



Anàlisi del contingut de RNA i estudi mutacional de gens candidats en infertilitat masculina

Meritxell Jodar Bifet



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 3.0. Espanya de Creative Commons**.

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 3.0. España de Creative Commons**.

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 3.0. Spain License**.

**Anàlisi del contingut de RNA i estudi mutacional de gens
candidats en infertilitat masculina**

Meritxell Jodar Bifet

Juny 2012

Tesi doctoral

Anàlisi del contingut de RNA i estudi mutacional de gens candidats en infertilitat masculina

Memòria presentada per
Meritxell Jodar Bifet

per optar al grau de
Doctora en Biomedicina

*Treball desenvolupat sota la direcció del Dr. Rafael Oliva Virgili i el Dr. Josep Oriola
Ambrós, al laboratori de Genètica Humana, Unitat de Genètica, Departament de Ciències
Fisiològiques I, Facultat de Medicina,
Universitat de Barcelona*

Director

Director

Autora

Dr. Rafael Oliva

Dr. Josep Oriola

Meritxell Jodar Bifet

AGRAÏMENTS

Al llarg dels anys de gestació d'aquesta tesi he demanat opinió i ajuda a moltes persones. Sou tants i tant temps que us importuno que tinc por de deixar-me algun nom al tinter.

En especial vull agrair la gran oportunitat que m'ha ofert el Dr. Rafael Oliva per poder complir un dels meus somnis, treballar en la ciència. Gràcies per acollir-me al teu grup i animar-me en les espontànies crisis existencials i a fer que cada dia gaudis una mica més del món científic.

També vull agrair especialment al Dr. Josep Oriola que m'ha ajudat a endinsar-me en el món de la genètica i de la PCR i sobretot a descobrir l'existència d'uns petitíssims fragments de DNA anomenats amplicons.

També es mereixen un especial agraïment les persones que han format part de les comissions de seguiment d'aquesta tesi, per les seves idees i recomanacions, el Dr. Cristobal Mezquita, Dr. Mariano Monzó i Dr. Pedro Jares.

Una part molt important d'aquesta tesi és gràcies a l'ajuda dels meus companys més ben dit amics que he fet en aquesta aventura anomenada PhD. En especial als actuals: Judit, Rubén i Xana, gràcies per estar sempre allí, en els moments de flipades, en les crisis, en els bons moments, en els mals moments, en fi... en TOTS. Sempre heu tingut les paraules o les accions adequades, ja sigui per animar-me, per parar-me, per traurem un somriure, per filosofar, per opinar, per corregir i sobretot per escoltar. Però no em vull oblidar dels que han passat, en especial la Sara i la Gemma M, sempre ha quedat un trosset de vosaltres en el laboratori i en nosaltres. No està bé que jo ho digui però: fem un grup increïble, meravellós i que serà irreplicable.

Tampoc vull oblidar a gent que aporta o ha aportat un granet d'arena a aquest motxilla de bons records que m'enduré amb mi: Valeria, Ingrid, Gemma B, Margerita, Maria Cristina, Sabrina, Teresa i Joan.

En especial menció vull destacar el Departament de Genètica Molecular de l'Hospital Clínic de Barcelona per la seva gran ajuda en les tècniques de la PCR, seqüenciació i de la real -Time, m'agradaria destacar persones com la Vero, Alba, Lourdes, Annabel, Estefania, Isabel, Irene, Laia, Dr.Montse Milà i Dr.Cèlia Bádenas.

També ha estat de gran ajuda la gran participació i implicació de la Unitat de Reproducció Assistida del Grup Hospital Clínic en especial el Dr. Ballejà, Marta Guimerà, Cristina i Raquel.

En el meu treball també hi ha la participació de gent d'altres grups dels quals he après molt, en especial del Dr Jose Vidal, gràcies pels anàlisis realitzats i totes les teves eines bioinformàtiques, a la Susana Kalko i Pedro Jares per l'ajuda i interpretació dels *arrays*, a La Dr. Tanya Vavouri , Dr. Niels, Lorena i Mads per obrir-me el camí de la seqüenciació massiva i en fi a tot els que de certa manera han col·laborat en la publicació dels treballs realitzats.

Finalment, i per no deixar-me ningú voldria agrair a tot el personal del nostre departament, el de Ciències Fisiològiques I.

Un altre món que no vull deixar de nombrar aquí, és el món de la citogenètica, vosaltres també heu aportat molt tant a nivell personal com professional, gràcies Sandra, Ari, Leo, Susana, Mónica, Rocío, Jose, Annabel i un llarg etc..

Aquesta tesi també es part de les meves compis de Màster: Anna, Eva i Noe, el camí que vam començar juntes l'estem acabant!!!! Tot i que sempre ens semblava impossible!!.

I a tots els meus amics, els del poble i els de Barna, sempre hem feu sentir súper especial quan em pregunteu i us quedeu escoltant el que faig i també ajudar-me a veure que hi ha més coses al món en els moments ofuscats.

Però sobretot aquesta tesi és gràcies a la meva família, al meu pare i a la meva mare per anteposar sempre la meva educació a les seves coses, i recolzar-me en totes les decisions. I a la Pita i les seves veles infalibles, i a la Laura per creure tant en mi..... i em quedo curta perquè tinc una de les millors famílies del món.

Vull fer una menció especial a la persona que porta 10 anys amb mi, i que és el millor company d'aventures que una persona pot desitjar, és el meu marit, el meu cari, el Rubén. Gràcies carinyo per sempre recolzar el meus somnis i intentar fer-los dia a dia realitat, al teu costat és molt fàcil ser feliç. Aquest últim tram de tesi he après molt de tu, el format de la tesi i certes figures han estat dissenyades per tu, per tant aquest treball es tant teu com meu i crec que el que tu sempre recordaràs es que: *les protamines son les proteïnes nuclears més abundants de l'espermatozoide humà.*

**A la meva meitat,
sense tu aquest treball no seria possible**

*“La science est faite d'erreurs qu'il est bon de commettre, car elles
mènent peu à peu à la vérité”*

“La ciència comet errors que són bons de cometre, ja que ens
portaran a la veritat”

(Professeur Lidenbrock, Voyage au Centre de la Terre)

Julio Verne

Índex

ÍNDEX

I. Introducció	21
1. Espermatogènesi	23
1.1. Gònades masculines (testicles)	23
1.2. Procés de l'espermatogènesi	24
1.3. Regulació hormonal de l'espermatogènesi	27
2. Espermatozoide madur	29
2.1. Estructura de l'espermatozoide madur	29
2.1.1. Cap de l'espermatozoide	29
2.1.2. Flagel de l'espermatozoide	33
2.2. Contribució de l'espermatozoide a l'embrió	35
2.2.1. Estímul d'activació	35
2.2.2. Centrosoma funcional	36
2.2.3. Marques epigenètiques	36
2.2.4. RNAs	38
3. Infertilitat	41
3.1. Pràctiques andrològiques en la determinació del factor masculí	41
3.1.1. Història clínica	41
3.1.2. Exploració física	42
3.1.3. Seminograma	42
3.1.4. Proves diagnòstiques addicionals	45
3.2. Causes conegudes de la infertilitat masculina	46
3.2.1. Causes gonadals	46
3.2.2. Causes sistèmiques	47
3.2.3. Factors externs	47
3.2.4. Factors genètics	48
3.3. Futurs biomarcadors de la infertilitat masculina	53
3.3.1. DNA	53
3.3.2. RNA	54
3.3.3. Proteïnes	55
3.3.4. Epigenètica	56
4. Selecció de gens candidats pel seu estudi mutacional	57
4.1 <i>PRM1</i> i <i>PRM2</i>	58
4.2 <i>HSPA2</i>	60
4.3 <i>PHB1</i>	60

4.4	<i>BRDT</i>	61
II.	Objectius	63
III.	Material i mètodes	67
1.	Procedència i selecció de mostres	69
1.1.	Mostres provinents del semen (espermatozoides)	69
1.2.	Mostres provinents de sang (limfòcits)	69
1.3.	Mostres provinents de saliva (cèl·lules epitelials i limfòcits)	70
2.	Microscopia	71
2.1.	Microscopia òptica	71
2.2.	Microscopia electrònica	73
3.	Estudis de DNA	74
3.1.	Extracció de DNA	74
3.1.1.	<i>Extracció de DNA d'espermatozoides</i>	74
3.1.2.	<i>Extracció de DNA de saliva</i>	75
3.2.	Reacció en cadena de la polimerasa (PCR)	76
3.3.	Seqüenciació i anàlisi de seqüències	81
3.3.1.	<i>Purificació del producte de PCR</i>	81
3.3.2.	<i>Seqüenciació i anàlisi de les seqüències</i>	82
3.4.	Anàlisi de les variants genètiques trobades	82
3.4.1.	<i>Anàlisi de la desviació de l'equilibri de Hardy-Weinberg</i>	82
3.4.2.	<i>Anàlisi de la patogenicitat</i>	83
3.4.3.	<i>Anàlisi de la conservació dels aminoàcids en l'evolució</i>	84
3.4.4.	<i>Caracterització dels haplotips presents en la població</i>	84
3.5.	Anàlisi de CNV (<i>copy number variations</i>)	84
4.	Estudis de RNA	86
4.1.	Extracció de RNA d'espermatozoides	86
4.2.	Retrotranscripció (de RNA a cDNA)	90
4.3.	Arrays d'expressió gènica	92
4.4.	PCR quantitativa a temps real	93

4.5. Seqüenciació massiva dels miRNAs	97
5. Estudis de Proteïnes	98
5.1. Estudi de la relació de protamines (P1/P2)	98
6. Anàlisis estadístics	102
6.1. Anàlisis estadístics de les variables estudiades	102
6.2. Anàlisis dels arrays d'expressió	102
6.3. Revisió sistemàtica o metanàlisi	103
IV. Resultats i discussió	105
1. Detecció d'alteracions en el contingut de RNAs mitjançant <i>microarrays</i>, en pacients infèrtils astenozoospèrmics (espermatozoides de mobilitat reduïda) en comparació a controls	107
1.1. Posada a punt de l'extracció de RNA d'espermatozoides	107
1.2. Estudi diferencial dels RNAs presents en pacients astenozoospèrmics <i>versus</i> controls fèrtils mitjançant l'ús de <i>microarrays</i> d'expressió	110
1.3. Validació dels transcrits diferencials obtinguts en l'objectiu 1.2 en un número superior de mostres mitjançant l'ús de la PCR quantitativa a temps real	112
1.4. Estudi dels transcrits de les protamines en pacients infèrtils astenozoospèrmics	117
2. Estudi mutacional de gens candidats derivats d'estudis previs del grup i derivats del primer objectiu. Estudis d'associació casos-controls de les mutacions i polimorfismes identificats per tal de determinar si es comporten com mutacions patogèniques, com factors de risc o com a polimorfismes no patogènics.	119
2.1. Gens de les protamines 1 i 2 (<i>PRM1</i> i <i>PRM2</i>)	119
2.1.1. Relació entre la variant c.-191C>A del gen <i>PRM1</i> i la morfologia alterada en espermatozoides	120
2.1.2. Estudi mutacional del gens <i>PRM1</i> i <i>PRM2</i>	122
2.1.3. Revisió bibliogràfica i metanàlisi de les variants descrites en els gens <i>PRM1</i> i <i>PRM2</i>	127
2.1.4. Anàlisi dels haplotips de les variants presents en els gens <i>PRM1</i> i <i>PRM2</i>	133
2.1.5. Estudi de CNV (<i>Copy Number Variations</i>) en el gen <i>PRM1</i>	134
2.2. Gen de la <i>Heat Shock 70 KDa protein 2 (HSPA2)</i>	135
2.3. Gen de la subunitat 1 de la Prohibitina (<i>PHB1</i>)	139

2.4. Gen de la <i>Bromodomain testis-specific protein (BRDT)</i>	140
2.5. Gens candidats derivats del primer objectiu, Bromodomain containing 2 (<i>BRD2</i>)	143
3. Descripció dels miRNAs més abundants presents en els espermatozoides i la seva possible implicació en la infertilitat masculina	148
V. Conclusions	151
VI. Bibliografia	155
VII. Abreviatures	167
VIII. Material i <i>software</i> utilitzat	173
IX. Annex I: Polymorphisms, haplotypes and mutations in the protamine 1 and 2 genes	179
X. Annex II: Differential RNAs in the sperm cells of asthenozoospermic patients	197

Índex de taules i figures

ÍNDEX DE TAULES

I. Introducció

<i>Taula 1.1</i>	Valors de referència dels paràmetres seminals establerts per la WHO 2010	45
------------------	--	----

II. Material i mètodes

<i>Taula 2.1</i>	Condicions per l'amplificació per PCR dels gens (i) <i>PRM1</i> , (ii) <i>PRM2</i> , (iii) <i>HSPA2</i> i (iv) Exó 3 del <i>BRDT</i>	77
<i>Taula 2.2</i>	Condicions per l'amplificació per PCR del gen <i>PHB1</i>	78
<i>Taula 2.3</i>	Condicions per l'amplificació per PCR del gen <i>BRD2</i> , promotor i exons del 2 al 7	79
<i>Taula 2.4</i>	Condicions per l'amplificació per PCR del gen <i>BRD2</i> exons del 8 al 13	80
<i>Taula 2.5</i>	<i>Primers</i> usats en l'estudi de CNV del gen <i>PRM1</i> usant PCR quantitativa a temps real	84
<i>Taula 2.6</i>	Condicions per l'amplificació per RT-PCR dels gens que ens permetran establir la qualitat del RNA extret (<i>CD45</i> , <i>PRM2</i> i <i>DLOOP</i>)	91
<i>Taula 2.7</i>	<i>Primers</i> i condicions òptimes pels estudis de quantificació relativa per PCR quantitativa a temps real	95
<i>Taula 2.8</i>	Tests estadístics realitzats segons els tipus de variables a comparar	102

III. Resultats i discussió

<i>Taula 3.1</i>	Paràmetres seminals (mitjana \pm SEM) dels diferents grups inclosos en l'estudi	107
<i>Taula 3.2</i>	Rendiment obtingut en l'aïllament del RNA de les mostres seleccionades	108
<i>Taula 3.3</i>	Mostres seleccionades per l'estudi transcriptòmic diferencial amb l'ús de <i>microarrays</i> d'expressió	110
<i>Taula 3.4</i>	Transcrits que es troben en una abundància superior o inferior en espermatozoides de pacient infèrtil astenozoospermics en comparació amb controls fèrtils normozoospermics detectats mitjançant <i>microarrays</i> d'expressió	111
<i>Taula 3.5</i>	Abundància relativa dels transcrits seleccionats, en els espermatozoides de pacients astenozoospermics i controls fèrtils mitjançant l'ús de la PCR quantitativa a temps real	114
<i>Taula 3.6</i>	Valors obtinguts en l'estudi diferencial dels transcrits de les protamines (<i>PRM1</i> i <i>PRM2</i>) mitjançant l'ús de <i>microarrays</i> i de la PCR quantitativa a temps real	117
<i>Taula 3.7</i>	Estudi de la relació de la variant c.-191C>A i la morfologia dels espermatozoides en la població espanyola	120
<i>Taula 3.8</i>	Estudi de la relació de la variant c.-191C>A i la morfologia dels espermatozoides en la població sueca	121
<i>Taula 3.9</i>	Variants gèniques identificades en el gen <i>PRM1</i>	122
<i>Taula 3.10</i>	Variants gèniques identificades en el gen <i>PRM2</i>	126
<i>Taula 3.11</i>	Variants gèniques identificades en el gen <i>PRM1</i> en diferents estudis	128

Taula 3.12	Variants gèniques identificades en el gen <i>PRM2</i> en diferents estudis	129
Taula 3.13	Resum dels estudis que han identificat la variant R34S en el gen <i>PRM1</i>	131
Taula 3.14	Variants gèniques identificades en el gen <i>HSPA2</i>	136
Taula 3.15	Variants gèniques identificades en el gen <i>PHB1</i>	139
Taula 3.16	Estudi de la variant c.602A>T (K62Q) del gen <i>BRDT</i> en la població espanyola	141
Taula 3.17	Variants gèniques identificades en el gen <i>BRD2</i>	144

ÍNDEX DE FIGURES

I. Introducció

Figura 1.1	Testicle humà i organització estructural dels túbuls seminífers	24
Figura 1.2	Espermatogènesi en humà (fase proliferant, fase meiòtica i espermiogènesi)	26
Figura 1.3	Regulació hormonal de l'espermatogènesi	28
Figura 1.4	Estructura del cap de l'espermatozoide	29
Figura 1.5	Dominis estructurals de la cromatina de l'espermatozoide	30
Figura 1.6	Biogènesi dels miRNAs, siRNAs i piRNAs	33
Figura 1.7	Estructura del flagel de l'espermatozoide humà	35
Figura 1.8	Possibles funcions del RNA d'espermatozoide	40
Figura 1.9	Cariotip de dos pacients infèrtils que presenten dues anomalies cromosòmiques	49
Figura 1.10	Tipus de microdelecions freqüents en el cromosoma Y	51
Figura 1.11	Transcripció, traducció i processament de les protamines humanes	58

II. Material i mètodes

Figura 2.1	Procediment per la recol·lecció de saliva mitjançant el kit <i>Oragene-DNA</i>	70
Figura 2.2	Visualització de les mostres de semen amb la cambra <i>Makler</i> i el microscopi òptic	71
Figura 2.3	Imatge de microscopia òptica 1000x d'un espermatozoide sotmès a la tinció Diff-Quik®	72
Figura 2.4	Imatge de microscopia electrònica de transmissió d'un espermatozoide. Podem observar el cap, la peça intermitja i part de la cua	73
Figura 2.5	Regions del gen on identifiquem les variants de les que estudiarem la seva possible patogenicitat usant programes <i>in silico</i>	83
Figura 2.6	Diferents fases obtingudes després de la realització del gradient de Percoll 50%	87
Figura 2.7	Diferents fases obtingudes després de la centrifugació en el procés d'extracció de RNA	88
Figura 2.8	Perfils de RNA d'espermatozoides (imatge esquerra) i de limfòcits (imatge dreta) obtinguts mitjançant l'ús de <i>Agilent 2100 Bioanalyzer</i>	90
Figura 2.9	Preparació de les mostres de RNA abans de la hibridació amb l' <i>array</i>	93

<i>Figura 2.10</i>	Exemple real per determinar si dos cDNA tenen una eficiència d'amplificació similar	96
--------------------	---	----

III. Resultats i discussió

<i>Figura 3.1</i>	Tercer i quart control de qualitat realitzats en les mostres de RNA aïllades	110
<i>Figura 3.2</i>	Control de qualitat per verificar l'absència de DNA mitocondrial	113
<i>Figura 3.3</i>	Abundància relativa del transcrit ANXA2 en tres grups d'estudi independents (pacients infèrtils astenozoospèrmics, pacients infèrtils normozoospèrmics i controls fèrtils)	115
<i>Figura 3.4</i>	Abundància relativa del transcrit BRD2 en tres grups d'estudi independents (pacients infèrtils astenozoospèrmics, pacients infèrtils normozoospèrmics i controls fèrtils)	116
<i>Figura 3.5</i>	Característiques morfològiques dels espermatozoides de la mostra que presenta la variant R17C en comparació amb un control mitjançant l'estudi per microscopia òptica i electrònica	123
<i>Figura 3.6</i>	Conservació de l'aminoàcid arginina de la posició 17 de la PRM1	124
<i>Figura 3.7</i>	Pedigrí del pacient que presenta la variant R17C (individu II 4)	124
<i>Figura 3.8</i>	Potencials llocs diana de la regió 3'UTR del gen <i>PRM1</i> per la unió de miRNAs	126
<i>Figura 3.9</i>	Conservació dels aminoàcids de la protamina 1 on s'han identificat variants no sinònimes en diferents estudis	130
<i>Figura 3.10</i>	Metanàlisi de la variant R34S del gen <i>PRM1</i>	132
<i>Figura 3.11</i>	Determinació dels haplotips del <i>locus</i> de les protamines en la població espanyola	133
<i>Figura 3.12</i>	Seqüències del gen <i>PRM1</i> d'algunes mostres seleccionades per l'estudi de CNV	134
<i>Figura 3.13</i>	Resultats de l'estudi pilot de presència de CNV en el gen de la <i>PRM1</i>	135
<i>Figura 3.14</i>	Estudis <i>in silico</i> realitzats per determinar la possible patogenicitat de la variant no sinònima identificada en el gen <i>HSPA2</i> (c.1444G>C (D482H))	138
<i>Figura 3.15</i>	Freqüències al·lèliques poblacionals de la variant c.602A>T del gen <i>BRDT</i>	141
<i>Figura 3.16</i>	Representació en diagrama de caixes de la relació de protamines (P1/P2) en els diferents genotips estudiats	142
<i>Figura 3.17</i>	RT-PCRs dissenyades per discriminar les quatre variants de transcrit més comunes descrites pel gen <i>BRD2</i> .	143
<i>Figura 3.18</i>	Alineament de dues variants del snRNA U2 (U2 1 i U2 2) i el miRNA immadur 1246	149

Introducció

INTRODUCCIÓ

1. Espermatogènesi

L'espermatogènesi és el procés de formació, desenvolupament i maduració de les cèl·lules germinals masculines (espermatozoides), que té lloc a les gònades masculines o testicles.

1.1. Gònades masculines (testicles)

Els testicles són dues glàndules ovoides, situades una a cada costat del penis, d'uns 5 cm de diàmetre, amb un pes que oscil·la entre els 10 i 15 g i que es troben suspeses dins l'escrot pel cordó espermàtic. En els testicles es generen les cèl·lules germinals masculines (espermatozoides).

Dins de cada testicle trobem una gran quantitat de túbuls seminífers que s'uneixen entre ells per formar una xarxa de canals anomenada *rete testis*, i és aquí on es generen els espermatozoides (*Veure figura 1.1*).

En els túbuls seminífers trobem dos tipus cel·lulars diferents (*Veure figura 1.1*):

- (i) Cèl·lules espermatogèniques, que es diferenciarien en espermatozoides. Dins els túbuls, podem observar els diferents estadis cel·lulars de les cèl·lules espermatogèniques, ordenats concèntricament en varies capes, constituint l'epiteli seminífer dels túbuls. Cadascuna de les capes conté les cèl·lules que es troben en la mateixa etapa de desenvolupament. Prop de la làmina basal (part més externa del túbul seminífer) hi trobem les espermatogònies (les més immadures), i cap a la llum del túbul s'hi col·loquen, en aquest ordre, els espermatòcits primaris, els secundaris, les espermatides i, finalment, els espermatozoides (*Veure punt 1.2. del present apartat*).
- (ii) Cèl·lules de Sertoli, que nodreixen les cèl·lules espermatogèniques i fan de suport en el seu desenvolupament. Aquestes cèl·lules controlen la migració de les cèl·lules germinals i, mitjançant les fortes unions que estableixen entre elles, creen la barrera hematotesticular.

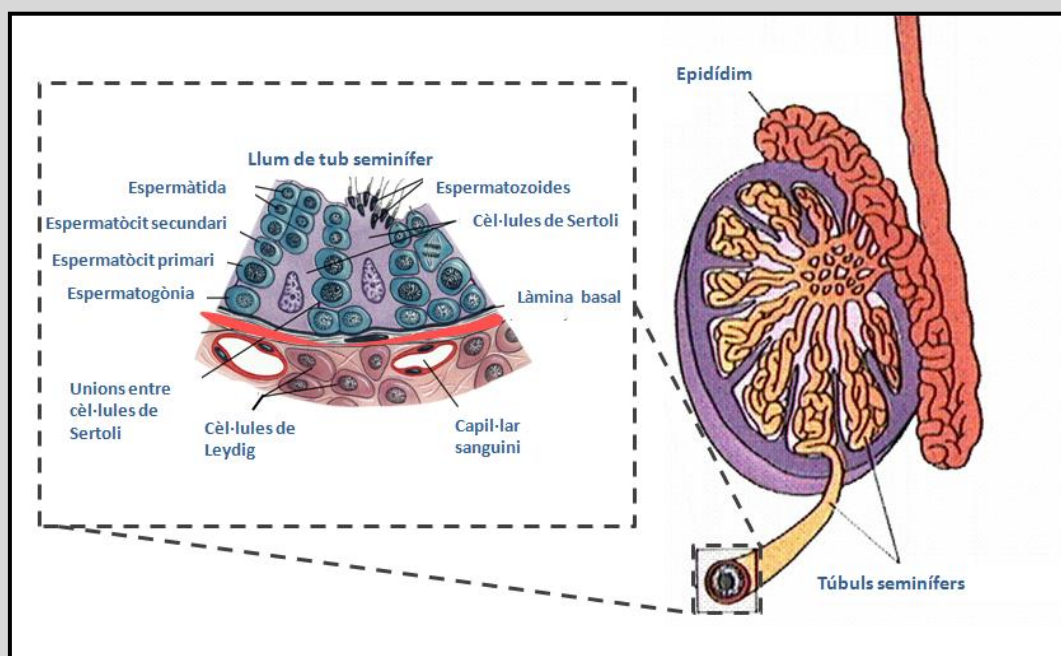
En el teixit conjuntiu, que es troba situat entre els espais que separen els túbuls seminífers adjacents, hi trobem:

- (i) Capil·lars sanguinis.
- (ii) Cèl·lules de Leydig, que són cèl·lules especialitzades en la síntesis d'andrògens, com la testosterona, de gran importància en la regulació hormonal de l'espermatogènesi (*Veure punt 1.3 del present apartat*).
- (iii) Cèl·lules mioïdes o peritubulars, que són cèl·lules contràctils que faciliten la propulsió dels espermatozoides pels túbuls seminífers.

Sobre cada testicle hi trobem una estructura anomenada epidídim. L'epidídim és un conducte molt contornejat, on s'emmagatzemen els espermatozoides per passar les seves etapes finals de maduració. A continuació del tram final de l'epidídim trobem el conducte deferent, que transporta els espermatozoides cap al conducte ejaculador per la seva expulsió cap a la uretra. Per tant, l'epidídim ajuda a expulsar els espermatozoides cap al conducte deferent durant l'excitació sexual, mitjançant les contraccions peristàltiques del múscul llis de la seva paret. Els espermatozoides poden romandre emmagatzemats i viables en l'epidídim durant mesos.

Diferents mecanismes mantenen la temperatura del testicle a 32 °C trobant-se per sota de la temperatura de la resta del cos. Aquesta temperatura és l'òptima per dur a terme l'espermatogènesi.

Figura 1.1. Testicle humà i organització estructural dels túbuls seminífers



Font: imatge modificada de www.biologia.edu.ar.

1.2. Procés de l'espermatogènesi

L'espermatogènesi consisteix en una sèrie d'esdeveniments cel·lulars seqüencials que permeten que les cèl·lules mare germinals diploides es transformin en espermatozoides, unes cèl·lules haploides altament especialitzades.

Durant l'**etapa prenatal**, en els primers estadis del desenvolupament embrionari dels mascles humans, la gònada es diferencia formant els testicles i les cèl·lules germinals primordials (PGC), que es diferenciarien en espermatogònies. Aquesta diferenciació queda aturada cap a les 16 o 18 setmanes de gestació, essent el final de l'etapa prenatal de l'espermatogènesi.

Durant l'**etapa postnatal**, l'espermatogènesi no s'inicia fins que s'assoleix la maduresa sexual, a causa de l'acció hormonal (*Veure punt 1.3. del present apartat*), i aquesta es manté constant durant tota la vida fèrtil de l'individu.

S'ha determinat que el procés de l'espermatogènesi en humans (*Veure figura 1.2*) té una duració aproximada d'uns 64 dies (Misell *et al.*, 2006), i aquesta es pot dividir en tres fases:

- (i) **Fase proliferant (mitosi).** En aquesta fase les espermatogònies ($2n\ 2c$) es divideixen mitjançant mitosi de manera constant originant espermatogònies tipus A i B. La divisió citoplasmàtica de les espermatogònies durant la mitosi no és completa, ja que les cèl·lules filles es mantenen unides a través d'uns fins ponts citoplasmàtics.

En la subsegüent fase de meiosi les noves cèl·lules filles tampoc realitzaran una divisió citoplasmàtica total, mantenint-se unides fins a la formació de l'espermatozoide.

- a. Les **espermatogònies de tipus A** es poden dividir en dos subtipus:
 - i. *Espermatogònies de tipus A de nucli fosc (Ad)*. Aquestes tenen la cromatina altament condensada i es divideixen amb poca freqüència. La seva proliferació resulta en la reposició d'espermatogònies Ad i en el pas a espermatogònies tipus Ap.
 - ii. *Espermatogònies de tipus A de nucli pàl·lid (Ap)*. La cromatina d'aquestes es troba poc condensada, fet que evidencia la seva gran activitat cel·lular. Per mitosi donaran origen a altres espermatogònies Ap i a espermatogònies tipus B.
- b. Les **espermatogònies de tipus B** són cèl·lules més diferenciades, que un cop augmenten el volum del seu citoplasma esdevenen espermatòcits primaris, els quals entraran en la següent fase de meiosi.

(ii) **Divisió meiótica (meiosi)**. Les espermatogònies tipus B ($2n$ $2c$) experimenten un creixement del seu citoplasma però també dupliquen el seu DNA (fase S), esdevenint **espermatòcits primaris** ($2n$ $4c$).

- a. La primera divisió meiótica dura aproximadament 24 dies. En aquesta divisió es redueix el número de cromosomes, ja que cadascun dels cromosomes homòlegs migra cap a una de les cèl·lules filles. Després de la primera divisió meiótica obtenim les primeres cèl·lules haploides anomenades **espermatòcits secundaris** (n $2c$).

És important remarcar que durant aquesta primera divisió meiótica és quan es dona el fenomen de recombinació genètica entre els cromosomes homòlegs paterns i materns.

- b. La segona divisió meiótica dura únicament unes hores, i dona lloc a les **espermàtides rodones** (n c). Aquestes tenen una dotació haploide, tant pel que fa al número de cromosomes com pel de cromàtides.

Com a resultat de la meiosi, de cada cèl·lula diploide (espermatogònia de tipus B) s'obtenen quatre espermàtides haploides, rodones i petites. Les espermàtides rodones es troben situades prop de la llum del túbul.

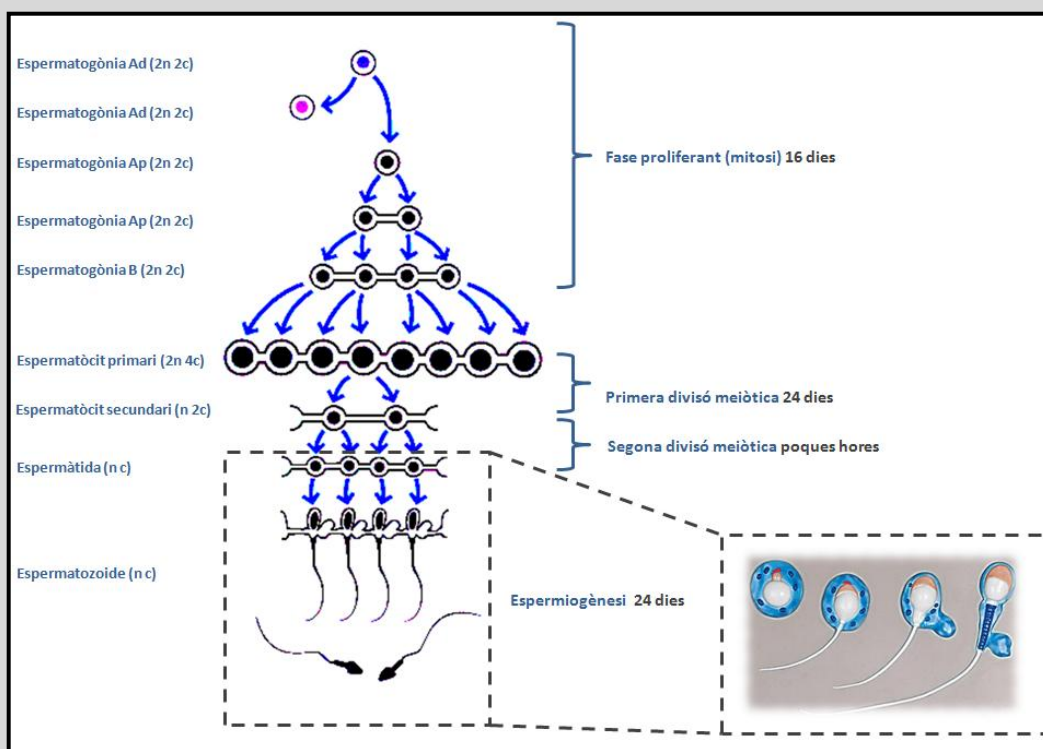
(iii) **Espermiogènesi**. Les **espermàtides rodones** entren en un procés de diferenciació cel·lular, en el que pateixen importants canvis morfològics, citoplasmàtics i nuclears, per acabar convertint-se en espermatozoides.

Podem dividir l'espermiogènesi en quatre fases:

- a. **Condensació del nucli**. El nucli de la espermàtida rodona que es troba en una posició central, migra cap a un dels pols cel·lulars allargant la cèl·lula (**espermàtida allargada**). Cap a les últimes fases de l'espermiogènesi es dona la compactació de la cromatina provocada pel reemplaçament de les histones per les protamines (Mezquita, 1985), degut a la superior càrrega positiva de les protamines front les histones (*Veure punt 2.1.1 del present apartat*). Aquesta compactació disminuirà la mida del nucli.
- b. **Formació de l'acrosoma**. Les vesícules del complex de Golgi es fusionen formant una gran vesícula on hi trobem proteases i altres enzims hidrolítics que seran necessaris per la penetració de la zona pel·lúcida de l'oòcit durant la fecundació. Un cop formada la vesícula, aquesta s'aplana i rodeja dues terceres parts del nucli formant l'acrosoma.

- c. *Formació del coll, la part mitjana i el flagel.* El centrosoma migrarà cap al pol oposat del nucli a on s'ha format l'acrosoma. A partir d'un dels centríols que formen el centrosoma s'iniciarà la formació de l'axonema del flagel. L'axonema consta d'un cilindre de nou microtúbuls dobles que rodegen dos microtúbuls centrals (estructura 9+2). Les mitocondries de l'espermàtida rodona també sofriran processos de migració i es situaran envoltant la part proximal de l'axonema flagel·lar. Aquestes es col·locaran de forma helicoidal formant la part mitjana de l'espermatozoide madur (*Veure punt 2.1.2 del present apartat*).
- d. *Eliminació de la major part del citoplasma.* L'excés de citoplasma serà eliminat mitjançant els cossos residuals, que seran fagocitats per les cèl·lules de Sertoli.

Figura 1.2. Espermatogènesi en humà (fase proliferant, fase meiótica i espermiogènesi)



Font: Imatge modificada provinent de www.embryology.ch.

Nota: n (cromosomes) i c (cromàtides).

Un fet interessant que ocorre durant l'espermatogènesi consisteix en que les cèl·lules germinals masculines en diferenciació no completen la divisió citoplasmàtica, ni durant la mitosi, ni durant la meiosi. Per tant, es generen grans clons de cèl·lules filles diferenciades d'una espermatogònia madura que romanen connectades per ponts citoplasmàtics (*Veure figura 1.2*). Els ponts citoplasmàtics es mantenen fins el final de la diferenciació dels espermatozoides, quan aquests són alliberats a la llum del túbul. Aquests ponts actuen com un dispositiu per a que tots els espermatozoides disposin de tots els productes d'un genoma diploide complet, degut al trànsit de RNAs i proteïnes per aquests ponts. Per tant la connexió per ponts citoplasmàtics ens assegura:

- (i) La maduració de cèl·lules germinals haploides que han rebut una còpia gènica defectuosa, que podria ser letal per l'espermatozoide per trobar-se en forma recessiva.

- (ii) La supervivència dels espermatozoides amb cromosoma Y, ja que el cromosoma X és portador de molts gens essencials que no es troben presents en el cromosoma Y.

Per tant, la presència dels ponts citoplasmàtics fa que espermatozoides genèticament diferents en realitat siguin molt semblants a nivell molecular (Braun *et al.*, 1989).

Un cop finalitzada la diferenciació de l'espermatozoide, aquest experimenta diferents processos de maduració per tal d'obtenir la capacitat de fecundar l'oòcit, ja que l'espermatozoide testicular no és totalment madur. Els últims processos de maduració són els següents:

- (i) **Espermiació.** Un cop s'ha completat la diferenciació dels espermatozoides, aquests s'alliberen dels túbuls seminífers a l'epidídim. En l'epidídim hi ha un procés de maduració que consisteix en diferents canvis a nivell de la membrana plasmàtica de l'espermatozoide:
- Tancament dels canals de calci.
 - Augment de nivell de colesterol.
 - Agregació d'una coberta glucoproteica.

Aquests canvis a nivell de la membrana plasmàtica fan que aquesta sigui més rígida, evitant que es doni la reacció acrosòmica i la mobilitat del flagel durant la seva estada a l'epidídim. Per tant, es produirà una estabilitat de l'espermatozoide reduint al mínim la seva despesa metabòlica.

- (ii) **Capacitació.** Quan els espermatozoides surten de l'epidídim cap al conducte deferent, reben el líquid seminal de la pròstata formant el conjunt del semen. Però no és fins que l'espermatozoide entra en el tracte femení, que aquest assoleix la maduració completa per poder dur a terme la fecundació. Aquest procés es coneix amb el nom de capacitació. Els canvis que es donen en el tracte femení són també a nivell de la membrana plasmàtica i contraris als que s'han donat a l'epidídim:
- Obertura dels canals de calci.
 - Disminució de nivell de colesterol.
 - Pèrdua de la coberta glucoproteica.

Aquests canvis són necessaris perquè es dugui a terme la reacció acrosòmica i per tant fer possible la fusió de l'espermatozoide amb l'oòcit.

1.3. Regulació hormonal de l'espermatogènesi

L'espermatogènesi es troba regulada pel sistema endocrí, en el que hi participen principalment: (i) hipotàlem, (ii) hipòfisi i (iii) testicle (*Veure figura 1.3*).

La hipòfisi anterior o adenohipòfisi secreta les hormones anomenades gonadotropines, que són fonamentals per la funció reproductora i, com indica el seu nom, actuen en les gònades masculines o testicles. Les hormones alliberades per l'adenohipòfisi són l'hormona estimulante del fol·licle (FSH) i l'hormona luteïnitzant (LH).

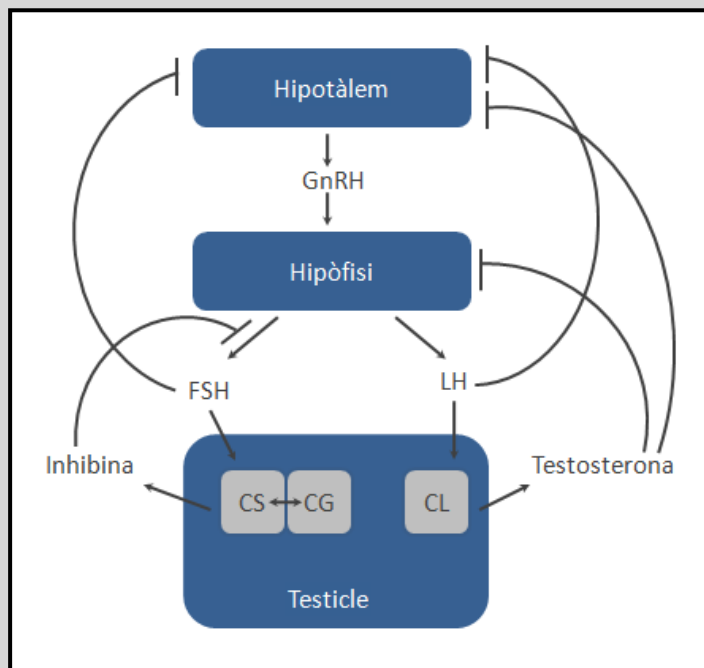
La secreció de les gonadotropines es troba regulada per una estructura del sistema nerviós central anomenada hipotàlem, que és la responsable de la secreció de l'hormona alliberadora de gonadotropines (GnRH), la qual es transporta a través la sang fins l'adenohipòfisi, i com el seu nom indica, estimula l'alliberament de les gonadotropines.

