cada una de las técnicas estudiadas, estas diferencias pueden estar diluidas respecto al poder reparador del ovocito. En algunos casos, como cuando se estudia la fragmentación del ADN espermático, se observa que este no afecta en exceso a la calidad embrionaria o tasas de gestación y esto se cree que es debido, principalmente a la capacidad reparadora del ovocito. Podíamos pensar que si el ovocito es capaz de reparar o solucionar problemas en el ADN espermático también podría ser capaz de puentear o “bypassear” posibles carencias de determinados ARNm que pudieran ser importantes para alcanzar una gestación.

El nacimiento de las técnicas que nos permiten analizar muchas variables a la vez, viene de la mano del desarrollo de programas informáticos que permiten el análisis conjunto de tantas variables. En esta tesis nos hemos servido de un par de ellos: *Gene Ontology* y *David Genes*.

Como ya hemos comentado anteriormente, la cantidad inmensa de información que generan los experimentos de microarrays, pueden conducirnos a un estado de ansiedad a la hora de sacar información determinada y concreta, de ahí uno de los grandes retos de esta tesis que ha sido encontrar la forma más sencilla y sistemática de presentar los datos. Por este motivo nos servimos de esos programas bioinformáticos, que nos ayudarán a dirigir nuestras investigaciones en una dirección determinada.

Concluyendo y a modo de resumen, la mayoría de términos ontológicos estadísticamente afectados cuando analizamos los diferentes listados de genes no están relacionados con funciones reproductivas, al menos directamente. Muchos de



los términos ontológicos son comunes a todas las técnicas y por norma se tratan de términos que podríamos denominar de patrón ubícuo. Además, cuando nos referimos a los GDE y GE de los distintos listados que previamente estaban descritos en procesos relacionados con la reproducción, sólo un pequeño porcentaje de todos los que aparecen en los listados lo está, lo que nos indica que aún existe un gran desconocimiento sobre la fisiología del espermatozoide

Los datos nos revelan que existen diferencias entre las muestras que embarazan y las que no para cada una de las técnicas, sin embargo es difícil saber exactamente cómo afectan estas diferencias al potencial reproductivo de las muestras de semen.

Esta tesis pretende contribuir en un futuro uso diagnóstico de la tecnología del microarray para potenciar el poder diagnóstico del espermiograma, o bien para seleccionar nuevas moléculas marcadoras para una mejor selección de los espermatozoides en los TRAs, como ha ocurrido en otras disciplinas, por ejemplo en el caso de la oncología, donde esta herramienta de análisis masivo se usa a la hora de clasificar, diagnosticar e incluso seleccionar el tratamiento en diferentes tipos de cáncer (Brinkmann and Wong., 2011, Reis-Filho and Puztai., 2011, Yoshihara *et al.*, 2010).

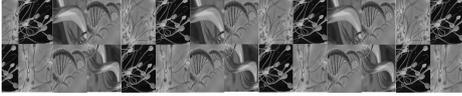
Se necesitan mucho más estudios en esta dirección, probando primero con muestras individuales de pacientes y quizá con modelos animales *knock-out* con los que se pueda comprobar la implicación funcional biológica real de las diferencias halladas.



Transcriptómica de la infertilidad masculina

Discusión

Sandra García Herrero. 2012



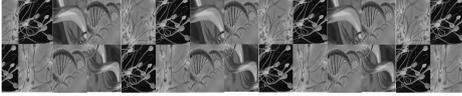
Conclusiones

En Macondo comprendí, que al lugar donde has sido feliz, no debieras tratar de volver.

(Peces de ciudad. Dímelo en la Calle. Joaquín Sabina)

***Cuando al punto final de los finales
no le siguen dos puntos suspensivos...***

(Lo peor del amor. Joaquín Sabina)



Conclusiones

- El contenido de ARNm presente en los espermatozoides difiere profundamente entre aquellas muestras procedentes de pacientes que logran un embarazo frente a aquellas que no (tanto cuando nos referimos a los genes exclusivos como a aquellos diferencialmente expresados).
- La población de ARNm diferentes entre muestras de espermatozoides con las que se consigue una gestación o no, también es distinta en un elevado grado según la técnica de reproducción asistida que estudiemos.
- El número de genes diferencialmente expresados es menor cuanto más invasiva es la técnica, lo que puede indicar que los requerimientos moleculares para la consecución exitosa de una gestación son menos cuanto mayor es el número de barreras biológicas que se evitan con las técnicas de reproducción asistida.
- Existe un alto grado de desconocimiento de la fisiología espermática, desde el punto de vista de que sólo un bajo porcentaje de la población de ARNm que aparece descrita en esta tesis, relacionados con los resultados reproductivos de las diferentes técnicas, han sido previamente descritos en ninguna función relacionada con la reproducción.
- Lo anteriormente mencionado nos lleva a concluir que el uso de microarrays para predecir los resultados de reproducción asistida, es una posibilidad real, que deberá contrastarse prospectivamente en un estudio clínico para determinar la capacidad de clasificación de la prueba.