La LH actua sobre les cèl·lules de Leydig provocant l'alliberament de la testosterona. Un cop la testosterona assoleix un determinat nivell, aquesta té un mecanisme de control negatiu sobre l'adenohipòfisi i l'hipotàlem.

La FSH actua sinèrgicament amb la testosterona sobre les cèl·lules de Sertoli, estimulant la secreció de la proteïna transportadora d'andrògens (ABP) cap a la llum dels túbuls seminífers. L'ABP s'uneix a la testosterona aconseguint així un nivell local elevat d'aquest androgen, que estimula la part final del desenvolupament dels espermatozoides. Un cop s'arriba al nivell òptim de testosterona local per l'espermatogènesi, les cèl·lules de Sertoli secreten una hormona anomenada inhibina, que redueix la secreció de FSH mitjançant un control negatiu sobre l'adenohipòfisi.

L'espermatogènesi requereix la presència de FSH i altes concentracions intracel·lulars de testosterona. Degut a que les cèl·lules germinals no tenen receptors de FSH ni de testosterona, els efectes de les dues hormones sobre l'espermatogènesi són mediatos per les cèl·lules de Sertoli.

Figura 1.3. Regulació hormonal de l'espermatogènesi



Font: Basada en una figura de la Dra. Jovita Mezquita.

Nota: GnRH (hormona alliberadora de gonadotropines), FSH (hormona estimulant del fol·licle), LH (hormona luteïnitzant), CS (Cèl·lula de Sertoli), CG (Cèl·lula germinal) i CL (Cèl·lula de Leydig).

2. Espermatozoide madur

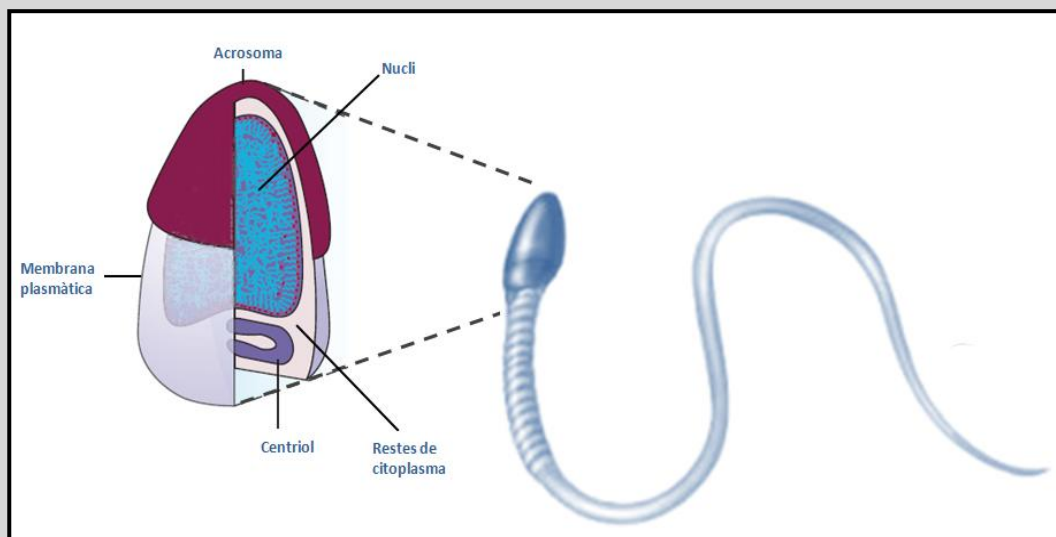
2.1. Estructura de l'espermatozoide madur

Podem dividir l'espermatozoide en dues grans estructures (i) el cap, (ii) el flagel.

2.1.1. Cap de l'espermatozoide

El cap de l'espermatozoide mesura aproximadament 5 μm de longitud. Dues terceres parts del nucli anterior està cobert per l'acrosoma. Tant el nucli com l'acrosoma es troben envoltats enmig d'una petita quantitat de citoplasma i revestits per la membrana plasmàtica, que uneix el cap i el coll de l'espermatozoide (Veure figura 1.4).

Figura 1.4. Estructura del cap de l'espermatozoide



Font : imatge modificada de la revisió de Krawetz (2005). "Paternal contribution: New insights and future challenges".

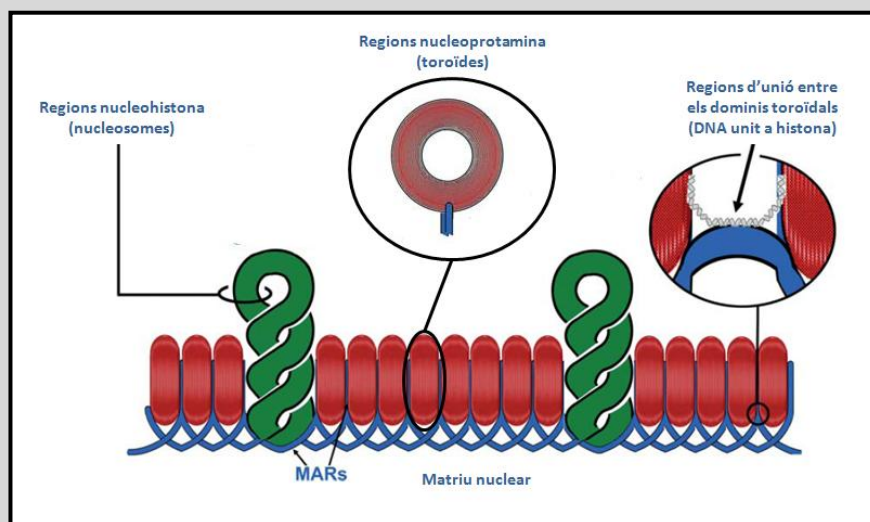
Nucli de l'espermatozoide

Al començament de l'espermioïgènesi (fase espermàtida rodona), la majoria de les histones són reemplaçades, primer per proteïnes de transició (TNPs) i subsegüentment per les protamines (PRMs). Les protamines són unes proteïnes petites, amb una càrrega positiva més elevada que la de les histones (Balhorn *et al.*, 1984). Aquest fet fa que les protamines competeixin amb les histones per la unió al DNA. Tot i això, aquest reemplaçament no és complet, i d'un 5% a un 15% del DNA romandrà associat a les histones.

El model estructural proposat recentment per la cromatina de l'espermatzoide humà es divideix en dos grans dominis estructurals (Ward, 2010; Johnson *et al.*, 2011) (Veure figura 1.5):

- (i) La major part del DNA es troba empaquetat per les protamines, a aquest domini l'anomenarem **nucleoprotamina**. Les protamines tenen una alta càrrega positiva degut al gran número de residus d'arginina (Arg) que contenen. Aquesta alta càrrega positiva neutralitza la càrrega negativa del DNA abolint la repulsió electrostàtica entre les cadenes de DNA pròximes, formant així uns complexos toroïdals (Hud *et al.*, 1993). Aquestes estructures toroïdals contenen unes 50 Kb de DNA. Les protamines també tenen un alt contingut en residus de cisteïna (Cys), que confereixen una major estabilitat d'aquestes estructures toroïdals gràcies a la formació de ponts disulfur intra i intermoleculars. Per tant, la unió del DNA a les protamines provoca que el genoma de l'espermatzoide madur es compacti en un estat semicristal·lí resistent a la digestió per nucleases.
- (ii) Aproximadament el 15% del DNA de l'espermatzoide humà madur roman associat a histones formant estructures nucleosòmiques, a aquest domini l'anomenarem **nucleohistona**. Estudis recents suggereixen que aquestes histones no es troben distribuïdes a l'atzar, sinó que preferiblement es troben associades a promotors de gens importants pel desenvolupament embrionari, a regions corresponents a miRNAs i a regions que es troben *imprintades* (Arpanahi *et al.*, 2009; Hammoud *et al.*, 2009). A més a més aquests estudis suggereixen que les histones es trobarien distribuïdes de dues maneres diferents. Una part de les histones, estarien distribuïdes en forma nucleosòmica ocupant grans àrees de DNA que oscil·len entre les 10 Kb i les 100 Kb (domini nucleohistona), mentre que altres histones es trobarien en petites regions de DNA distribuïdes de forma regular al llarg del genoma, sent una unitat repetitiva de l'estructura de la cromatina espermàtica. S'ha proposat que aquestes petites regions de DNA empaquetades per histones, correspondrien a regions d'unió entre els dominis toroïdals. Per tant, entre cada domini toroïdal s'ha observat un segment sensible a nucleases (unit a histones) i s'ha postulat que aquests fragments de DNA corresponen a regions del DNA que interaccionen amb la matriu nuclear (MARs) del nucli de l'espermatzoide.

Figura 1.5. Dominis estructurals de la cromatina de l'espermatzoide



Font : imatge modificada de la revisió de Ward (2010). "Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development".

El fet que en les últimes fases de l'espermatogènesi s'elimini la major part del citoplasma va fer que en un principi no es donés importància a les petites restes de citoplasma que romanen al cap de l'espermatozoide, ja que es consideraven romanents de l'espermatogènesi sense cap funció, cosa que en l'actualitat està en debat (*Veure punt 2.2. del present apartat*).

La utilització de noves tecnologies ens ha permès crear un llistat detallat de **proteïnes nuclears** (de Mateo *et al.*, 2011) i **RNAs** presents en l'espermatozoide humà (Ostermeier *et al.*, 2002).

Les **proteïnes nuclears** més abundants en l'espermatozoide humà són les protamines (85 o 95%). Combinant l'aïllament de nuclis purificats d'espermatozoides humans i l'ús de tècniques proteòmiques basades en l'espectrofotometria de masses, s'ha establert un llistat de proteïnes nuclears presents en el nucli de l'espermatozoide, com són (i) diferents variants d'histones, (ii) factors de transcripció i (iii) diferents proteïnes relacionades amb l'estructura de la cromatina (de Mateo *et al.*, 2011), les funcions de les quals discutirem més endavant (*Veure punt 2.2 del present apartat*).

La presència de **RNA** en l'espermatozoide ha estat qüestionada durant uns 50 anys degut a:

- (i) La baixa eficiència dels antics mètodes de detecció de RNA.
- (ii) La poca quantitat de RNA present en l'espermatozoide. Els espermatozoides es caracteritzen per l'absència de RNA ribosòmic (rRNA), mentre que el rRNA en altres tipus cel·lulars, representen el 90% del RNA total.
- (iii) La heterogeneïtat cel·lular del semen. El semen a part d'espermatozoides conté altres tipus cel·lulars (cèl·lules somàtiques i espermàtides immadures). Aquest fet, feia dubtar que la baixa quantitat de RNA detectat correspongués realment al RNA present en l'espermatozoide madur.

Finalment, la presència de RNA en l'espermatozoide madur es va confirmar mitjançant l'ús de tècniques d'hibridació *in situ* (Wykes *et al.*, 1997), on es va observar la colocalització del RNA corresponent a la protamina 2 en el nucli de l'espermatozoide humà. Posteriorment, mitjançant la utilització de la RT-PCR en mostres d'espermatozoides sense contaminació somàtica (Miller *et al.*, 1999), es va reafirmar la presència de RNA en l'espermatozoide madur. Amb les noves tecnologies, com són l'ús de *microarrays* i de seqüenciació massiva de RNA, s'ha establert que la quantitat de RNA present en l'espermatozoide humà madur és de 10 a 400 ng i s'ha pogut crear una detallada llista de RNA missatgers (mRNA) presents en l'espermatozoide madur (Krawetz, 2005).

No obstant, el RNA present en espermatozoides no es limita únicament a mRNA, ja que també s'ha confirmat la presència de petits RNAs no codificants (sncRNA: *small non coding RNA*) (Moldenhauer *et al.*, 2003). Els sncRNAs són RNAs d'uns 18 a 30 nucleòtids que es poden classificar segons la seva biogènesi (Moazed, 2009) (*Veure figura 1.6*):

(i) **MicroRNAs (miRNA)**

Gran part dels miRNAs caracteritzats es troben en regions intròniques de gens que codifiquen per proteïnes, mentre que també s'han caracteritzat recentment en regions intergèniques i exòniques.

Els transcrits primaris (pri-microRNA) són generats per la polimerasa II. Aquests pri-microRNAs formen una estructura de *hairpin stem-loop*, que en el nucli es talla per una ribonucleasa anomenada Drosha, de forma que el producte resultant dóna lloc a un pre-microRNA d'uns 60 a 70 nucleòtids.

Aquest pre-microRNA serà exportat al citoplasma, i un cop allà serà tallat per l'endonucleasa RNasa III anomenada Dicer. Es donarà lloc a una molècula de doble cadena d'uns 20 a 23 nucleòtids, que rebrà el nom de microRNA dúplex. Posteriorment, es separaran les dues cadenes i una d'elles donarà lloc al miRNA madur.

Per dur a terme la seva acció, el miRNA madur es conjuguarà amb un conjunt de proteïnes Argonauta fins a formar el complex RISC (*RNA-induced silencing complex*). Aquests complexos regulen l'expressió gènica inhibint o activant la traducció de determinats mRNAs.

(ii) *Petit RNA d'interferència (siRNA: small interfering RNA)*

Tot i que es coneix millor la generació de siRNA a partir de RNA exogen de doble cadena, també tenim siRNAs originats a partir de RNA endogen de doble cadena (endo-siRNAs).

Aquests endo-siRNAs es generen mitjançant la transcripció bidireccional de pseudogens o la transcripció direccional de repeticions invertides.

Aquesta transcripció resultarà en el precursor del siRNA, que consisteix en un RNA llarg de doble cadena. Aquest precursor serà transportat cap al citoplasma i serà processat per la endonucleasa III Dicer. El resultat d'aquest processament seran siRNAs madurs d'uns 20 a 24 nucleòtids de longitud.

S'ha descrit que els siRNAs madurs degraden els mRNAs diana mitjançant la conjugació amb les proteïnes Argonauta i formant els complexos RISC.

(iii) *RNA que interactua amb el Piwi (piRNA: Piwi-interacting RNA)*

En mamífers els piRNAs solament s'han descrit en les cèl·lules germinals masculines, mentre que en els invertebrats s'han descrit tant en cèl·lules germinals masculines com en femenines (Girard *et al.*, 2006).

Els piRNAs es troben per tot el genoma formant agrupacions o *clusters* amb una longitud que pot variar entre 1 i 100 Kb.

La biogènesi dels piRNAs no es coneix molt bé però s'ha descrit com un mecanisme independent de Drosha i Dicer. S'ha descrit que en el processament del precursor dels piRNAs participen les proteïnes PIWI, tot i que el mecanisme encara no s'ha establert.

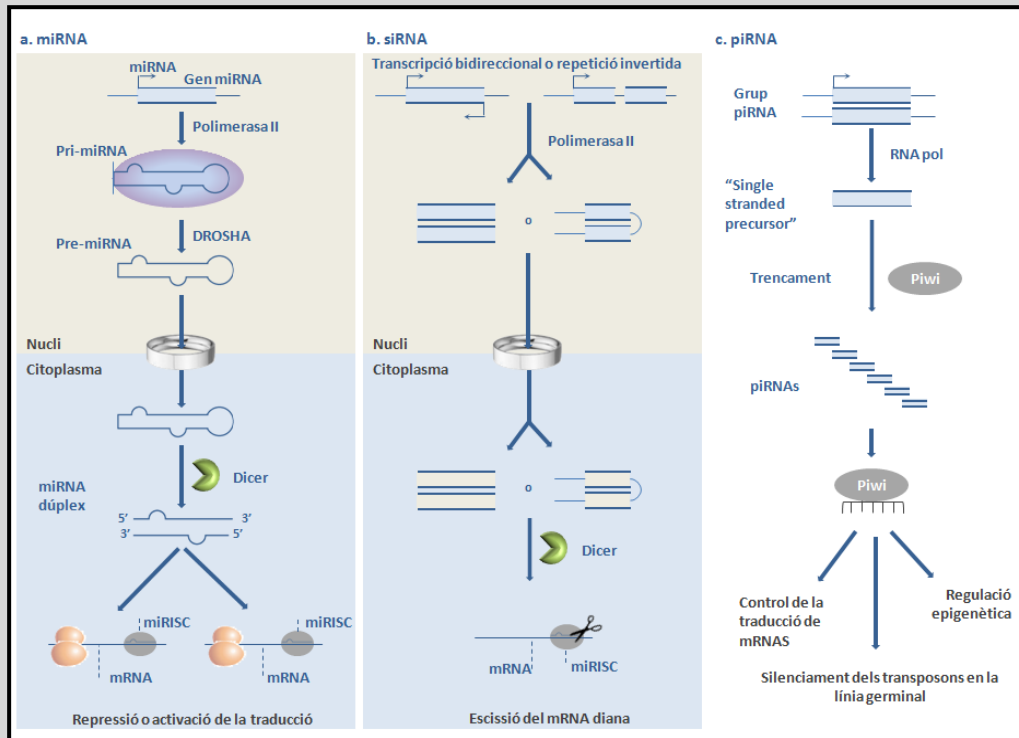
Els piRNAs madurs són els sncRNAs descrits més llargs, la seva longitud pot oscil·lar entre els 23 i els 32 nucleòtids.

Les funcions proposades per aquests piRNAs són les següents, tot i que el mecanisme d'acció encara no es troba definit amb claredat:

- a. La regulació epigenètica
- b. La prevenció de la transposició dels retrotransposons.
- c. La regulació positiva de la traducció.
- d. L'estabilitat dels mRNAs.

Recentment s'ha publicat un article on es descriuen els sncRNAs presents en l'espermatzoide madur humà (Krawetz *et al.*, 2011), on ha estat el primer cop que s'ha descrit la presència de piRNAs en l'espermatzoide humà.

Figura 1.6. Biogènesi dels miRNAs, siRNAs i piRNAs



Font : Imatge basada en l'article de Gangaraju & Lin (2009). "MicroRNAs: Key regulators of stem cells".

Acrosoma

L'acrosoma és un orgànel que es troba en el cap de l'espermatzoide en forma de caputxa i que conté diversos enzims hidrolítics, principalment la hialuronidasa. L'emmagatzematge d'aquests enzims hidrolítics és necessari per la penetració de l'espermatzoide a l'òcit. Un cop s'alliberen aquests enzims (reacció acrosòmica), aquests faciliten la dispersió de les cèl·lules fol·liculars de la corona radiada i la penetració de la zona pel·lúcida de l'òcit per part de l'espermatzoide.

2.1.2. Flagel de l'espermatzoide

El flagel de l'espermatzoide mesura aproximadament 50 µm de longitud, aquest fet li ajuda a tenir un gran mobilitat.

Podem dividir el flagel en 4 parts: (i) el coll, (ii) la peça mitjana, (iii) la cua o peça principal i (iv) la peça terminal (Veure figura 1.7).

Coll

El coll de l'espermatzoide és molt curt, per la qual cosa no és visible mitjançant el microscopi òptic, tot i que és lleugerament més gruixut que les altres parts del flagel.

Durant el procés de l'espermioogènesi, el centrosoma es divideix en dos centríols, el **centríol proximal** que constitueix la placa basal del flagel i el **centríol distal** que originarà el filament axial del flagel i acabarà desapareixent un cop format el flagel. Per tant, en el coll observem la placa basal, el centríol proximal i el principi de l'axonema (9 parells de microtúbuls rodejant 2 microtúbuls centrals).

Peça mitjana

La peça mitjana mesura aproximadament 5 µm. Es caracteritza per la presència just sota la membrana, d'una **beina de mitocòndries** disposades una després de l'altra en forma helicoidal. En cada espermatozoide hi trobem de 75 a 100 mitocòndries. La beina de mitocòndries rodeja l'axonema (9+2) amb 9 fibres denses externes al voltant que li confereixen a l'axonema una gran rigidesa.

Una de les funcions proposades per aquesta beina de mitocòndries és la producció d'energia en forma de trifosfat d'adenosina (ATP), obtingut pel procés de fosforilació oxidativa que es dona a les mitocòndries. Part d'aquesta energia pot ser usada per a que es doni la mobilitat de l'espermatozoide.

La mitocòndria té dues membranes: (i) la interna, que es troba plegada formant les crestes mitocondrials i que envolta la matriu mitocondrial, i (ii) l'externa, que limita amb la interna delimitant l'espai intermembranós.

En la membrana mitocondrial interna hi trobem (i) els diferents complexos de la cadena respiratòria mitocondrial (transportadors d'electrons) que produeixen potencials electroquímics transmembrana en l'espai intermembranós i (ii) les ATP-sintases que utilitzen l'energia del gradient format per la cadena respiratòria mitocondrial per sintetitzar ATP.

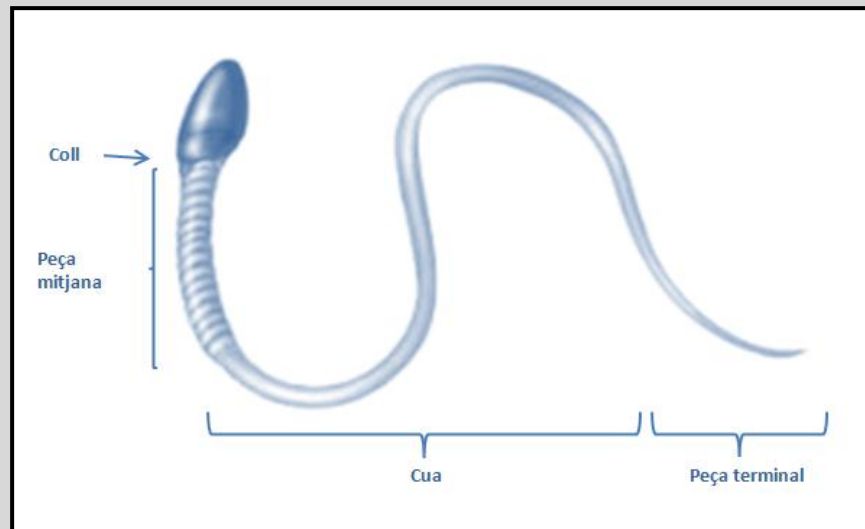
Cua o peça principal

La peça principal mesura aproximadament uns 40 µm de longitud. Sota la membrana hi ha present una beina fibrosa formada per dues fibres longitudinals unides entre si per moltes prolongacions concèntriques. Aquesta beina fibrosa rodeja les fibres denses que envolten l'axonema.

Peça terminal

És la part final de la cua, d'uns 5 µm de longitud i únicament consta de l'axonema rodejat directament per la membrana.

Figura 1.7. Estructura del flagel de l'espermatozoide humà



Es creu que la mobilitat dels espermatozoides és el resultat de moviments longitudinals rítmics de lliscament entre els túbuls que constitueixen l'axonema, i que l'energia per aquest procés es deriva de l'ATP sintetitzat en les mitocòndries de la peça mitjana.

2.2. Contribució de l'espermatozoide a l'embrió

La idea més acceptada fins el 2002 era que l'oòcit aportava tots els components citoplasmàtics (proteïnes, RNA, mitocòndries, etc.) necessaris pel desenvolupament embrionari, mentre que es creia que l'única funció de l'espermatozoide era ser un vehicle per aportar el genoma haploide masculí a l'oòcit madur.

No obstant, estudis recents suggereixen que aquest model és incomplet ja que a part del genoma haploide, s'ha observat que l'espermatozoide aporta a l'oòcit un estímul d'activació, un centrosoma funcional, un genoma amb unes marques epigenètiques i altres factors com RNAs.

2.2.1. Estímul d'activació

Els oòcits humans es troben arrestats en l'estadi de metafase II de la meiosi que es dona durant l'oogènesi humana. Un cop es dona la fusió entre un espermatozoide fertilitzant i un oòcit, s'indueix en el citoplasma de l'oòcit unes oscil·lacions de calci que permeten la finalització de la meiosi de l'oòcit, formant així el segon corpuscle polar i el pronucli femení.

S'ha establert que la iniciació d'aquesta activació de l'oòcit, es dona després que un factor d'activació transmès per l'espermatozoide (SOAF: *sperm-borne oocyte activating factor*) entri en el citoplasma de l'oòcit (Runft *et al.*, 2002). Tot i això, encara no està clar quines proteïnes espermàtiques tenen aquest rol crucial. S'han proposat varies proteïnes candidates per aquesta funció.

La proteïna **PLC zeta** (fosfolipasa C zeta) es localitza en la regió perinuclear de l'espermatozoide (citoplasma que rodeja el nucli de l'espermatozoide) i va ser considerada en el 2002, com la proteïna candidata principal per l'activació de l'oòcit (SOAF), ja que es va demostrar que la microinjecció del cRNA corresponent la proteïna PLC zeta o de la seva proteïna recombinant en el citoplasma de l'oòcit, feia iniciar un alliberament de calci produït així l'activació de l'oòcit (Cox *et al.*, 2002; Saunders *et al.*, 2002).

No obstant, recentment ha aparegut un estudi que suggereix que la PLC zeta no compleix els requisits fonamentals per ser considerada com un factor activador de l'oòcit (SOAF), ja que la PLC zeta no es detecta en l'espermatozoide un cop s'ha dut a terme la reacció acrosòmica, i per tant no podria ser incorporada en el citoplasma de l'oòcit (Aarabi *et al.*, 2012).

2.2.2. Centrosoma funcional

Com s'ha comentat anteriorment, el centrosoma es troba format per un parell de centríols associats a diferents proteïnes que conjuntament formen el centre organitzador de microtúbuls de la cèl·lula. Aquest centre regulador de microtúbuls és el responsable de la correcta segregació dels cromosomes durant la divisió cel·lular.

Anteriorment s'ha citat que l'espermatozoide únicament està dotat del centríol proximal, ja que el centríol distal i algunes de les proteïnes associades al centrosoma són eliminats durant l'espermatogènesi. Per altra banda, l'oòcit ha perdut els dos centríols però encara manté certes proteïnes associades al centrosoma que seran essencials per la funció del centrosoma en l'embrió.

Un cop l'espermatozoide ha penetrat en l'oòcit i es comença la formació dels pronuclis, el centríol proximal que ha aportat l'espermatozoide es duplica i recluta les proteïnes associades al centrosoma de l'oòcit, formant així un centrosoma funcional per l'embrió (Manandhar *et al.*, 2005).

2.2.3. Marques epigenètiques

S'ha demostrat l'existència d'un major percentatge d'errors en l'obtenció d'embaràs en aquells pacients que es sotmeten a tècniques de reproducció assistida en comparació als que es donen de forma natural. Una hipòtesi que podria explicar aquest fet és la utilització d'espermatozoides que no podrien fertilitzar de forma natural, els quals poden tenir un risc elevat de presentar errors epigenètics.

A continuació es mostren possibles mecanismes epigenètics que es poden donar en els espermatozoides.

Metilació del DNA

En els anys 80, mitjançant tècniques de microinjecció, es va poder realitzar en ratolins zigots a partir de 2 pronuclis femenins (zigots ginogènets) i a partir de 2 pronuclis masculins (zigots androgènets). Es va poder observar que cap d'ells desenvolupava un embrió correctament. Aquests estudis van demostrar que el genoma patern i matern no són equivalents i són necessaris ambdós pel correcte desenvolupament d'un embrió.

Una de les modificacions epigenètiques més estudiades és la metilació del residu de citosina de les illes de dinucleòtids CpG del DNA, que promou l'emmudiment dels gens que en les seves corresponents illes CpG presenten un alt grau de metilació (Rousseaux *et al.*, 2005).

En el moment de la fertilització, el DNA de l'espermatozoide conté unes marques epigenètiques degut a la presència d'una metilació específica en illes CpG de certs gens (*imprintat* patern), mentre que altres regions que es troben metilades en el DNA de l'òocit es troben desmetilades en l'espermatozoide (*imprintat* matern). Aquestes marques de metilació permetran l'expressió específica de gens d'origen patern o matern durant les primeres etapes del desenvolupament embrionari.

Immediatament després de la fertilització, el genoma patern és activament desmetilat excloent el gens *imprintats* i seqüències repetitives. La primera onada de metilació *de novo* es dona durant la fase de blastocist en les diferents línies cel·lulars somàtiques. No obstant, en les cèl·lules germinals primordials (PGC), que són els precursors de les cèl·lules germinals, es dona una segona onada de desmetilació, incloent ara la desmetilació dels gens *imprintats* materns i paterns. Finalment es restableix el patró patern de metilació en les pre-espermatogònies per a que en un futur es doni una correcta espermatogènesi (Sasaki & Matsui, 2008).

Modificacions de la cromatina

Com hem indicat anteriorment (*Veure punt 2.1.1. del present apartat*), la correcta protaminació del material genètic de l'espermatozoide és crítica per a que hi hagi una bona condensació del nucli. Diverses hipòtesis sostenen que aquesta protaminació aporta a l'espermatozoide una forma hidrodinàmica que l'ajudaria a tenir una millor mobilitat i una protecció òptima de la cromatina espermàtica front l'atac de nucleases durant el trajecte de l'espermatozoide pel tracte femení. No obstant, també s'ha suggerit que aquesta protaminació pot oferir també una marca epigenètica per silenciar les regions de DNA unides a les protamines (Oliva, 2006).

Estudis recents han observat que el DNA de l'espermatozoide que resta unit a histones no s'estableix a l'atzar, sinó que aquestes regions estan enriquides en seqüències gèniques reguladores, on la majoria d'aquestes corresponen a gens involucrats en el desenvolupament embrionari (Arpanahi *et al.*, 2009). En un altre estudi s'ha observat que a més a més de l'enriquiment en seqüències reguladores de gens involucrats en el desenvolupament embrionari, també es troben retinguts per histones gens de miRNAs i gens *imprintats* (Hammoud *et al.*, 2009).

Diferents estudis suggereixen una nova hipòtesi que proposa que l'embrió hereta l'organització dels dominis DNA *loop* associats a la matriu nuclear del genoma patern de l'espermatozoide i que aquesta organització estructural es manté en l'embrió primerenc podent actuar com a bastida per la replicació del DNA en les primeres fases del desenvolupament embrionari (Yamauchi *et al.*, 2011).

Variants i modificacions d'histones

Les possibles funcions epigenètiques de les modificacions de la cromatina espermàtica en la fertilització són molt controvertides. Aquesta controvèrsia es deguda a que les protamines de l'espermatozoide són ràpidament substituïdes per histones d'origen matern en les primeres fases de la formació del zigot. No obstant, s'hipotetitza que la localització de variants específiques d'histones i les modificacions d'aquestes podrien ser les responsables del marcatge epigenètic aportat per l'espermatozoide durant les primeres fases del desenvolupament embrionari.

Les histones tenen la gran capacitat d'activar o emmudir diferents gens segons les modificacions que tinguin en els seus residus de lisina (K) i serina (S), fent d'elles uns potents reguladors epigenètics. Les modificacions de les histones són un component essencial en la regulació epigenètica de la transcripció durant l'espermatogènesi i el desenvolupament embrionari. Cal destacar que en certs estudis s'ha observat que gens clau en el desenvolupament es troben units a histones amb un marcatge bivalent (marques d'activació i marques d'emudiment), el qual és molt similar al que trobem en gens de desenvolupament en les cèl·lules mare embrionàries (Hammoud *et al.*, 2009)

2.2.4. RNAs

Tot i que la presència de RNAs en l'espermatozoide està actualment acceptada, les possibles funcions biològiques d'aquests encara es troben en debat (*Veure figura 1.8*).

mRNAs

El fet que l'espermatozoide sigui una cèl·lula transcripcionalment inerta feia pensar que aquests mRNAs eren únicament romanents de l'espermatogènesi, degut a una expulsió incompleta del citoplasma durant la compactació del nucli i, per tant, sense cap funció. Tot i això, l'anàlisi per *microarrays* dels mRNAs presents en espermatozoides de diferents ejaculats humans mostra l'acumulació d'una població estable de mRNAs, que es manté constant en les diferents mostres estudiades. Aquest fet, suggereix que hi ha una retenció selectiva de mRNAs durant l'espermatogènesi (Ostermeier *et al.*, 2002).

El significat funcional d'aquests mRNAs encara no ha estat establert, tot i que s'han proposat diferents hipòtesis:

(i) *La participació en el desenvolupament embrionari primerenc*

Diferents estudis han mostrat que certs mRNAs, que es troben presents en l'espermatozoide i absents en l'oòcit madur, s'observen en el zigot després de dur a terme ICSI heteròloga. A més a més, alguns d'aquests es mantenen al llarg de les primeres hores del desenvolupament, el que suggereix que possiblement siguin necessaris per una correcta embriogènesi, mentre que altres són degradats en el moment de la formació del zigot (Ostermeier *et al.*, 2004; Avedano *et al.*, 2009). Addicionalment, en l'espermatozoide madur, s'ha detectat el mRNA que codifica per la proteïna PLC zeta (*Veure punt 2.2.1 del present apartat*) i s'ha observat que la injecció d'aquest mRNA en oòcits de ratolí desencadena oscil·lacions del calci i, per tant, l'activació del oòcit (Sone *et al.*, 2005).

Aquestes troballes suggereixen, que els mRNAs retinguts selectivament en l'espermatozoide madur podrien tenir un rol important en el desenvolupament embrionari primerenc.

(ii) Funció estructural

S'ha demostrat que certs RNAs retinguts en l'espermatozoide es troben associats a la matriu nuclear (Lalancette *et al.*, 2008). Per tant, es creu que certs RNAs de l'espermatozoide madur podrien tenir una funció passiva en la reorganització de la cromatina durant l'espermatogènesi, estabilitzant la unió entre la matriu nuclear i el DNA associat a histona, o bé una funció activa en el marcatge de les seqüències de DNA per evitar la seva associació a protamines.

Aquest fet suggereix que aquests RNAs podrien tenir una importància rellevant en l'empaquetament diferencial del DNA de l'espermatozoide, qüestió que es creu funcionalment important en la embriogènesi (*Veure punt 2.2.3 del present apartat*).

(iii) Traducció a proteïna

S'ha postulat que certs transcrits són traduïts a proteïna en l'espermatozoide, tot i l'absència de rRNAs nuclears, el que afavoreix la idea que aquesta traducció es dona en la mitocondria (Gur & Breitbart, 2006). Aquesta hipòtesi és molt controvertida ja que cap altre grup ha pogut replicar el resultat d'aquest estudi.

(iv) Modificadors epigenètics

S'ha observat que un RNA present en l'espermatozoide de ratolí (Kit: *Mast/stem cell growth factor receptor Kit*) pot alterar epigenèticament el fenotip de la descendència, mentre que el genotip salvatge d'aquesta es preserva, mitjançant un procés anomenat paramutació (Rassoulzadegan *et al.*, 2006). Els ratolins que presenten la mutació nul·la Kit^{tm1Alf} (inserció del gen *lacZ*) en homocigosi moren a les poques hores de naixement, ja que aquest gen està involucrat en diferents processos de desenvolupament. Per altra banda, els ratolins heterocigots per aquesta mutació presenten un tret fenotípic molt característic, el color blanc de la punta de la cua i les potes d'aquests.

Aquest estudi va observar que al creuar dos ratolins heterocigots, la progènie que presentava les 2 còpies gèniques normals, sense la mutació, mantenien i transmetien el fenotip característic del mutant heterocigot a la seva progènie. També van observar que la microinjecció del mRNA Kit procedent de ratolins heterocigots per la mutació en embrions normals d'una cèl·lula, resultava en el naixement de ratolins amb el fenotip característic dels heterocigots (cua i potes blanques).

Aquests experiments ens il·lustren el concepte de canvis epigenètics heretats via RNA, el que reforça la idea de la importància del RNA que viatja de l'espermatozoide a l'òocit. La gran pregunta ara és saber si això ocorre en altres gens i si també es dona en humans, ja que podria ser clau per explicar la predisposició familiar a malalties que no poden ser explicades per les lleis mendelianes.

(v) Romanents de l'espermatogènesi

Alguns RNAs de l'espermatozoide poden ser romanents de l'espermatogènesi sense cap funció, tot i això aquests poden ser útils com a marcadors de l'estat de fertilitat i per avaluar els esdeveniments passats que han esdevingut durant l'espermatogènesi.

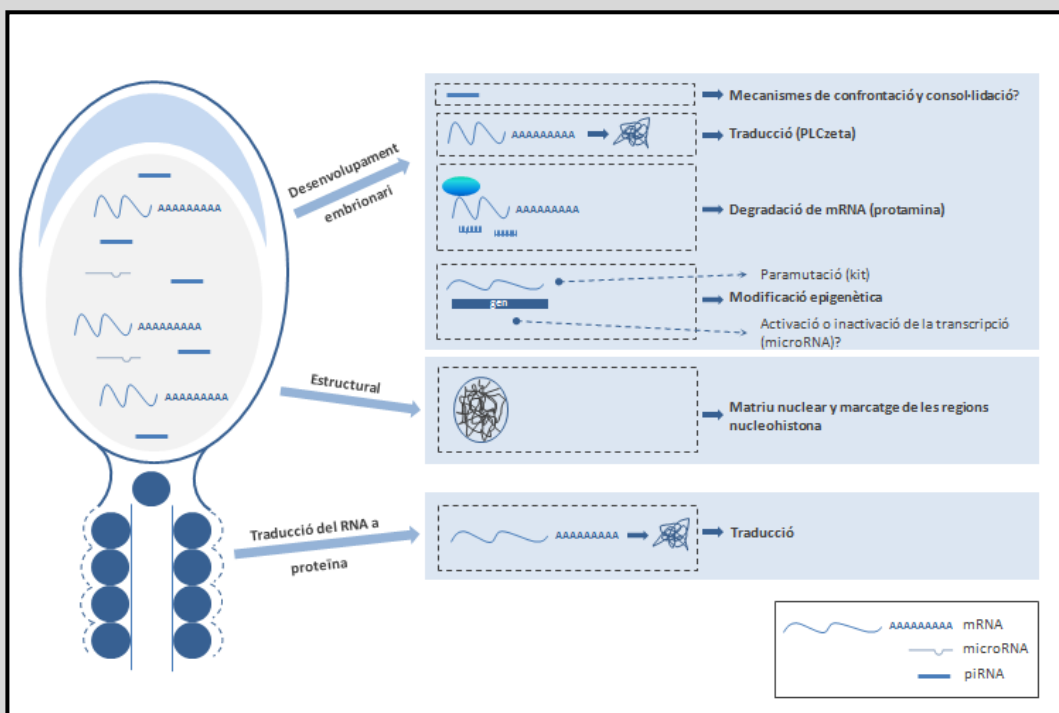
Small non coding RNAs (sncRNAs)

En la literatura hi ha evidències que mostren que els sncRNAs, sobretot el miRNAs, són una peça clau en el control de la diferenciació cel·lular mitjançant la regulació post-transcricional de l'expressió gènica. No obstant, el paper dels miRNAs aportats per l'espermatozoide en el desenvolupament de les etapes primerenques de l'embrió és un tema controvertit.

Recentment, un estudi en ratolins ha mostrat el paper crucial d'un microRNA, el miR-34c, en la primera divisió del zigot de ratolí (Liu *et al.*, 2012). S'ha observat que en ratolí aquest miRNA està altament expressat en espermàtides rodones i també es detecta en embrions d'una cèl·lula (s'ha comprovat que no és d'origen matern), mentre que no està present en oòcits ni en embrions de més de una cèl·lula. Van poder comprovar la funció d'aquest miRNA injectant en zigots un inhibidor del miRNA-34c, i van observar que la gran majoria del zigots no es dividien, mentre que si injectaven l'inhibidor i una molècula que competia per la unió d'aquest inhibidor (per tant el miR-34c no era inhibit) gairebé el 100% del zigots feien la seva primera divisió.