Bibliografía

- Abu-Hassan,D., Koester,F., Shoepfer,B., Schultze-Mosgau,A., Asimakopoulos, B., Diedrich, K., Al-Hasani,S. 2006 . Comet assay of cumulus cells and spermatozoa DNA status, and the relationship to oocyte fertilization and embryo quality following ICSI. *Reprod.Biomed.Online.* 12, 447-452
- Agarwal,A., Gupta,S., Sikka,S. 2006 . The role of free radicals and antioxidants in reproduction. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 18, 325-332
- Agarwal,A., Said,T.M. 2005 . Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male infertility: a clinical approach. *BJU Int.* 95, 503-507
- Aguilar,C., Meseguer,M., Garcia-Herrero,S., Gil-Salom,M., O'Connor,J.E., Garrido,N. 2009 . Relevance of testicular sperm DNA oxidation for the outcome of ovum donation cycles. *Fertil.Steril.*
- Altmae,S., Salumets,A. 2011 . A novel genomic diagnostic tool for sperm quality? *Reprod.Biomed.Online.*
- Anway,M.D., Wright,W.W., Zirkin,B.R., Korah,N., Mort,J.S., Hermo,L. 2004 . Expression and localization of cathepsin k in adult rat sertoli cells. *Biol.Reprod.* 70, 562-569
- Barrett,J.C., Kawasaki,E.S. 2003 . Microarrays: the use of oligonucleotides and cDNA for the analysis of gene expression. *Drug Discov.Today.* 8, 134-141
- Benadiva,C.A., Nulsen,J., Siano,L., Jennings,J., Givargis,H.B., Maier,D. 1999 . Intracytoplasmic sperm injection overcomes previous fertilization failure with conventional in vitro fertilization. *Fertil.Steril.* 72, 1041-1044



- Benagiano,G., Bastianelli,C., Farris,M. 2006 . Infertility: a global perspective. *Minerva Ginecol.* 58, 445-457
- Bosch,E., Valencia,I., Escudero,E., Crespo,J., Simon,C., Remohi,J., Pellicer,A. 2003 . Premature luteinization during gonadotropin-releasing hormone antagonist cycles and its relationship with in vitro fertilization outcome. *Fertil.Steril.* 80, 1444-1449
- Boomsma,C.M., Heineman,M.J., Cohlen,B.J., Farquhar,C. 2007 . Semen preparation techniques for intrauterine insemination. *Cochrane Database Syst.Rev.* (4), CD004507
- Brinkmann,O., Wong,D.T. 2011 . Salivary transcriptome biomarkers in oral squamous cell cancer detection. *Adv.Clin.Chem.* 55, 21-34
- Brinkworth,M.H., Nieschlag,E. 2000 . Association of cyclophosphamide-induced male-mediated, foetal abnormalities with reduced paternal germ-cell apoptosis. *Mutat.Res.* 447, 149-154
- Brugo-Olmedo,S., Chillik,C., Kopelman,S. 2003 . Definición y causas de la infertilidad. *RCOG.* 54, 227-248
- Bungum,M., Humaidan,P., Axmon,A., Spano,M., Bungum,L., Erenpreiss,J., Giwercman,A. 2007 . Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome. *Hum.Reprod.* 22, 174-179
- Bungum,M., Humaidan,P., Spano,M., Jepson,K., Bungum,L., Giwercman,A. 2004 . The predictive value of sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters for the outcome of intrauterine insemination, IVF and ICSI. *Hum.Reprod.* 19, 1401-1408



- Carrell,D.T., Emery,B.R., Hammoud,S. 2007 . Altered protamine expression and diminished spermatogenesis: what is the link? *Hum.Reprod.Update.* 13, 313-327
- Carrell,D.T., Liu,L., Peterson,C.M., Jones,K.P., Hatasaka,H.H., Erickson,L., Campbell,B. 2003 . Sperm DNA fragmentation is increased in couples with unexplained recurrent pregnancy loss. *Arch.Androl.* 49, 49-55
- Cedenho,A.P., Lima,S.B., Cenedeze,M.A., Spaine,D.M., Ortiz,V., Oehninger,S. 2006 . Oligozoospermia and heat-shock protein expression in ejaculated spermatozoa. *Hum.Reprod.* 21, 1791-1794
- Chohan,K.R., Griffin,J.T., Lafromboise,M., De Jonge,C.J., Carrell,D.T. 2006 . Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. *J.Androl.* 27, 53-59
- Cobo,A., Domingo,A., Pérez,S., Crespo,J., Remohí,J., Pellicer,A. 2008 . Vitrification: an effective new approach to oocyte banking and preserving fertility in cancer patients *Clin Transl Oncol.* 10, 268-273
- Cobo,A., Diaz,C. 2011 . Clinical application of oocyte vitrification: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Fertil.Steril.* 96, 277-285
- De Kretze,r.D., Dennis,P., Hudson,B., Leeton,J., Lopata,A., Outch,K., Talbot,J., Wood,C. 1973 . Transfer of a human zygote. 29, 728-729
- de Lamirande,E., O'Flaherty,C. 2008 . Sperm activation: role of reactive oxygen species and kinases. *Biochim.Biophys.Acta.* 1784, 106-115



- Diaz-Gimeno,P., Horcajadas,J.A., Martinez-Conejero,J.A., Esteban,F.J., Alama,P., Pellicer,A., Simon,C. 2011 . A genomic diagnostic tool for human endometrial receptivity based on the transcriptomic signature. *Fertil.Steril.* 95, 50-60
- Diaz,I., Navarro,J., Blasco,L., Simon,C., Pellicer,A., Remohi,J. 2000 . Impact of stage III-IV endometriosis on recipients of sibling oocytes: matched case-control study. *Fertil.Steril.* 74, 31-34
- Enciso,M., Muriel,L., Fernandez,J.L., Goyanes,V., Segrelles,E., Marcos,M., Montejo,J.M., Ardoy,M., Pacheco,A., Gosalvez,J. 2006 . Infertile men with varicocele show a high relative proportion of sperm cells with intense nuclear damage level, evidenced by the sperm chromatin dispersion test. *J.Androl.* 27, 106-111
- Ergur,A.R., Dokras,A., Giraldo,J.L., Habana,A., Kovanci,E., Huszar,G. 2002 . Sperm maturity and treatment choice of in vitro fertilization (IVF) or intracytoplasmic sperm injection: diminished sperm HspA2 chaperone levels predict IVF failure. *Fertil.Steril.* 77, 910-918
- Escriba,M.J., Bellver,J., Bosch,E., Sanchez,M., Pellicer,A., Remohi,J. 2006 . Delaying the initiation of progesterone supplementation until the day of fertilization does not compromise cycle outcome in patients receiving donated oocytes: a randomized study. *Fertil.Steril.* 86, 92-97
- ESHRE Capri Workshop Guidelines to the prevalence, diagnosis, treatment and management of infertility, 1996 *Human Reproduction* vol 11 no 8 pp 1775-1807, 19%



- ESHRE Capri Workshop Group 2009 . Intrauterine insemination. Hum.Reprod.Update. 15, 265-277
- Evenson,D., Wixon,R. 2006 . Meta-analysis of sperm DNA fragmentation using the sperm chromatin structure assay. Reprod.Biomed.Online. 12, 466-472
- Fernandez,J.L., Muriel,L., Goyanes,V., Segrelles,E., Gosalvez,J., Enciso,M., LaFromboise,M., De Jonge,C. 2005a . Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. Fertil.Steril. 84, 833-842
- Fernandez,J.L., Muriel,L., Goyanes,V., Segrelles,E., Gosalvez,J., Enciso,M., LaFromboise,M., De Jonge,C. 2005b . Halosperm is an easy, available, and cost-effective alternative for determining sperm DNA fragmentation. Fertil.Steril. 84, 860
- Fox,M.S., Ares,V.X., Turek,P.J., Haqq,C., Reijo Pera,R.A. 2003 . Feasibility of global gene expression analysis in testicular biopsies from infertile men. Mol.Reprod.Dev. 66, 403-421
- Garcia-Herrero,S., Meseguer,M., Martinez-Conejero,J.A., Remohi,J., Pellicer,A., Garrido,N. 2009 . The transcriptome of spermatozoa employed in homologous intrauterine insemination (IUI) varies considerably between samples that achieve pregnancy and those that do not. Fertil Steril.
- Garcia-Herrero,S., Garrido,N., Martinez-Conejero,J.A., Remohi,J., Pellicer,A., Meseguer,M. 2011 . Differential transcriptomic profile in spermatozoa achieving pregnancy or not via ICSI. Reprod.Biomed.Online. 22, 25-36