Per tant, és molt intrigant la contribució de sncRNAs paterns en la fertilització, ja que podrien participar en el mecanismes de confrontació i consolidació dels genomes dels pares (Bourc'his & Voinnet, 2010). Durant la confrontació, els sncRNAs podrien actuar assegurant la compatibilitat dels genomes mitjançant l'aparellament del RNAs de l'oòcit i de l'espermatozoide, per prevenir o activar la resposta, mentre que durant la fase de consolidació els sncRNAs paterns podrien actuar com a guia de la heterocromatització.

Figura 1.8. Possibles funcions del RNA d'espermatozoide



Font: imatge basada en l'article de Lalancette et al., 2008. "Paternal contributions: New Functional Insights for Spermatozoal DNA".

3. Infertilitat

La fertilitat es defineix com a la capacitat que tenen els éssers vius de reproduir-se. L'esterilitat és la pèrdua d'aquesta capacitat (Vanrell, 1992).

Existeix una forta controvèrsia en l'ús dels vocables **infertilitat** i **esterilitat**. En principi, són considerats sinònims (per la *Real Academia de la Lengua*, per exemple), tot i que alguns autors consideren estèril a la parella que no pot concebre fills, i infèril a la que avorta repetidament (Vanrell, 1992). D'altres (*The American College of Obstetrics and Gynecologist*, per exemple) considera l'esterilitat com la incapacitat irreversible de concepció, mentre que la infertilitat seria l'absència o disminució de la concepció, però sense caràcter irreversible. Donat els continus avanços en el camp de la Reproducció Assistida, aquesta definició no és de molta ajuda, ja que s'han de redefinir contínuament els criteris d'irreversibilitat.

Un dels termes més utilitzats en els últims temps és el terme de **subfertilitat**, que es pot definir com la incapacitat d'aconseguir un embaràs a terme després d'un any de relacions sense protecció en la fase fèrtil del cicle menstrual (Evers, 2002), ja que hi ha autors que estableixen que el 80% de les parelles que tenen relacions sexuals en aquest període aconseguirien l'embaràs en tant sols 6 cicles (Gnoth *et al.*, 2005). D'aquesta manera, la parella subfèrtil es defineix com aquella menys fèrtil que una parella normal.

La subfertilitat és un problema que afecta entre el 15% i el 20% de la població en edat reproductiva (1 de cada 5-7 parelles). S'estima que aproximadament un 40% dels casos de subfertilitat es deu a un *factor masculí*, un 40% es deu a un *factor femení* i un 20% es deu a un *factor conjunt* (Oliva & Ballescà, 1999).

Un cop s'ha establert el problema de subfertilitat conjugal, la parella afectada precisa d'un correcte diagnòstic etiològic per tal de buscar una solució eficaç. Per tant, necessitarem d'un estudi racional i metòdic d'ambdós membres.

En aquesta tesi únicament ens centrarem en l'estudi de la infertilitat deguda a un factor masculí.

3.1. Pràctiques andrològiques en la determinació del factor masculí

Per la determinació d'una subfertilitat deguda a un factor masculí es realitzaran rutinàriament en un laboratori d'andrologia un seguit de proves.

3.1.1. Història clínica

És important, primer de tot, la creació d'una detallada història clínica amb els següents punts:

- (i) Antecedents d'interès andrològic (gestació i part propi, pubertat, història genitourinària, existència de patologies de risc, etc.).
- (ii) Història reproductiva (duració de la subfertilitat, existència de gestacions anteriors, funció sexual).
- (iii) Malalties generals rellevants (diabetis, galteres, etc.).
- (iv) Exposició a factors amb efecte negatiu sobre la fertilitat (medicaments, estil de vida, etc.).
- (v) Història familiar (consanguinitat, antecedents de infertilitat, fertilitat en els germans).

3.1.2. Exploració física

La exploració física sol constar dels següents punts:

- (i) Hàbits somàtics, dades antropomètriques i caràcters sexuals secundaris.
- (ii) Exploració dels genitals externs: penis, regió inguinal, escrot, testicles, epidídim, conductes deferents, etc.
- (iii) Exploració prostàtica mitjançant el tacte rectal.

3.1.3. Seminograma

El seminograma es duu a terme per conèixer la qualitat del semen. El manual de laboratori per l'examinació i processament del semen humà (WHO 2010) ens explica detalladament i d'una manera estàndard, les pautes necessàries per l'examen de l'ejaculat humà que han de seguir els laboratoris d'andrologia.

A continuació, es descriuen els paràmetres més importants a l'hora d'analitzar una mostra de semen, així com les tècniques més apropiades per a la seva determinació.

Examen macroscòpic

Abans de procedir a l'anàlisi microscòpic cal tenir en compte certs aspectes macroscòpics de la mostra. Primer de tot, hem d'analitzar la **viscositat** de la mostra i la **liqüefacció**. Una mostra de semen normal es liqua aproximadament en 20 o 30 minuts a temperatura ambient. La viscositat es refereix a la fluïdesa de la mostra. No s'ha de confondre viscositat amb liqüefacció (una mostra pot tenir una viscositat normal i que la seva liqüefacció no sigui completa).

No podem analitzar les característiques microscòpiques fins que el procés de liqüefacció s'hagi completat.

Altres aspectes a tenir en compte són l'**aspecte** (color i opacitat/transparència), l'**olor**, el **volum** de l'ejaculat i el **pH** de la mostra.

Examen microscòpic

Analitzarem diferents paràmetres microscòpics per la determinació de la qualitat dels espermatozoides presents en la mostra.

(i) **Concentració**

La determinació exacta de la concentració d'espermatozoides (milions d'espermatozoides per mil·lilitre de semen) i de la seva quantitat total en l'ejaculat (milions d'espermatozoides per ejaculat) són molt importants, considerant-ne ambdós paràmetres fonamentals per avaluar la qualitat de l'ejaculat (*Veure Taula 1.1*).

El mètode més emprat per calcular la concentració és la cambra Makler, que tant serveix per estudiar la concentració com la mobilitat (*Veure Figura 2.2 de l'apartat Materials i mètodes*).

(ii) Mobilitat

Existeixen quatre tipus d'espermatozoides en funció de la mobilitat que presenten (WHO 2010):

- a. Espermatozoides mòbils progressius ràpids (velocitat tipus A): es desplacen de forma rectilínia i ràpida amb velocitat igual o superior a 25 µm/seg.
- b. Espermatozoides mòbils progressius lents (velocitat tipus B): es desplacen més lentament, de forma rectilínia o curvilínia, amb velocitat de progressió entre 10 i 25 µm/seg.
- c. Espermatozoides mòbils no progressius (velocitat tipus C): es mouen, però no canvien de posició.
- d. Espermatozoides immòbils (velocitat tipus D): no es mouen en absolut.

La determinació de mobilitat espermàtica és molt subjectiva i pot presentar gran variabilitat entre els observadors. Per aquest motiu, s'utilitza un sistema d'anàlisi d'imatge tractat amb ordinador (CASA: Proiser, València, Espanya) per tal d'obtenir una descripció més objectiva i detallada de la mobilitat espermàtica.

(iii) Morfologia

L'estudi de la morfologia es realitza amb preparacions tenyides per *Diff-Quick*[®] i visualitzades al microscopi òptic (*Veure punt 2.1 de l'apartat Materials i mètodes*).

Els defectes en la morfologia de l'espermatozoide es poden classificar en les següents categories:

- a. Defectes en el cap de l'espermatozoide (gran, petit, piriforme, cònic, amorf, vacuolar, doble, amb acrosoma petit, o qualsevol combinació d'aquests).
- b. Defectes en el coll i la peça mitjana (absent, angulada, distesa, irregular, molt fina, inserció asimètrica de la peça mitjana al cap, presència de grans gotes citoplasmàtiques).
- c. Defectes de la cua (absent, curta, múltiple, trencada, ampla, recargolada).

De tots els paràmetres seminals estudiats, la morfologia sembla ser el que millor prediu el potencial fecundant d'una mostra de semen. Però, l'estimació de la morfologia espermàtica és molt subjectiva i requereix de personal molt especialitzat per la seva determinació seguint els criteris estrictes de Kruguer (Kruguer *et al.*, 1987).

Interpretació del seminograma

Per una bona interpretació del seminograma i una orientació del diagnòstic adequada, s'han d'analitzar almenys dues mostres de semen recollides en un interval de temps entre 1 i 3 mesos, per evitar les possibles variacions individuals i altres factors que poden alterar la qualitat de la mostra (certes medicacions, estrés, etc.).

Comparant els valors obtinguts en el seminograma amb els valors de referència establerts per la WHO (*Veure Taula 1.1*) podem classificar els pacients segons els paràmetres seminals de les seves mostres de semen de la següent manera:

(i) **Normozoospèrmia**

Són pacients que presenten paràmetres seminals dins el rang de la normalitat. No obstant, normozoospèrmic no és sempre sinònim de fèrtil. Una mostra de semen pot ser normal segons els paràmetres seminals bàsics (volum, concentració, mobilitat i morfologia), però tenir certes alteracions no visibles per microscòpia òptica que dificultin o impedeixin la fecundació de l'òocit.

(ii) **Aspèrmia**

Els pacients que es classifiquen en aquest grup no tenen producció de semen.

(iii) **Azoospèrmia**

Aquest pacients no presenten espermatozoides en el seu ejaculat, inclús no s'observen espermatozoides després de dur a terme una centrifugació de la mostra. La incidència d'azoospèrmia en la població general és d'un 2% i en la població subfèrtil pot arribar a ser del 15 al 20%. Podem classificar les azoospèrmies en:

- a. Azoospèrmia secretora: La causa de l'azoospèrmia és alguna alteració durant el procés d'espermatogènesi.
- b. Azoospèrmia obstructiva: La causa de l'azoospèrmia és l'existència d'alguna obstrucció de les vies seminals.
- c. Combinació d'ambdues patologies.

(iv) **Criptozoospèrmia**

Les mostres fresques d'aquest tipus de pacients són similars a les azoospèrmies (no es detecten espermatozoides en l'ejaculat), però sí que s'observa alguns espermatozoides en el sediment un cop centrifuguem la mostra.

(v) **Oligozoospèrmia**

El nombre total d'espermatozoides o la concentració espermàtica de l'ejaculat es troba sota el límit inferior marcat per la WHO (*Veure Taula 1.1*), per tant, la mostra té un nombre total d'espermatozoides inferior a 39 milions o presenta una concentració espermàtica inferior a 15 milions d'espermatozoides per mil·lilitre.

(vi) **Astenozoospèrmia**

La mobilitat dels espermatozoides presents a l'ejaculat es troba alterada. Podem considerar un pacient astenozoospèrmic quan menys del 32% dels seus espermatozoides presenten una mobilitat progressiva (A+B) o si el 60% dels seus espermatozoides són immòbils (A+B+C < 40%).

(vii) **Teratozoospèrmia**

La teratozoospèrmia es defineix quan en un ejaculat una proporció inferior al 4% dels espermatozoides són morfològicament normals. Aquest paràmetre al llarg dels anys s'ha tornat menys restrictiu, el límit de referència establert per la WHO el 1999 era del 15% de formes normals. En la última revisió del 2010 s'ha establert el 4%.

Un tipus específic de teratozoospèrmia és la globozoospèrmia, que es caracteritza per la presència d'espermatozoides amb un cap esfèric amb absència d'acrosoma.

Taula 1.1. Valors de referència dels paràmetres seminals establerts per la WHO 2010

Paràmetre seminal	Límit inferior de referència
Examen macroscòpic	
Volum seminal	1,5 ml
pH	≥ 7,2
Examen microscòpic	
Concentració espermàtica	15x10 ⁶ per ml
Nombre total d'espermatozoides	39x10 ⁶ per ejaculat
Motilitat progressiva (A+B)	32%
Motilitat total (A+B+C)	40%
Morfologia espermàtica	4% de formes normals

Font: Basada en el WHO 2010.

Normalment una mostra de semen presenta més d'una alteració dels seus paràmetres seminals tenint així pacients oligoastenozoospermics, oligoteratozoospermics, astenoteratozoospermics i oligoastenoteratozoospermics.

3.1.4. Proves diagnòstiques addicionals

En casos molt concrets pot ser adequat la realització de diferents proves addicionals.

Determinació hormonal

Una prova addicional que es pot realitzar en pacients azoospermics i oligozoospermics severos és la determinació hormonal de la FSH. S'ha observat que pacients que presenten una azoospermia obstructiva presenten normalment uns nivells de FSH normal, mentre que si l'azoospermia es deu a una parada madurativa (azoospermia secretora), aquests pacients presenten uns nivells de FSH elevada. Hi ha estudis que relacionen inversament la FSH i el número de cèl·lules germinals testiculars, mentre que no guarda cap relació amb la quantitat d'espermatozoides de l'ejaculat. Tot i això, es creu que la determinació de la inhibina B pot ser un millor marcador de l'estat de l'espermatogènesi.

També es pot determinar els nivells hormonals de LH i testosterona en casos que hi hagi una disfunció sexual associada com per exemple, un volum testicular baix, signes de hipoandrogenització o endocrinopaties.

Biòpsia testicular

La biòpsia testicular pot ser aconsellada en pacients azoospermics i oligozoospermics severos que no presentin una obstrucció dels canals deferents, i en casos en que la parella presenti avortaments repetitius. Amb el teixit testicular extret amb una biòpsia testicular es poden realitzar dos tipus d'estudis:

- (i) **Estudis histològics.** Mitjançant l'observació per microscopi de l'estructura dels túbuls seminífers i del estadi cel·lular de les cèl·lules germinals presents, podem conèixer la presència d'algun bloqueig meiótic. Podem trobar presència de cèl·lules germinals en profase però no en metafase, si aquest bloqueig és total ens portaria a una azoospermia amb parada madurativa, mentre que si aquest bloqueig és parcial ens portaria a una oligozoospermia. També podem observar si la causa d'infertilitat pot ser deguda a problemes que afectin a les cèl·lules de Sertoli o de Leydig.
- (ii) **Estudis de meiosi.** Aquests estudis ens permeten observar i valorar, a partir del teixit testicular extret, l'estructura, la composició i l'ordenació dels cromosomes en els diferents passos de l'espermatogènesi. Una meiosi anòmala pot alterar el número de cromosomes presents en l'espermatozoide i, per tant, que en el moment de la fecundació es provoquin avortaments de forma repetitiva.

Estudi del dany al DNA

La integritat del genoma dels gàmetes (tant de l'oòcit com de l'espermatozoide) és una característica fonamental a tenir en compte per aconseguir una fecundació amb èxit. Els anàlisis que hem explicat fins ara no revelen defectes de l'espermatozoide que afectin la integritat del genoma patern.

L'espermatozoide humà és molt susceptible a l'estrès oxidatiu. Aquest procés indueix lesions de la membrana i fragmentació del DNA, tant nuclear com mitocondrial. Hi ha moltes evidències que indiquen una correlació negativa entre les alteracions en la integritat del DNA dels espermatozoides i el seu potencial fertilitzant (Simon *et al.*, 2011).

Els pacients que presenten un seminograma normal poden presentar anomalies en la integritat del seu DNA, cosa que no és detectada rutinàriament i, per tant, alguns autors postulen que la proporció de fragmentació de DNA podria ser usat com a marcador predictiu de la qualitat espermàtica. No obstant, un dels inconvenients diagnòstics que presenta l'estudi de fragmentació del DNA és la gran variabilitat que presenta un mateix pacient.

3.2. Causes conegudes de la infertilitat masculina

3.2.1. Causes gonadals

Les causes gonadals més estudiades són les següents:

- (i) **Criptorquídia.** La criptorquídia es dona quan durant el desenvolupament dels testicles aquests no descendeixen fins l'escrot. Això pot originar problemes estructurals i inclús atrofia dels testicles.
- (ii) **Varicocele.** El varicocele consisteix en la dilatació de les venes que drenen la sang del testicle. S'ha demostrat que l'existència de varicocele té efectes adversos en l'espermatogènesi, alterant així la producció d'espermatozoides. Es creu que aquesta alteració pot ser deguda a canvis de temperatura en el testicle i a l'aparició d'un reflux venós, tot i que de moment no es coneix exactament el seu mecanisme fisiopatològic.
- (iii) **Infeccions.** Per exemple, una infecció per galteres pot deixar seqüeles que esdevinguin en una atrofia testicular.
- (iv) **Patologies de la via seminal.** Moltes d'aquestes patologies no afecten a la producció d'espermatozoides sinó a la seva sortida del testicle. Es poden tenir obstruccions a nivell espermàtic, de l'epidídim i del conducte deferent. Dins d'aquest grup podem incloure la impotència sexual i l'ejaculació retrògrada.

3.2.2. Causes sistèmiques

Podem dividir les causes sistèmiques en diferents grups:

- (i) *Hormonals.* Les alteracions hormonals poden ser degudes a desordres hipotalàmics, hipogonadisme, dèficit de testosterona, hipotiroïdisme, hiperplàsia adrenal congènita, etc.
- (ii) *Immunològiques.* Es coneix que certs pacients (tant homes com dones) poden desenvolupar anticossos que reaccionin contra els espermatozoides e interfereixin amb la fertilitat. En els homes podem trobar anticossos antiespermàtics que s'adhereixen als espermatozoides en el plasma seminal, mentre que en les dones aquests anticossos antiespermàtics poden aparèixer en el moc cervical impeding la fecundació de l'oòcit.
- (iii) *Psicològiques.* Diversos estudis mostren una correlació negativa entre la presència de factors psicològics, com la ansietat, estrès i depressió, i la qualitat espermàtica.
- (iv) *Malalties.* Malalties com la diabetis, la obesitat, les viriasis, els estats febrils i d'altres poden influenciar negativament en la qualitat dels espermatozoides i/o en l'espermatogènesi.
- (v) *Medicaments.* Diversos medicaments tenen un efecte tòxic en la producció d'espermatozoides.

3.2.3. Factors externs

Existeix tota una sèrie de factors que afecten a la fertilitat humana i que tenen un origen extern. Aquests factors s'anomenen gonadotoxines, ja que tenen un efecte tòxic o supressor sobre la producció, mobilitat i/o morfologia dels espermatozoides. Normalment, els efectes d'aquests tòxics són reversibles un cop es deixa d'estar exposat a ells.

Els factors externs més estudiats són:

- (i) *Tabac.* La nicotina i els seus metabolits semblen estar presents en el moc cervical de les dones fumadores i semblen ser tòxics pels espermatozoides. Per altra banda, en homes fumadors s'observa un detriment dels paràmetres seminals i un augment en el dany del DNA dels espermatozoides.
- (ii) *Drogues.* S'han realitzat diferents estudis que mostren una disminució de la concentració espermàtica durant la consumició de determinades drogues. Una possible explicació és que la ingesta de drogues psicoactives poden produir una alteració hormonal.
- (iii) *Alcohol.* En l'home, la ingesta abundant d'alcohol sembla resultar en disfunció sexual i afectació de l'espermatogènesi.
- (iv) *Factors ambientals.* S'ha descrit que determinats factors ambientals (contaminació, raigs UV, pesticides, insecticides, metalls pesats, disruptors endocrins...) poden estar associats amb alteracions dels paràmetres seminals.

3.2.4. Factors genètics

La cerca de factors genètics associats a la infertilitat masculina és un camp molt estudiat des de l'aparició de les tècniques d'anàlisi del DNA, com poden ser l'estudi del cariotip i l'estudi per PCR de gens relacionats amb la fertilitat. De moment, s'han establert algunes associacions fortes entre anomalies genètiques i infertilitat masculina, i el seu estudi ja és rutinari en molts centres de fertilitat. Podem dividir aquestes anomalies genètiques en tres grans grups:

Anomalies cromosòmiques

El cariotip normal està format per 22 cromosomes autosòmics més 2 cromosomes sexuals que determinen el sexe de l'individu (46,XY determina el sexe masculí). Les anomalies cromosòmiques es detecten aproximadament en un 5% dels pacients amb problemes de fertilitat, però la seva prevalença augmenta fins un 13% quan considerem únicament pacients azoospermics (Ferlin *et al.*, 2006).

Tenim dos tipus d'anomalies cromosòmiques que es poden avaluar mitjançant l'estudi del cariotip en sang perifèrica (Veure figura 1.9):

- (i) **Anomalies numèriques (aneuploidies).** Aquestes alteracions impliquen la presència d'un cromosoma extra o l'absència d'un cromosoma.

L'anomalia cromosòmica més comuna en pacients masculins infèrtils és l'aneuploidia 47,XXY (**Síndrome de Klinefelter**). La prevalença del Síndrome de Klinefelter és d'un 10% en pacients azoospermics i d'un 5% en pacients oligozoospermics severos. Aquests pacients presenten un hipogonadisme greu, i solament alguns pacients 47,XXY aconseguen descendència mitjançant la utilització d'espermatozoides obtinguts a través d'una biòpsia testicular. El més recomanable en aquestes parelles és la inseminació amb semen d'un donant anònim.

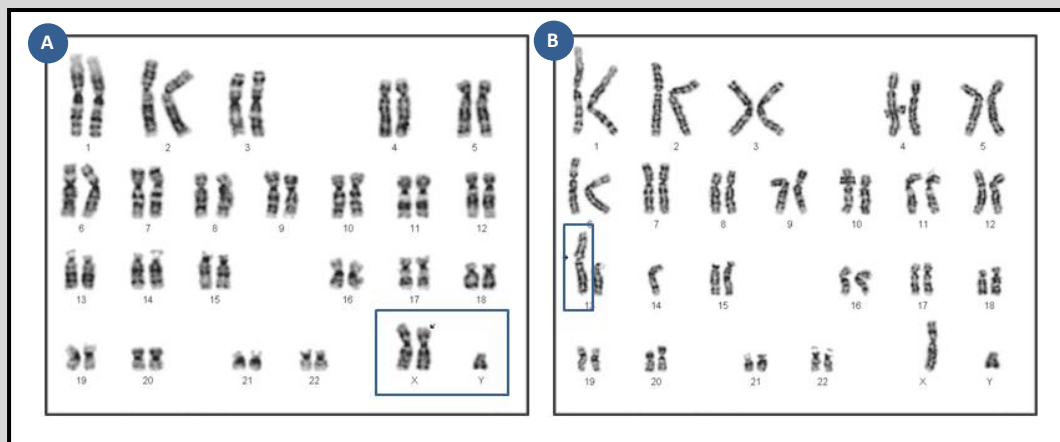
- (ii) **Anomalies estructurals.** Aquestes alteracions impliquen la presència de translocacions o altres anomalies en un o més cromosomes. Únicament parlarem d'anomalies estructurals equilibrades (no hi ha guany ni pèrdua de material genètic) que no afecten fenotípicament a l'individu portador.

Les anomalies estructurals equilibrades més freqüents en pacients infèrtils són les translocacions robertsonianes, que es produeixen per la translocació de dos cromosomes acrocèntrics, que es fusionen pel centròmer i es dona la pèrdua dels seus braços curts. Els braços curts dels cromosomes acrocèntrics tenen bàsicament múltiples gens redundants per RNA ribosòmics, per això, la pèrdua del braços curts d'un parell de cromosomes acrocèntrics no resulta deletèria.

Un 0,8% dels pacients infèrtils són portadors d'una translocació robertsoniana que és una proporció nou cops més gran que la proporció que trobem en la població general (Ferlin *et al.*, 2006).

La translocació robertsoniana més freqüent és la **45,XY,der(13;14)**, aquesta translocació dona lloc a un detriment de l'espermatogènesi, que es tradueix en oligozoospermia, probablement per la fallida en l'aparellament meiótic i per tant, a l'aparició d'espermatozoides amb una dotació cromosòmica desequilibrada, que en cas d'embaràs sol resultar en avortaments espontanis. Per aquesta raó, és recomanable l'estudi del cariotip en pacients amb avortaments recurrents.

Figura 1.9. Cariotip de dos pacients infèrtils que presenten dues anomalies cromosòmiques



Nota:

- A) Cariotip de l'anomalia cromosòmica numèrica 47,XXY corresponent a un Síndrome de Klinefelter.
 B) Cariotip de l'anomalia cromosòmica estructural 45,XY,der(13;14).

És interessant mencionar que molt ocasionalment (1/100.000) és possible detectar la presència d'un sexe cromosòmic que no correspon al sexe fenotípic, ja que podem trobar mascles 46,XX i femelles 46,XY. Una de les causes més freqüent és la translocació del gen *SRY* (*Sex-determining Region Y*) del cromosoma Y al X (Margarit *et al.*, 1998). El gen *SRY* també s'anomena factor de determinació testicular, ja que aquest gen controla el desenvolupament inicial del sexe masculí. Si realitzem el cariotip en un pacient mascle infèrtil, i observem la fórmula cromosòmica 46,XX, realitzarem addicionalment tècniques moleculars, com la PCR, per la detecció del gen *SRY*.

Delecions del cromosoma Y

Al 1976, mitjançant estudis citogenètics, es va descriure per primer cop la presència de delecions en el braç llarg del cromosoma Y en un 0,5% de pacients infèrtils, i es va proposar l'existència d'un factor d'azoospermia (AZF; *Azoospermia factor*) en el braç llarg del cromosoma Y (Tiepolo & Zuffardi, 1976), degut a la presència de gens importants per l'espermatogènesi en aquesta zona.

El cariotip té la resolució de detectar les delecions més grans de 10 Mb (10 milions de bases de DNA), però gràcies a l'entrada de noves tècniques moleculars (com la PCR) es va poder augmentar la resolució detectant delecions més petites, anomenades **microdelecions del cromosoma Y**.

Mitjançant diferents estudis es va poder establir la presència de tres regions AZF en el braç llarg del cromosoma Y (Veure figura 1.10):

- (i) **AZF_a**. Les microdelecions en aquesta regió es troben associades amb una azoospermia degut a l'anomenat "síndrome de només cèl·lules de Sertoli" (SCOS; *Sertoli cell-only syndrome*).

- (ii) **AZFb.** Les microdelecions en aquesta regió s'associen amb azoospèrmies amb parada madurativa (azoospèrmies secretores).
- (iii) **AZFc.** Les microdelecions en aquesta regió s'associen a un fenotip més variable que va des de l'azoospèrmia a l'oligozoospèrmia, sent l'última la més freqüent.

Un estudi que realitza una avaluació de la literatura i inclou 13.000 pacients infèrtils, mostra que la prevalença de les microdelecions del cromosoma Y en pacients infèrtils és del 7,4%, en azoospèrmics la prevalença és superior al 9.7% i en oligozoospèrmics del 6%. Les delecions completes de la regió AZFc són les més comunes de les microdelecions (69%), seguides per les delecions de la regió AZFb (14%) i de la regió AZFa (6%) (Massart *et al.*, 2012).

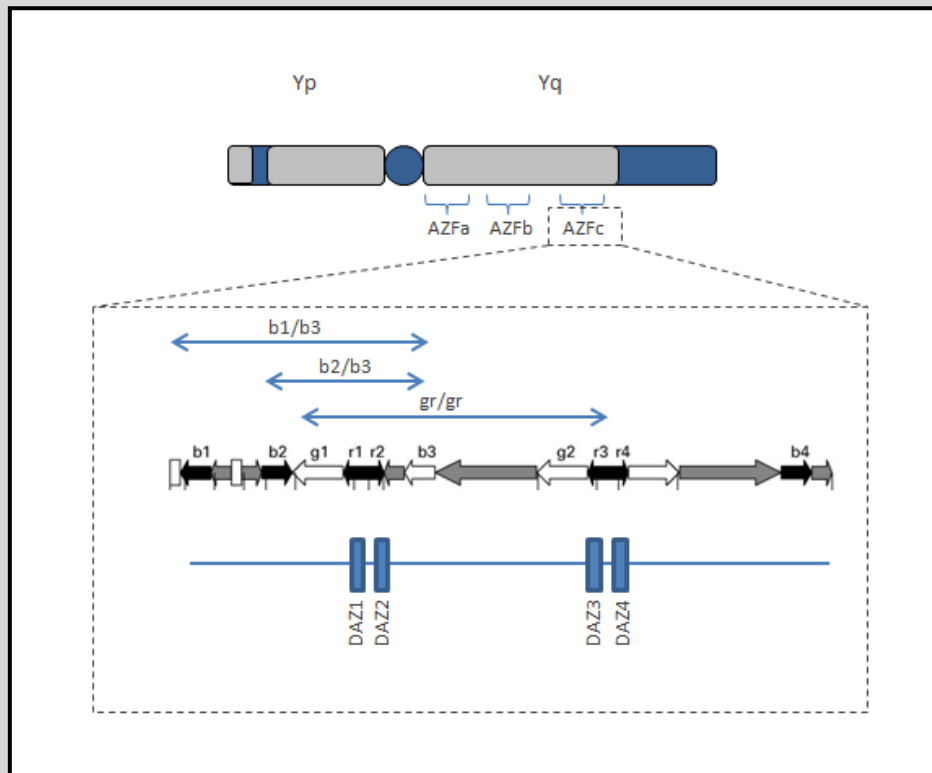
La determinació de la presència de microdelecions del cromosoma Y es realitza rutinàriament a la clínica en pacients azoospèrmics i oligozoospèrmics severos, ja que té un gran valor diagnòstic previ a un tractament de reproducció assistida. S'ha establert que la presència de microdelecions de la regió AZFc en pacients azoospèrmics té un bon pronòstic, ja que ens indica que és molt probable trobar espermatozoides després de realitzar-se una biòpsia testicular i, per tant, permetrà la possibilitat d'un tractament per ICSI (injecció introcitoplasmàtica de l'espermatozoide). Per altra banda, les microdelecions en les regions AZFa i AZFb tenen un mal pronòstic pel que fa a la recuperació d'espermatozoides en una biòpsia testicular, el que desaconsella la pràctica de la biòpsia testicular en els pacients que presentin aquestes delecions.

En 2003, en un estudi es va mostrar la presència de microdelecions parcials de la regió AZFc, anomenades **microdelecions parcials** gr/gr, b1/b3 i b2/b3 (Repping *et al.*, 2003) (Veure figura 1.10). Les microdelecions gr/gr són les més comunes i estudiades, i es caracteritzen per la pèrdua de la meitat de la regió AZFc, incloses dues de les quatre còpies de gen DAZ. El gen DAZ es considera el gen candidat del fenotip d'azoospèrmia/oligozoospèrmia severa en les microdelecions de la regió AZFc.

Al contrari que les delecions completes, les microdelecions parcials gr/gr es poden trobar en pacients normozoospèrmics, per tant no es poden considerar com una causa de la fallida de l'espermatogènesi, sinó com un factor de risc d'infertilitat masculina. S'ha postulat que altres factors lligats al cromosoma Y (haplogrups de l'Y) o no lligats, poden influenciar en la patogènicitat d'aquesta microdelecció parcial.

L'estructura duplicada i complexa de la regió AZFc predisposa a aquesta regió a diferents reordenaments mediatos per la recombinació homòloga, que inclou delecions parcials, delecions/duplicacions i duplicacions parcials. Aquests reordenaments defineixen els haplogrups de l'Y, que poden determinar un factor de risc d'infertilitat. Una de les explicacions proposades per la troballa de delecions gr/gr en pacients normozoospèrmics podria ser l'existència d'una duplicació compensatòria que restaurés el número normal de còpies del gen DAZ i, per tant, una correcta funcionalitat (Krausz *et al.*, 2009).

Figura 1.10. Tipus de microdelecions freqüents en el cromosoma Y



Font: imatge basada en l'article de Krausz et al., 2009. "Phenotypic variation within European carriers of the Y-chromosomal gr/gr deletion is independent of Y-chromosomal background".

Nota: Es mostra les tres principals microdelecions (AZFa, b i c), causants d'azoospermia o oligospermia severa, i també el factor de risc d'infertilitat masculina (microdelecions parcials (gr/gr, b1/b3 i b2/b3)).

Anomalies gèniques

Diversos centenars de gens són necessaris per a que es dugui a terme un correcte desenvolupament sexual, desenvolupament del testicle i procés d'espermatogènesi. Això ens porta a pensar que la presència de mutacions o polimorfismes en aquests gens poden ser responsables de la major part dels casos d'infertilitat idiopàtica.

A més a més, s'ha determinat que podria ser molt probable que una proporció important d'infertilitats masculines idiopàtiques, sigui deguda a una herència recessiva, ja que s'han detectat diversos tipus de defectes estructurals en els espermatozoides d'un 27% de pacients amb pares consanguinis en comparació amb únicament un 1% del mateix tipus de defectes en pacients amb pares no consanguinis (Baccetti *et al.*, 2001).

Tot i aquesta idea inicial, únicament l'estudi d'alguns gens es duen a terme en la clínica de forma rutinària:

(i) Mutacions gèniques associades a la infertilitat masculina

De moment les úniques mutacions estudiades de forma rutinària en la clínica són les següents:

- a. **Mutacions en el gen CFTR** (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*). La principal causa d'agenèsia o obstrucció dels conductes deferents és la presència d'una mutació greu en un dels al·lells i una mutació lleu en l'altre al·lel del gen *CFTR*.

La combinació d'aquestes dues mutacions (una greu i una lleu) no és suficient per a que el portador manifesti la malaltia de la fibrosis quística, no obstant, sí és suficient per ocasionar alteracions durant el desenvolupament dels conductes deferents, provocant així l'agenèsia d'aquests, que es traduirà en l'aparició d'una azoospermia obstructiva. En aquests pacients es recomana el tractament amb ICSI, ja que és possible la recuperació d'espermatozoides, però abans serà necessari l'estudi d'aquest gen en la dona, ja que hi ha un risc més elevat que la descendència presenti la malaltia de la fibrosis quística. Aquesta mutació té una prevalença del 50-60% en pacients amb una azoospermia obstructiva i del 5% en la totalitat dels pacients infèrtils (Ferlin *et al.*, 2006).
- b. **Mutacions en el gen AR** (receptor d'andrògens). Els andrògens i el receptor d'andrògens funcional són essencials pel desenvolupament i el manteniment del fenotip masculí i per l'espermatogènesi. Les mutacions en el gen *AR* causen una gran varietat de defectes coneguts com "síndrome d'insensibilitat als andrògens". El fenotips dels pacients que presenten completament la síndrome d'insensibilitat als andrògens presenten uns genitals externs femenins, els pacients que presenten la síndrome de forma intermèdia presenten genitals externs masculins però amb greus disfuncions sexuals (micropenis) mentre que formes molt lleus poden presentar infertilitat masculina com primer o únic símptoma. La prevalença de mutacions d'aquest gen en la població d'azoospermia i oligospermia és del 2 al 3% (Ferlin *et al.*, 2006).
- c. **Mutacions en els gens *INSL3-LGR8*** (*Insuline-like factor 3 – Leucine-rich-repeat-containing G protein-coupled receptor 8*). Les mutacions en aquests gens han estat associades a problemes en el descens dels testicles, que anomenem criptorquídia (Veure punt 3.2.1 del present apartat). La prevalença d'aquesta mutació en pacients que presenten una criptorquídia és del 4 al 5% (Ferlin *et al.*, 2006).

(ii) Polimorfismes i infertilitat masculina

S'han descrit diferents polimorfismes o variants gèniques en diferents gens que es poden considerar com a factors de risc per la infertilitat masculina. Si realitzem una cerca en el programa de malalties hereditàries OMIM (*Online Mendelian Inheritance in Man; veure relació de softwares utilitzats*) podem trobar 3876 entrades de gens o *loci* que han estat relacionats amb infertilitat masculina. Si acotem el fenotip del pacient infèrtil trobem 72 entrades per l'azoospermia, 16 per l'oligospermia, 6 per la teratozoospermia i 6 per l'astenozoospermia (resultats obtinguts en l'any 2012).

Podem classificar aquests polimorfismes en les següents categories:

- a. **Polimorfismes en gens que es troben involucrats en la regulació endocrina de l'espermatogènesi.** Per exemple, el receptor d'andrògens (*AR*), el receptor d'estrògens (*ER*), el receptor específic de la FSH (*FSHR*), etc.
- b. **Polimorfismes en gens implicats en l'espermatogènesi.** Per exemple el gen *DAZL* (gen autosòmic, homòleg al gen *DAZ* del cromosoma Y), els gens de les protamines (*PRM1* i *PRM2*), les proteïnes nuclears de transició (*TNP1* i *TNP2*), gen *CREM* (gen essencial per la diferenciació de espermàtides rodones a espermatozoides madurs), etc.

- c. **Polimorfismes en gens que tenen funcions comunes en la cèl·lula.** Per exemple, el *POLG* (*mitochondrial DNA polymerase γ*), *GSTM1* (*glutathioneS-transferase*), *MTHFR* (*methylenetetrahydrofolate reductase*), etc.

Normalment, els diferents estudis que s'han realitzat amb aquests gens no han tingut els mateixos resultats en els diferents grups on s'han estudiat. Les principals causes del diferents resultats solen ser per la variabilitat de: (i) la mida i la composició de la població en estudi, (ii) el tipus de polimorfisme analitzat i les tècniques utilitzades en el seu estudi, (iii) les condicions multifactorials i la heterogeneïtat del fenotip associat a la infertilitat i (iv) la variabilitat interindividual en l'efecte fenotípic, com poden ser les diferències ètniques i geogràfiques que poden contribuir a les variacions genètiques.

Per tant, els efectes fenotípics dels polimorfismes es troben modulats per altres factors genètics i factors ambientals, indicant que la infertilitat masculina té una naturalesa similar a les malalties multifactorials, ja que sembla ser que cap variant única és responsable d'una proporció apreciable de casos d'infertilitat per factor masculí. Per tant, els diferents polimorfismes trobats es consideren potencials factors de risc per a la infertilitat.

Únicament en pacients amb un fenotip molt específic s'ha trobat defectes en un únic gen, però la majoria de pacients que visiten les clíniques de fertilitat presenten majoritàriament paràmetres seminals pobres, per tant diferents variants genètiques que presentin, combinat amb certs factors ambientals, poden ser la causa dels seus paràmetres seminals anòmals.

3.3. Futurs biomarcadors de la infertilitat masculina

Tot i que l'avaluació dels paràmetres seminals és útil en el diagnòs de la infertilitat masculina té importants limitacions ja que no sempre bons paràmetres seminals són indicatius de un bon potencial de fertilitat. Per tant és necessari trobar marcadors addicionals que ens donin informació del potencial de fertilització de l'espermatozoide.

Molts grups es troben actualment en la cerca de nous biomarcadors de la fertilitat, degut a l'aparició de noves tecnologies i als avenços realitzats en el coneixement de l'espermatozoide. Podem dividir els nous avenços en quatre gran àrees: (i) en el DNA, (ii) en el RNA, (iii) en les proteïnes i (iv) en la epigenètica.

3.3.1. DNA

Estudis *genome-wide* en la cerca de SNPs associats a la infertilitat

Els nous avenços que permeten fer l'estudi de tot el genoma (*arrays* de SNPs, *arrays* d'hibridació genòmica comparada i la seqüenciació de nova generació) ens permetrà l'anàlisi de múltiples gens a la vegada. De moment, únicament s'ha realitzat un estudi d'associació *genome-wide* en pacients oligozoospèrmics i azoospèrmics per a més de 300.000 SNPs (Aston & Carrell, 2009; Aston *et al.*, 2010). Tot i que el número de pacients estudiats era inferior al recomanable en aquests tipus d'estudis, els resultats van mostrar alguns SNPs que tenien una forta associació amb l'azoospèrmia i oligozoospèrmia (n=21 SNPs) i d'aquests únicament un havia estat anteriorment associat amb la infertilitat masculina. Aquest estudi va fallar pel que fa a la identificació d'una causa real que expliqués la infertilitat, però sí va identificar certs canvis presents únicament en pacients i no en controls, indicant que aquests SNPs podrien actuar com a factors de risc.