- Garrido,N., Meseguer,M., Simon,C., Pellicer,A., Remohi,J. 2004 . Pro-oxidative and anti-oxidative imbalance in human semen and its relation with male fertility. *Asian J.Androl.* 6, 59-65
- Garrido,N., Melo,M., Simon,C., Remohi,J., Pellicer,A., Meseguer,M. 2007 . Ovarian stimulation length, number of follicles higher than 17 mm and estradiol on the day of human chorionic gonadotropin administration are the risk factors for multiple pregnancy in intrauterine insemination. 6, 19-26
- Garrido,N., Remohi,J., Martínez-Conejero,J.A., García-Herrero,S., Pellicer,A., Meseguer,M. 2008 . Contribution of sperm molecular features to embryo quality and assisted reproduction success. *Reprod.Biomed.Online.* 17, 855-865
- Garrido, N., Martínez-Conejero, J.A., Jauregui, J., Horcajadas, J.A., Simón, C., Remohí, J., Meseguer, M. 2009. Microarray analysis in sperm from fertile and infertile men without basic sperm analysis abnormalities reveals a significantly different transcriptome. *Fertil.Steril.* 91, 1307-1310
- Gil-Salom,M., Romero,J., Rubio,C., Ruiz,A., Remohi,J., Pellicer,A. 2000 . Intracytoplasmic sperm injection with cryopreserved testicular spermatozoa. *Mol.Cell.Endocrinol.* 169, 15-19
- Gomez,E., Buckingham,D.W., Brindle,J., Lanzafame,F., Irvine,D.S., Aitken,R.J. 1996 . Development of an image analysis system to monitor the retention of residual cytoplasm by human spermatozoa: correlation with biochemical markers of the cytoplasmic space, oxidative stress, and sperm function. *J.Androl.* 17, 276-287



- Guerin,P., El Mouatassim,S., Menezo,Y. 2001 . Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum.Reprod.Update.* 7, 175-189
- Henkel,R., Kierspel,E., Hajimohammad,M., Stalf,T., Hoogendijk,C., Mehnert,C., Menkveld,R., Schill,W.B., Kruger,T.F. 2003 . DNA fragmentation of spermatozoa and assisted reproduction technology. *Reprod.Biomed.Online.* 7, 477-484
- Henkel,R., Hajimohammad,M., Stalf,T., Hoogendijk,C., Mehnert,C., Menkveld,R., Gips,H., Schill,W.B., Kruger,T.F. 2004 . Influence of deoxyribonucleic acid damage on fertilization and pregnancy. *Fertil.Steril.* 81, 965-972
- Horcajadas,J.A., Pellicer,A., Simon,C. 2007 . Wide genomic analysis of human endometrial receptivity: new times, new opportunities. *Hum.Reprod.Update.* 13, 77-86
- Irvine,D.S., Twigg,J.P., Gordon,E.L., Fulton,N., Milne,P.A., Aitken,R.J. 2000 . DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *J.Androl.* 21, 33-44
- Jervis,K.M., Robaire,B. 2001 . Dynamic changes in gene expression along the rat epididymis. *Biol.Reprod.* 65, 696-703
- Khorram,O., Patrizio,P., Wang,C., Swerdloff,R. 2001 . Reproductive technologies for male infertility. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 86, 2373-2379
- Kliesch,S., Cooper,T.G. 2008 . Semen analysis: spermogram according to WHO criteria. *Urologe A.* 47, 1548, 1550-4



- Kodama,H., Yamaguchi,R., Fukuda,J., Kasai,H.Tanaka,T. 1997 . Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. *Fertil.Steril.* 68, 519-524
- Kovacs,P., Kovats,T., Sajgo,A., Szollosi,J., Matyas,S., Kaali,S.G. 2011 . The role of hyaluronic acid binding assay in choosing the fertilization method for patients undergoing IVF for unexplained infertility. *J.Assist.Reprod.Genet.* 28, 49-54
- Krawetz,S.A. 2005a . Paternal contribution: new insights and future challenges. *Nat.Rev.Genet.* 6, 633-642
- Krawetz,S.A. 2005b . On the significance of RNA in human sperm. *Zhonghua Nan Ke Xue.* 11, 170-174
- Kusakabe,T., Nakajima,K., Nakazato,K., Suzuki,K., Takada,H., Satoh,T., Oikawa,M., Arakawa,K., Nagamine,T. 2008a . Changes of heavy metal, metallothionein and heat shock proteins in Sertoli cells induced by cadmium exposure. *Toxicol.In.Vitro.* 22, 1469-1475
- Kusakabe,T., Nakajima,K., Suzuki,K., Nakazato,K., Takada,H., Satoh,T., Oikawa,M., Kobayashi,K., Koyama,H., Arakawa,K., Nagamine,T. 2008b . The changes of heavy metal and metallothionein distribution in testis induced by cadmium exposure. *Biometals.* 21, 71-81
- Lahteenmaki,A., Reima,I.,Hovatta,O. 1995 . Treatment of severe male immunological infertility by intracytoplasmic sperm injection. *Hum.Reprod.* 10, 2824-2828