Cal destacar que molts dels SNPs trobats es localitzaven en regions allunyades dels gens, el que feia dubtar de la seva importància, però una idea que últimament s'està proposant és la importància de les regions no codificants del DNA en processos reguladors.

La utilització de la seqüenciació de nova generació facilitarà la detecció de noves variants que no són detectades pels *arrays* de SNPs, per tant en un futur, quan el cost d'aquestes tècniques disminueixi i l'especialització del personal per analitzar aquestes dades augmenti, serà una eina molt útil per conèixer el *background* genètic que tenim en els nostres pacients i inclús ens permetrà fer una millor classificació d'aquests.

Anàlisis dels *copy number variations* (CNV)

S'ha vist que els CNVs són de gran importància en malalties multifactorials complexes, com poden ser l'esquizofrènia, el retard mental i el càncer. Per tant, l'existència de CNVs podria també afectar a l'activitat de gens individuals importants en l'espermatogènesi. Mitjançant *arrays* de genòmica comparada, s'ha realitzat el primer estudi de CNVs en un grup de pacients infèrtils oligozoospermics i azoospermics molt ben caracteritzats, comparant-los amb controls fèrtils normozoospermics (Tüttelmann *et al.*, 2011). Els resultats d'aquest estudi han evidenciat la presència de certs CNVs que poden contribuir a explicar l'origen complex de la infertilitat masculina.

3.3.2. RNA

mRNAs

Com hem mencionat anteriorment, alguns RNAs de l'espermatozoide poden ser romanents de l'espermatogènesi i poden ser útils com a marcadors de l'estat de fertilitat i per avaluar els esdeveniments passats que han ocorregut durant l'espermatogènesi.

Diferents estudis han demostrat diferències en la quantitat de determinats transcrits amb funció rellevant en l'espermatogènesi o en la capacitació dels espermatozoides, entre pacients i controls (Lambard *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004; Cedenho *et al.*, 2006; Depa-Martynow *et al.*, 2007; Guo *et al.*, 2007; Jedrzejczak *et al.*, 2007; Kempisty *et al.*, 2007; Steger *et al.*, 2008; Avendano *et al.*, 2009) mitjançant l'ús de la PCR quantitativa, i en els quals s'ha explorat la seva utilitat com potencials marcadors clínics de la infertilitat.

Les noves tecnologies, com els estudis d'expressió mitjançant *arrays*, van permetre establir el perfil transcriptòmic característic en 10 controls fèrtils normozoospermics (Ostermeier *et al.*, 2002)

El següent pas, va ser comparar els perfils transcriptòmics en pacients infèrtils, per veure si es diferenciaven del perfil establert en els controls, el que va permetre obtenir un llistat de transcrits diferencials entre aquestes dues poblacions. S'ha observat un conjunt de transcrits diferencials en pacients teratozoospermics, on s'ha vist que la via ubiquitina-proteosoma està greument alterada en aquest tipus de pacients (Platts *et al.*, 2007). Més recentment s'ha vist una distribució diferencial de transcrits en un conjunt de pacients infèrtils (Garcia-Herrero *et al.*, 2010).

En l'anàlisi transcriptòmic de 24 individus normozoospermics es va veure que dins la heterogeneïtat observada en el transcriptoma de l'espermatozoide, una proporció de parells de transcrits es mantenen sempre constants, és a dir, que la relació entre dos transcrits es manté constant en els individus estudiats (Lalancette *et al.*, 2009). Per tant, aquests resultats ens estarien indicant la possible utilització d'aquestes relacions de transcrits, que semblen estar estrictament regulats, com a possibles biomarcadors de la infertilitat.

sncRNAs

Durant el processament dels miRNAs i siRNAs és necessària l'actuació de la RNA polimerasa III anomenada DICER. Per determinar la importància d'aquests sncRNAs durant l'espermatogènesi, s'ha generat un ratolí genoanul·lat específic de les cèl·lules germinals masculines per aquesta RNA polimerasa (DICER). En aquests genoanul·lats la deleció del gen que codifica per DICER es dona específicament en la etapa postnatal, en la fase d'espermatogònia (Korhonen *et al.*, 2011).

Es va poder observar que aquest tipus de ratolí genoanul·lat presentava una reducció en la mida dels testicles i que l'espermatogènesi es troba interrompuda, tot i que en l'epidídim es trobaven una ínfima quantitat d'espermatozoides madurs on la majoria presentaven greus anomalies morfològiques. Tot i que sembla que la diferenciació espermatogènica no es trobava alterada, les anomalies més greus provenien de la diferenciació durant la fase haloide de l'espermatogènesi, el que estaria indicant la importància de DICER durant l'organització de la cromatina en la fase d'espermàtida allargada.

Diferents grups es troben estudiant el paper de certs miRNAs durant l'espermatogènesi, de moment ha aparegut un estudi que suggereix la possible implicació d'un miRNA abundant i específic de testicle, el miR34c, en les últimes fases de l'espermatogènesi (Bouhallier *et al.*, 2010). Aquesta possible implicació s'ha de corroborar amb la generació d'un genoanul·lat per aquest miRNA.

3.3.3. Proteïnes

Relació de protamines

Les protamines són les proteïnes nuclears més abundants en l'espermatozoide humà. En humans se'n coneixen dues formes: la protamina 1 (P1) i la protamina 2 (P2). El contingut de P2 en el nucli de l'espermatozoide humà és similar al de P1 (la relació P1/P2 és aproximadament 1). Diversos estudis han demostrat la correlació entre una relació anòmala de P1/P2 i la infertilitat masculina (de Yebra *et al.*, 1998; Oliva, 2006). Els pacients que presenten una relació P1/P2 alterada solen presentar una pitjor qualitat del semen, una disminució en la capacitat de fertilització i una pitjor taxa d'embaràs quan recorren a les tècniques de fertilització in vitro.

Tot i això, fins el 2011, no havia cap estudi prospectiu que estudiés la relació P1/P2 en la població general (Nanassy *et al.*, 2011). Aquest estudi va mostrar que la relació P1/P2 de referència en la població general oscil·la entre els valors 0,5 a 1,43, aquesta relació és bastant més àmplia de la que s'esperava, indicant que no sembla tant clar l'associació de la relació alterada de P1 i P2 i la infertilitat.

Tot i això, es creu que pot ser una prova rutinària extra en la clínica de la reproducció assistida, ja que les alteracions d'aquesta relació és més elevada en pacients que en controls.

Perfils proteòmics

Tal com ocorria amb el mRNA, diferents grups han observat perfils proteòmics diferents en pacients en comparació amb controls, per exemple, en pacients amb una relació de protamines alterada (de Mateo *et al.*, 2007), en pacients astenozoospèrmics (Martinez-Heredia *et al.*, 2008), en pacients oligozoospèrmics (Botta *et al.*, 2009) i en pacients globozoospèrmics (espermatozoides amb caps esfèrics i sense acrosoma) (Liao *et al.*, 2009).

Queda per establir la utilitat dels perfils proteòmics com a marcadors de la fertilitat i, fins i tot, l'ús d'alguna de les proteïnes diferencials descrites com a biomarcador de la fertilitat o per explicar la patogènia de la infertilitat.

3.3.4. Epigenètica

Metilació del DNA

Els canvis en l'estat de metilació del DNA en la cèl·lula germinal serveixen com a disparadors per al desenvolupament de la gametogènesi. Per tant, es pot suposar que alteracions en l'estat de metilació de certs gens en les cèl·lules germinals en diferenciació pot representar un agent causal de fallida de l'espermatogènesi.

La gran majoria dels estudis que han analitzat els patrons de metilació del DNA en el context d'alteracions en l'espermatogènesi humana, s'han centrat en uns gens que es troben *imprintats* (*IGF2/H19* i *MEST*) (Poplinsky *et al.*, 2009), demostrant que un patró anòmal de la metilació en aquests gens està associat a una fallida de l'espermatogènesi i per tant, a la infertilitat masculina.

No obstant, nous estudis enfoquen aquests estudis de metilació no a regions *imprintades*, sinó a les illes CpG de gens que es saben que realment estan implicats en l'espermatogènesi. Un exemple és l'estudi d'associació d'un patró anòmal de metilació de la illa CpG del promotor del gen *DAZ* i la mala qualitat del semen (Navarro-Costa *et al.*, 2010).

Distribució nucleohistona- nucleoprotamina

Com hem explicat anteriorment, el DNA de l'espermatozoide humà es troba empaquetat majoritàriament per protamines, però sembla ser que un 5 o 15% del DNA roman empaquetat per histones i que aquest empaquetament diferencial no es deu al atzar, sinó que les histones es troben associades a regions determinades del genoma.

El primer estudi que ha comparat aquesta distribució diferencial entre pacients infèrtils i controls ha mostrat que el nivell d'histones en pacients que presentaven paràmetres seminals anòmals era més elevat, de un 5% a un 32%. A més a més, s'observava que tot i que alguns dels pacients presentaven un nivell d'histones normal, aquestes no es trobaven retingudes en les regions que s'havien determinat en els controls, el que suggeria que la distribució de les histones en aquests pacients infèrtils es podia donar a l'atzar (Hammoud *et al.*, 2011).

Per tant, queda oberta una finestra a la cerca de la relació de la distribució diferencial de histones i protamines i la fallida de l'espermatogènesi.

4. Selecció de gens candidats pel seu estudi mutacional

Com hem mencionat anteriorment, es creu molt probable que una proporció important de infertilitats masculines idiopàtiques siguin degudes a una herència recessiva. Els mètodes d'anàlisi genètics de lligament que s'apliquen en la majoria de malalties hereditàries no són apropiats en el cas de la infertilitat, ja que de forma natural el fenotip no es transmet a la descendència dels afectes. Per tant, en les famílies existeix només un o pocs membres afectes.

Les alternatives són estudis mutacional de gens candidats o estudis d'associació poblacional utilitzant casos (pacients infèrtils) i controls (individus fèrtils).

Per poder identificar gens candidats i, per tant, causes genètiques de la infertilitat hem utilitzat tres estratègies diferents:

- (i) **Estudis proteòmics diferencials.** Se suposa que algunes mutacions poden provocar canvis qualitius o quantitius en les proteïnes de l'espermatzoide. Aquests canvis poden ser detectats per estudis proteòmics diferencials, mitjançant l'electroforesi bidimensional i posteriorment la seva identificació per espectrometria de masses (de Mateo *et al.*, 2007; Martínez-Heredia *et al.*, 2007) i així, un cop identificades les proteïnes diferencials entre pacients i controls, és possible l'anàlisi dels gens en busca de possibles mutacions o polimorfismes que expliquin la modificació de la seva expressió, almenys en algun d'ells.
- (ii) **Estudis transcriptòmics diferencials.** A partir de l'estudi dels trànscrips diferencials entre pacients i controls, es pot arribar a esbrinar quins trànscrips són més o menys abundants en els pacients, obrint un ventall de possibles mutacions o polimorfismes que siguin els agents causals d'aquesta desregulació de la transcripció i/o degradació dels mRNAs. Un dels objectius d'aquesta tesi és la realització de la transcriptòmica diferencial entre pacients astenozoospermics i controls fèrtils, ja que una reducció en la mobilitat de l'espermatzoide és una de les majors causes de la infertilitat masculina, just després de la reducció del número d'aquests.
- (iii) **Recerca bibliogràfica de models animals infèrtils.** El model animal més emprat en l'estudi de la infertilitat masculina és el ratolí, ja que aquest presenta una espermatogènesi comparable a l'humana. En la base de dades *Mouse Genome Informatics* (MGI; veure relació de softwares utilitzats) hi ha descrits uns 388 models animals genoanul·lats que presenten una espermatogènesi alterada. Malgrat això, sempre s'ha de tenir cautela a l'hora de traduir els resultats del ratolí a l'humà, ja que alguns processos biològics (per exemple, la interacció espermatzoide-oòcit) poden ser molt diferents entre ratolins i humans. A més a més, gens molt similars poden tenir diferents funcions en les dues espècies i gens que en ratolins poden afectar a l'estat de fertilitat en humans la seva acció pot ser compensada per l'acció d'un altre gen.

A banda d'esperar que els resultats de la transcriptòmica diferencial entre pacients astenozoospermics i controls fèrtils normozoospermics ens identifiqui possibles gens candidats, hem dut a terme l'estudi mutacional de gens candidats determinats per estudis anteriors del grup i/o recerca bibliogràfica de genoanul·lats. Aquest gens seleccionats van ser: (i) Protamina 1 (*PRM1*) i Protamina 2 (*PRM2*) (ii) *Heat shock protein 2* (*HSPA2*) (iii) Subunitat 1 de la prohibitina (*PHB1*) i (iv) *Bromodomain testis specific* (*BRDT*).

4.1. PRM1 i PRM2

Com hem mencionat anteriorment, les protamines són les proteïnes nuclears més abundants en els espermatozoides i actuen empaquetant el genoma patern. Aquestes proteïnes tenen un alt contingut d'aminoàcids carregats positivament, particularment arginina, el que permet la formació d'un complex altament condensat amb el DNA genòmic patern (Suau & Subirana, 1977; Mezquita, 1985; Oliva & Dixon, 1991; Oliva, 2006).

En mamífers es coneixen dos tipus de protamines, la protamina 1 (*PRM1*) i la família de la protamina 2 (*PRM2*). La protamina 1 es troba present en totes les espècies de vertebrats estudiades, mentre que algunes espècies no presenten protamina 2.

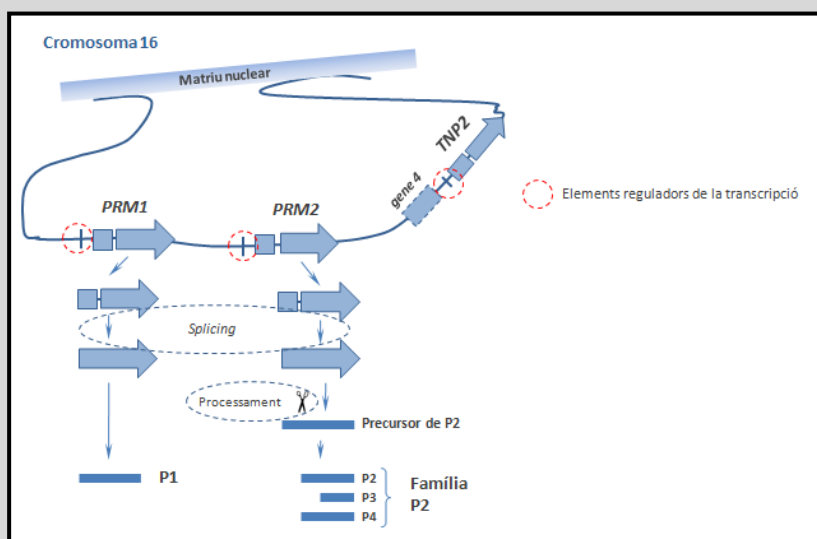
Les protamines tenen moltes funcions conegudes i altres proposades (Oliva, 2006). Les més rellevants són:

- (i) Condensació del genoma patern en un nucli compacte i hidrodinàmic. Els espermatozoides amb nuclis més hidrodinàmics seran més ràpids per tal de poder fertilitzar primer l'òvul.
- (ii) Protecció del material genètic patern fent-lo inaccessible a l'acció de nucleases o agents mutagènics interns i externs.
- (iii) Participació en l'*imprinting* del genoma patern durant l'espermatogènesi. Les protamines també poden conferir marques epigenètiques en alguna regió del genoma de l'espermatozoide, afectant posteriorment en la seva reactivació després de la fertilització.

En humans hi ha una còpia del gen *PRM1* i una còpia del gen *PRM2* per genoma haploide, localitzats en el cromosoma 16. Les seqüències genòmiques de *PRM1* i *PRM2* es troben en un domini en forma de *loop* junt amb el gen de la proteïna nuclear de transició 2 (*TNP2*) i una seqüència anomenada *gene4*. Mentre que els gens *PRM1*, *PRM2* i *TNP2* són expressats en alts nivells i la seva funció ha estat estudiada extensivament, el gen de *gene4* presenta més controvèrsia i uns nivells baixos d'expressió, encara que certs estudis apunten que es pot tractar d'un pseudogen (Oliva, 2006).

Mentre que la *PRM1* es sintetitza com una proteïna madura, el components de la família de *PRM2* es generen per la proteòlisis d'un precursor comú que es transcriu d'un únic gen (Veure figura 1.11).

Figura 1.11. Transcripció, traducció i processament de les protamines humanes



Font: Imatge basada en la revisió de Oliva, 2006. "Protamines and male infertility".

La importància de les protamines durant l'espermatogènesi va ser emfatitzada per la creació de dos models animals **genoanul·lats**. El primer indicava que una haploinsuficiència de *PRM1* i *PRM2* causava en ratolí una infertilitat severa (Cho *et al.*, 2001). El segon era un ratolí doble genoanul·lat pels gens de les proteïnes nuclears de transició 1 i 2 (*TNP1* i *TNP2*), en el qual es va observar infertilitat masculina, una condensació irregular de la cromatina espermàtica i una fallida en el procés post-transcripcional del *PRM2* (Zhao *et al.*, 2004).

En el nucli espermàtic humà el **contingut de proteïna** corresponent a la protamina 1 és molt similar al de la protamina 2 (la relació P1/P2 és aproximadament 1). Diferents estudis han demostrat que en alguns pacients infèrtils hi ha una alteració en l'expressió de protamines (de Yebra *et al.*, 1998).

El fet que una alteració proteica de les protamines sembli estar relacionat amb la infertilitat masculina i que, a més a més, els ratolins genoanul·lats per les protamines presentin una infertilitat severa, fa d'aquests dos gens bons gens candidats per realitzar un estudi mutacional.

Hi ha diferents estudis en busca de mutacions d'aquests dos gens que poguessin explicar la reducció en l'expressió de les protamines en pacients infèrtils. No obstant això, l'anàlisi mutacional inicial en els gens de les protamines suggereix que les mutacions patogèniques en aquests gens són una causa rara d'infertilitat masculina. Aquesta baixa incidència de variacions que causin substitucions d'aminoàcids en els gens de les protamines ens indica la gran importància que té la conservació d'aquests al llarg de l'evolució, per tal de garantir una bona espermatogènesi i així la continuïtat de l'espècie.

Ja que s'ha vist aquesta baixa variabilitat en la zona codificant dels gens, els nous estudis s'han enfocat cap a les regions no codificants 5' i 3' (mutacions en aquestes regions dels gens poden provocar variacions en la seva expressió). En tots els camps de la medicina hi ha un gran interès en l'estudi dels marcadors genètics com són els polimorfismes, ja que una variant genètica pot ser la responsable directament d'alterar la funció o l'expressió de la proteïna, o bé pot trobar-se en desequilibri de lligament amb una mutació rellevant que formi part del mateix gen o del mateix haplotip.

En el nostre grup, en el 2008, es va publicar un polimorfisme en el promotor del gen *PRM1* (c.-191C>A). La presència d'aquest polimorfisme es trobava més augmentada en pacients teratozoospèrmics, suggerint que la presència d'aquest polimorfisme podia alterar l'expressió de la protamina 1, el que podia resultar en una alteració del recanvi d'histones a protamines i, per tant, la morfologia de l'espermatozoide (Gázquez *et al.*, 2008).

Una de les limitacions importants d'aquest treball previ va ser que el número de pacients estudiats (n=65) i de controls (n=100) era relativament petit. Es plantejava, per tant, si les significances d'aquestes troballes es mantindrien si la població estudiada incrementés. Una altra limitació va ser que únicament es va analitzar el polimorfisme c.-191C>A, per tant quedava per determinar si podia existir variants genètiques en altres regions del gen.

Un dels nostres objectius en aquesta tesi és confirmar l'associació de la presència del polimorfisme del promotor (c.-191C>A) i la morfologia alterada dels espermatozoides, descrita en anterioritat en el nostre grup, en un grup independent de pacients i controls. A més a més, estudiarem les regions codificants i no codificants dels gens de *PRM1* i *PRM2* en busca de noves variants que puguin estar associades a la infertilitat. Gràcies a la proximitat dels dos gens (*PRM1* i *PRM2*), que es troben separats únicament per 5.000 parells de bases, intentarem establir els haplotips més comuns en la nostra població i veure si alguna alteració en l'haplotip es pot relacionar amb la infertilitat.

4.2. HSPA2

La proteïna HSPA2 pertany a un tipus específic de proteïnes de xoc tèrmic que s'expressa especialment en cèl·lules espermatogèniques i actua com una xaperona ajudant al plegament *de novo* de les proteïnes sintetitzades com també ajuda a obtenir la conformació estructural necessària d'una proteïna per la funcionalitat d'aquesta en certs moments específics.

En els ratolins *genoanul·lats* per la *heat-shock protein 70.2* (la proteïna homòloga humana correspon a la HSPA2) són infèrtils i presenten una parada madurativa en l'estadi d'espermatòcits primaris i una alta freqüència d'espermatòcits en apoptosi, ja que no podien completar la fase de meiosi I. Mitjançant diferents experiments es va mostrar que en els testicles de ratolí, la HSPA2 interaccionava amb la proteïna CDC2, que és una quinasa clau en l'activació de la transició de la fase G2-M durant el cicles cel·lulars de mitosi i meiosi. Es va suggerir que la interacció de la xaperona HSPA2 amb la CDC2 era totalment necessària per l'activitat quinasa de la CDC2 (Zhu *et al.*, 1997).

També s'ha determinat la interacció de la xaperona HSPA2 amb les proteïnes de transició (TNP1 i TNP2) en la fase d'espermàtida allargada (Govin *et al.*, 2006).

Diferents estudis han mostrat alteracions en el **RNA** del gen *HSPA2* en pacients infèrtils. S'ha correlacionat alteracions en la quantitat de RNA del gen *HSPA2* en els testicles de pacients azoospermics amb alteracions en l'espermatogènesi (Son *et al.*, 2000) i en els espermatozoides de pacients oligoteratozoospermics (Cedenho *et al.*, 2006).

Adicionalment, els resultats **proteòmics** previs del nostre grup van mostrar un augment significatiu de la proteïna HSPA2 en pacients amb major lesió germinal determinada per TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated fluorescein-dUTP nick end labeling*) i en pacients astenozoospermics (de Mateo *et al.*, 2007; Martinez-Heredia *et al.*, 2007).

Sobre la base d'aquests antecedents iniciarem un estudi mutacional pilot del gen.

4.3. PHB1

La prohibitina és la proteïna de membrana mitocondrial més conservada en els espermatozoides. El complex de la prohibitina està format per dues subunitats: (i) la *PHB1* (codificada pel cromosoma 17) i (ii) la *PHB2* (codificada pel cromosoma 12). El nostre estudi mutacional es centrarà en el gen *PHB1* perquè la proteïna PHB1 és l'específica de la membrana mitocondrial, mentre que la PHB2 es pot trobar també en nucli i en el citoplasma.

La proteïna PHB1 és expressada àmpliament en una gran varietat de teixits i, per tant, no és d'estranyar que el ratolí genoanul·lat pel gen *PHB1* presenti una mort embrionària letal quan es troba en homozigosi. Tot i això, ens és de gran interès aquesta proteïna perquè en cultius **knockdown** de cèl·lules somàtiques s'ha observat que aquestes presenten un potencial de membrana reduït, una reducció de l'activitat del complex I de la cadena respiratòria i un increment en la generació de radicals lliures (ROS) (Schleicher *et al.*, 2008). El fet que diferents estudis hagin relacionat els alts nivells de ROS en semen amb la infertilitat masculina i sobretot en la alteració de la mobilitat de l'espermatozoide (Thompson *et al.*, 2003), converteix aquest gen en un bon gen candidat a estudiar.

En estudis **proteòmics** del grup es va trobar una correlació positiva entre la quantitat de proteïna PHB1 amb una major lesió germinal determinada per TUNEL i una correlació negativa amb la relació augmentada de P1/P2 (de Mateo *et al.*, 2007).

4.4. BRDT

La proteïna BRDT pertany a la família BET (*bromodomain and extraterminal-domain*). Mentre la resta de membres de la família BET s'expressa en una gran varietat de teixits, la BRDT és una proteïna específica de testicle.

La família BET es caracteritza per contenir en la seva estructura proteica dos dominis *bromodomains*, que es caracteritzen per la seva capacitat d'unió a la cromatina acetilada, tenint la propietat de compactar-la (Pivot *et al.*, 2003). Aquest fet, sumat a l'especificitat de la BRDT en el testicle, ens suggereix que la BRDT pot estar involucrada en la maduració post-meïòtica de les cèl·lules germinals masculines.

Aquesta hipòtesi ha estat reforçada per l'observació que els ratolins mascles **genoanul·lats** que tenen deletat en homozigosi el primer domini *bromodomain* del gen *BRDT*, presenten una infertilitat severa (qualitat molt baixa de tots els paràmetres seminals), confirmant així la gran importància del primer domini *bromodomain* de la proteïna BRDT en la correcta maduració dels espermatozoides. S'ha observat que en aquests ratolins no té lloc el reemplaçament d'histones per protamines. Tot i que l'expressió de les proteïnes nuclears de transició i de les protamines no es troba alterada, aquestes no són incorporades (Shang *et al.*, 2007).

Un grup amb el qual estem col·laborant liderat per la Dra. Sophie Rousseaux (Laboratori de Citogenètica i de Biologia de la Reproducció del Centre Hospital-Universitari de Grenoble, França), ha identificat una variant on l'aminoàcid 62 de la proteïna BRDT varia de lisina a glutamina, la qual pot ser potencialment patogènica ja que es localitza en el primer domini *bromodomain* de la proteïna BRDT. Aquest canvi s'ha trobat en homozigosi en un 1,6% de pacients infèrtils estudiats, on tots els homozigots identificats corresponen a pacients infèrtils que presenten una oligozoospermia severa, mentre que aquesta variant en homozigosi no s'ha identificat en cap control fèrtil estudiat. Els primers estudis funcionals que s'han realitzat per aquesta variant suggereixen que aquesta pot desestabilitzar la unió *in vivo* de la proteïna BRDT amb la cromatina acetilada de les cèl·lules espermatogèniques.

Objectius

OBJECTIUS

Com hem vist en la introducció, la infertilitat és un problema que cada cop és més comú en la població actual. S'ha definit que la meitat dels casos de la infertilitat es deu a un factor masculí, no obstant, la gran majoria segueix sent d'etiologia desconeguda. Els grans objectius d'aquesta tesi es poden dividir en dos camps: (i) la cerca de factors genètics que puguin ser causa de la infertilitat masculina i (ii) la cerca de nous factors, com els RNAs i miRNAs, que puguin aclarir la patogenicitat de tipus determinats de infertilitat i el seu futur ús com a biomarcadors de la fertilitat.

1. Detecció d'alteracions en el contingut de RNAs mitjançant *microarrays*, en pacients infèrtils astenozoospermics (espermatozoides de mobilitat reduïda) en comparació a controls.

- 1.1. *Posada a punt de l'extracció de RNAs en espermatozoides.*
- 1.2. *Estudi diferencial dels RNAs presents en pacients astenozoospermics versus controls fèrtils, mitjançant l'ús de microarrays d'expressió.*
- 1.3. *Validació dels transcrits diferencials obtinguts en l'objectiu 1.2 en un número superior de mostres mitjançant l'ús de la PCR quantitativa a temps real.*
- 1.4. *Estudi dels transcrits de les protamines en pacients infèrtils astenozoospermics.*

2. Estudi mutacional dels gens candidats derivats d'estudis previs del grup i derivats del primer objectiu. Estudis d'associació casos-controls de les mutacions i polimorfismes identificats per tal de determinar si es comporten com mutacions patogèniques, com factors de risc o com a polimorfismes no patogènics.

- 2.1. *Gens de les protamines 1 i 2 (PRM1 i PRM2).*
 - 2.1.1. Relació entre la variant c.-191C>A del gen *PRM1* i la morfologia alterada en espermatozoides.
 - 2.1.2. Estudi mutacional dels gens *PRM1* i *PRM2*.
 - 2.1.3. Revisió bibliogràfica i metanàlisi de les variants descrites en els gens *PRM1* i *PRM2*.
 - 2.1.4. Anàlisi dels haplotips de les variants presents en els gens *PRM1* i *PRM2*.
 - 2.1.5. Estudi de CNV (*Copy Number Variations*) en el gen *PRM1*.
- 2.2. *Gen de la Heat Shock 70 KDa protein 2 (HSPA2).*
- 2.3. *Gen de la subunitat 1 de la prohibitina (PHB1).*
- 2.4. *Gen de la Bromodomain testis-specific (BRDT).*
- 2.5. *Gens candidats derivats del primer objectiu, Bromodomain containing 2 (BRD2).*

3. Descripció dels miRNAs més abundants presents en els espermatozoides i la seva possible implicació en la infertilitat masculina.

Material i mètodes

MATERIAL I MÈTODES

1. Procedència i selecció de mostres

En els diferents estudis realitzats hem utilitzat diferents tipus de mostres humanes: (i) mostres provinents del semen (espermatozoides), (ii) mostres provinents de sang (limfòcits) i (iii) mostres provinents de saliva (cèl·lules epitelials i limfòcits).

1.1. Mostres provinents del semen (espermatozoides)

La majoria de mostres de semen procedeixen de la Unitat de Reproducció Assistida de l'Hospital Clínic de Barcelona, mentre que una petita part prové de mostres criopreservades de la Unitat de Reproducció Assistida de la Clínica Corachan de Barcelona, totes elles amb el consentiment informat del pacient.

Les mostres de semen s'han recollit en contenidors estèrils, després d'un mínim de tres dies d'abstinència. Després de la seva líquüefacció, s'han avaluat els paràmetres seminals d'acord amb les recomanacions de la *World Health Organization, 2010* (volum del semen, concentració d'espermatozoides, percentatge dels diferents tipus de mobilitat i morfologia dels espermatozoides). Per determinar els paràmetres seminals s'ha utilitzat un sistema informatitzat *CASA* per l'anàlisi del semen (Proiser, València, Espanya) i una cambra de comptatge *Makler* (Sefi Medical Instruments, Hainfa, Israel). La morfologia dels espermatozoides s'ha avaluat segons el criteri estricte de Kruger (Kruger *et al.*, 1987) i s'han examinat un mínim de 100 espermatozoides per mostra.

Els fenotips de les mostres analitzades es poden classificar en: pacients infèrtils (i) oligozoospermics, (ii) astenozoospermics, (iii) teratozoospermics, (iv) les diferents combinacions d'aquests i (v) normozoospermics. També s'ha pogut disposar de donants de semen normozoospermics amb fertilitat provada.

En el cas de no ser necessari el processament de les mostres en fresc, realitzarem el següent procés per tal de conservar-les en condicions òptimes per la seva futura utilització:

- (i) Es realitza un rentat amb el medi nutritiu *HAM F10 1x* (Invitrogen, Paisley, Escòcia) per tal d'eliminar el líquid seminal
Un tub que contingui 1 ml d'ejaculat s'ha afegit aproximadament 4 ml de HAM F10 1x.
- (ii) Es centrifuga (3.000 G, 5 minuts, 4 °C).
- (iii) El sediment es resuspén en 1ml de *HAM F10 1x* amb un 7% de *glicerol* (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), per tal de protegir mínimament les mostres durant el procés de congelació i posteriorment en la seva descongelació.
- (iv) Es guarden les mostres a -20 °C o -30 °C.

1.2. Mostres provinents de sang (limfòcits)

Les mostres de sang arriben al departament de Biologia i Genètica Molecular de l'Hospital Clínic de Barcelona, on s'extreu automàticament el DNA dels limfòcits mitjançant el *kit MagNa Pure LC DNA Isolation* (Roche Diagnostic, Almere, Països Baixos) amb l'equip *MagNa Pure LC* (Roche Diagnostic, Almere, Països Baixos).

Els fenotips obtinguts són pacients oligozoospermics molt severos i azoospermics. Aquests pacients s'han realitzat la prova genètica de presència de microdeleccions del cromosoma Y (Veure punt 3.2.4 de l'apartat Introducció).

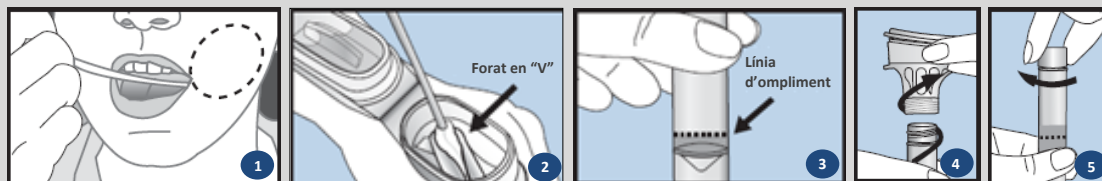
També s'ha disposat de DNA corresponent a controls de paternitat provada del departament de Medicina Legal de la Universitat de Barcelona, dels que cal destacar que no disposem dels corresponents paràmetres seminals.

Un altra font de DNA provinent de sang ha estat la de pacients infèrtils i controls normozoospermics de paternitat provada provinents del *Reproductive Medicine Center* i el *Departament of Gynaecology* del Hospital de Malmö, Suècia.

1.3. Mostres provinents de saliva (cèl·lules epitelials i limfòcits)

Les mostres de saliva han estat recollides pels propis pacients mitjançant el *kit Oragene-DNA* (DNA Genotek Inc, Ottawa, Canadà). Segons les instruccions donades, es passa l'esponja que es troba dins el *kit* per la part interna de la boca i genives (Veure figura 2.1-1), per tal d'absorbir tanta saliva com sigui possible. Un cop l'esponja es troba saturada de saliva, s'introdueix dins el forat en forma de "V" de l'embut (Veure figura 2.1-2) i s'escorre la saliva contra la paret interior del citat forat. La saliva flueix dins el tub. Es repeteix aquests passos fins que la saliva arriba a la línia marcada (Veure figura 2.1-3). Es treu l'embut i es tanca el tub amb el tap petit (Veure figura 2.1-4). Finalment s'agita el tub durant uns 10 segons (Veure figura 2.1-5).

Figura 2.1. Procediment per la recollida de saliva mitjançant el *kit Oragene-DNA*



Font: imatge modificada del protocol d'extracció de DNA de saliva Orange-DNA, Genotek.

2. Microscopia

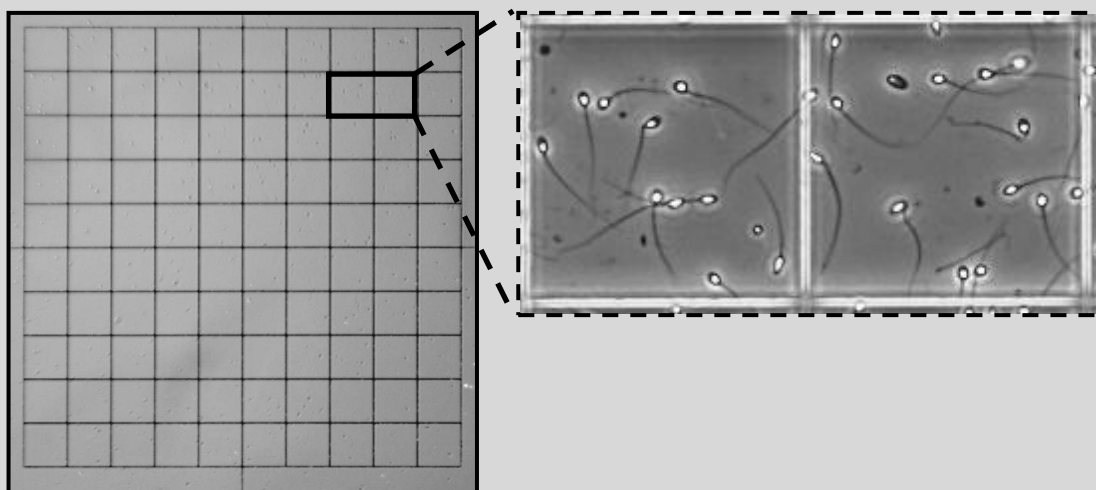
2.1. Microscopia òptica

En el laboratori de Genètica Humana de la Universitat de Barcelona disposem del microscopi òptic de contrast de fases *Olympus BX50* (Olympus Corporation, Tokyo, Japó) que ens permet visualitzar els espermatozoides de les mostres de semen.

Gràcies al citat microscopi òptic i a la utilització d'una cambra *Makler* hem pogut fer el comptatge dels espermatozoides presents en les mostres de semen.

La cambra *Makler* consta d'una quadricula d'1 mm² dividida en 100 quadres amb una profunditat de 10 µl (Veure figura 2.2). Es transfereixen a la cambra 3 µl de la mostra de semen, es compten els espermatozoides presents en tres línies de 10 quadrats cadascuna, la mitja dels tres valors serà la concentració expressada com a 10⁶ espermatozoides per ml. Gràcies a la profunditat de la cambra no és necessari immobilitzar els espermatozoides i per tant també podem observar les característiques mòbils d'aquests.

Figura 2.2. Visualització de les mostres de semen amb la cambra *Makler* i el microscopi òptic



Nota: en la imatge de l'esquerra podem observar la imatge de microscopia òptica de la mostra en fresc amb la cambra *Makler* a 50x. En la imatge de la dreta podem veure aquests quadres a 200x on podem fer el recompte dels espermatozoides presents en aquests.

Per a la determinació de la morfologia espermàtica s'ha realitzat prèviament una tinció *Diff-Quik*[®] que ens permetrà comptabilitzar, en la mostra, el percentatge d'espermatozoides amb una morfologia normal.

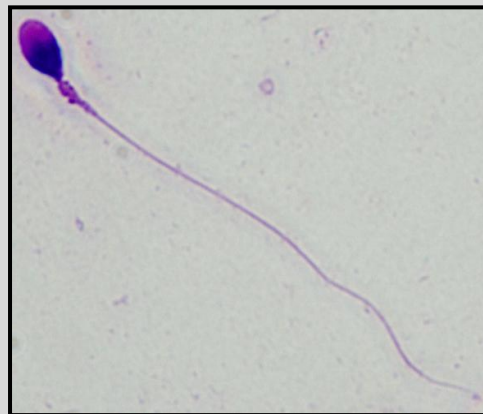
Aquesta tinció ens permet distingir zones basòfiles i acidòfiles, i per tant diferenciar les diferents parts de l'espermatozoide (la zona de l'acrosoma es tenyeix d'un color rosat, la zona postacrosòmica d'un color blavós i la peça mitjana queda d'un color rosat o blau cel) i analitzar la seva morfologia.

Per realitzar aquesta tinció s'ha dut a terme el següent procediment:

- (i) Es dipositen 5 µl de la mostra de semen en un portaobjectes esmerilat.
- (ii) Es realitza una extensió dels 5 µl de la mostra de semen amb l'ajuda d'un altre portaobjectes.
- (iii) Es deixa assecar el portaobjectes aproximadament 5 minuts a temperatura ambient.
- (iv) Es col·loca els portaobjectes en el cistell per preparacions i es submergeix 5 cops durant 1 segon en la solució *Diff-Quick Fix* (Medion Diagnostics, Düdingen, Suïssa), aquesta solució conté metanol i s'utilitza per fixar la mostra.
- (v) Les restes de fixador s'assequen amb paper absorbent.
- (vi) Seguidament es submergeix el cistell 5 cops en la solució tenyidora I, *Diff-Quick I* (Medion Diagnostics, Düdingen, Suïssa). Aquesta solució està composta per *Eosin G* en tampó fosfat pH 6,6, i tenyeix les regions acidòfiles d'un color rosat.
- (vii) Les restes de colorant s'assequen amb paper absorbent.
- (viii) Es procedeix submergint el cistell 5 cops en la solució tenyidora II, *Diff Quick II* (Medion Diagnostics, Düdingen, Suïssa). Aquesta solució està composta per *Thiazine dye* en tampó fosfat pH 6,6, i tenyeix d'un color blavós les zones basòfiles.
- (ix) Es submergeix el cistell 5 cops en una cubeta amb aigua, realitzant-se dos canvis de l'aigua per tal d'eliminar les restes de colorant.
- (x) Es deixen assecar els portaobjectes a temperatura ambient.
- (xi) Finalment, es preparen els portaobjectes amb el medi de muntatge *DPX* (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanya) el qual es troba dissolt amb xilè. Aquest procés ens donarà una alta estabilitat del colorant durant un llarg període de temps.

Seguint els passos esmentats, s'aconsegueix una visió dels espermatozoides (400x) en el microscopi òptic de contrast de fase (Veure figura 2.3) que permet la determinació de la morfologia, on necessitarem estudiar almenys 100 espermatozoides.

Figura 2.3. Imatge de microscopia òptica 1000x d'un espermatozoide sotmès a la tinció *Diff-Quik*®



2.2. Microscopia electrònica

La Universitat de Barcelona disposa de la Unitat de Microscopia Electrònica on s'hi troba un microscopi electrònic de transmissió (TEM) *Jeol 1010* (JEOL Ltd., Tokyo, Japó) que ens permet l'estudi de la ultraestructura cel·lular en seccions ultrafines (50-70 nm) (Veure figura 2.4).

El protocol de preparació de la mostra per a la seva posterior visualització en el microscopi electrònic de transmissió és el següent:

- (i) En una alíquota on tenim 15 milions d'espermatozoides afegim un volum igual de la **solució fixadora** i ho deixem tota la nit a 4 °C.

Solució fixadora

- | | | |
|--|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> a. 2% de paraformaldehid b. 5% de glutaraldehid | } | En un tampó 0,1 M fosfat a un pH de 7,4 |
|--|---|---|

- (ii) Es centrifuga (8.950 G, 10 minuts, 4 °C).
- (iii) El sediment es neteja diversos cops amb la mateixa solució fixadora.
- (iv) Es procedeix a la post-fixació en una **solució post-fixadora**.

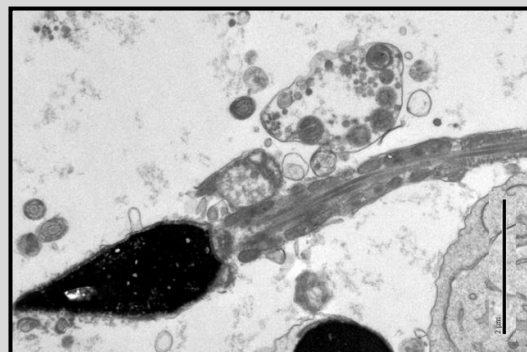
Solució post-fixadora

- | | | |
|--|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> a. 0,1% (v) de tetraòxid d'osmi b. 0,8% de ferrocianur de potassi | } | En un tampó 0,1 M fosfat a un pH de 7,4 |
|--|---|---|

A partir d'aquí el següents passos es van realitzar en el Servei de Microscopia Electrònica

- (v) Deshidratem la mostra en gradients d'acetona.
- (vi) Finalment la mostra s'incorpora en una resina *epoxi Spurr* (Serva, Heidelberg, Alemanya).
- (vii) S'obtenen les seccions de 80 nm mitjançant *E Ultracut* (Reichert-Jung, Wien, Àustria) i un *ganivet de diamant*.
- (viii) Les seccions es mantenen en una reixeta de coure.
- (ix) Per tal de poder observar la preparació en el microscopi *Jeol 1010* en l'acceleració de 8 kV es contrasta amb el 2% d'uranil acetat i citrat de plom.

Figura 2.4. Imatge de microscopia electrònica de transmissió d'un espermatozoide. Podem observar el cap, la peça mitjana i part de la cua



3. Estudis de DNA

3.1. Extracció de DNA

3.1.1. Extracció de DNA d'espermatozoides

La cromatina espermàtica humana està molt condensada, per tant, separar el DNA unit a les proteïnes és una tasca difícil. El protocol que utilitzem en l'aïllament de DNA d'espermatozoides és el que apareix en l'article Hoissan *et al.*, (1997), amb diferents modificacions:

- (i) Es prepara una alíquota de semen fresc o congelat que contingui entre 5 i 10 milions d'espermatozoides.
- (ii) Es centrifuga (3.000 G, 10 minuts, 4 °C).
- (iii) Es neteja el sediment amb 400 µl de PBS (Biomérieux, Marcy l'Etoile, França).
- (iv) Es centrifuga (3.000 G, 10 minuts, 4 °C).
- (v) S'elimina el sobrenedant.

Es pot congelar el sediment a -20 o -30 °C i seguir amb el protocol en un altre moment.

- (vi) S'afegeix al sediment la **solució de lisi** i homogeneïtzem bé.

Solució de lisi (511 µL)

- a. 500 µl de **Solució Stock***
- b. 10,5 µl de *β*-mercaptoetanol (MERCK schuchardt OHG, Hohenbrunn, Alemanya)
- c. 5 µl de *Proteïnasa K* (Promega, Madison, USA), 0,20mg/ml

El β-mercaptoetanol a 0,30 M ajuda a trencar els ponts disulfur de les protamines

***Solució Stock**

- a. 6 M *Tiocianat de guanidina* (Fluka Chemie GmbH, Buchs, Suïssa)
- b. 30 mM de *citrat sòdic* (Biosciencies, Inc., La Jolla, USA) a pH 7
- c. 0,5% *N-Lauroylsarcosine* (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

- (vii) S'incuba la mostra amb el medi de lisi en el bany a 55 °C durant 4 hores.
- (viii) S'afegeix 500 µl de *2-Propanol* (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanya). S'observa dues fases.
- (ix) S'inverteix repetidament el tub per tal de precipitar el DNA, fins que s'observa que les fibres de DNA s'ajunten formant una malla.
- (x) Es centrifuga (12.000 G, 10 minuts, temperatura ambient).
- (xi) Es realitzen 2 rentats amb 1 ml d'*Etanol 70%* (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanya).
- (xii) Es centrifuga (12.000 G, 10 minuts, temperatura ambient).
- (xiii) Es retira el sobrenedant i es deixa assecar a temperatura ambient.

- (xiv) S'afegeix de 20 µl a 50 µl del **tampó Tris-EDTA**, segons la mida de la malla obtinguda, i es vorteja.

Tampó Tris-EDTA

- a. 0,1 mM EDTA (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanya)
- b. 10 mM Tris (USB Corporation, Cleveland, USA)

- (xv) S'escalfen les mostres a 56 °C durant 20 minuts. Si es veu que el DNA no es dissol bé es pot incubar-les a 80 °C, 10 minuts.
- (xvi) Es comprova la concentració i la qualitat del DNA en el *NanoDrop 1000 Spectrophotometer* (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA). La mesura de les concentracions de DNA que s'obtenen es realitza calculant l'absorbància a 260 nm (llum d'absorció dels àcids nucleics). Per comprovar la puresa del DNA obtingut es determinen dues relacions:
- a. Relació d'absorbància entre 260 nm i 280 nm (280 nm, llum d'absorbància de les proteïnes). Aquest quocient ens permet conèixer la presència de proteïnes en la mostra de DNA. Els valors òptims d'aquesta relació es troben entre 1,8 i 2 ($1,8 \leq A_{260}/A_{280} \leq 2$).
 - b. La relació d'absorbància entre 260nm i 230nm. Aquest quocient ens permet determinar la presència de sals i altres contaminants, com el tiocianat de guanidina. Els valors òptims de la relació es troben entre 1,8 i 2 ($1,8 \leq A_{260}/A_{280} \leq 2$).

3.1.2. Extracció de DNA de saliva

Un cop arriba la saliva de l'individu en el contenidor original es segueix el protocol d'extracció de DNA del *kit Oragene-DNA* (Veure figura 2.1) amb certes modificacions:

- (i) S'inverteix la mostra durant uns segons.
- (ii) S'incuba la mostra, que es troba en el contenidor original, en el bany, durant un mínim d'una hora a 50 °C. Aquest pas de tractament tèrmic és essencial per assegurar que el DNA extret de les cèl·lules es dissolgui correctament i les nucleases s'inactivin de forma permanent.
- (iii) Es deixa refredar a temperatura ambient.
- (iv) Es prepara 2 *ependorfs* de 2 ml per cada mostra amb 40 µl de *Orange Purifier*, i s'afegeix 1 ml de la mostra en cadascun. Es barreja bé la mostra (es pot usar un agitador).

En aquest moment la mostra s'enterboleix degut a la precipitació de les impureses.

- (v) S'incuba en gel 10 minuts per a que l'eliminació d'impureses sigui eficaç.
- (vi) Es centrifuga (14.000 rpm, 10 minuts, temperatura ambient).
- (vii) Es recull el sobrenedant i es passa a un tub nou de 15 ml.
- (viii) S'afegeix 6 ml d'*Etanol absolut* (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanya) i s'inverteix el tub 10 cops per a que precipiti el DNA, formant-se una malla de DNA visible.

- (ix) Es recull amb una pipeta *Pasteur* la malla de DNA i es transfereix a un *ependorf* nou.
- (x) ES realitza dos rentats amb 1 ml d'*Etanol* 70% .
- (xi) Es centrifuga (14.000 rpm, 5 minuts, temperatura ambient).
- (xii) Es retira el sobrenedant i es deixa assecar el sediment a temperatura ambient.
- (xiii) S'afegeix 500 µl del **Tampó Tris-EDTA** (0,1 mM *EDTA* i 10 mM *Tris*). Es vorteja.
- (xiv) S'escalfen les mostres a 56 °C durant 20 minuts.
- (xv) Es comprova la concentració i la qualitat del DNA en el *NanoDrop 1000 Spectrophotometer*.

3.2. Reacció en cadena de la polimerasa (PCR)





La tècnica de la PCR ens serveix per obtenir milions de còpies de la regió del gen que ens interessa. Per tal de dur a terme la tècnica de la PCR es necessiten els següents components:

- (i) El DNA que es vol amplificar. Les concentracions òptimes de DNA per dur a terme una PCR es troben entre 100 ng/µL i 200 ng/µL.
- (ii) 20 mM de *primers* o encebadors que delimitin la regió del gen que es vol amplificar. Si els *primers* necessaris per amplificar la regió d'interès no es troben descrits en la literatura, es poden dissenyar amb l'ajuda de programes informàtics com *PRIMER3* (*veure relació de softwares utilitzats*) (Rozen & Skaletsky, 2000).
- (iii) 1,25mM de desoxiribonucleòtids (*dATP Li-Salt*, *dCTP Li-Salt*, *dTTP Li-Salt*, *dGTP Li-Salt*; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanya).
- (iv) La Taq Polimerasa, l'enzim que durà a terme la reacció d'amplificació. Es van utilitzar dos tipus de Taq polimerasa:
 - a. *TAQ DNA Polymerase Industrial GMP Grade* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanya), que inclou el seu propi *buffer*.
 - b. *BioTherm Taq Polymerase Bio3-500* (GeneCraft, Munster, Alemanya) que inclou el seu propi *buffer* i clorur de magnesi (MgCl₂).

En el laboratori de Genètica Humana de la Universitat de Barcelona es disposa del termociclador *PTC-100™ Programmable Thermal Controller* (MJ Research, Inc, Waltham, USA), amb el qual es programa els diferents temps i les temperatures necessàries per dur a terme l'amplificació (Temperatura de desnaturalització del DNA (96°C)- temperatura d'*annealing* o d'aparellament dels *primers* (variable)- temperatura d'extensió o polimerització (72°C)).

En les següents taules, es mostren les diferents condicions aplicades en l'amplificació dels gens estudiats:

- (i) Protamina 1 (*PRM1*) (*Veure taula 2.1*).
- (ii) Protamina 2 (*PRM2*) (*Veure taula 2.1*).
- (iii) Heat Shock 70 KDa protein 2 (*HSPA2*) (*Veure taula 2.1*).
- (iv) Bromodomain testis-specific protein (*BRDT*) (*Veure taula 2.1*).
- (v) Prohibitina 1 (*PHB1*) (*Veure taula 2.2*).
- (vi) Bromodomain containing 2 (*BRD2*) (*Veure taules 2.3 i 2.4*).

GEN	Seqüència dels primers usats Direcció 5'-3'	Origen dels primers	Mida de l'amplificació	Condicions de temperatura	Condicions de PCR (x mostra)
Protamina 1 (PRM1)	PRM2: AGGCCAAAATCCGGCATGGAACAG	Primer 3	793 pb	96°C 30" 62°C 30" 72°C 2'	
	P1B: TCAAGAACAAGGAGAGAAGAGTGG	Tanaka <i>et al.</i> , 2003			
Protamina 2 (PRM2)	P2F: GGTAGAGGCTGCTATGATCCATGATTGC	Hammoud <i>et al.</i> , 2007	727 pb	96°C 30" 62°C 30" 72°C 30"	
	P2D: TGGCCGTGTGCTCTTGCTCTTGC	Primer 3			
	P2A: CTCCAGGGCCCACTGCAGCCTCAG	Primer 3			
	P2R: GTGAGGGAAGCCAGGTTTGTGTGATTCC	Hammoud <i>et al.</i> , 2007			
Heat shock 70 kDa protein 2 (HSPA2)	2S: GTGGAGCTGGAAGAGTTTGTGAG	Primer 3	1473 pb	96°C 1' 58°C 1' 72°C 5'	
	3SR: GTGGTGTTCCTCTTGATGAGTGG	Primer 3			
	2Fnew: GAACGTGCTCATCTTTGACCTG	Primer 3			
	2R: CAAGCTTCTACAGAACAGGTGTG	Primer 3			
Bromodomain testis-specific protein (BRDT)	KQ62F: CAGCTCCTGTGAAACCATT	Rousseaux, S.	322 pb	96°C 30" 58°C 30" 72°C 1'	
	KQ62R: TTTTTTGAACCTAACATAGTTGAA	Rousseaux, S.			

Taula 2.1. Condicions per l'amplificació per PCR dels gens (i) *PRM1*, (ii) *PRM2*, (iii) *HSPA2* i (iv) Exó 3 del *BRDT*

Seqüència dels primers usats Direcció 5'-3'	Origen dels primers	Mida de l'amplificació	Condicions de temperatura	Condicions de PCR (x mostra)	GEN
P2F: GGTATCCTTCAATGGATGATTTAGC	Primer 3	377 pb	96°C 30" 58°C 30" 72°C 1'	DNA 1 µl Tampó 2,5 µl dNTPs 2,5 µl Primers 1/1 µl Taq Biotherm 0,1 µl	<p>Prohibitina 1 (PHB1)</p>
P2R: CCTCTTGGCCACAAACACATTAC	Primer 3			MgCl ₂ 1,5 µl DNA 1 µl	
P3F: GCACAGGGCTCTTTCAA	Primer 3	296 pb	96°C 30" 58°C 30" 72°C 30"	Tampó 2,5 µl dNTPs 2,5 µl Primers 1/1 µl Taq Biotherm 0,1 µl	
P3R: AGCACCTTCCACACTCCCTACTTTA	Primer 3			MgCl ₂ 1,5 µl DNA 1 µl	
P45F: GTAGTGAGCCGAGATTGTCCCAITG	Primer 3	698 pb	96°C 30" 58°C 30" 72°C 1'	Tampó 2,5 µl dNTPs 2,5 µl Primers 1/1 µl Taq Biotherm 0,1 µl	
P45R: GGAGGACTAATAGCGTCTAC	Primer 3			MgCl ₂ 1,5 µl DNA 0,5 µl	
P6F: CTGGGGAGGTGGTGGATTGAGTAGA	Primer 3	523 pb	96°C 30" 58°C 30" 72°C 1'	Tampó 2,5 µl dNTPs 2,5 µl Primers 1/1 µl Taq Biotherm 0,1 µl	
P6R: CCGGAAGAAGGGATGACAGATGA	Primer 3			MgCl ₂ 1,5 µl DNA 1 µl	
P7F: TAGCCTGACATGCGGTGCCCTGAG	Primer 3	593 pb	96°C 30" 62°C 30" 72°C 2'	Tampó 2,5 µl dNTPs 2,5 µl Primers 0,5/0,5 µl Taq Biotherm 0,1 µl MgCl ₂ 1,5 µl DMSO 1 µl	
P7R: CCCGCCCTGCGTGTGCCAAATG	Primer 3				

Taula 2.2. Condicions per l'amplificació per PCR del gen PHB1

Seqüència dels primers usats Direcció 5'-3'	Origen dels primers	Mida de l'amplificació	Condicions de temperatura	Condicions de PCR (x mostra)	GEN
BRD2PA: TCTCTGACGCTCATTITCC	Primer 3	411 pb	96°C 30" 58°C 30" 72°C 1'	DNA 1 µl Tampó 2,5 µl dNTPs 4 µl Primers 0,5/0,5 µl Taq Roche 0,1 µl	
BRD2PB: GAATCAACAGAGCCAGAG	Primer 3		x35		
BRD2 2BF: CTTAGCGGGTTATGCTGGAC	Primer 3	209 pb	96°C 30" 58°C 30" 72°C 30"	DNA 1 µl Tampó 2,5 µl dNTPs 2,5 µl Primers 1/1 µl Taq Biotherm 0,1 µl MgCl ₂ 1,5 µl	
BRD2 2BR: CCGCTCAGTACTCCCAACAC	Primer 3		x35		
BRD2 3F: CATCAGACTATTGTCAGATGC	Matsuzaka <i>et al.</i> , 2002	401 pb	96°C 30" 58°C 30" 72°C 30"	DNA 1 µl Tampó 2,5 µl dNTPs 2,5 µl Primers 1/1 µl Taq Biotherm 0,15 µl MgCl ₂ 1,5 µl	
BRD2 3R: CCGGCTCAATGTCTCTAC	Matsuzaka <i>et al.</i> , 2002		x35		
BRD2 4F: AGTCGGGATCGGTAGTCTC	Primer 3	337 pb	96°C 30" 58°C 30" 72°C 1'	DNA 1 µl Tampó 2,5 µl dNTPs 2,5 µl Primers 1/1 µl Taq Biotherm 0,15 µl MgCl ₂ 1,5 µl	
BRD2 4R: TCCGACTACCCTACCTGGAT	Primer 3		x35		
BRD2 5BF: CTGGTGGGGGTATGGTAATG	Primer 3	355 pb	96°C 30" 60°C 30" 72°C 30"	DNA 1 µl Tampó 2,5 µl dNTPs 2,5 µl Primers 1/1 µl Taq Biotherm 0,15 µl MgCl ₂ 1,5 µl DNA 0,8 µl	
BRD2 5BR: ACTGGTAACACTGCCCTGGA	Primer 3		x35		
BRD2 6F: GCAGGTAGGAAGAGTGGGAG	Matsuzaka <i>et al.</i> , 2002	370 pb	96°C 30" 65°C 30" 72°C 1'	DNA 1 µl Tampó 2,5 µl dNTPs 2,5 µl Primers 0,5/0,5 µl Taq Biotherm 0,15 µl MgCl ₂ 1,5 µl	
BRD2 6R: ACTCCAAGCCACTTTACTTAAG	Matsuzaka <i>et al.</i> , 2002		x35		
BRD2 7F: GGCTTGGAGTGACAGGTTCC	Matsuzaka <i>et al.</i> , 2002	472 pb	96°C 30" 58°C 30" 72°C 1'	DNA 1 µl Tampó 2,5 µl dNTPs 2,5 µl Primers 1/1 µl Taq Biotherm 0,15 µl MgCl ₂ 1,5 µl	
BRD2 7R: TGCACCTAGGCTCCCATC	Matsuzaka <i>et al.</i> , 2002		x35		

Taula 2.3. Condicions per l'amplificació per PCR del gen *BRD2*, promotor i exons del 2 al 7

Seqüència dels primers usats Direcció 5'-3'	Origen dels primers	Mida de l'amplificació	Condicions de temperatura	Condicions de PCR (x mostra)	GEN
BRD2 8F: TGTGCAGCTTCTGATGCTG	Matsuzaka <i>et al.</i> , 2002	243 pb	96°C 30" 60°C 30" 72°C 30"	DNA 1 µl Tampó 2,5 µl dNTPs 4 µl Primers 1/1 µl Taq Roche 0,1 µl	
BRD2 8R: CCTCAGCTTGAGGGCTATGC	Matsuzaka <i>et al.</i> , 2002				
BRD2 9F: ACTTGGTGGCTGGGTATGTAG	Matsuzaka <i>et al.</i> , 2002	369 pb	96°C 30" 63°C 30" 72°C 1'	DNA 0,5 µl Tampó 2,5 µl dNTPs 2,5 µl Primers 0,3/0,3 µl Taq Biotherm 0,15 µl	
BRD2 9R: GGACAAAGGGCATGAACC	Matsuzaka <i>et al.</i> , 2002			MgCl ₂ 1,5 µl DNA 1 µl	
BRD2 10F: GTTCATGCCCTTTGTCTCTC	Matsuzaka <i>et al.</i> , 2002	397 pb	96°C 30" 58°C 30" 72°C 1'	Tampó 2,5 µl dNTPs 2,5 µl Primers 1/1 µl	
BRD2 10R: CCCAGAGACAGAAAATAGCC	Matsuzaka <i>et al.</i> , 2002			Taq Biotherm 0,15 µl MgCl ₂ 1,5 µl DNA 1 µl	
BRD2 11F: TGACAACTCTTTTGCCTTAG	Matsuzaka <i>et al.</i> , 2002	406 pb	96°C 30" 56°C 30" 72°C 30"	Tampó 2,5 µl dNTPs 2,5 µl Primers 1/1 µl	
BRD2 11R: AATCCTGAATGCAAAACAGACC	Matsuzaka <i>et al.</i> , 2002			Taq Biotherm 0,15 µl MgCl ₂ 1,5 µl DNA 1 µl	
BRD2 12F: GACGTTCAAGGGAACCTTG	Matsuzaka <i>et al.</i> , 2002	255 pb	96°C 30" 58°C 30" 72°C 1'	Tampó 2,5 µl dNTPs 2,5 µl Primers 1/1 µl	
BRD2 12R: GGATGGAGTCAATCTGTAGTGG	Matsuzaka <i>et al.</i> , 2002			Taq Biotherm 0,15 µl MgCl ₂ 1,5 µl DNA 1 µl	
BRD2 13F: TCCATCCTGCCTTCTTGAC	Matsuzaka <i>et al.</i> , 2002	392 pb	96°C 30" 62°C 30" 72°C 1'	Tampó 2,5 µl dNTPs 2,5 µl Primers 1/1 µl	
BRD2 13R: CTTCAGTAAATGTCCCTGCATC	Matsuzaka <i>et al.</i> , 2002			Taq Biotherm 0,15 µl MgCl ₂ 1,5 µl	

Taula 2.4. Condicions per l'amplificació per PCR del gen *BRD2*, exons del 8 al 13

Un cop es finalitza el procés de PCR, es comprova que s'ha amplificat el fragment desitjat.

- (i) Es prepara un **gel d'agarosa al 3%**.

Gel d'agarosa al 3%

- | | | |
|---|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> a. 1,5% <i>Agarose LM Sieve SA</i> (Laboratorios Conda S.A., Madrid, Espanya) b. 1,5% <i>Agarosa D1 Low EEO</i> (Laboratorios Conda S.A., Madrid, Espanya) | } | En tampó <i>TBE 1x</i> (Life Technologies Corporation, Grand Island, USA) |
|---|---|---|

Abans que es solidifiqui el gel s'afegeix 15 µl de Gel Red Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, Hayward, USA). Aquest compost s'intercala entre les molècules de DNA i permet visualitzar-lo amb llum UV.

- (ii) En 3 µl del producte de PCR que es vol comprovar s'afegeix 3 µl de tampó de càrrega. Aquest **tampó de càrrega** actua com a colorant, que facilita la càrrega del producte de PCR en el gel d'agarosa al 3%.

Tampó de càrrega

- a. 0,05% *Xilencianol 5%* (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanya)
- b. 0,05% de *blau de bromofenol 0,25%* (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanya)
- c. 95% de *formamida* (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanya)
- d. 20 mM de *EDTA*

- (iii) S'omple la cubeta d'electroforesi horitzontal amb 2 l de tampó *TBE 1x* i es diposita el gel d'agarosa al 3% dins la cubeta, quedant aquest totalment submergit.
- (iv) Es carrega les mostres (producte de PCR + tampó de càrrega) en cadascun dels pouets del gel. Per poder comprovar les mides del DNA amplificat es carrega en el primer pouet 3 µl del *marcador de tamany d'1Kb* (Invitrogen, Paisley, Escòcia).
- (v) Es connecta la cubeta d'electroforesi horitzontal a la font d'alimentació *Consort E734 Model 200/2.0 Powersupply* (Bio-rad laboratories, Hercules, USA) a 120 V durant aproximadament 30 minuts. Es crea un corrent elèctric on el DNA, que té càrrega negativa, migrarà cap al pol positiu més o menys ràpid segons el seu nombre de parells de bases.
- (vi) Un cop finalitzat, es pot visualitzar les bandes de DNA mitjançant un aparell de llum UV. Comparant les diferents bandes obtingudes amb les bandes del marcador de pes molecular es pot conèixer aproximadament el parells de bases de la amplificació realitzada.

3.3. Seqüenciació i anàlisi de seqüències

3.3.1. Purificació del producte de PCR

Un cop es finalitza l'amplificació, en el tub de reacció s'hi troba restes de *primers* i *dNTPs* que no s'han consumit, i que en el cas de no ser eliminats interferirien la reacció de seqüenciació. Per eliminar aquests contaminants es realitza un tractament amb *EXOSAP-IT* (USB Corporation, Cleveland, USA). Aquest compost consta de dos enzims hidrolítics (*Exonucleasa I* i *Fosfatasa Shrimp Alkaline*):

- (i) *Exonucleasa I*: degrada oligonucleòtids i qualsevol fragment de DNA de cadena simple que s'hagi produït durant el procés d'amplificació.
- (ii) *Fosfatasa Shrimp Alkaline*: degrada els dNTPs restants evitant així que puguin interferir en la reacció de seqüenciació.

3.3.2. Seqüenciació i anàlisi de les seqüències

Un cop purificat el producte de PCR es procedeix a la seva seqüenciació.

- (i) En 5 µl del producte de PCR s'afegeix 13 µl del **mix de seqüenciació**.

Mix de seqüenciació (13µl)

- a. 6 µl del mix del Kit de seqüenciació cíclica BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems, Foster City, USA)
- b. 6,5 µl d'aigua estèril
- c. 0,5 µl del primer (20 pmols) que interessa (s'ha utilitzat un o ambdós primers usats per l'amplificació, veure els primers marcats en blau en les taules 2.1 a 2.4)

- (ii) Es duu a terme la **reacció cíclica de seqüenciació**.

Reacció cíclica de seqüenciació

- a. 94°C 30''
 - b. 55°C 15''
 - c. 60°C 1'
- } x 28 cicles

- (iii) Les reaccions es processen en un seqüenciador automàtic *DNA 3100* (Applied Biosystems, Foster City, USA).
- (iv) Es purifica el producte de seqüenciació utilitzant les columnes del kit *Illustra AutoSeq G-50Dye Terminator Removal Kit* (GE Healthcare, Buckinghamshire, Regne Unit).
- (v) Les seqüències obtingudes s'analitzen amb el *software ChromasPro* (Technelysium Pty Ltd, Helensvale, Australia).

3.4. Anàlisi de les variants genètiques trobades

3.4.1. Anàlisi de la desviació de l'equilibri de Hardy-Weinberg

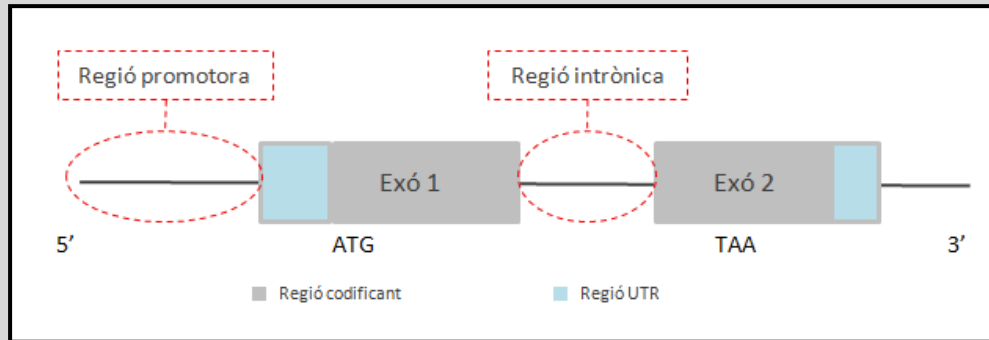
La llei de Hardy-Weinberg estableix que en grans poblacions d'aparellament aleatori en absència de mutació, migració i selecció, les freqüències genotípiques i gèniques es mantenen constants de generació en generació. El fet que un polimorfisme no compleixi l'equilibri de Hardy-Weinberg ens indica que pot haver una pressió selectiva que pot modificar la freqüència genètica d'aquest en la població.

Per tal d'avaluar si els polimorfismes trobats en els nostres estudis mutacionals segueixen la llei de Hardy-Weinberg farem ús del *software Finetti* (veure relació de softwares utilitzats).

3.4.2. Anàlisi de la patogenicitat

Per tal de conèixer *a priori* la patogenicitat de les variants identificades, realitzarem una sèrie d'estudis *in silico*. Usarem diferents programes depenent de quina zona del gen es troben les variants en estudi (regió codificant, regió intrònica i regió promotora; Veure figura 2.5).

Figura 2.5. Regions del gen on identifiquem les variants de les que estudiarem la seva possible patogenicitat usant programes *in silico*



- (i) Les variants en la regió codificant es poden classificar en dos tipus:
- Variants silencioses o neutrals:** tot i que aquestes variants no provoquen canvis en la seqüència d'aminoàcids, i per tant, no comportaran cap conseqüència en l'estructura i funcionalitat de la proteïna, sí poden donar lloc a noves variants de *splicing* si es troben prop de la regió del l'intró. Per determinar si una variant pot provocar una alteració en el *splicing* de l'intró, podem utilitzar el *software ESEfinder* (veure relació de softwares utilitzats).
 - Variants no sinònimes:** aquestes variants donen lloc a un canvi d'aminoàcid en la seqüència de la proteïna, però resta per establir si aquest canvi és perjudicial per l'estructura i/o funcionalitat de la proteïna. Per poder determinar si una variant no sinònima pot provocar una alteració estructural i/o funcional de la proteïna, podem utilitzar softwares com *MutPred* i *PolyPhen2* (veure relació de softwares utilitzats).
- (ii) Les variants de la regió intrònica poden provocar noves variants de *splicing*. Per tal de determinar si aquestes variants poden provocar una alteració en el *splicing* de l'intró utilitzarem el *software ESEfinder*.
- (iii) Les variants en la regió promotora del gen poden localitzar-se dins d'elements potencialment reguladors, provocant una alteració en l'afinitat de certs factors de transcripció i altres elements reguladors, variant així l'expressió de la proteïna. Per tal de determinar si variants en la regió promotora poden alterar l'expressió de la proteïna podem utilitzar el *software SNPInspector* (veure relació de softwares utilitzats).

3.4.3. Anàlisi de la conservació dels aminoàcids en l'evolució

Una eina molt útil per conèixer fins quin punt una variant de la regió codificant no sinònima és potencialment patogènica, és comprovar si l'aminoàcid alterat per la variant es troba conservat al llarg de l'evolució. El fet que un aminoàcid sigui molt conservat, ens indica que aquest pot ser clau per l'estructura i/o funcionalitat de la proteïna, mentre que si l'aminoàcid es localitza en una regió molt variable al llarg de l'evolució, el seu canvi pot no ser crític per l'estructura i/o funcionalitat de la proteïna.

Per dur a terme un estudi evolutiu, primer buscarem totes les seqüències de la proteïna descrites en altres espècies i les alinearem utilitzant el *software ClustalW program* (veure relació de softwares utilitzats).

El resultat que ens dóna aquest programa són molt visuals i ens determinen el grau de conservació dels aminoàcids d'una proteïna al llarg de l'evolució.

3.4.4. Caracterització dels haplotips presents en la població

El fet que dos gens es trobin molt pròxims i que presentin múltiples SNPs en els seus *locis* fa que ens plantegem la possibilitat que aquests es transmetin en bloc. Segons els patrons de desequilibri de lligament (r^2) dels SNPs trobats, establerts amb el programa Haploview (veure relació de softwares utilitzats), podem determinar aquells SNPs que es transmeten en bloc i per tant defineixen els haplotips.

3.5. Anàlisi de CNV (copy number variations)

Per poder analitzar el número de còpies d'un gen concret en el genoma humà farem ús de la PCR quantitativa a temps real. La base d'aquesta tècnica és l'ús de la PCR quantitativa per comparar el número de còpies del gen que volem analitzar, envers un gen descrit de còpia única. Si la relació és aproximadament d'1 ens estaria indicant que el gen en estudi és també un gen de còpia única.

Aquesta tècnica es va usar per conèixer si el gen *PRM1* presentava una sola còpia en el genoma humà. Com a gen control vam usar una regió de còpia única que es localitza en el cromosoma 12p i correspon al gen *Lysine (K)-specific demethylase 5A (KDM5A)*.

El primer pas es dissenyar uns primers idonis pel gen en estudi i el gen control (gen de còpia única).

Taula 2.5. Primers usats en l'estudi de CNV del gen *PRM1* usant PCR quantitativa a temps real

GEN	Seqüència dels primers usats Direcció 5'-3'	Origen dels primers	Mida de l'amplificació
Protamina 1 (<i>PRM1</i>)	PRM1 14: GCCAGGTACAGATGCTGTCTG	Primer 3	107 pb
	PRM1 15: ATGGCTCTCCTCCGTGTCT	Primer 3	
<i>Lysine (K)-specific demethylase 5A (KDM5A)</i>	JARED1A F: GGCAATGACCAGAGTGAGATT	Facilitats per Dra.Milà	170 pb
	JARED1A R: AATTCACAAGCCTGTGCTCTAA	Facilitats per Dra.Milà	

(i) Es prepara un banc de dilucions d'una mostra control (donant fèrtil normozoospèrmic) amb les següents concentracions de DNA:

1. **Estàndard 1:** 2 ng/ μ l
2. **Estàndard 2:** 1 ng/ μ l
3. **Estàndard 3:** 0,5 ng/ μ l
4. **Estàndard 4:** 0,25 ng/ μ l
5. **Estàndard 5:** 0,125 ng/ μ l
6. **Estàndard 6:** 0,0625 ng/ μ l

Les mostres problema a analitzar es preparen a una concentració de 0,2 ng/ μ l.

A partir d'aquest punt sempre es treballa en gel.

- (ii) En una placa *MicroAmp* de 96 pous (Applied Biosystems, Singapore, Xina) s'afegeix 8 μ l dels DNAs que s'han preparat en el primer pas. Els estàndards, es troben per duplicat per ambdós gens (*PRM1* i *KDM5A*) i les mostres problema per triplicat per ambdós gens.
- (iii) S'afegeix 18 μ l de la barreja que conté: 12 μ l *Power SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, USA) i 10 mM de cada *primer* sentit i antisentit del gen que es vol quantificar.
- (iv) La reacció es programa en 40 cicles a una temperatura d'aparellament de 60 °C en l'aparell *Lightcycler 2.0 instrument* (Roche Applied Science, Indianapolis, USA).
- (v) Mitjançant els resultats de les corbes estàndards es pot observar si les dues reaccions (la corresponent al gen *PRM1* i al gen control) tenen una eficiència similar i per tant si són comparables (*Veure figura 2.10*).
- (vi) Amb l'ajuda de les corbes estàndards es realitza una quantificació absoluta de la concentració que hi ha de cada gen per cada mostra. Si la relació és aproximadament 0,5 o 1,5 ens estaria indicant la possible existència de menys o més còpies del gen problema.

4. Estudis de RNA

4.1. Extracció de RNA d'espermatozoides

Abans de procedir a l'extracció del RNA d'espermatozoides s'ha de preparar la mostra per evitar qualsevol mínima contaminació per cèl·lules somàtiques. Per l'extracció de RNA, és important que la mostra es processí poques hores després de la seva obtenció.

Tots els passos següents es realitzen en gel.

- (i) S'elimina el fluid seminal de la mostra fent un **rentat amb 8 ml de HAMF10 1x**.
- (ii) Es centrifuga (3.000 G, 10 minuts, 4 °C).
- (iii) Per tal d'eliminar la gran majoria de cèl·lules somàtiques presents en la mostra es realitza un **gradient de Percoll al 50%**.
- (iv) Es dissol el sediment amb tants ml de HAM F10 1x com gradients de Percoll al 50% es vol realitzar (les condicions òptimes són per cada 50 milions d'espermatozoides un gradient de Percoll al 50%).
- (v) Es prepara els gradients de Percoll al 50%. Per preparar el gradient del 50% es parteix del **gradient de Percoll 100%** (aquest és estable una setmana a 4 °C).

Gradient de Percoll (100%)

- a. 87% de *Percoll comercial* (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suècia)
- b. 10% *HAM F10 10x* (Biological Industries, Haemek, Israel)
- c. 3% de NaHCO₃ 7,5%

A continuació es prepara el Percoll 50%.

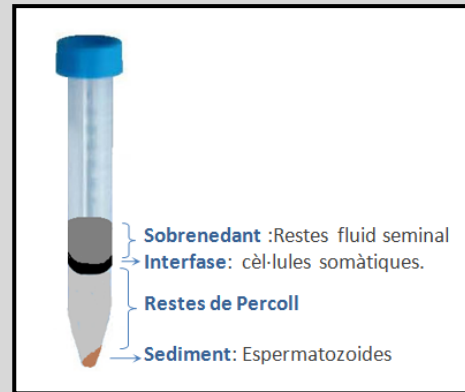
Gradient de Percoll (50%)

- a. 50% gradient de Percoll 100%
- b. 47% de *HAM F10 1x*
- c. 3% de NaHCO₃ 7,5%.

- (vi) S'afegeix 1 ml de Percoll 50% en un tub nou de 15 ml, sobre aquest coixí de densitat s'afegeix 1 ml de la mostra que conté aproximadament uns 50 milions d'espermatozoides. Aquest pas s'ha de realitzar amb molta cura (amb el tub en diagonal) per tal que les dues fases no es barregin. El número de gradients que es realitza depèn de la quantitat total d'espermatozoides de la mostra de partida.
- (vii) Es deixa reposar el gradient 10 minuts en gel per permetre una mínima barreja i evitar un canvi de fase brusc que podria conduir a la colmatació del gradient.
- (viii) Es centrifuga (800 G, 20 minuts, 4 °C).

- (ix) Un cop centrifugat s'observa la presència d'una interfase i un sediment (Veure figura 2.6).

Figura 2.6. Diferents fases obtingudes després de la realització del gradient de Percoll 50%



- (x) Es descarta cuidadosament el sobrenedant, la interfase i les restes de Percoll.
 (xi) Es resuspèn el sediment en 1 ml de PBS i es passa a un nou tub de 15 ml.

Es guarda una alíquota de 5 µl per conèixer el rendiment del gradient observant la mostra en el microscopi òptic.

- (xii) S'afegeix fins a 13 ml de PBS, i invertim el tub.
 (xiii) Es centrifuga (1.000 G, 20 minuts, 4 °C).
 (xiv) Es descarta el sobrenedant i es realitza un altre rentat amb 13 ml de PBS.
 (xv) Es centrifuga (1.000 G, 20 minuts, 4 °C).
 (xvi) A continuació es realitza un **tractament de lisi de cèl·lules somàtiques** per completar la correcta eliminació d'aquestes cèl·lules. Afegim 13 ml de **solució de lisi somàtica** (SCLB) i es vorteja vigorosament.