- Lalancette,C., Miller,D., Li,Y., Krawetz,S.A. 2008 . Paternal contributions: New functional insights for spermatozoal RNA. *J.Cell.Biochem.*
- Larson,K.L., DeJonge,C.J., Barnes,A.M., Jost,L.K., Evenson,D.P. 2000 . Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques. *Hum.Reprod.* 15, 1717-1722
- Lewis,S.E. 2007 . Is sperm evaluation useful in predicting human fertility? *Reproduction.* 134, 31-40
- Liebaers,I., Sermon,K., Staessen,C., Joris,H., Lissens,W., Van Assche,E., Nagy,P., Bonduelle,M., Vandervorst,M., Devroey,P., Van Steirteghem,A. 1998 . Clinical experience with preimplantation genetic diagnosis and intracytoplasmic sperm injection. *Hum.Reprod.* 13 Suppl 1, 186-195
- Maganto-Pavón,E. 2003 . Enrique IV de Castilla (1454-1474). Un singular enfermo urológico. Una endocrinopatía causa de los problemas uro-andrológicos del monarca. Infertilidad o esterilidad. Intentos de inseminación artificial (IV). *Arch Esp Urol.* 56, 245-254
- Mandelbaum,J., Antoine,J.M., Plachot,M., Belaisch-Allart,J., Salat-Baroux,J. 1997 . Are there indications for intra-cytoplasmic sperm injection in female infertility? *Contracept.Fertil.Sex.* 25, 607-610
- Martin,C., Balasubramanian,R., Dwyer,A.A., Au,M.G., Sidis,Y., Kaiser,U.B., Seminara,S.B., Pitteloud,N., Zhou,Q.Y., Crowley,W.F.,Jr 2011 . The role of the prokineticin 2 pathway in human reproduction: evidence from the study of human and murine gene mutations. *Endocr.Rev.* 32, 225-246



- Martínez-Conejero, J.A., Garrido, N., Remohi, J., Pellicer, A., Simon, C., Meseguer, M. 2008 . MUC1 in human testis and ejaculated spermatozoa and its relationship to male fertility status. *Fertil.Steril.* 90, 450-452
- Meseguer, M., Garrido, N., Remohi, J., Pellicer, A., Simon, C., Martínez-Jabaloyas, J.M., Gil-Salom, M. 2003 . Testicular sperm extraction (TESE) and ICSI in patients with permanent azoospermia after chemotherapy. *Hum.Reprod.* 18, 1281-1285
- Meseguer, M., Garrido, N., Martínez-Conejero, J.A., Simon, C., Pellicer, A., Remohi, J. 2004a . Relationship between standard semen parameters, calcium, cholesterol contents, and mitochondrial activity in ejaculated spermatozoa from fertile and infertile males. *J.Assist.Reprod.Genet.* 21, 445-451
- Meseguer, M., Garrido, N., Martínez-Conejero, J.A., Simon, C., Pellicer, A., Remohi, J. 2004b . Role of cholesterol, calcium, and mitochondrial activity in the susceptibility for cryodamage after a cycle of freezing and thawing. *Fertil.Steril.* 81, 588-594
- Meseguer, M., Garrido, N., Simon, C., Pellicer, A., Remohi, J. 2004c . Concentration of glutathione and expression of glutathione peroxidases 1 and 4 in fresh sperm provide a forecast of the outcome of cryopreservation of human spermatozoa. *J.Androl.* 25, 773-780
- Meseguer, M., Martínez-Conejero, J.A., O'Connor, J.E., Pellicer, A., Remohi, J., Garrido, N. 2008 . The significance of sperm DNA oxidation in embryo development and reproductive outcome in an oocyte donation program: a new model to study a male infertility prognostic factor. *Fertil.Steril.* 89, 1191-1199



- Miller,D., Briggs,D., Snowden,H., Hamlington,J., Rollinson,S., Lilford,R., Krawetz,S.A. 1999 . A complex population of RNAs exists in human ejaculate spermatozoa: implications for understanding molecular aspects of spermiogenesis. *Gene*. 237, 385-392
- Miller,D., Ostermeier,G.C., Krawetz,S.A. 2005 . The controversy, potential and roles of spermatozoal RNA. *Trends Mol.Med*. 11, 156-163
- Miller,D., Ostermeier,G.C. 2006a . Towards a better understanding of RNA carriage by ejaculate spermatozoa. *Hum.Reprod.Update*. 12, 757-767
- Miller,D., Ostermeier,G.C. 2006b . Spermatozoal RNA: Why is it there and what does it do? *Gynecol.Obstet.Fertil*. 34, 840-846
- Morris,I.D., Ilott,S., Dixon,L., Brison,D.R. 2002 . The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (Comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development. *Hum.Reprod*. 17, 990-998
- Muriel,L., Garrido,N., Fernandez,J.L., Remohi,J., Pellicer,A., de los Santos,M.J., Meseguer,M. 2006a . Value of the sperm deoxyribonucleic acid fragmentation level, as measured by the sperm chromatin dispersion test, in the outcome of in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil.Steril*. 85, 371-383
- Nagy,Z.P., Verheyen,G., Liu,J., Joris,H., Janssenswillen,C., Wisanto,A., Devroey,P., Van Steirteghem,A.C. 1995 . Results of 55 intracytoplasmic sperm injection cycles in the treatment of male-immunological infertility. *Hum.Reprod*. 10, 1775-1780



- Nallella,K.P., Sharma,R.K., Aziz,N., Agarwal,A. 2006 . Significance of sperm characteristics in the evaluation of male infertility. *Fertil.Steril.* 85, 629-634
- Nasr-Esfahani,M.H., Razavi,S., Vahdati,A.A., Fathi,F., Tavalae,M. 2008 . Evaluation of sperm selection procedure based on hyaluronic acid binding ability on ICSI outcome. *J.Assist.Reprod.Genet.* 25, 197-203
- Nikolettos,N., Al-Hasani,S., Baukloh,V., Schopper,B., Demirel,L.C., Baban,N., Sturm,R., Rudolf,K., Tomalak,K., Tinneberg,H.R., Diedrich,K. 1999 . The outcome of intracytoplasmic sperm injection in patients with retrograde ejaculation. *Hum.Reprod.* 14, 2293-2296
- Ochsendorf,F.R. 1999 . Infections in the male genital tract and reactive oxygen species. *Hum.Reprod.Update.* 5, 399-420
- Ostermeier,G.C., Dix,D.J., Miller,D., Khatri,P., Krawetz,S.A. 2002 . Spermatozoal RNA profiles of normal fertile men. *Lancet.* 360, 772-777
- Ostermeier,G.C., Miller,D., Huntriss,J.D., Diamond,M.P., Krawetz,S.A. 2004 . Reproductive biology: delivering spermatozoan RNA to the oocyte. *Nature.* 429, 154
- Ostermeier,G.C., Goodrich,R.J., Diamond,M.P., Dix,D.J., Krawetz,S.A. 2005 . Toward using stable spermatozoal RNAs for prognostic assessment of male factor fertility. *Fertil.Steril.* 83, 1687-1694
- Palermo,G., Joris,H., Devroey,P., Van Steirteghem,A.C. 1992 . Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet.* 340, 17-18



- Parrington,J., Jones,M.L., Tunwell,R., Devader,C., Katan,M., Swann,K. 2002 . Phospholipase C isoforms in mammalian spermatozoa: potential components of the sperm factor that causes Ca²⁺ release in eggs. *Reproduction*. 123, 31-39
- Reis-Filho,J.S., Pusztai,L. 2011 . Gene expression profiling in breast cancer: classification, prognostication, and prediction. *Lancet*. 378, 1812-1823
- Romany,L., Meseguer,M., Remohí,J., Pellicer,A., Garrido,N. 2009 . Métodos para la selección objetiva de espermatozoides competentes. *RIF*. 26, 425-435
- Said,T.M., Agarwal,A., Sharma,R.K., Thomas,A.J.,Jr., Sikka,S.C. 2005 . Impact of sperm morphology on DNA damage caused by oxidative stress induced by beta-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate. *Fertil.Steril*. 83, 95-103
- Sailer,B.L., Jost,L.K., Evenson,D.P. 1995 . Mammalian sperm DNA susceptibility to in situ denaturation associated with the presence of DNA strand breaks as measured by the terminal deoxynucleotidyl transferase assay. *J.Androl*. 16, 80-87
- Sakkas,D., Mariethoz,E., Manicardi,G., Bizzaro,D., Bianchi,P.G., Bianchi,U. 1999 . Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev.Reprod*. 4, 31-37
- Santiso,R., Tamayo,M., Gosalvez,J., Meseguer,M., Garrido,N., Fernandez,J.L. 2010 . Simultaneous determination in situ of DNA fragmentation and 8-oxoguanine in human sperm. *Fertil.Steril*. 93, 314-318