Solució de lisi somàtica (SCLB)

- a. 1% de SDS (Calbiochem, La Jolla, USA)
- b. 0,5% de Tritó X-100 (Sigma Chemical CO, St Louis, USA)

- (xvii) S'incuba la mostra amb la solució de lisi 30 minuts en gel.
 (xviii) Es centrifuga (1.000 G, 20 minuts, 4 °C).
 (xix) Es resuspèn el sediment en 1 ml de PBS.
 (xx) Es realitza el comptatge d'espermatozoides de la mostra utilitzant la càmera *Makler* i el microscopi òptic que també ens permetrà visualitzar l'absència de cèl·lules somàtiques.
 (xxi) Es divideix la mostra en alíquotes de 30 milions d'espermatozoides cadascuna, que es dipositen en *ependorfs* nous lliures de RNAses.

- (xxii) Es centrifuga (500 G, 8 minuts, 4 °C).
- (xxiii) Es descarta el sobrenedant (és important retirar el màxim de sobrenedant possible).

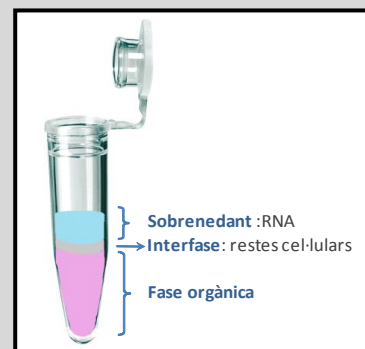
A partir d'aquest punt es comença la lisi dels espermatozoides i l'extracció de RNA utilitzant el Kit miRNeasy (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemanya). Tots els següent passos es realitzen a temperatura ambient, per tant ha de ser un treball ràpid.

- (xxiv) S'afegeix 600 µl de QIAzol Lysis Reagent i 6 µl β-mercaptoetanol per poder lisar de forma eficaç els espermatozoides. Per ajudar al trencament cel·lular i per homogeneïtzar la mostra, es passa aquesta a través d'una agulla de 25 Gauges (0,5 mm), que es troba unida a una xeringa estèril d'1 ml, 20 cops. Un eficaç trencament cel·lular i una bona homogeneïtzació són imprescindibles per l'obtenció d'un RNA de qualitat.

En aquest moment es pot parar el procés guardant la mostra lisada a -80°C. La mostra serà estable durant mesos.

- (xxv) Es deixa la mostra junt amb la solució de lisi 5 minuts a temperatura ambient.
- (xxvi) S'afegeix 140 µl de cloroform (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanya) i es vorteja la mostra vigorosament 15 segons.
- (xxvii) Es deixa l'eppendorf 3 minuts a temperatura ambient.
- (xxviii) Es centrifuga (14.000 G, 15 minuts, 4 °C). Un cop centrifugat s'observa l'aparició de 3 fases, (i) la fase superior, que correspon a la fase aquosa que conté el RNA, (ii) una interfase blanquinosa on queden restes cel·lulars i brutícia i (iii) una fase vermella corresponent a la fase orgànica (Veure figura 2.7).

Figura 2.7. Diferents fases obtingudes després de la centrifugació en el procés d'extracció de RNA



- (xxix) Es transfereix la fase aquosa a un nou eppendorf. <s'afegeix 1,5 volums d'etanol absolut i es barreja bé amb la pipeta.
- (xxx) Es passa tot el volum a la columna RNeasy.
- (xxxi) Es centrifuga (≥ 8.000G, 15 segons, temperatura ambient).
- (xxxii) Es descarta el fluid que ha travessat la columna. S'afegeix 700 µl del buffer RWT a la columna.

Al començar l'extracció de RNA és aconsellable deixar el buffer RWT a 37°C per dissoldre qualsevol precipitat que s'hagi pogut formar.

- (xxxiii) Es centrifuga (≥ 8.000 G, 15 segons, temperatura ambient).
- (xxxiv) Es descarta el fluid que ha travessat la columna. S'afegeix 500 μ l del *buffer RPE* a la columna.
- (xxxv) Es centrifuga (≥ 8.000 G, 15 segons, temperatura ambient).
- (xxxvi) Es descarta el fluid que ha travessat la columna. S'afegeix 500 μ l del *buffer RPE* a la columna.
- (xxxvii) Es centrifuga (8.000 G, 2 minuts, temperatura ambient).
- (xxxviii) Es descarta el fluid que ha travessat la columna.
- (xxxix) Es centrifuga (velocitat màxima, 1 minut, temperatura ambient).
- (xli) Es passa la columna a un *ependorf* nou. S'afegeix de 30 μ l a 50 μ l d'aigua lliure de RNAses, pre-escalfada a 65 °C, sobre la columna.
- (xlii) Es deixa l'*ependorf* amb la columna 5 minuts a temperatura ambient.
- (xliv) Es centrifuga (8.000 G, 1 minut, temperatura ambient).

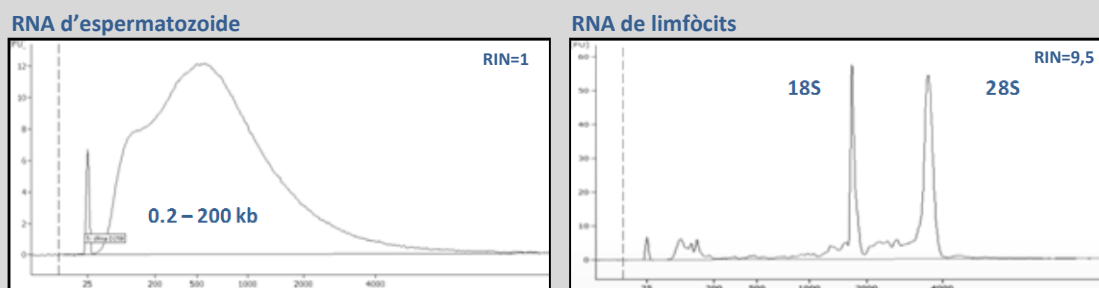
El RNA obtingut es pot guardar durant uns mesos a -80 °C abans de la seva utilització.

En tots el RNA extrets es realitzen una sèrie de **controls de qualitat**:

El **primer control de qualitat** es realitza amb el *NanoDrop 1000 Spectrophotometer*, obtenint la concentració i puresa del RNA respecte les proteïnes. Per conèixer la concentració de RNA es multiplica l'absorbància a 260 nm per la constant del RNA (x40). Els valors de concentració de RNA obtinguts en mostres d'espermatòzoides són molt heterogenis, per tant, es donen per vàlides les concentracions superiors a 20 ng/ μ l i inferiors a 50 ng/ μ l. La puresa del RNA respecte a la presència de proteïnes es calcula fent la relació de A260 nm/A280 nm, els valors òptims d'aquesta relació oscil·len entre 1,9 i 2,1.

El **segon control de qualitat** consisteix en analitzar el perfil i la integritat dels RNAs amb l'ús de l'aparell *Agilent 2100 Bioanalyzer* (Agilent Technologies, Palo Alto, USA). Un dels mètodes més usats per conèixer la integritat del RNA és fer la relació entre els RNAs ribosòmics (rRNA) més abundants (18S i 28S). La tecnologia *Agilent 2100 Bioanalyzer* ha desenvolupat un algoritme matemàtic anomenat RIN (RNA Integrity Number) que va del 1 al 10, sent 10 l'indicador de més qualitat de RNA. El fet que l'espermatòzoide no presenti rRNAs fa que aquest mètode no sigui útil per determinar la integritat del seu RNA. Tot i no poder usar els mètodes estandarditzats per conèixer la qualitat del RNA, és recomanable l'ús del *Agilent 2100 Bioanalyzer* per comprovar l'absència dels rRNAs majoritaris (18S i 28S) i veure que la gran part de RNAs obtinguts es localitzen en el rang (0,2 kb-200 kb) (aquest valor de referència és establert en Goodrich *et al.*, (2007)) (Veure figura 2.8).

Figura 2.8. Perfils del RNA d'espermatozoides (imatge esquerra) i de limfòcits (imatge dreta) obtinguts mitjançant l'ús de *Agilent 2100 Bioanalyzer*



Font: imatge basada en l'article de Jodar et al., 2012 (Veure annex II). "Differential RNAs in the sperm cells of asthenozoospermic patients".

Nota: podem observar l'absència de rRNAs 18S i 28S en el perfil de RNA d'espermatozoides (imatge esquerra). El RIN del RNA d'espermatozoides és de 1 mentre que el de limfòcits és de 9,5. Aquests valors de RIN indicarien la integritat del RNA de limfòcits i la degradació absoluta del RNA d'espermatozoides, però no és real degut a l'absència de rRNAs en l'espermatozoide. Per tant, el control de qualitat que seguirem per les mostres de RNA provinents d'espermatozoides és que el major rang de RNAs es trobi entre 0,2 Kb i 200 Kb.

Els altres controls de qualitat a realitzar són la confirmació de l'absència de RNAs propis de limfòcits i l'absència de DNA genòmic i mitocondrial. Per poder realitzar aquests controls de qualitat, prèviament tindrem que realitzar el pas de RNA a cDNA mitjançant l'ús de la retrotranscripció i de la seva corresponent PCR.

4.2. Retrotranscripció (de RNA a cDNA)

Per dur a terme el pas de RNA a cDNA s'ha utilitzat el *kit High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, Foster City, USA).

El volum final de la reacció és de 20 µl:

- (i) 10 µl corresponents a la concentració de RNA que es vol passar a cDNA.
- (ii) 10 µl del **mix de reacció**:

Mix de reacció (10 µl)

- a. 2 µl de *buffer*
- b. 0,8 µl dNTPs
- c. 2 µl de *random primers*
- d. 1 µl Transcriptasa reversa (MRT)
- e. 0,3 µl inhibidors de RNAses
- f. 3,9 µl d'aigua lliure de RNAses

Per dur a terme la retrotranscripció es va usar el termociclador *PTC-100™ Programmable Thermal Controller* on es programen les següents temperatures:

Programa de retrotranscripció

- 25 °C 10 minuts
- 37 °C 2 hores (temperatura òptima per l'acció de la transcriptasa reversa)
- 90 °C 10 minuts (inactivació de la transcriptasa reversa)

Un cop s'obté el cDNA es pot dur a terme diferents PCR com a control de qualitat del RNA obtingut (*Veure punt 4.1 del present apartat*).

Per determinar la qualitat del RNA extret, es realitza una retrotranscripció de 100 ng totals de RNA. A continuació es duu a terme tres PCRs diferents (*Veure taula 2.6*):

- Per verificar l'absència de leucòcits es realitza una RT-PCR d'un marcador específic d'aquests, el **CD45**. El **CD45** forma part d'un grup de glucoproteïnes de membrana i es coneix com l'antigen més comú de leucòcits. Per tant, si es realitza una RT-PCR per aquest antigen i no amplifica en les mostres de RNA d'espermatozoides (*Veure punt 4.1 del present apartat*), aquest resultat indica l'absència de leucòcits en les citades mostres de RNA.
- Per verificar l'absència de DNA en les mostres de RNA extretes, es realitza una RT-PCR del gen de la proteïna protamina 2 (**PRM2**). El **PRM2** consta de dos exons separats per un petit intró, per tant mitjançant una RT-PCR d'aquest gen es pot veure la presència o l'absència de l'intró (per la diferent mida de l'amplificació), verificant l'absència de DNA. Aquest control de qualitat també dóna informació sobre la integritat del RNA extret, ja que si en una de les mostres de RNA no amplifiqués, per RT-PCR, el cDNA del **PRM2** ens estaria indicant un alt grau de degradació del RNA.
- Per verificar l'absència de DNA mitocondrial no es pot usar l'estratègia d'amplificar un cDNA mitocondrial per comprovar l'absència de l'intró, ja que cap gen mitocondrial conté regions intròniques en la seva seqüència. Per tant, s'ha dissenyat uns *primers* per amplificar una regió del DNA mitocondrial que no es transcriu, anomenada **DLOOP**. La manca d'amplificació d'aquesta regió en el RNA estaria verificant l'absència de DNA mitocondrial en les mostres de RNA extretes.

Taula 2.6. Condicions per l'amplificació per RT-PCR dels gens que ens permetran establir la qualitat del RNA extret (CD45**, **PRM2** i **DLOOP**)**

GEN	Seqüència dels primers usats Direcció 5'-3'	Origen dels primers	Exons	Mida de l'amplificació genòmica	Mida de l'amplificació cDNA	Condicions de temperatura	Condicions de PCR (x mostra)
CD45	CD45BF: CCTTGAACCCGAACATGAGT	Primer 3	12-13	3306 pb	179 pb	96°C 30" 60°C 30" 72°C 20"	cDNA 1 µl Tampó 2,5 µl dNTPs 2,5 µl Primers 0,5/0,5 µl Taq Biotherm 0,15 µl MgCl ₂ 1,5 µl
	CD45BR: ATCTTGAGGGGGATTCCAG	Primer 3					
PRM2 (protamina 2)	RTPCR2F: TATAGCGCAGACTGC	Ostermeier <i>et al.</i> , 2005	1-2	310 pb	149 pb	96°C 30" 56°C 30" 72°C 30"	cDNA 1 µl Tampó 2,5 µl dNTPs 4 µl Primers 0,5/0,5 µl Taq Roche 0,1 µl
	RTPCR2R: GCCTTCTGCATGTTCTCT	Ostermeier <i>et al.</i> , 2005					
DLOOP	LOOP1: CACCATTAGCACCCAAAGCT	Tsutsumi <i>et al.</i> , 2006	mt-DNA	443 pb	-	96°C 30" 55°C 30" 72°C 1'	cDNA 1 µl Tampó 2,5 µl dNTPs 4 µl Primers 0,5/0,5 µl Taq Roche 0,1 µl
	LOOP2: TGATTCACGGAGGATGGTG	Tsutsumi <i>et al.</i> , 2006					

Font: taula basada en l'article de Jodar *et al.*, 2012 (*Veure annex II*). "Differential RNAs in the sperm cells of asthenozoospermic patients".

4.3. Arrays d'expressió gènica

La utilització dels *microarrays* en l'estudi del transcriptoma de les cèl·lules permet analitzar les diferències en l'expressió gènica entre pacients infèrtils i controls i, per tant, poden ajudar a entendre els mecanismes que provoquen la patogenicitat en els pacients.

En el nostre estudi s'ha utilitzat el *GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array* (Affymetrix Inc, Santa Clara, USA).

Per poder hibridar les mostres de RNA en els *arrays* s'han de preparar primer les mostres (Veure figura 2.9).

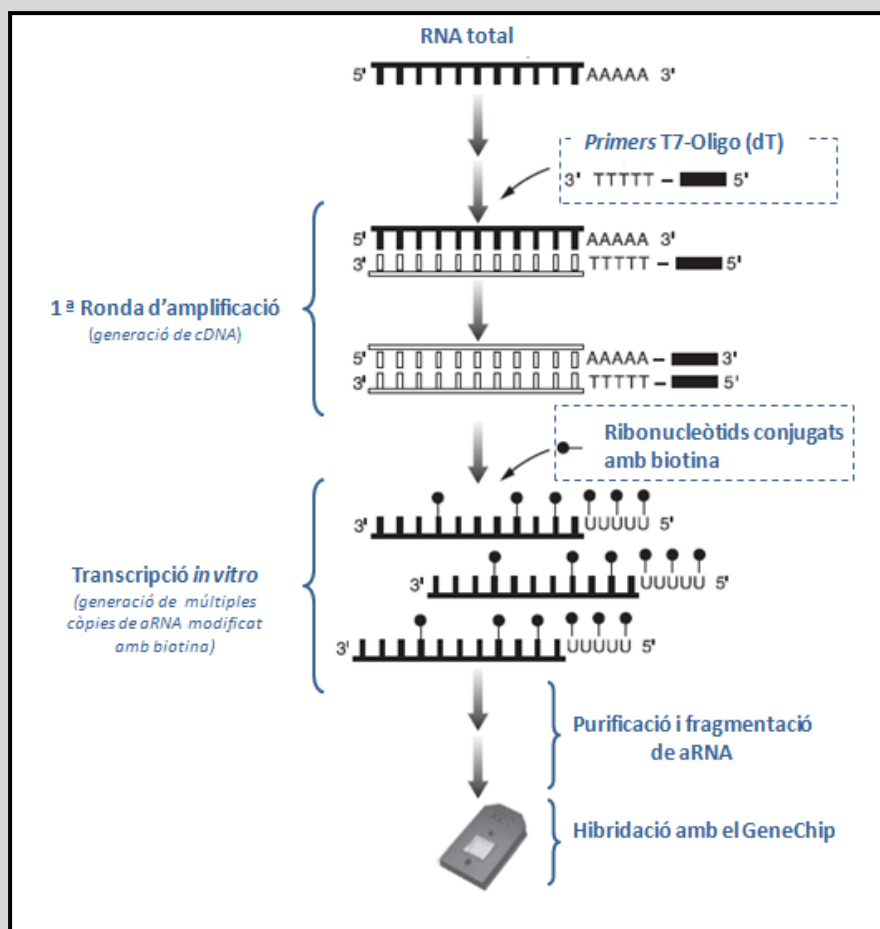
La preparació i posterior hibridació de les mostres de RNA en l'*array* es va dur a terme en la Plataforma de Genoma Funcional del IDIBAPS (CEK - Centre Esther Koplowitz, Barcelona, Espanya).

- (i) 50 ng de RNA total, provinent d'una mostra d'espermatozoides, es sotmet a una única ronda d'amplificació reversa mitjançant l'ús de primers T7-Oligo(dT).

És important destacar que únicament s'ha realitzat una ronda d'amplificació, ja que en els estudis transcriptòmics realitzats per altres grups on realitzen estudis d'expressió gènica diferencial entre mostres de semen de pacients infèrtils i controls fèrtils, sotmeten el RNA total a dues rondes d'amplificació, la primera amb primers T7-Oligo(dT) i la segona amb random primers. L'ús d'una sola ronda d'amplificació fa que els resultats siguin més representatius de la realitat.

- (ii) Es sintetitzen les 2 cadenes del cDNA.
- (iii) Un cop s'obté el cDNA de doble cadena, aquest es purifica abans de realitzar la transcripció *in vitro* amb l'ús del GeneChip® 3' IVT Express Kit (Affymetrix Inc, Santa Clara, USA). Així es generen múltiples còpies de aRNA modificat amb biotina a partir del cDNA. Aquesta tècnica es basa en una transcripció reversa *in vitro* amb nucleòtids conjugats amb biotina.
- (iv) Es purifica aquest aRNA, el qual es fragmentarà abans de procedir a la seva hibridació amb l'*array*.
- (v) S'hibrida en l'*array Affymetrix U133 Plus 2.0* en el qual hi ha representats 38.500 gens ben caracteritzats.

Figura 2.9. Preparació de les mostres de RNA abans de la hibridació amb l'array



Font: imatge modificada del protocol de GeneChip® 3' IVT Express Kit d'Affymetrix.

4.4. PCR quantitativa a temps real

El fet que la utilització de *microarrays* és encara una tècnica amb un significatiu cost econòmic, s'ha utilitzat una tècnica menys costosa, la PCR quantitativa a temps real, per poder validar l'expressió diferencial dels gens detectats per *microarray* en un número més gran de mostres.

La PCR quantitativa a temps real o PCR quantitativa és una variació de la PCR estàndard. La importància de la PCR quantitativa és que aquesta ofereix la possibilitat de detectar l'amplificació de cDNA d'interès a temps real.

Es va utilitzar el *termociclador 7300 Real Time PCR System* (Applied Biosystems, Carlsbad, USA), que incorpora un lector de fluorescència. La detecció dels productes d'amplificació es basa en la mesura de la quantitat de fluorescència. En el nostre cas utilitzarem un agent intercalant, el *SYBR Green*, que és un fluorocrom que s'intercala en totes les molècules de DNA de doble cadena i la seva detecció es dona en la fase d'extensió de la PCR. La senyal d'intensitat augmentarà a mesura que augmentin el número de cicles de PCR, degut a l'acumulació de productes de PCR.

Es realitza una quantificació relativa de l'expressió dels gens d'interès de les mostres problema front una mostra de referència. A aquesta mostra de referència se li assignarà el valor d'1 i les mostres problema s'expressaran com el número de cops que augmenta o disminueix l'expressió gènica respecte la mostra de referència. En el nostre estudi es va usar com a mostra de referència un pacient infèril normozoospermic.

A part de l'amplificació del cDNA que volem quantificar, amplifiquem també el cDNA d'un gen de referència, generalment d'expressió constitutiva, que permetrà normalitzar la quantitat inicial de RNA afegida a la reacció. Aquesta normalització és necessària per tal de corregir els possibles errors en la concentració de RNA de partida. En estudis de quantificació relativa de RNA en mostres d'espermatozoides, un dels gens de referència més usats és la β -actina (*ACTB*).

Un aspecte a tenir en compte en la quantificació relativa és que, al no disposar d'una mostra estàndard de concentració coneguda, es necessita comprovar que l'eficiència de la reacció de PCR pel gen problema i el gen de referència (*ACTB*) són similars.

Es van dissenyar diferents *primers* pels gens problema i el gen de referència per tal de comprovar que tenen unes eficiències d'amplificació similars (*Veure taula 2.7*).

- (i) Es realitza una retrotranscripció amb 100 ng de RNA (*Veure punt 4.2 del present apartat*).
- (ii) Es realitza una sèrie de dilucions (de 4 o 5 punts) a partir del producte de la retrotranscripció.
- (iii) S'amplifica per duplicat els dos gens (el problema i el de referència) en cada dilució i es determina la Ct (cicle de la PCR en que la fluorescència supera el valor llindar fixat i és inversament proporcional a la concentració inicial de cDNA). Per dur a terme la reacció s'afegeix en una placa MicroAmp de 96 pous.
 - a. 2 μ l de cDNA de cada dilució.
 - b. 18 μ l **mix de reacció**.

Mix de reacció

- a. 12,5 μ l SYBR Green
- b. 0,3 μ l de cada *primer* (*Forward* i *Reverse*)
- c. 4,9 Aigua estèril

- (iv) S'utilitza el programa per defecte de l'aparell, en el qual únicament es varia la *temperatura d'annealing* (temperatura òptima per l'aparellament dels *primers*) (*Veure taula 2.7*).
- (v) Amb els valors Ct obtinguts es construeixen les corbes estàndards i es comparen ambdues eficiències. Per tal de comparar-les es calculen els valors Ct del gen de referència menys el del gen problema per cada punt de la dilució (Δ Ct). Es representen les diferències dels valors Ct obtinguts front el logaritme de la concentració de la mostra inicial. Si la pendent resultant es inferior a 0,1, indica que les eficiències d'amplificació són comparables (*Veure figura 2.10*).

Taula 2.7. Primers i condicions òptimes pels estudis de quantificació relativa per PCR quantitativa a temps real

GEN	Seqüència dels primers usats Direcció 5'-3'	Origen dels primers	Exons	Mida de l'amplificació genòmica	Mida de l'amplificació cDNA	Temperatura d'annealing
<i>ACTB</i>	ACTB F: TTCCTTCTGGGCATGGAGT ACTB R: TACAGGTCTTTGCGGATGTC	Steger <i>et al.</i> , 2008	4- 5	—	90pb	60 °C
<i>ANXA2</i>	ANXA2 1: GGACGCTCTCAGCTCTCG ANXA2 2: CTTCTGAGGCCAATGTGTT	Primer 3	1- 2	720 pb	112 pb	60 °C
<i>BRD2</i>	BRD2 1: ACCAGGGCCTTTACCAGTCT BRD2 2: TATTGGACCTGGGACAGAG	Primer 3	9-10	370 pb	250 pb	60 °C
<i>MT-ND2</i>	ND2 1:CTATCTCGCACCTGAAACAAGC ND2 2: GGTGGAGTAGATTAGGCGTAGG	Piechota <i>et al.</i> , 2006	mtDNA	213 pb	213 pb	60 °C
<i>MT-ND3</i>	ND3 5: CCCTCCTTTTACCCCTACCA ND3 6: GGCCAGACTTAGGGCTAGGA	Primer 3	mtDNA	101 pb	101 pb	60 °C
<i>OAZ3</i>	OAZ3 5: TATTGCGCTGGGAACCTTGAC OAZ3 2:CCTTGATCCAAGGCTGATA	Primer 3	2- 3	—	170 pb	62 °C
<i>PRM1</i>	PRM1 1:AGAGCCGGAGCAGATATTACC PRM1 2:TACATCGCGTCTGTACTCG	Primer 3	1- 2	202 pb	156 pb	60 °C
<i>PRM2</i>	RTPCR2F: TATAGGCGCAGACTGC RTPCR2R: GCCTTCTGCATGTTCTCT	Ostermeier <i>et al.</i> , 2005	1-2	310 pb	149pb	60 °C

Font: taula basada en l'article de Jodar *et al.*, 2012 (Veure annex II). "Differential RNAs in the sperm cells of asthenozoospermic patients".

A continuació es mostra un exemple pràctic per la determinació de les eficiències d'amplificació pel gen de referència (*ACTB*) i un dels gens problemes, el *MT-ND2* (NADH deshidrogenasa 2) (Veure figura 2.10).

(i) Es realitza una retrotranscripció a partir de 100 ng de RNA d'una mostra, en 20 µl.

Es considera que la retrotranscripció té una eficiència del 100% per tant obtindriem una concentració de cDNA de 50 ng/µl.

(ii) Es realitza 5 dilucions 1/10 diferents.

(iii) Es realitza la PCR quantitativa a temps real amb 2 µl de cDNA i 18 µl del mix de reacció.

(iv) Es representen els valors Ct front el logaritme dels ng de cDNA dels que hem partit.

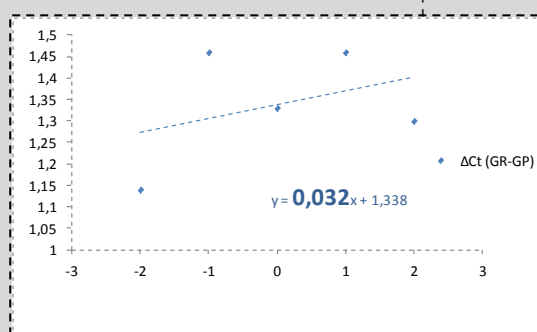
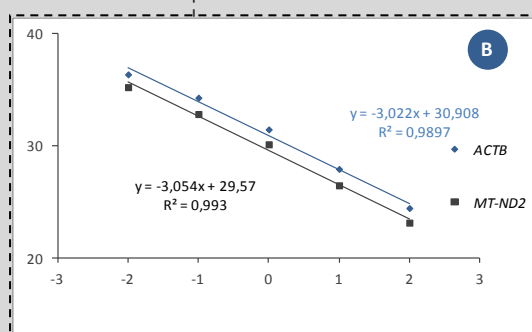
En la Figura 2.10.B es pot veure que les corbes estàndards per cadascun dels gens, observant que les corbes d'amplificació són paral·leles, i per tant, les eficiències comparables.

(v) Es representen els valors de la diferència de Ct del *ACTB* – Ct del *MT-ND2* (Δ Ct) front el logaritme dels ng de cDNA dels quals hem partit.

En la Figura 2.10.C es pot observar la representació de Δ Ct front el logaritme ng de cDNA, veient que la seva pendent és de 0,032, inferior a 0,1, per tant, està indicant que els dos gens tenen una eficiència d'amplificació similar.

Figura 2.10. Exemple real per determinar si dos cDNA tenen una eficiència d'amplificació similar

A	ng cDNA	Ct <i>ACTB</i> (GR) (Gen de referència)	Ct <i>MT-ND2</i> (GP) (Gen problema)	log ng cDNA	Δ Ct (GR-GP)
	0,01 ng	36,38	35,24	-2	1,14
	0,1 ng	34,3	32,84	-1	1,46
	1 ng	31,47	30,14	0	1,33
	10 ng	27,94	26,48	1	1,46
	100 ng	24,45	23,15	2	1,3



Nota:

- A) Ct corresponents a l'amplificació del gen problema (*MT-ND2*) i el gen de referència (*ACTB*) per diferents quantitats inicials de cDNA de la mateixa mostra.
- B) Corbes estàndard per cadascun dels gens.
- C) Representació del logaritme dels ng inicials de cDNA amplificat front el valor de la diferència de Ct ($Ct\ ACTB - Ct\ MT-ND2$).

Degut al fet que les eficiències d'amplificació dels gens problema i el gen de referència són similars, per fer la quantificació relativa no serà necessària la preparació de corbes estàndard i podrem quantificar mitjançant el mètode $\Delta\Delta$ Ct (Livak & Schmittgen, 2001). El procediment que es va seguir va ser el següent:

- (i) Es realitza una RT amb 2 quantitats inicials de RNA diferents (50 ng i 100 ng), de les mostres que es volen analitzar i de la mostra calibradora.
- (ii) Es duu a terme la PCR quantitativa a temps real, pel gen de referència (*ACTB*) i el gen problema, de les diferents mostres per obtenir els valors Ct.

La PCR quantitativa a temps real es va dur a terme en una placa MicroAmp de 96 pous amb 2 μ l de cDNA i 18 μ l de mix de reacció (12,5 μ l SYBR Green, 0,3 μ l de cada primer necessaris per amplificar el cDNA desitjat (Veure taula 2.7) i 4,9 μ l d'aigua estèril). Es fan tres rèpliques de cada amplificació.

- (iii) Es determina el valor Δ Ct, restant per cada mostra la Ct de gen problema menys la Ct del gen de referència.
- (iv) Es determina el valor $\Delta\Delta$ Ct, restant el Δ Ct de la mostra calibradora menys Δ Ct de cada mostra.

- (v) Es calcula els valors d'expressió normalitzats del gen problema respecte als del calibrador, utilitzant la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Si el valor de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ és inferior a 1, indica que la mostra problema té menys RNA que la mostra calibradora, mentre que si és superior a 1 indica que en té més quantitat.

Per cada mostra s'ha realitzat l'estudi partint de dues quantitats diferents de RNA, això servirà de control de qualitat de la PCR quantitativa a temps real. El valor $2^{-\Delta\Delta Ct}$ obtingut en les dues quantitats de RNA diferents de partida han de ser similars per donar com a vàlid el resultat.

4.5. Seqüenciació massiva dels miRNAs

- (i) Es va aïllar el RNA total de qualitat (*Veure punt 4.1 del present apartat*) dels espermatozoides de dos donants fèrtils normozoospèrmics.

La confecció de la llibreria de small RNAs i la seqüenciació massiva d'aquesta es va dur a terme en el Wilhelm Johansen Centre for Functional Genome Research de la Universitat de Copenhaguen, Dinamarca.

- (ii) Es van confeccionar unes **llibrerries de smallRNAs** usant *Illumina's Small RNA DGE v1.0 kit* (Illumina Inc, San Diego, USA).

Llibrerries de smallRNAs

- a. Es lliga el RNA total amb uns adaptadors 5' i 3' especials per small RNAs
- b. Es duu a terme una transcripció reversa
- c. S'amplifica el producte de la transcripció reversa

- (iii) Mitjançant l'aparell *Illumina's GAI sequencer* (Illumina Inc, San Diego, USA) realitzem la seqüenciació massiva (*Next generation sequencing*) obtenint totes les seqüències dels smalls RNAs en format *Fastqfiles*.

L'anàlisi de les seqüències de miRNAs d'espermatozoides que es van obtenir van ser analitzades en el departament de Regulatory Genomics de l'Institut de Medicina Predictiva i Personalitzada de Càncer.

- (iv) Pel l'anàlisi de les seqüències s'eliminen totes les seqüències corresponents a RNAs ribosòmics (rRNAs) i RNAs de transferència (tRNAs) i altres seqüències de RNA repetitives. Es va enfocar el nostre anàlisi en aquelles seqüències d'alta qualitat que corresponen a una única localització en el genoma humà.

5. Estudis de Proteïnes

5.1. Estudi de la relació de protamines (P1/P2)

El contingut de protamines (P1 i P2) en el nucli de l'espermatozoide humà fèrtil és similar (la relació P1/P2 és aproximadament 1). Diversos estudis han demostrat la correlació entre una relació anòmala de P1/P2 i la infertilitat masculina. Per tant, la determinació d'aquest quocient ens donarà més informació dels pacients que hem usat en el nostres estudis.

El protocol que s'usa per l'**extracció de protamines** es troba descrit en la tesis de *M^a. Lluïsa de Yebra*, tot i que s'han afegit certes modificacions:

- (i) Es prepara una alíquota que contingui 10 milions d'espermatozoides.
- (ii) Es centrifuga (8.940 G, 5 minuts, 4 °C).
- (iii) Es descarta el sobrenedant i es realitza un rentat per tal d'acabar d'eliminar les restes de fluid seminal, amb 200 µl de *HAM F10 1x*.
- (iv) Es centrifuga (8.940 G, 5 minuts, 4 °C).
- (v) Es renta el sediment amb 200 µl de la **solució de permeabilització** que es mostra a continuació per tal de desestabilitzar les membranes dels espermatozoides i per tant, aconseguir la permeabilització d'aquests.

Solució de permeabilització (1 ml)

- a. 20 µl de *Tris-HCl 1M a pH 8* (USB Corporation, Cleveland, USA)
- b. 4 µl *MgCl₂ 1 M* (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanya)
- c. 5 µl *Tritó X-100*
- d. 971 µl Aigua *MiliQ*

- (vi) Es centrifuga (8.940 G, 5 minuts, 4 °C).
- (vii) Es suplementa el sediment amb 143 µl de **PMSF 1 mM** (inhibidor de proteases).

PMSF 1 mM (1 ml)

- a. 10 µl *PMSF 100 mM* (Sigma-Aldrich, St Louis, USA)
- b. 990 µl Aigua *MiliQ*

La preparació del PMSF 1 mM es realitza just abans de la seva utilització. El PMSF 100 mM és estable a -20 °C, ja que es troba dissolt en isopropanol, no obstant un cop es dissol en aigua es degradarà al cap d'uns minuts.

- (viii) Es centrifuga (8.940 G, 5 minuts, 4 °C).
- (ix) Es dissol totalment el sediment en 36 µl de la **solució de lisi** que es mostra a continuació. Mitjançant aquest xoc hipotònic es lisa tots els espermatozoides.

Solució de lisi (1 ml)

- a. 100 µl de *Tris-HCl* 1 M a pH 8
- b. 40 µl de *EDTA* 0,5 M a pH 8
- c. 10 µl *PMSF* 100 mM
- d. 850 µl Aigua *MiliQ*

- (x) S'afegeix el mateix volum, 36 µl, de la solució de solubilització del DNA que es mostra a continuació. Aquesta solució ens permet extreure la cromatina de les cèl·lules. La solució consta de tiocianat de guanidina que té un efecte desnaturalitzant i el DTT trenca els ponts disulfur de les protamines.

Solució de solubilització del DNA (1ml)

- a. 0,0887 g de *DTT* (Sigma-Aldrich, St Louis, USA)
- b. Fins a 1 ml de *Tiocianat de Guanidina* 6 M

Es crea una substància densa que correspon a la cromatina, per tant barrejarem bé mitjançant cops secs uns 10 minuts.

- (xi) S'atura la reacció afegint 5 volums d'etanol absolut a -20 °C (360 µl). Es barreja mitjançant inversió i vòrtex, observant l'aparició d'un filament blanc que correspon al DNA deshidratat.

- (xii) S'incuba el tub durant 15 minuts a -20 °C.

En aquest pas es pot aturar el protocol guardant el tub a -20 °C durant un llarg temps.

- (xiii) Es centrifuga (12.880 G, 15 minuts, 4 °C).

- (xiv) Es decanta el sobrenedant i s'elimina les restes d'etanol cuidadosament amb l'ajuda d'un paper absorbent.

- (xv) S'afegeix 360 µl de *HCl* 0,5 M (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanya). El HCl competeix amb el DNA que està unit a les protamines, alliberant-les de la cromatina.

- (xvi) Es vorteja la mostra.

- (xvii) S'incuba a 37 °C, 5 minuts.

- (xviii) Es vorteja la mostra.

- (xix) S'incuba a 37 °C, 2 minuts.

- (xx) Es centrifuga (17.530 G, 10 minuts, 4 °C)

- (xxi) S'incorpora el sobrenedant, que és on es troben les **proteïnes**, en un tub prerafredat que conté 89,3 µl d'*àcid tricloracètic (TCA)* 100% (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanya). En afegir el sobrenedant al TCA aquest es trobarà al 20%, que és el percentatge òptim per la precipitació de les proteïnes. En el sediment tenim el **DNA**, tot i que està altament degradat.

- (xxii) S'incuba els sobrenedant amb el TCA al 20%, 10 minuts a 4°C. Durant aquesta incubació es desnaturalitzen les proteïnes i precipiten.

- (xxiii) Es centrifuga (17.530 G, 10 minuts, 4°C)
- (xxiv) Es decanta el sobrenedant i es realitza dos rentats del sediment afegint 500 µl d'una **solució de rentat** que es mostra a continuació.

Solució de rentat (1 ml)

- a. 990 µl d'acetona (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanya)
- b. 10 µl β-mercaptoetanol

- (xxv) Es centrifuga (17.530 G, 5 minuts, 4°C).
- (xxvi) Es decanta el sobrenedant i s'asseca el sediment, on es troben les proteïnes, amb l'ús del *speed-vacuum* durant 9 minuts.
- (xxvii) Es resuspèn el sediment amb 14,3 µl del **tampó de mostra** que es detalla a continuació.

Tampó de mostra (1 ml)

- a. 0,330 g d'Urea 5,5 M (Biorad Laboratories, Hercules, USA)
- b. 200 µl de β-mercaptoetanol
- c. 50 µl d'àcid acètic (Panreac, Castellar del Vallès, Espanya)
- d. Fins a 1 ml d'aigua MiliQ

Es pot guardar les proteïnes en aquest tampó de mostra a -20°C durant llarg temps.

Per poder separar les protamines i determinar la seva relació es realitza una **electroforesi àcida**, ja que degut a l'alta càrrega positiva de les protamines aquestes no es poden visualitzar en gels de SDS convencionals. En els gels àcids les proteïnes no es separen per pes molecular, sinó per càrrega.

- (i) Es realitza un **gel àcid de poliacrilamida** com es mostra a continuació.

2 gel àcids de poliacrilamida (15 ml)

- a. 2,25 g d'Urea
- b. 0,771 ml d'àcid acètic
- c. 7,5 ml d'una solució de 30% acrilamida – 0,2% bisacrilamida (Sigma-Aldrich, St Louis, USA)
- d. Fins a 15 ml d'aigua MiliQ

Desgassifiquem durant 30-40 minuts amb el *speed-vacuum*

- e. 80 µl TEMED (GE Healthcare, Uppsala, Suècia)
- f. 800 µl APS al 10% (Serva, Heidelberg, Alemanya)

- (ii) S'afegeix la solució cuidadosament sense fer bombolles entre els dos vidres (prèviament rentats amb etanol) i es col·loca la pinta.
- (iii) **Es gelifica** durant 1 hora.
- (iv) Es treu la pinta i es neteja els pous amb aigua.
- (v) S'omple la cubeta d'electroforesi vertical amb el *tampó d'àcid acètic 0,9 N* (Panreac, Castellar del Vallès, Espanya).