- Schatte,E.C., Orejuela,F.J., Lipshultz,L.I., Kim,E.D., Lamb,D.J. 2000 . Treatment of infertility due to anejaculation in the male with electroejaculation and intracytoplasmic sperm injection. *J.Urol.* 163, 1717-1720
- Schatten,G. 1994 . The centrosome and its mode of inheritance: the reduction of the centrosome during gametogenesis and its restoration during fertilization. *Dev.Biol.* 165, 299-335
- Schena,M., Shalon,D., Davis,R.W., Brown,P.O. 1995 . Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science.* 270, 467-470
- Schulte,R.T., Ohl,D.A., Sigman,M., Smith,G.D. 2009 . Sperm DNA damage in male infertility: etiologies, assays, and outcomes. *J.Assist.Reprod.Genet.*
- Sha,J., Zhou,Z., Li,J., Yin,L., Yang,H., Hu,G., Luo,M., Chan,H.C., Zhou,K.Spermatogenesis study group 2002 . Identification of testis development and spermatogenesis-related genes in human and mouse testes using cDNA arrays. *Mol.Hum.Reprod.* 8, 511-517
- Sharlip,I.D., Jarow,J.P., Belker,A.M., Lipshultz,L.I., Sigman,M., Thomas,A.J., Schlegel,P.N., Howards,S.S., Nehra,A., Damewood,M.D., Overstreet,J.W., Sadovsky,R. 2002 . Best practice policies for male infertility. *Fertil.Steril.* 77, 873-882
- Sherman,B.T., Huang da,W., Tan,Q., Guo,Y., Bour,S., Liu,D., Stephens,R., Baseler,M.W., Lane,H.C., Lempicki,R.A. 2007 . DAVID Knowledgebase: a gene-centered database integrating heterogeneous gene annotation

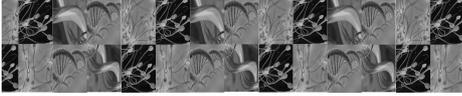


resources to facilitate high-throughput gene functional analysis. *BMC Bioinformatics*. 8, 426

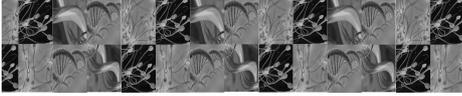
- Singh,N.P., Muller,C.H., Berger,R.E. 2003 . Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. *Fertil.Steril.* 80, 1420-1430
- Smith,R., Kaune,H., Parodi,D., Madariaga,M., Rios,R., Morales,I., Castro,A. 2006 . Increased sperm DNA damage in patients with varicocele: relationship with seminal oxidative stress. *Hum.Reprod.* 21, 986-993
- Spano,M., Kolstad,A.H., Larsen,S.B., Cordelli,E., Leter,G., Giwercman,A., Bonde,J.P. 1998 . The applicability of the flow cytometric sperm chromatin structure assay in epidemiological studies. *Asclepios. Hum.Reprod.* 13, 2495-2505
- Steptoe, P.C., Edwards,R.G., 1978. Birth after the preimplantation of human embryo. *The Lancet.* 32, 366.
- Sutovsky,P., Hauser,R., Sutovsky,M. 2004 . Increased levels of sperm ubiquitin correlate with semen quality in men from an andrology laboratory clinic population. *Hum.Reprod.* 19, 628-638
- Sutovsky,P., Terada,Y., Schatten,G. 2001 . Ubiquitin-based sperm assay for the diagnosis of male factor infertility. *Hum.Reprod.* 16, 250-258
- Sutovsky,P., Schatten,G. 2000 . Paternal contributions to the mammalian zygote: fertilization after sperm-egg fusion. *Int.Rev.Cytol.* 195, 1-65
- Thomas,P.D., Mi,H., Lewis,S. 2007 . Ontology annotation: mapping genomic regions to biological function. *Curr.Opin.Chem.Biol.* 11, 4-11