Tampó d'àcid acètic 0,9 N (2,5 L)

- a. 128,43 ml d'àcid acètic
- b. Fins a 2,5 L d'aigua miliQ

- (vi) Degut al fet que l'electroforesi separa les proteïnes per càrrega i no per pes molecular, és important que abans de fer córrer les mostres en el gel, es realitza una **pre-electroforesi**, per tal d'eliminar els ions del gel que podrien alterar els resultats de l'electroforesi. És important que la polaritat dels elèctrodes a la font estigui invertida. La pre-electroforesi es duu a terme a 150 V durant 1 hora i 30 minuts, fins que l'amperatge es mantingui constant (18 mA amb una cubeta amb 2 gels).
- (vii) Es renova el tampó de cubeta amb el tampó d'àcid acètic 0,9 N.
- (viii) Es renta els pouets amb una xeringa i el tampó d'àcid acètic 0,9N, per treure restes d'urea que queden al pou.
- (ix) Es carrega 2,5 µl de la mostra diluïda amb el tampó de mostra.
- (x) Es realitza l'**electroforesi** a 150 V, 55 minuts. És important que la polaritat dels elèctrodes a la font estigui invertida per a que les protamines d'alta càrrega positiva siguin les que migrin cap al pol negatiu.

Per tal de poder visualitzar les protamines es realitza una **tinció** quantitativa amb el *blau de Coomassie EZBlue* (Sigma-Aldrich, St Louis, USA).

- (i) Primer es fixa les proteïnes en el gel amb una solució fixadora composta per 50% de metanol i 10% d'àcid acètic. Es deixa el gel en aquesta solució, en agitació, 15 minuts.
- (ii) Es rehidrata el gel amb aigua MiliQ, 15 minuts.
- (iii) S'afegeix el colorant *Comassie EzBlue* i es deixa actuar durant 1 hora.
- (iv) Es deixa el gel tenyit amb aigua MiliQ tota la nit per eliminar l'excés de colorant.

Per analitzar i **determinar la relació de protamines** escanejarem el gel i quantificarem la densitat òptica de les bandes corresponents a les protamines amb el *software Quantity One* (Biorad Laboratories, Hercules, USA).

6. Anàlisi estadístics

6.1. Anàlisi estadístics de les variables estudiades

Per l'anàlisi estadístic de les diferent variables estudiades hem utilitzat el *paquet estadístic SPSS* (SPSS Corp., Chicago, USA).

El primer que s'analiza és la determinació de la normalitat de les variables mitjançant el test de Kolmogorov-Smirnov. Si les variables a comparar segueixen la normalitat s'utilitzen tests paramètrics, mentre que si no segueixen la normalitat s'usa tests no paramètrics.

Segons si les nostres variables són quantitatives o qualitatives i si segueixen o no la normalitat utilitzarem diferents tests (*Veure taula 2.8*).

Taula 2.8. Tests estadístics realitzats segons els tipus de variables a comparar

Variable 1	Variable 2	Anàlisi
Qualitativa (2 categories)	Qualitativa (2 categories)	χ^2 , Test Fisher
Qualitativa (>2 categories)	Qualitativa (>2 categories)	χ^2
Qualitativa (2 categories)	Quantitativa	Paramètric: T Student No paramètric: Mann-whitney
Qualitativa (>2 categories)	Quantitativa	Paramètric: Anova No paramètric: Kruskal-Wallis
Quantitativa	Quantitativa	Paramètric: Correlació Pearson No paramètric: Correlació Spearman

6.2. Anàlisi dels arrays d'expressió

Les mesures d'expressió de l'*array* es van normalitzar i resumir utilitzant la metodologia *Robust Multi-array Average* (Irizarry *et al.*, 2003).

Es va usar l'aproximació no paramètrica *Rank Prod* (Breitling *et al.*, 2004) en el *TM4 Software Suite* (Saeed *et al.*, 2006) per determinar quins gens estaven diferencialment expressats de forma estadísticament significativa entre pacients i controls.

Es van considerar que els gens que estaven diferencialment expressats de forma estadísticament significativa, entre els dos grups estudiats, eren aquells que presentaven un valor *q-value* inferior a 0,05.

6.3. Revisió sistemàtica o metanàlisi

La realització d'una revisió sistemàtica requereix seguir un protocol, que ha d'incloure els següents passos:

- (i) Establir de la forma més clara i concisa la pregunta que s'intenta respondre.
- (ii) Realització d'una cerca exhaustiva, objectiva i reproduïble dels treballs d'investigació sobre el tema. El rigor en la cerca de la bibliografia determinarà la qualitat i validesa del metanàlisi.
- (iii) Establir els criteris d'inclusió i exclusió de l'estudi. Aquesta llista de criteris d'inclusió i exclusió ha de ser el més objectiva possible. Per exemple, el tipus de disseny del treball, el número de mostres estudiades, la informació detallada de les mostres incloses en el treball, entre d'altres.
- (iv) Avaluació de la qualitat dels treballs finalment inclosos en l'estudi.
- (v) Anàlisi de l'heterogeneïtat dels estudis. Si els estudis són molt heterogenis, la millor opció serà abandonar l'estudi del metanàlisi. Es realitza l'estadístic Q per comprovar la homogeneïtat dels nostres estudis, es rebutja la homogeneïtat de l'estudi quan el *P-value* de l'estadístic Q és inferior a 0,10.
- (vi) Vam utilitzar el model d'efectes aleatoris pel càlcul del OR (odd ratio) i l'interval de confiança del 95%. Aquest model té en consideració la variabilitat "inter" i "intra" estudis.
- (vii) Els resultats obtinguts es van representar en gràfiques que mostren l'efecte individual de cada estudi, el valor global obtingut al combinar tots els estudis i el seu corresponent interval de confiança.

Per l'estudi del metanàlisi es va usar el *software Meta-Analyst 3.13 11 statistical* (Wallace et al., 2009).

Resultats i discussió

RESULTATS I DISCUSSIÓ

1. Detecció d'alteracions en el contingut de RNAs mitjançant *microarrays*, en pacients infèrtils astenozoospèrmics (espermatozoides de mobilitat reduïda) en comparació a controls

Una de les eines proposades per cercar nous gens potencialment implicats en infertilitat masculina és l'anàlisi dels transcrits diferencials presents en l'espermatozoide d'un tipus de pacients determinat, en aquest cas pacients astenozoospèrmics (els seus espermatozoides presenten una mobilitat reduïda) en comparació amb controls normozoospèrmics. La detecció de gens alterats pot en una fase posterior obrir les portes al estudi de les causes d'aquesta alteració tal com pot ser la recerca de possibles polimorfismes o mutacions en els gens detectats que puguin estar relacionats amb alteracions en els nivells detectats.

Es va decidir estudiar alteracions en l'expressió de gens en pacients astenozoospèrmics ja que una reducció en la mobilitat de l'espermatozoide és una de les majors causes de infertilitat masculina, just després de la reducció del número d'espermatozoides.

Fins ara, hi ha diferents estudis que mostren diferències significatives en l'abundància de determinats transcrits implicats en la mobilitat de l'espermatozoide, en pacients astenozoospèrmics, mitjançant l'ús de la PCR quantitativa a temps real. Per exemple s'ha observat una reducció dels nivells dels transcrits corresponents als gens *PRM1*, *PRM2*, *HILS1*, *TNP1* i *TNP2* (Jedrzejczak *et al.*, 2007; Kempisty *et al.*, 2007), i un augment en els transcrits corresponents a *TPX-1* i *LDHC* (Wang *et al.*, 2004). Però fins ara no hi ha un estudi global per *microarray*, que determini les alteracions del transcriptoma en aquest tipus de pacients.

1.1. Posada a punt de l'extracció de RNA d'espermatozoides

Hem seleccionat un total de 36 individus per dur a terme l'extracció del RNA present en els seus espermatozoides:

- (i) 29 pacients infèrtils: (17 pacients infèrtils astenozoospèrmics i 12 pacients infèrtils normozoospèrmics).
- (ii) 7 controls fèrtils normozoospèrmics.

Si comparem els diferents paràmetres seminals que disposem de cada grup d'individus, veiem que únicament presenten diferències significatives ($p < 0.01$; NS diferències no significatives) en els diferents paràmetres relacionats amb la mobilitat dels espermatozoides (Veure taula 3.1).

Taula 3.1. Paràmetres seminals (mitjana \pm SEM) dels diferents grups inclosos en l'estudi

	Pacients astenozoospèrmics (n=17)	Pacients normozoospèrmics (n=12)	Controls fèrtils (n=7)	Astenozoospèrmics vs Normozoospèrmics	Astenozoospèrmics vs Controls fèrtils	Normozoospèrmics vs Controls fèrtils
Concentració (milions espermatozoides/ml)	63,100 \pm 9,381	91,408 \pm 16,349	77,600 \pm 16,483	NS	NS	NS
Volum (ml)	3,506 \pm 0,468	3,150 \pm 0,308	3,314 \pm 0,468	NS	NS	NS
Millions totals espermatozoides	185,51 \pm 29,636	247,366 \pm 25,578	241,047 \pm 38,786	NS	NS	NS
Mobilitat a (%)	3,100 \pm 0,780	39,083 \pm 3,915	28,929 \pm 5,27	$p = 0,000^*$	$p = 0,000^*$	NS
Mobilitat b (%)	13,412 \pm 2,258	36,367 \pm 2,279	36,500 \pm 3,141	$p = 0,000^*$	$p = 0,000^*$	NS
Mobilitat progressiva (%)	16,506 \pm 2,720	75,450 \pm 4,272	62,471 \pm 4,084	$p = 0,000^*$	$p = 0,000^*$	NS
Mobilitat c (%)	12,953 \pm 3,231	12,358 \pm 1,775	16,757 \pm 2,159	NS	$p = 0,047$	NS
Mobilitat total (%)	29,453 \pm 5,372	87,808 \pm 2,932	79,229 \pm 4,374	$p = 0,000^*$	$p = 0,000^*$	NS
Formes normals (%)	18,866 \pm 1,892	25,000 \pm 1,810	25,429 \pm 2,148	$p = 0,049$	NS	NS

Font: taula basada en l'article de Jodar *et al.*, 2012 (Veure annex II). "Differential RNAs in the sperm cells of asthenozoospermic patients".

Un cop seleccionades les mostres, es va procedir a aïllar el RNA d'espermatozoides correctament purificats (*Veure punt 4.1 de l'apartat de Materials i mètodes*). En la Taula 3.2 es poden observar els femtograms (fg) de RNA obtinguts per espermatozoide de cada mostra. És interessant destacar la heterogeneïtat que es presenta en el rendiment d'aïllament de RNA per cada mostra, tal i com s'indicava en estudis previs (Lalancette *et al.*, 2009; rang de 29 a 400 fg per espermatozoide).

Taula 3.2. Rendiment obtingut en l'aïllament del RNA de les mostres seleccionades

Mostres	Número d'espermatozoides lisats (x10 ⁶)	ng RNA total	fg RNA per espermatozoide
Pacients astenozoospèrmics			
3569	15	1686	112,4
3632	19	776,25	40,85
3637	18	1187,7	62,15
3643	12	1923,3	160,27
3671	15	875,7	58,38
3728	15	977,2	65,14
3814	15	919,45	61,29
3816	15	2209	147,2
3953	22	1117,6	50,8
4124	16	986,07	61,62
4125	18	672	37,3
4334	25	2640,75	105,63
4344	20	2501	125,05
4365	20	1689,5	84,47
4374	20	1607,5	80,37
4376	40	1123	28,07
5075	15	2380	158,6
Pacients normozoospèrmics			
3729	15	945	63
3882	12	1259,9	104,99
3883	20	1308	65,4
4062	30	1268	42,26
4063	16	1795	112,18
4265	20	747,77	34,8
4727	30	1991	66,36
4759	10	1090	109
4760	30	1123	37,43
4903	30	815,5	27,18
4934	30	701	23,36
4996	30	699,6	23,32
Controls fèrtils normozoospèrmics			
D221	24	757,5	31,56
D258	28	812,5	29,01
D214	40	560,5	14,01
D280	80	1551,5	19,39
D257	22	943,5	42,88
D274	40	1848,8	46,22
D278	10	824,5	82,4

Es pot observar que la quantitat de RNA per cèl·lula obtingut en els pacients astenozoospermics és generalment més elevada que en els pacients normozoospermics i controls fèrtils. Aquesta diferència pot venir donada per algun problema tècnic o per la fisiologia de la mostra. Per exemple, podria ser deguda a que en certs pacients l'eliminació del citoplasma durant l'espermatogènesi fos inferior que la que es dona en controls.

Com hem explicat en l'apartat de Materials i mètodes, en els estudis de RNA és molt important disposar de bons controls de qualitat, per determinar la puresa i el grau de degradació del RNA obtingut (*Veure punt 4.1 de l'apartat de Materials i mètodes*):

- (i) El *primer control de qualitat* és per determinar la concentració de RNA i el seu grau de puresa respecte la presència de proteïnes mitjançant l'ús de l'aparell *NanoDrop 1000 Spectrophotometer*.

Totes les concentracions de RNA obtingudes oscil·len entre 20 i 50 ng/ μ l i la relació de A260 nm/A280 nm entre 1,9-2,1 (aquestes dades no es mostren).

- (ii) El *segon control de qualitat* és per analitzar el perfil i la integritat dels nostres RNAs amb l'ús de l'aparell *Agilent 2100 Bioanalyzer*.

Cap de les mostres analitzades mostrava la presència de rRNA 18S i 28S i el rang de RNA oscil·lava entre 0,2 i 200 Kb (*Veure figura 2.8 de l'apartat de Materials i mètodes*).

- (iii) El *tercer control de qualitat* es realitza per comprovar l'absència de RNAs propis de leucòcits, ja que és molt comú la presència d'aquestes cèl·lules els ejaculats. Una petita contaminació de la mostra de semen per altres cèl·lules somàtiques ens podria emascarar els resultats, ja que una cèl·lula somàtica presenta de 10 a 30 pg de RNA per cèl·lula, aproximadament 300 cops més que el que trobem per espermatozoide.

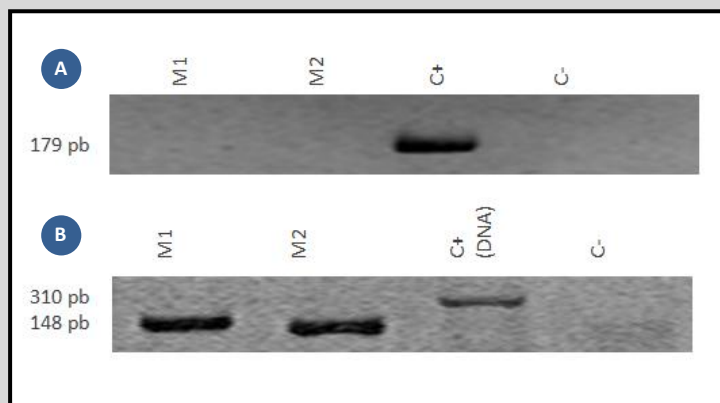
Per dur a terme aquest control vam realitzar una RT seguida d'una PCR del antigen específic de leucòcits, el *CD45* (*Veure punt 4.2 de l'apartat de Materials i mètodes*). Aquesta PCR és molt específica i sensible ja que podem detectar petites contaminacions de leucòcits. Cap de les mostres seleccionades van presentar amplificació per aquest RNA (*Veure figura 3.1*).

- (iv) El *quart control de qualitat* es realitza per verificar l'absència de DNA en les mostres de RNA i per tenir informació sobre la seva integritat.

Per dur a terme aquest control vam realitzar una RT seguida d'una PCR del gen *PRM2* (*Veure punt 4.2 de l'apartat de Materials i mètodes*). Segons la mida de l'amplificació obtinguda podem determinar la presència de DNA en les mostres analitzades i de la integritat del RNA aïllat (*Veure figura 3.1*).

Totes les mostres que hem seleccionat pels diferents estudis a realitzar en aquest punt compleixen els quatre controls de qualitat.

Figura 3.1. Tercer i quart control de qualitat realitzats en les mostres de RNA aïllades



Font: imatge basada en l'article de Jodar et al., 2012 (Veure annex II) . "Differential RNAs in the sperm cells of asthenozoospermic patients".

Nota:

- A) Anàlisi electroforètic dels productes de la RT-PCR corresponent al marcador específic de leucòcits *CD45*, per verificar l'absència del RNA *CD45* en dues de les mostres seleccionades (M1 i M2). Com a control positiu (C+) hem utilitzat una mostra de semen contaminada amb un milió/ml de leucòcits, on podem observar l'amplificació d'un fragment de 179 pb corresponent al RNA de *CD45*.
- B) Anàlisi electroforètic dels productes de la RT-PCR corresponent a la *PRM2* per comprovar l'absència de DNA (amplificació de 310 pb) en dues mostres de RNA seleccionades (M1 i M2), on podem observar que la banda amplificada és de 148 pb, indicant l'absència de l'intró. L'amplificació de 148 pb en les dues mostres seleccionades també ens dona informació sobre la integritat del nostre RNA. El control positiu (C+) correspon a una amplificació de DNA genòmic.

1.2. Estudi diferencial dels RNAs presents en pacients astenozoospermics versus controls fèrtils mitjançant l'ús de microarrays d'expressió

Es van seleccionar 4 controls fèrtils normozoospermics i 4 pacients infèrtils astenozoospermics per dur a terme l'estudi transcriptòmic diferencial mitjançant l'ús de *microarrays* d'expressió (Veure taula 3.3).

Taula 3.3. Mostres seleccionades per l'estudi transcriptòmic diferencial amb l'ús de *microarrays* d'expressió

Mostra	Concentració milions/ml	Volum ml	Mobilitat (%)			Mobilitat progressiva
			a	b	c	
3632	16,1	7,0	0,0	22,8	15,2	22,80%
3643	77,4	1,7	0,7	15,9	12,3	16,60%
3953	149,1	1,2	0,1	13,3	13,7	13,40%
4125	28,9	2,5	2,4	16,6	11,0	19,00%
D.221	140,9	3,5	16,9	32,3	17,7	49,20%
D.257	60,0	2,1	23,4	37,4	16,4	60,80%
D.258	172,7	1,9	20,1	32,7	17,4	52,80%
D.278	75,7	4,2	26,9	31,5	6,5	58,40%

Es van hibridar 50 ng de RNA de cada mostra en un *array Affimetrix HG-U133_Plus_2* (Veure punt 4.3 de l'apartat de Materials i mètodes) i els resultats obtinguts es van analitzar mitjançant paquets estadístics específics (Veure punt 6.2 de l'apartat de Materials i mètodes).

Tot i que els resultats de l'*array* van ser peculiars, degut a la poca quantitat de RNA i al soroll de fons observats, vam identificar 19 transcrits amb una abundància significativament diferent, 17 d'ells disminuïts i 2 augmentats, en pacients astenozoospermics en comparació amb els controls (Veure Taula 3.4).

Taula 3.4. Transcrits que es troben en una abundància superior o inferior en espermatozoides de pacient infèrtil astenozoospermic en comparació amb controls fèrtils normozoospermics, detectats mitjançant *microarrays* d'expressió

q-Values	Probe set	Nom del gen	Símbol del gen	Relació	Senyal-rma (pacients)	Senyal-rma (controls)
Transcrits amb una abundància inferior en pacients astenozoospermics que en els controls fèrtils						
0	1555653_at	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	HNRPA3	0,485	2,194	3,219
0,003	1553551_s_at	NADH dehydrogenase subunit 2	MT-ND2	0,581	1,959	2,766
0,003	1568126_at	annexin A2	ANXA2	0,431	3,778	5,049
0,006	242904_x_at	hypothetical protein LOC100289246	LOC100289246	0,5	5,032	5,914
0,01	225899_x_at	similar to FLJ45445 protein	FLJ45445	0,552	3,37	4,105
0,01	230972_at	ankyrin repeat domain 9	ANKRD9	0,661	4,675	5,29
0,024	222075_s_at	ornithine decarboxylase antizyme 3	OAZ3	0,502	3,592	4,62
0,027	238188_at	chromosome 1 open reading frame 148	C1orf148	0,578	3,129	3,907
0,027	227129_x_at	hypothetical LOC402483	FLJ45340	0,579	3,139	3,916
0,027	226385_s_at	chromosome 7 open reading frame 30	C7orf30	0,578	5,006	5,822
0,028	1553588_at	NADH dehydrogenase subunit 3	MT-ND3	0,58	2,926	3,683
0,033	228919_at	NA	NA	0,703	6,398	6,939
0,033	241835_at	hypothetical LOC100132147	LOC100132147	0,663	4,593	5,021
0,035	207010_at	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, beta 1	GABRB1	0,709	2,94	3,56
0,036	209403_at	TBC1 domain family, member 3	TBC1D3	0,623	4,052	4,862
0,041	237425_at	hypothetical BC042079 locus	LOC474358	0,654	5,914	6,463
0,043	214911_s_at	bromodomain containing 2	BRD2	0,639	4,02	4,641
Transcrits amb una abundància superior en pacients astenozoospermics que en els controls fèrtils						
0,01	227227_at	CDNA FLJ32605	NA	1,831	4,379	3,586
0,02	233092_s_at	DKFZP434B061 protein	DKFZP434B061	1,655	3,94	3,115

Font: taula basada en l'article de Jodar et al., 2012 (Veure annex II). "Differential RNAs in the sperm cells of asthenozoospermic patients".

És interessant destacar que 16 d'aquests 19 transcrits diferencials es troben dins el 10% dels transcrits més abundants en espermatozoides, aquest fet recolza la veracitat de les diferències significatives trobades.

També podem observar en la Taula 3.4, que més del 50% dels transcrits diferencials detectats (10 de 19) corresponen a proteïnes no caracteritzades o predites, un fet molt recurrent en els estudis de proteòmica i transcriptòmica de l'espermatozoide. En un futur, seria molt interessant caracteritzar aquestes proteïnes per poder identificar el seu paper en el procés de l'espermatogènesi o en la mobilitat de l'espermatozoide.

Si relacionem els transcrits amb una abundància diferencial (q-value<0,5) amb el processos biològics en els que es troben implicats, els resultats indiquen que dos processos biològics es troben alterats en pacients infèrtils astenozoospermics en comparació amb controls fèrtils. Aquests són:

- (i) El desenvolupament de les espermàtides ($p < 0,005$).
- (ii) La biosíntesi de la ubiquinona ($p < 0,05$). La ubiquinona, també anomenada Coenzim Q, actua com un portador d'electrons durant la fosforilació oxidativa en les mitocondries.

Per tant, els resultats obtinguts ens estarien suggerint que en els pacients astenozoospèrmics hi ha certs problemes durant les fases finals de l'espermatogènesi i també en la síntesis d'ATP per part de la mitocondria (cadena respiratòria mitocondrial).

Aquests resultats són molt similars als que van obtenir en un estudi recent que comparava pacients infèrtils i controls fèrtils, on mitjançant l'ús de *microarrays* observaven que els transcrits detectats amb una abundància diferencial estaven relacionats amb els processos biològics de desenvolupament de les espermàtides i en la producció d'energia (Garcia-Herrero *et al.*, 2010).

1.3. Validació dels transcrits diferencials obtinguts en l'objectiu 1.2 en un número superior de mostres mitjançant l'ús de la PCR quantitativa a temps real

Per tal de validar els resultats de l'*array*, vam seleccionar alguns dels transcrits amb una abundància alterada (*Veure taula 3.4*), que estiguessin potencialment relacionats amb la mobilitat de l'espermatozoide o en el procés d'espermatogènesi, per tal de comprovar la seva abundància relativa en un número superior de mostres, usant la PCR quantitativa a temps real (*Veure punt 4.4 de l'apartat de Materials i mètodes*).

Els transcrits que vam seleccionar per validar els resultats diferencials de l'*array* van ser els següents:

- (i) El transcrit **ANXA2**.

L'ANXA2 és un transcrit que codifica per una proteïna d'unió al calci. S'ha descrit que aquesta proteïna es troba en l'acrosoma i en el flagel de l'espermatozoide (Feinberg *et al.*, 1991) i, per tant, podria estar implicada en diferents processos dependents de calci com són la mobilitat del flagel, la reacció acrosòmica i la fertilització.

- (ii) El transcrit **BRD2**.

Tal com hem mencionat en la introducció, les diferents modificacions de les histones en els espermatozoides proporcionen al seu DNA associat marques epigenètiques que regulen la transcripció de gens tant durant l'espermatogènesi com en el desenvolupament embrionari (*Veure punt 2.2.3 de l'apartat d'Introducció*).

La proteïna BRD2 forma part de la família BET (*bromodomain and extraterminal-domain*) que són proteïnes importants en l'organització de la cromatina i la herència epigenètica. S'ha suggerit que aquesta família pot actuar com a traductor de les marques proporcionades per les modificacions de les histones i com a xaperones de les histones mentre es dona la transcripció (LeRoy *et al.*, 2008)

Una de les modificacions que podem trobar en les histones són les acetilacions. S'ha descrit que la proteïna BRD2 interactua amb les lisines 12 i 5 acetilades de la histona H4 (Kanno *et al.*, 2004; Umehara *et al.*, 2010). L'acetilació en aquests residus de la H4 està lligada amb l'activitat transcripcional del gen on es troba associada.

Es va descriure que el gen *BRD2* es trobava en una regió del cromosoma 6 que estava lligada a l'aparició d'azoospèrmia no obstructiva, no obstant, no es va detectar cap mutació en la regió codificant d'aquest gen en pacients azoospèrmics (Matsuzaka *et al.*, 2002).

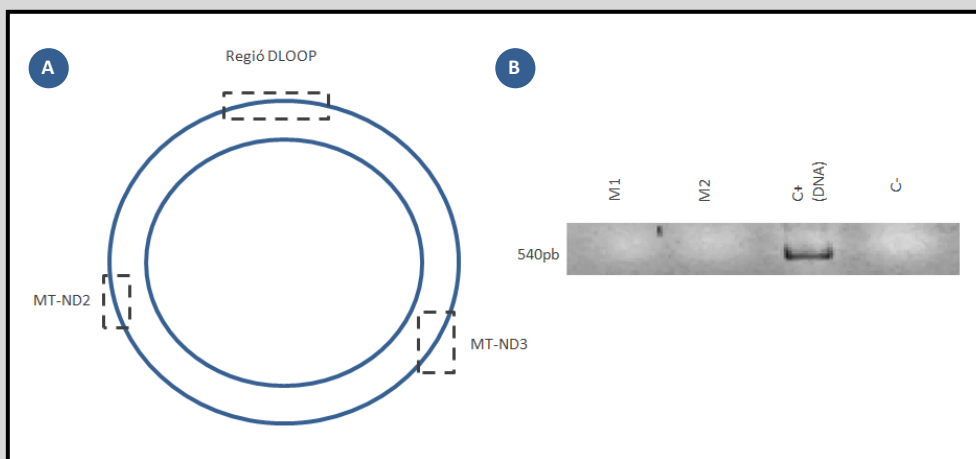
El ratolí genoanul·lat pel gen *BRD2* tampoc ens dóna informació sobre la seva implicació en la fallida de l'espermatogènesi, degut a que aquest mor en el període embrionari (Gyuris *et al.*, 2009), ja que aquesta proteïna es troba en el nucli de les cèl·lules de molts teixits (Shang *et al.*, 2004).

Tot i això, la seva gran homologia amb una altre membre de la seva família, la proteïna *BRDT*, que és específica de testicle i el seu corresponent genoanul·lat sí mostra una infertilitat severa (Veure punt 4.4 de l'apartat d'Introducció), ens fa pensar la possible implicació de la proteïna *BRD2* en el procés d'espermatogènesi.

(iii) Els transcrits mitocondrials **MT-ND2** i **MT-ND3**.

El fet que els gens mitocondrials no presentin introns ens va plantejar el dubte que les diferències observades fossin degudes realment per la diferent abundància dels transcrits o per la possibilitat d'una contaminació per DNA mitocondrial. Per poder verificar l'absència de contaminació de DNA mitocondrial vam realitzar una RT-PCR en les mostres de RNA de la única regió del DNA mitocondrial que no es transcriu, la regió DLOOP (Veure figura 3.2; Veure punt 4.2 de l'apartat de Materials i mètodes). Degut a que no es va observar amplificació d'aquesta regió vam verificar l'absència de DNA mitocondrial.

Figura 3.2. Control de qualitat per verificar l'absència de DNA mitocondrial



Font: imatge basada en l'article de Jodar *et al.*, 2012 (Veure annex II). "Differential RNAs in the sperm cells of asthenozoospermic patients".

Nota:

- A) Localització dels gens mitocondrials *MT-ND2* i *MT-ND3* i la regió DLOOP en el DNA mitocondrial circular de doble cadena.
- B) Anàlisi electroforètic dels productes de la PCR corresponent a la regió DLOOP per comprovar l'absència de DNA mitocondrial (amplificació de 540 pb) en dues mostres de RNA seleccionades (M1 i M2). Com a control positiu (C+) hem utilitzat una mostra de DNA on podem observar l'amplificació d'un fragment de 540 pb corresponent a la regió mitocondrial que no es transcriu, DLOOP.

Els transcrits mitocondrials (MT-ND2 i MT-ND3) codifiquen per proteïnes que formen part de diferents subunitats del complex I de la cadena respiratòria mitocondrial. Aquest complex I és l'encarregat de la transferència d'electrons des del NADH a la cadena respiratòria que acabarà produint energia en forma d'ATP, el qual juga un paper de rellevància en l'espermatogènesi, diferenciació i funcionament òptim de les cèl·lules germinals.

S'ha descrit que diferents mutacions en el DNA mitocondrial es troben associades a una pobra qualitat del semen (Shamsi *et al.*, 2008). Diferents estudis descriuen que els espermatozoides amb mobilitat alterada presenten més còpies de DNA mitocondrial en comparació amb aquells amb una mobilitat progressiva òptima (Amaral *et al.*, 2007). Es creu que aquest fet es deu a que el DNA mitocondrial amb deleccions es replica més ràpid. Podria ser que, tot i tenir més còpies de DNA mitocondrial, aquest sigui de baixa qualitat i la transcripció d'aquests gens sigui menor, tal i com observem en principi en els nostres resultats.

(iv) El transcrit **OAZ3**.

La antienzima OAZ3 pertany a un grup de proteïnes que regulen la síntesi de poliamines, que juguen un paper important en l'espermatogènesi. En aquest cas, aquesta regulació es dona amb la unió de OAZ3 amb la *ornithine decarboxylase* (ODC), que és l'enzim que produeix la primera poliamina a partir de la *ornithina*, el qual és el pas limitant en la producció de poliamines. La unió de la proteïna OAZ3 a ODC dona un senyal que fa que ODC es destrueixi a través del proteosoma.

OAZ3 és l'únic membre de la família que s'expressa en estadis posteriors de l'espermatogènesi (Christensen *et al.*, 2006) i que, sumat a que els ratolins transgènics que sobreexpressen ODC i que tenen un nivell alt de poliamines són infèrtils (Halmekeyto *et al.*, 1991) ens indiquen la rellevància de OAZ3 en el procés d'espermatogènesi. A més a més, els ratolins genoanul·lats per OAZ3 presenten espermatozoides amb unió dèbil entre el cap i la cua que fa que aquests tinguin una mobilitat alterada (Tokuhiro *et al.*, 2009).

L'estudi per PCR quantitativa a temps real d'aquests 5 transcrits es va realitzar en 16 pacients astenozoospermics i en 6 controls fèrtils normozoospermics. Els resultats d'aquesta quantificació diferencial es mostren en la Taula 3.5.

Taula 3.5. Abundància relativa dels transcrits seleccionats, en els espermatozoides de pacients astenozoospermics i controls fèrtils mitjançant l'ús de la PCR quantitativa temps real

	Pacients astenozoospermics (n= 16)	Controls fèrtils (n=6)	Significació estadística (Test U Mann-Whitney)
Abundància dels transcrits (relatiu a la β-actina)			
ANXA2 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	0,6 \pm 0,1	2,4 \pm 0,6	P < 0,005
BRD2 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	0,4 \pm 0,1	2,1 \pm 0,6	P < 0,001
mtND2 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	1,8 \pm 0,4	2,6 \pm 0,8	NS
mtND3 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	1,9 \pm 0,5	1,9 \pm 0,4	NS
OAZ3 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	0,4 \pm 0,0	1,0 \pm 0,3	P < 0,050

Font: taula basada en l'article de Jodar *et al.*, 2012 (Veure annex II). "Differential RNAs in the sperm cells of asthenozoospermic patients".

Els resultats obtinguts mitjançant l'ús de la PCR quantitativa a temps real confirmen l'abundància diferencial de tres dels cinc transcrits seleccionats (ANXA2, BRD2 i OAZ3) entre pacients infèrtils astenozoospermics i els controls fèrtils normozoospermics ($p < 0,05$; *Veure taula 3.5*). No obstant, en augmentar el número de mostres estudiades no s'han observat diferències significatives en l'abundància relativa dels dos transcrits mitocondrials seleccionats (*Veure taula 3.5*).

A continuació vam seleccionar els dos transcrits més diferencials, el ANXA2 i el BRD2, per estudiar la seva abundància relativa en un nou grup de pacients infèrtil que en aquest cas presentaven una mobilitat adequada (normozoospermics; *Veure taula 3.1*).

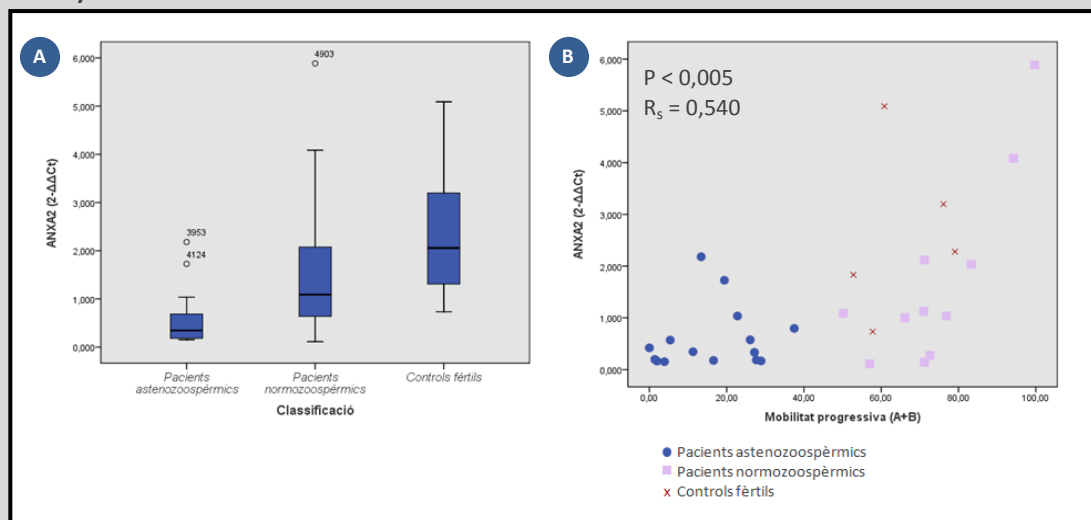
En el cas del **ANXA2** la mitjana de l'abundància relativa del transcrit \pm error típic de la mitja en els tres grups independents van ser els següents:

- (i) Pacients astenozoospermics: $0,601 \pm 0,158$.
- (ii) Pacients normozoospermics: $1,718 \pm 0,540$.
- (iii) Controls fèrtils normozoospermics: $2,407 \pm 0,636$.

Podem veure que, tant en pacients normozoospermics com en els controls fèrtils, l'abundància del transcrit ANXA2 és superior a la que trobem en els pacients astenozoospermics. No obstant, mentre que quan comparem pacients astenozoospermics i controls fèrtils aquestes diferències són estadísticament significatives (*Veure taula 3.5*), quan comparem els valors obtinguts en els pacients astenozoospermics envers els normozoospermics les diferències observades no són estadísticament significatives (*Veure figura 3.3.A*).

Tot i això, sí vam observar una correlació positiva estadísticament significativa entre la velocitat progressiva dels espermatozoides (A+B) i els nivells d'abundància relativa del transcrit ANXA2 ($p < 0,005$; *Veure figura 3.3.B*).

Figura 3.3. Abundància relativa del transcrit ANXA2 en tres grups d'estudi independents (pacients infèrtils astenozoospermics, pacients infèrtils normozoospermics i controls fèrtils)



Font: imatge basada en l'article de Jodar et al., 2012 (*Veure annex II*). "Differential RNAs in the sperm cells of asthenozoospermic patients".

Nota:

- A) Diagrama de caixes de l'abundància relativa del transcrit ANXA2 en les 3 poblacions estudiades.
- B) Correlació positiva estadísticament significativa entre l'abundància relativa del transcrit ANXA2 i la mobilitat progressiva dels espermatozoides (A+B). S'indiquen el valor de significació *P-value* i el coeficient de correlació de Spearman (R_s).

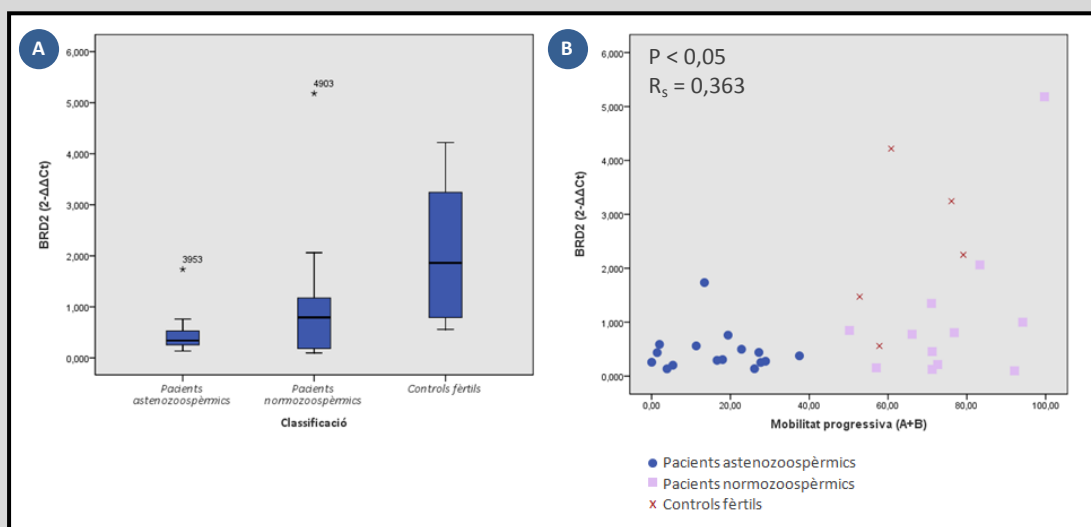
En el cas del transcrit **BRD2**, la mitjana de l'abundància relativa del transcrit \pm error típic de la mitja en els tres grups independents van ser els següents:

- (i) Pacients astenozoospèrmics: $0,453 \pm 0,095$.
- (ii) Pacients normozoospèrmics: $1,089 \pm 0,408$.
- (iii) Controls fèrtils normozoospèrmics: $2,089 \pm 0,203$.

Com ja passava amb el transcrit ANXA2, els pacients astenozoospèrmics presenten una abundància inferior del transcrit BRD2, tot i que aquestes diferències únicament arriben a ser estadísticament significatives quan comparem pacients astenozoospèrmics i controls fèrtils (Veure taula 3.5; Veure figura 3.4.A).

En aquest cas també hi ha una correlació positiva estadísticament significativa entre la velocitat progressiva dels espermatozoides (A+B) i els nivells d'abundància relativa del transcrit BRD2 ($p < 0,05$; Veure figura 3.4.B).

Figura 3.4. Abundància relativa del transcrit BRD2 en tres grups d'estudi independents (pacients infèrtils astenozoospèrmics, pacients infèrtils normozoospèrmics i controls fèrtils)



Font: imatge basada en l'article de Jodar et al., 2012 (Veure annex II) - "Differential RNAs in the sperm cells of astenozoospermic patients".

Nota:

- A) Diagrama de caixes de l'abundància relativa del transcrit BRD2 en les 3 poblacions estudiades.
- B) Correlació positiva estadísticament significativa entre l'abundància relativa del transcrit BRD2 i la mobilitat progressiva dels espermatozoides (A+B). S'indiquen el valor de significació *P-value* i el coeficient de correlació de Spearman (R_s).