- Thonneau,P., Marchand,S., Tallec,A., Ferial,M.L., Ducot,B., Lansac,J., Lopes,P., Tabaste,J.M., Spira,A. 1991 . Incidence and main causes of infertility in a resident population (1,850,000) of three French regions (1988-1989). Hum.Reprod. 6, 811-816
- Toledo,A.A., Mitchell-Leef,D., Elsner,C.W., Slayden,S.M., Roudebush,W.E. 2003 . Fertilization potential of human sperm is correlated with endogenous platelet-activating factor content. J.Assist.Reprod.Genet. 20, 192-195
- Tournaye,H., Devroey,P., Liu,J., Nagy,Z., Lissens,W., Van Steirteghem,A. 1994 . Microsurgical epididymal sperm aspiration and intracytoplasmic sperm injection: a new effective approach to infertility as a result of congenital bilateral absence of the vas deferens. Fertil.Steril. 61, 1045-1051
- Virro,M.R., Larson-Cook,K.L., Evenson,D.P. 2004 . Sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles. Fertil.Steril. 81, 1289-1295
- Wang,H., Zhou,Z., Xu,M., Li,J., Xiao,J., Xu,Z.Y., Sha,J. 2004 . A spermatogenesis-related gene expression profile in human spermatozoa and its potential clinical applications. J.Mol.Med. 82, 317-324
- World Health Organization 2010 . WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen
- World Health Organization 1999 . Laboratory manual of the WHO for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction



- Yoshihara,K., Tajima,A., Yahata,T., Kodama,S., Fujiwara,H., Suzuki,M., Onishi,Y., Hatae,M., Sueyoshi,K., Fujiwara,H., Kudo,Y., Kotera,K., Masuzaki,H., Tashiro,H., Katabuchi,H., Inoue,I., Tanaka,K. 2010 . Gene expression profile for predicting survival in advanced-stage serous ovarian cancer across two independent datasets. PLoS One. 5, e9615



Transcriptómica de la infertilidad masculina

Bibliografía

Sandra García Herrero. 2012

Abreviaturas

ADN: Ácido desoxiribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

E: Embarazo

FIV: Fecundación *in Vitro*

FSH: *Follicle-stimulating hormone* (Hormona folículo estimulante)

GDE: Genes diferencialmente expresados

GE: Genes exclusivos

GnRH: *Gonadotropine-releasing hormone* (Hormona liberadora de gonadotropina)

GO: *Gene Ontology*

hCG: *human chorionic gonadotropin* (Gonadotropina coriónica humana)

hMG: *Human menopausal gonadotropin* (Gonadotropina menopáusica humana)

IA: Inseminación artificial homóloga

IAH: Inseminación artificial homóloga

ICSI: *Intracytoplasmic sperm injection* (Inyección intra-citoplasmática de espermatozoides)

IMC: Índice de masa corporal

LH: *Luteinizing hormone* (Hormona luteinizante)

MACs: *Magnetic-activated cell sorting* (separación celular inmunomagnética)

NE: No embarazo

Ng: nanogramos

OMS: Organización mundial de la salud

Pb: pares de bases

PBS: *Phosphate buffered saline*

PCR: *Polymerase chain reaction* (Reacción en cadena de la polimerasa)

qPCR: quantitative PCR (PCR cuantitativa)

RAE: Real academia de la lengua española

RPM: Revoluciones por minuto

SCSA: *Sperm Chromatin Structure Assay*

SCD: *Sperm chromatine dispersión*

TC: tasa de cambio

TRAs: Técnicas o tratamientos de reproducción asitida

TUNEL: *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*

UI: Unidades internacionales

β -hCG: Subunidad beta de la hCG o lo que vulgarmente se denomina prueba de embarazo

μ l: microlitro

μ M: micromolar

Epílogo

Nunca me planteé tener hijos hasta que empecé a ver el drama de muchas personas para tenerlos. Nunca pensé que pudiera tener problemas hasta que vi gente, incluso mucho más joven que yo, que no podía tener descendencia.

Al final, ni mi pareja ni yo hemos tenido problema alguno para traer al mundo a nuestra hija, pero sólo hay que fijarse un poco para ver que estamos todos rodeados de gente que no lo tiene tan fácil, todos conocemos a alguien que no puede tener hijos y que requiere de los avances médicos para conseguir este objetivo.

Por ese motivo creo que el trabajo que hacen los profesionales de la reproducción asistida en clínicas como el IVI y los laboratorios de este grupo (que es el caso que conozco más de cerca) es maravilloso y precioso y pensar que igual de manera remota, con esta tesis, pudiera poner un diminuto granito de arena para ayudar en un futuro a la gente que no puede tener hijos, me hace sentir realmente feliz.

***Porque estoy harta. Porque estoy harta de tenerlas y no poderlas usar en cosa propia.
Que estoy ofendida, ofendida y rebajada hasta lo último, viendo que los trigos
apuntan, que las fuentes no cesan de dar agua y que paren las ovejas cientos de
corderos, y las perras, y que parece que todo el campo puesto de pie me enseña sus
crías tiernas, adormiladas, mientras yo siento dos golpes de martillo aquí, en lugar de
la boca de mi niño***

Yerma. Federico García Lorca