Els resultats que hem obtingut de l'abundància relativa dels dos transcrits (ANXA2 i BRD2) en el grup de pacients infèrtils normozoospèrmics ens mostra una situació intermèdia entre la població de pacients infèrtils astenozoospèrmics i de controls fèrtils, el que suggereix que hi ha un cert grau de disfunció per aquests transcrits en el grup de pacients normozoospèrmics.

Aquest resultat suggereixen que un nivell baix d'aquests dos transcrits podria estar associat amb l'astenozoospèrmia i per tant podrien ser usats com a biomarcadors de l'estat de fertilitat dels pacients.

Com hem dit anteriorment, l'ANXA2 és una proteïna d'unió al calci que podria estar involucrada en diferents processos calci dependents. Els nostres resultats suggereixen que nivells baixos del RNA corresponent al gen *ANXA2* podrien estar associats a una baixa mobilitat flagel·lar, ja que aquest procés és depenent del calci.

La BRD2 és una proteïna que confereix importants marques epigenètiques que poden regular tant la transcripció durant el procés de l'espermatogènesi com el del desenvolupament embrionari. Els nostres resultats confirmen els resultats trobats en un altre estudi, el qual observava una major quantitat del transcrit BRD2 en controls fèrtils que en pacients infèrtils (Garcia-Herrero *et al.*, 2010). Aquests resultats suggereixen que uns nivells baixos del transcrit BRD2 podria estar associat a un error epigenètic de l'espermatogènesi, i que això es podria traduir en infertilitat.

1.4. Estudi dels transcrits de les protamines en pacients infèrtils astenozoospermics

En el nostre estudi també vam decidir incloure l'anàlisi dels transcrits de les protamines (PRM1 i PRM2), ja que existia certa base per pensar que podien estar relacionades amb la mobilitat. Està descrit que una relació de proteïna P1/P2 alterada contribueix a una condensació de la cromatina anòmala i que s'associa amb un increment dels trencaments de les cadenes de DNA (Castillo *et al.*, 2011), fet que podria iniciar una senyalització d'apoptosi induint la inactivació de les mitocondries i per tant, l'alteració de la mobilitat dels espermatozoides (Miyagawa *et al.*, 2005). Es coneix que en mostres astenozoospermiques es detecta major lesió en el DNA (Ribas-Maynou *et al.*, 2012).

Si observem les quantitats dels transcrits PRM1 i PRM2 que hem obtingut en l'anàlisi del *microarray*, podem observar que la quantitat d'aquests és inferior en pacients astenozoospermics que en els controls fèrtils, tot i que aquestes diferències no són estadísticament significatives (Veure taula 3.6). No obstant, per tal de validar estudis previs, on mostraven diferències significatives en la quantitat d'aquests transcrits en individus astenozoospermics envers individus normozoospermics (Kempisty *et al.*, 2007), vam decidir avaluar la quantitat relativa d'aquests transcrits en els tres grups independents de l'estudi mitjançant l'ús de la PCR quantitativa a temps real (Veure taula 3.6).

Taula 3.6. Valors obtinguts en l'estudi diferencial dels transcrits de les protamines (PRM1 i PRM2) mitjançant l'ús de *microarrays* i de la PCR quantitativa a temps real

	Pacients astenozoospermics (n=4)	Pacients normozoospermics (n=12)	Controls fèrtils (n=6)	Astenozoospermics vs Normozoospermics	Astenozoospermics vs Controls fèrtils	Normozoospermics vs Controls fèrtils
Resultats de l'array (<i>senyal-rna</i>)				Relació (q value)		
PRM1	10,2 ± 0,6	-	10,5 ± 0,9	-	0,876 (NS)	-
PRM2	7,2 ± 0,7	-	7,6 ± 1,1	-	0,794 (NS)	-
Resultats de PCR temps real (2-$\Delta\Delta Ct$)				Significació estadística (Test U Mann-Whitney)		
PRM1	0,7 ± 0,2	0,9 ± 0,2	2,5 ± 0,6	NS	P < 0,001	p < 0,01
PRM2	0,9 ± 0,2	1,5 ± 0,4	3,7 ± 1,3	NS	P < 0,005	NS

Font: taula basada en l'article de Jodar *et al.*, 2012 (Veure annex II). "Differential RNAs in the sperm cells of asthenozoospermic patients".

El resultat de la PCR quantitativa a temps real ens reafirmen els resultats dels estudis previs, ja que observem que els transcrits de les protamines són significativament inferiors en pacients astenozoospermics en comparació als controls fèrtils normozoospermics.

També hem observat que els pacients infèrtils normozoospermics també presenten diferències estadísticament significatives per el transcrit de la PRM1 en comparació amb els controls fèrtils. No obstant, no s'observen diferències entre els pacients normozoospermics i astenozoospermics.

Aquests resultats ens suggereixen que les diferències en l'abundància dels transcrits de les protamines, sobretot per la protamina 1, podrien estar més correlacionades amb l'estat de fertilitat que amb el paràmetres seminals de la mobilitat. Aquests resultats són coherents amb un estudi previ on observaven un nivells més alts dels transcrits de les protamines en aquells pacients que tenien una millor taxa d'embaràs i també amb una millor qualitat dels embrions (Depa-Martynow *et al.*, 2007). Aquests resultats ens porten a pensar en la importància de les protamines en una correcta fertilització, però també en que poden tenir certes funcions en el correcte desenvolupament preimplantacional.

En aquest estudi hem detectat en pacients astenozoospermics diversos RNAs amb una abundància alterada, mitjançant l'ús de *microarrays* seguit d'una validació per PCR quantitativa a temps real. Aquests resultats ens ofereixen la possibilitat d'aprofundir en l'estudi dels mecanismes patogènics que poden actuar en l'astenozoospermia, com també en el plantejament de la futura utilització d'aquests RNAs alterats que hem detectat com a possibles futurs biomarcadors de la fertilitat, per tal d'aconseguir una millor caracterització dels pacients infèrtils.

A més a més, els resultats ens mostren nous gens candidats per al seu estudi mutacional, amb la finalitat de cercar mutacions que ens puguin explicar les possibles alteracions en la seva transcripció.

Els resultats d'aquest estudi han derivat en la següent publicació internacional (*Veure Annex II*):

Jodar M, Kalko S, Castillo J, Ballescà JL and Oliva R.

Differential RNAs in the sperm cells of asthenozoospermic patients.

Human Reproduction (FI: 4,357; Q1 *Reproductive Biology*). (2012) vol.27 num.5 pag.1431-1438

2. Estudi mutacional de gens candidats derivats d'estudis previs del grup i derivats del primer objectiu. Estudis d'associació casos-controls de les mutacions i polimorfismes identificats per tal de determinar si es comporten com mutacions patogèniques, com factors de risc o com a polimorfismes no patogènics

Una part important en l'estudi de les malalties complexes, com és la infertilitat masculina, és la cerca de variants gèniques mitjançant la seqüenciació de gens candidats, per tal d'identificar polimorfismes que siguin la causa o bé es comportin com a factors de risc de la malaltia.

Existeixen nombroses alternatives per a la cerca de gens candidats (Matzuk & Lamb, 2008). Però en el nostre cas la estratègia que hem utilitzat en la cerca de possibles gens candidats nous ha estat basar-nos en els resultats derivats d'estudis previs de:

- (i) Proteòmica diferencial en espermatozoides de pacients infèrtils i controls.
- (ii) Transcriptòmica diferencial en espermatozoides de pacients infèrtils i controls.
- (iii) Generació de genoanul·lats en ratolí associats a infertilitat.

2.1. Gens de les protamines 1 i 2 (PRM1 i PRM2)

Uns dels primers gens candidats que es van seleccionar van ser els gens de les protamines, ja que les protamines són les proteïnes nuclears més abundants en l'espermatozoide humà. A més a més, són claus en el reempaquetament del genoma patern i, per tant, claus en el procés de l'espermatogènesi (*Veure punt 4.1 de l'apartat d' Introducció*).

Aquesta selecció queda reforçada per les troballes obtingudes amb les tres estratègies utilitzades en la cerca de nous gens candidats:

- (i) Els pacients que presenten una relació de proteïnes P1/P2 alterada solen presentar una pitjor qualitat del semen, una disminució en la capacitat de fertilització i una pitjor taxa d'embaràs quan recorren a les tècniques de fertilització *in vitro* (*Veure punt 3.3.3 de l'apartat d'Introducció*).
- (ii) Diferents estudis suggereixen que una alteració en l'abundància dels transcrits de les protamines es troba associada a uns paràmetres seminals alterats i a una menor taxa d'embaràs.
- (iii) El ratolí que presenten una haploinsuficiència per *PRM1* o *PRM2* són infèrtils i els seus espermatozoides presenten anomalies morfològiques, tant del cap com de la cua i mostres alteracions en la integritat de la cromatina, indicant una condensació del DNA incompleta (Cho *et al.*, 2001).

Aquest fet suggereixen que qualsevol mutació en el gens de les protamines podria ser la causa de la infertilitat en certs tipus de pacients, encara que aquests presentin una producció normal d'espermatozoides.

No obstant això, els anàlisis mutacionals inicials en els gens de les protamines suggereixen que mutacions patogèniques en aquests són una causa rara d'infertilitat masculina (de Yebra *et al.*, 1998).

A més a més, en estudis més recents s'havia descrit en 3 dels 30 pacients estudiats una variant que dona lloc a un canvi d'una arginina per una serina (G197T) que sí podria ser la causa d'infertilitat (Iguchi *et al.*, 2006). Els pacients que presentaven aquesta mutació tenien un

fenotip molt similar al que presentava el ratolí amb haploinsuficiència de *PRM1* o *PRM2* (comptatge normal, molta fragmentació del DNA i formes normals inferior a 4,4%).

Per tant, les mutacions en els gens de les protamines són una causa infreqüent d'infertilitat tot i que no tan rara com es pensava en un principi.

Degut a la baixa variabilitat en la zona codificant del gen, els nous estudis s'han enfocat cap a les regions no codificants 5' i 3' (mutacions en aquestes regions dels gens poden provocar alteracions en la regulació transcripcional i traduccional de les protamines, afectant així la seva expressió). En un d'aquests estudis es van identificar nous SNPs, però cap d'aquestes variants semblava ser responsable de l'alteració en l'expressió de les protamines (Hammoud *et al.*, 2007).

En el nostre grup, en el 2008, es va realitzar un estudi on es suggeria que un polimorfisme freqüent en el promotor del gen de la *PRM1* (c.-191C>A) podia comportar-se com un factor de risc per la presència d'anomalies en la morfologia de l'espermatozoide (Gázquez *et al.*, 2008). Tot i això, el número de mostres utilitzades en l'estudi era baixa i únicament es va analitzar el polimorfisme c.-191C>A.

Per tant, en el present estudi ens hem proposat augmentar el número de mostres estudiades per tal de validar els resultats trobats en l'estudi de Gázquez *et al.* (2008) i, a més a més, seqüenciar les regions codificants i no codificant dels gens *PRM1* i *PRM2*, en busca de variants i/o polimorfismes. Addicionalment, degut a la proximitat dels dos gens, s'ha intentat establir els haplotips més comuns en la nostra població.

2.1.1. Relació entre la variant c.-191C>A del gen *PRM1* i la morfologia alterada en espermatozoides

Per tal de validar els resultats previs del grup, on es veia que la freqüència del genotip AA per la variant c.-191C>A de la *PRM1* es trobava significativament augmentada en pacients infèrtils amb una morfologia amb una proporció de FN≤9% en comparació amb pacients amb FN>9% (fet que suggeria que aquesta variant podia actuar com a factor de risc per a presentar morfologies alterades en els espermatozoides (Gázquez *et al.*, 2008)) vam decidir augmentar el número de mostres estudiades i així comprovar si aquesta associació es mantenia (Veure Taula 3.7).

Taula 3.7. Estudi de la relació de la variant c.-191C>A i la morfologia dels espermatozoides en la població espanyola

Nota: * La freqüència del genotip AA en pacients amb una morfologia ≤ 9% FN és significativament superior que en pacients amb una morfologia >9% FN (p<0,05).

FN: Formes normals

	Morfologia			
	FN ≤ 9%		FN >9%	
Població espanyola	(n= 124)		(n= 198)	
Genotip				
CC % (n)	54	(67)	54	(107)
CA % (n)	35.5	(44)	41.4	(82)
AA % (n)	10.5 *	(13)	4.6	(9)
Freqüència al·lèlica				
C (n)	0.718	(178)	0.747	(296)
A (n)	0.282	(70)	0.253	(100)

Font: taula basada en l'article de Jodar *et al.*, 2010 (Veure annex I) . "Polymorphisms, haplotypes and mutations in the protamine 1 and 2 genes".

Podem observar que en la població espanyola es confirma que la presència del genotip c.-191AA en el gen *PRM1* és comporta com un factor de risc per la presència d'alteracions en la morfologia dels espermatozoides.

Per tal de reafirmar aquesta associació, vam decidir comprovar si aquesta es mantenia en una població independent, en aquest cas en la població sueca (*Veure taula 3.8*).

Taula 3.8. Estudi de la relació de la variant c.-191C>A i la morfologia dels espermatozoides en la població sueca

	Morfologia	
	FN ≤ 9%	FN >9%
Població sueca	(n= 48)	(n= 50)
Genotip		
CC % (n)	45,8 (22)	52 (26)
CA % (n)	52,1 (25)	34 (17)
AA % (n)	2,1 (1)	14* (7)
Freqüència al·lèlica		
C (n)	0,719 (69)	0,69 (69)
A (n)	0,281 (27)	0,31 (31)

Font: taula basada en l'article de Jodar et al., 2010 (*Veure annex I*). "Polymorphisms, haplotypes and mutations in the protamine 1 and 2 genes".

Nota: * La freqüència del genotip AA en individus amb una morfologia >9% FN és significativament superior que en pacients amb una morfologia ≤ 9% FN ($p < 0,05$).

FN: Formes normals

Tot i que el número de mostres estudiades en la població sueca no és molt elevat, sí que podem observar que la freqüència del genotip AA és significativament menor en individus amb una proporció de FN≤9% que en individus amb >9% de FN.

No obstant, ens va cridar l'atenció que les freqüències genotípiques per aquest polimorfisme en la població sueca es trobessin desviades de l'equilibri de la llei de Hardy-Weinberg, suggerint la presència d'una pressió selectiva en la població.

Una de les causes descrites en la literatura per a la desviació de l'equilibri de la llei Hardy-Weinberg en els resultats de les freqüències genotípiques d'un polimorfisme és la presència de *copy number variations* (CNV) en el *loci* estudiat (Lee et al., 2008).

Per tant, tot i que aquest polimorfisme sembla ser un factor de risc per les anomalies morfològiques dels espermatozoides en la població espanyola, els resultats inesperats en el genotipatge d'aquest polimorfisme en la població sueca fa que ens replantegem el seu efecte en la morfologia dels espermatozoides. Intentarem buscar noves explicacions per l'associació descrita, com la presència de CNV en el gen *PRM1* (*Veure punt 2.1.5 del present apartat*) i el fet que en la població espanyola aquest polimorfisme pugui estar en desequilibri de lligament amb un altra variant que sigui la causa real de les anomalies en la morfologia de l'espermatozoide.

2.1.2. Estudi mutacional dels gens *PRM1* i *PRM2*

L'estudi mutacional del gen *PRM1* es va realitzar en 156 pacients infèrtils de nacionalitat espanyola, que podem dividir en dos subgrups segons la morfologia dels espermatozoides (85 pacients presentaven una proporció de FN ≤ 9% i 71 pacients > 9%). Aquesta subdivisió es va establir segons estudis previs del grup (Gázquez *et al.*, 2008). També es van incloure en l'estudi 102 controls fèrtils de nacionalitat espanyola, tot i no disposar dels seus paràmetres seminals. En aquest estudi vam incloure 53 pacients infèrtils de nacionalitat sueca, on 48 presentaven una proporció de FN ≤ 9% i 5 pacients >9%. També es van incloure 50 controls fèrtils normozoospèrmics de nacionalitat sueca.

Es van identificar un total de 9 variants en el gen de la *PRM1*: (i) 2 en la regió promotora 5', (ii) 4 en la regió codificant, (iii) 1 en l'intró i (iv) 2 en la regió no traduïda 3' (Veure taula 3.9).

Taula 3.9. Variants gèniques identificades en el gen *PRM1*

Variant	Regió del gen	Canvi d'aminoàcid	Freqüència al·lèlica (Distribució genotípica)	
			Pacients infèrtils	Controls fèrtils
Població espanyola			(n= 156)	(n= 102)
c.-248C>A	5' regió promotora	--	0.003 A (0, 1, 155)	0.000 A (0, 0, 102)
c.-191C>A	5' regió promotora	--	0.260 A (13, 55, 88)	0.225 A (4, 38, 60)
c.49C>T	Exó 1	R17C	0.003 T (0, 1, 155)	0.000 T (0, 0, 102)
c.102G>T	Exó 1	R34S	0.003 T (0, 1, 155)	0.000 T (0, 0, 102)
c.112+40G>A (g.152G>A)	Intró	--	0.003 A (0, 1, 155)	0.000 A (0, 0, 102)
c.139A>C (g.230A>C)	Exó 2	R47R	0.282 C (12, 64, 80)	0.339 C (14, 41, 47)
c.153*4T>A (g.248T>A)	3' UTR	--	0.003 A (0, 1, 155)	0.000 A (0, 0, 102)
Població sueca			(n= 53)	(n= 50)
c.-191C>A	5' regió promotora	--	0.274 A (1, 27, 25)	0.310 A (7, 17, 26)
c.102G>T	Exó 1	R34S	0.009 T (0, 1, 52)	0.010 T (0, 1, 49)
c.113G>T	Exó 2	R38M	0.000 T (0, 0, 53)	0.010 T (0, 1, 49)
c.139A>C (g.230A>C)	Exó 2	R47R	0.302 C (2, 28, 23)	0.280 C (4, 20, 26)
c.153*96A>G (g.340A>G)	3' UTR	--	0.000 T (0, 0, 53)	0.010 T (0, 1, 49)

Font: taula basada en l'article de Jodar *et al.*, 2010 (Veure annex I). "Polymorphisms, haplotypes and mutations in the protamine 1 and 2 genes".

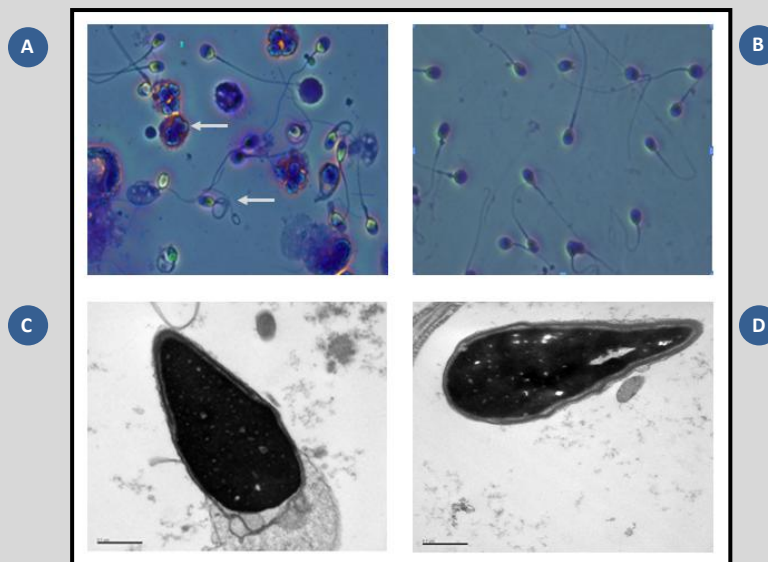
Nota: Es mostren les freqüències al·lèliques de cada variant seguides pels números absoluts dels genotips en parèntesis (homozigot recessiu, heterozigot, homozigot dominant).

De les quatre variants trobades en la regió codificant, tres d'elles corresponen a variants no sinònimes, la **c.49C>T (R17C)**, la **c.102G>T (R34S; rs 35576928)** i la **c.113G>T (R38M)**, mentre que l'altra correspon a una variant silenciosa freqüent localitzada en l'exó 2 del gen, la **c.139C>A (R47R; rs 737008)**. La distribució d'aquesta variant silenciosa entre pacients i controls no mostra diferències significatives.

La variant **c.49C>T** no havia estat descrita en cap estudi previ. Aquesta variant provoca un canvi d'una arginina per una cisteïna (**R17C**). Vam identificar aquesta variant en heterozigosi en un únic pacient infèrtil que presentava uns paràmetres normals de concentració però amb anomalies tant en la seva mobilitat com en la seva morfologia (3% de formes normals). Per tal de determinar la patogenicitat d'aquesta variant, vam realitzar en aquest pacient diferents estudis addicionals:

- (i) Vam realitzar un tinció *Diff-Quik*[®] per tal d'estudiar més atentament les característiques de la mostra de semen. Cal destacar que aquesta mostra presentava un gran número de cèl·lules immadures i que l'anomalia morfològica més freqüent dels espermatozoides corresponia a la presència de cues enrotllades (Veure figura 3.5.A). És interessant destacar que el fenotip de les mostres de semen dels ratolins amb haploinsuficiència de *PRM1* o *PRM2* és molt similar al que hem descrit en aquest pacient.
- (ii) El fet que aquesta variant creï una nova cisteïna, suggereix la possibilitat que es doni un *crosslinking* anòmal entre les cisteïnes en el nucli de l'espermatozoide. Mitjançant l'estudi d'aquesta mostra per microscòpia electrònica de transmissió no vam poder observar diferències ultraestructurals en el cap dels espermatozoides d'aquest pacient en comparació amb un control (Veure figura 3.5.C).

Figura 3.5. Característiques morfològiques dels espermatozoides de la mostra que presenta la variant R17C en comparació amb un control, mitjançant l'estudi per microscopia òptica i electrònica



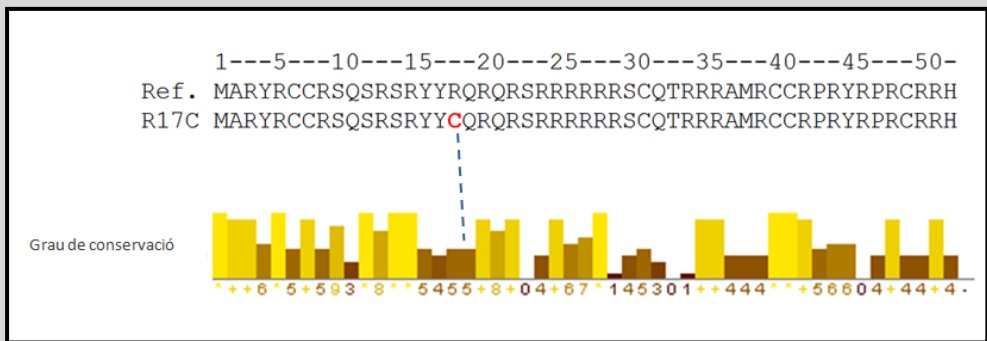
Font: imatge basada en l'article de Jodar et al., 2010 (Veure annex I). "Polymorphisms, haplotypes and mutations in the protamine 1 and 2 genes".

Nota:

- A) Microscopia òptica dels espermatozoides del pacient amb la variant R17C, cal destacar la presència d'espermatozoides amb cues enrotllades i cèl·lules immadures.
- B) Microscopia òptica dels espermatozoides d'un control fèrtil normozoospermic.
- C) Microscopia electrònica dels espermatozoides del pacient amb la variant R17C.
- D) Microscopia electrònica dels espermatozoides d'un control fèrtil normozoospermic.

- (iii) L'estudi sobre la variabilitat d'aquest aminoàcid al llarg de l'evolució ha mostrat que és un aminoàcid molt conservat en les diferents espècies de primats, tot i que en l'estudi amb espècies més distanciades evolutivament, el grau de conservació d'aquest aminoàcid no és tant elevat (Veure figura 3.6).

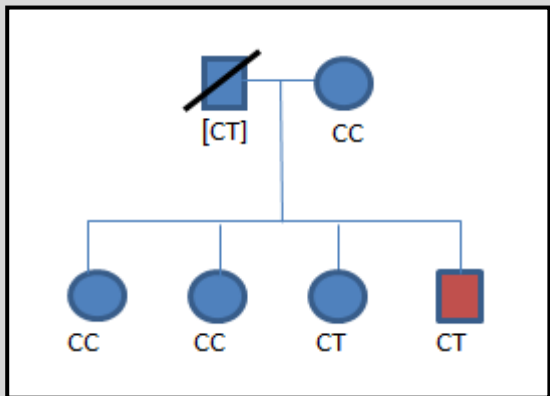
Figura 3.6. Conservació de l'aminoàcid arginina de la posició 17 de la PRM1



Font: imatge basada en l'article de Jodar et al., 2010 (Veure annex I). "Polymorphisms, haplotypes and mutations in the protamine 1 and 2 genes".

- (iv) Es van realitzar diferents estudis *in silico* per tal de saber *a priori* la possible patogenicitat d'aquesta variant, i cap d'ells va mostrar resultats positius sobre la patogenicitat d'aquesta.
- (v) Es va poder disposar del DNA provinent de saliva de diferents membres de la família del pacient, per tal d'elaborar el arbre genealògic i així determinar la herència d'aquesta variant. En estudiar el genotip d'aquesta variant en la mare del pacient, es va veure que ella no era portadora. No obstant, el fet que sí es trobes en una de les seves tres germanes implica que aquesta variant l'ha heretada del seu pare (no es va poder disposar de mostra en l'estudi), el qual era fèrtil, suggerint que no es tracta d'una variant patogènica (Veure figura 3.7).

Figura 3.7. Pedigrí del pacient que presenta la variant R17C (individu II 4)



Font: imatge basada en l'article de Jodar et al., 2010 (Veure annex I). "Polymorphisms, haplotypes and mutations in the protamine 1 and 2 genes".

- (vi) Per tal de veure si aquesta variant comporta algun canvi a nivell funcional, es va estudiar la relació de protamines (P1/P2) que presentaven els espermatozoides d'aquest pacient i es va confirmar que la relació no es trobava alterada, ja que estava dins els límits de la normalitat (0,8 -1,2).

- (vii) Es va plantejar el dubte, de si, en aquest pacient, es podrien donar certs mecanismes epigenètics que no permetessin la transcripció i/o la traducció de la còpia alterada del gen.

Mitjançant l'estudi del RNA corresponent al gen *PRM1* present en els espermatozoides d'aquest pacient, es va confirmar que presentava transcrits corresponents a les dues còpies, encara que falta per establir si aquestes es tradueixen. S'ha intentat un estudi d'identificació proteica utilitzant la metodologia d'espectrofotometria de masses, però els resultats no són informatius ja que no es poden detectar els pèptids que corresponen a la protamina 1. Això es deu a que aquesta metodologia requereix una digestió prèvia de la mostra amb tripsina, per tal d'obtenir una preparació de pèptids que seran analitzats i identificats amb l'espectrofotòmetre de masses. La tripsina és un enzim que digereix les proteïnes en els residus de lisina i arginina, els quals componen aproximadament la meitat de la seqüència aminoacídica de les protamines. Per tant, després d'una digestió amb tripsina de les protamines s'obtenen fragments tan petits que fan que sigui impossible la seva detecció i, per tant, la seva identificació per espectrofotometria de masses convencional.

Els resultats d'aquests estudis addicionals, principalment el fet que sembla ser que el pare (no disponible) presentava la variant i no va tenir cap problema a l'hora de reproduir-se (va tenir 4 fills sense necessitat de l'ús de tècniques de reproducció assistida), ens suggereixen fermament que ens trobem davant d'una variant no patològica.

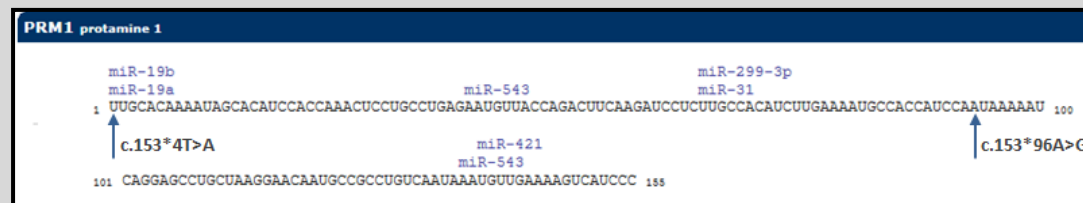
En el nostre estudi s'ha identificat en heterozigosi la variant **c.102G>T** en dos pacients infèrtils i un control fèrtil, la qual provoca un canvi d'una arginina altament conservada per una serina (**R34S**). Aquesta variant va ser descrita prèviament en 3 pacients de 30 estudiats, amb un fenotip similar al del ratolí que presenta haploinsuficiència per *PRM1* o *PRM2* (comptatge espermàtic normal, fragmentació de DNA i morfologia alterada; Iguchi *et al.*, 2006), suggerint que podia ser causa de la infertilitat. Recentment, hi ha un debat obert sobre si aquesta variant té una associació amb un augment de risc d'infertilitat, ja que tal i com s'ha vist en el nostre estudi, aquesta variant s'ha trobat en controls fèrtils i pacients amb uns fenotips molt diferents que els descrits per Iguchi *et al.* (2006), tot i que els estudis *in silico* prediuen que és una variant potencialment patològica.

En la població sueca hem identificat una nova variant, la **c.113G>T**, que dóna lloc a un canvi d'una arginina per una metionina (**R38M**). El fet que es trobi en el primer nucleòtid del segon exó fa pensar que pot haver-hi una nova variant de *splicing*, hipòtesi reforçada pels estudis *in silico* realitzats. Tot i aquests indicis, aquesta mutació es va trobar en un control fèrtil, el que ens suggereix que o no té impacte en la infertilitat o aquest és baix.

Únicament es va detectar una variant en la zona intrònica del gen (**c.112+40G>A**) en un pacient infèrtil astenoteratozoospermic. No obstant, els estudis *in silico* no ens han donat evidències de la generació potencial de noves variants de *splicing*.

Dues variants es van identificar en la regió 3'UTR, les quals poden ser localitzades en regions crítiques per la regulació de la traducció del transcrit, ja que poden ser regions diana per la unió de miRNAs. Una de les variants es va identificar per primer cop en un pacient infèrtil astenozoospermic de nacionalitat espanyola (**c.153*4T>A**), mentre que l'altra, que ja estava descrita en la literatura, es va identificar en un control fèrtil normozoospermic de nacionalitat sueca (**c.153*96A>G**) el que ens suggereix que no té o té un baix impacte en la infertilitat. Mitjançant estudis *in silico* amb el *software microRNA.org – Target and Expression* (veure relació de softwares utilitzats), es va poder observar les potencials regions diana dels miRNAs (veure figura 3.8).

Figura 3.8. Potencials llocs diana de la regió 3'UTR del gen *PRM1* per la unió de miRNAs



Podem observar que en el potencial lloc d'unió dels miRNAs 19a i 19b es localitza la variant c.153*4T>A, per tant, la presència d'aquesta variant podria alterar la regulació en la traducció dels transcrits de la protamina 1 (no disposem dades de la relació de protamines d'aquesta mostra).

Si estudiem mitjançant programes *in silico*, les possibles conseqüències de la presència de les variants promotores c.-248C>A i c.-191C>A, podem veure que es destrueixen llocs diana d'unió de diferents factors de transcripció. Cal destacar que la variant c.-248C>A, que es va identificar en heterozigosi en un pacient infèrtil, destrueix un lloc d'unió d'un activador de la transcripció anomenat KLF6 (*Krüppel-like factor 6*), que està descrit que es troba altament expressat en testicle humà, entre altres teixits, tot i que no es coneix cap relació amb la transcripció de les protamines o en el procés de l'espermatogènesi. Cap dels altres factors de transcripció afectats han estat detectats en el testicle humà.

L'estudi mutacional del gen *PRM2* es va realitzar en 111 pacients infèrtils i 50 controls fèrtils de nacionalitat espanyola.

Es van identificar un total de 15 variants en el gen de la *PRM2*: (i) 7 en la regió promotora 5', (ii) 2 en la regió codificant, (iii) 5 en l'intró i (iv) 1 en la regió no traduïda 3' (Veure taula 3.10).

Taula 3.10. Variants genètiques identificades en el gen de la *PRM2*

Variant	Regió del gen	Canvi d'aminoàcid	Freqüència al·lèlica (Distribució genotípica)	
			Pacients infèrtils	Controls fèrtils
Població espanyola				
			(n= 111)	(n= 50)
c.-512T>G	5' regió promotora	--	0,004 G (0, 1, 110)	0,000 G (0, 0, 50)
c.-392G>A	5' regió promotora	--	0,022 A (0, 5,106)	0,010 A (0, 1, 49)
c.-389T>C	5' regió promotora	--	0,243 C (8, 38, 65)	0,330 C (5, 23, 22)
c.-371G>C	5' regió promotora	--	0,306 C (9, 50, 52)	0,260 C (4, 18, 28)
c.-321C>T	5' regió promotora	--	0,031 T (0, 7, 104)	0,010 T (0, 1, 49)
c.-226G>A	5' regió promotora	--	0,059 A (0, 13, 98)	0,100 A (0, 10, 40)
c.-123C>G	5' regió promotora	--	0,004 G (0, 1, 110)	0,000 G (0, 0, 50)
c.66T>C	Exó 1	H22H	0,004 C (0, 1, 110)	0,000 C (0, 0, 50)
c.201C>T	Exó 1	H52H	0,000 T (0, 0, 111)	0,010 T (0, 1, 49)
c.271+10C>T (g.281C>T)	Intró	--	0,004 T (0, 1, 110)	0,010 T (0, 1, 49)
c.271+19C>T (g.290C>T)	Intró	--	0,004 T (0, 1, 110)	0,010 T (0, 1, 49)
c.271+27G>C (g.298G>C)	Intró	--	0,441 C (22, 54, 35)	0,400 C (11, 18, 21)
c.271+102C>A (g.373C>A)	Intró	--	0,248 A (8, 39, 64)	0,330 A (5, 23, 22)
c.271+135C>T (g.406C>T)	Intró	--	0,004 T (0, 1, 110)	0,000 T (0, 0, 50)
c.309*61G>C (g.532G>C)	3' UTR	--	0,009 C (0, 2, 109)	0,010 C (0, 1, 49)

Font: taula basada en l'article de Jodar et al., 2010 (Veure annex I). "Polymorphisms, haplotypes and mutations in the protamine 1 and 2 genes".

Nota: Es mostren les freqüències al·lèliques de cada variant seguides pels números absoluts dels genotips en parèntesis (homozigot recessiu, heterozigot, homozigot dominant).

Les dues variants identificades en la regió codificant, **c.66T>C (H22H)** i **c.201C>T (H52H)** corresponen a dues variants silencioses que ja estaven descrites en la literatura i que hem identificat en heterozigosi en un pacient i en un control.

Les 5 variants intròniques identificades (**c.271+10C>T**, **c.271+19C>T**, **c.271+27G>C**, **c.271+102C>A** i **c.271+135C>T**) ja havien estat descrites en altres estudis, i cap d'elles s'ha predit que actuï creant una nova variant de *splicing*. En el nostre estudi podem observar que totes aquestes variants es troben en una freqüència similar entre pacients i controls, el que ens indica que cap d'elles individualment sembla estar associada a la infertilitat.

Únicament s'ha detectat una variant en la regió 3'UTR (**c.309*61G>C**), però aquesta no es localitza en una potencial regió diana per cap miRNAs.

Quatre de les variants detectades en la regió promotora del gen (**c.-392G>A**, **c.-389T>C**, **c.-371G>C** i **c.-226G>A**) ja havien estat descrites prèviament i les freqüències en que es troben són molt similars entre pacients i controls. Cap d'elles implica segons estudis *in silico*, la creació o destrucció d'un potencial lloc diana per factors de transcripció presents en testicles.

Les altres tres variants es van descriure per primer cop en aquest estudi. Les variants **c.-512T>G** i **c.-123C>T** es van identificar cadascuna en heterozigosi en un pacient diferent. Mentre que la variant c.-123C>T sembla que no afecta a cap lloc d'unió per factors de transcripció presents en testicle, la variant c.-512T>G destrueix potencialment un lloc d'unió dels factors de transcripció de la família HNF3 (*Hepatocyte nuclear factor 3*), que tal i com el seu nom indica són factors de transcripció molt importants en el fetge. Tot i això, s'ha descrit àmpliament en altres teixits, com és el testicle. La família HNF3 consta de diferents membres, on s'ha vist que la HNF3 γ (FOXA3) té un paper clau en l'espermatogènesi, ja que ratolins genoanul·lats per aquest factor de transcripció presenten greus problemes de fertilitat (Behr *et al.*, 2007). No obstant, observem que aquesta regió del promotor de la *PRM2* és específica per la unió dels membres α i β de la família HNF3 (FOXA1 i FOXA2), per tant no queda molt clar la possible patogenicitat d'aquesta variant. La variant **c.-321C>T** s'ha detectat en 7 pacients i en un sol control, però el fet que no estigui localitzada en cap lloc d'unió per un factor de transcripció i que la seva freqüència no sigui significativament diferent entre pacients i controls, fa que no es consideri una variant associada a la infertilitat.

Cal remarcar que en el nostre estudi no hem identificat cap variant d'alta penetrància que pugui estar associada a la infertilitat masculina.

2.1.3. Revisió bibliogràfica i metanàlisi de les variants descrites en els gens *PRM1* i *PRM2*

A continuació es mostrarà un resum de tots els estudis mutacionals rellevants en els gens *PRM1* i *PRM2* que es troben en la bibliografia fins l'any 2011 (*Veure taula 3.11 i 3.12*). S'han descrit en aquests estudis un total de 22 variants en el gen *PRM1* i 23 en el gen *PRM2*.

Variant	Regió	Canvi d'aminoàcid	Identitat NCBI	Variants descrites sol en pacients	Diferències significatives entre pacients i controls	Comentaris	Referències
c.-275G>T	5' regió promotora	NA	rs74007631	Sí	No	Variant infreqüent	Hammond et al., 2007
c.-248C>A	5' regió promotora	NA	-	Sí	No	Variant infreqüent	Hammond et al., 2007. Treball actual.
c.-238G>A	5' regió promotora	NA	-	Sí	No	Variant infreqüent	Hammond et al., 2007.
c.-191C>A	5' regió promotora	NA	rs2301365	No	No	Polimorfisme	Hammond et al., 2007. Ravel et al., 2007. Imken et al., 2009.
c.-114C>T	5' regió promotora	NA	-	Sí	No	Factor de risc per anomalies morfològiques	Gazquez et al., 2008. Treball actual.
c.-107G>C	5' UTR	NA	-	Sí	No	Variant infreqüent	Hammond et al., 2007.
c.-102C>T	5' UTR	NA	-	Sí	No	Variant infreqüent	Hammond et al., 2007.
c.42A>G	Exó 1	No	-	No	No	Variant infreqüent	Hammond et al., 2007.
c.49C>T	Exó 1	Arg17Cys	-	Sí	No	Crea nou lloc d'unió?	Ravel et al., 2007. Imken et al., 2009.
c.54G>A	Exó 1	No	rs3526993	No	No	Variant específic poblacional	Kichine et al., 2008.
c.65G>A	Exó 1	Ser22Asn	-	Sí	-	Variant infreqüent	Hammond et al., 2007.
c.69C>A	Exó 1	No	-	No	No	Patogenicitat desconeguda	Tanaka et al., 2003.
c.93G>C	Exó 1	Gln31His	-	No	No	Variant infreqüent	Ravel et al., 2007.
c.102G>T	Exó 1	Arg34Ser	rs35576928	Sí	No	Crea un nou lloc de fosforilació?	Iguchi et al., 2006. Ravel et al., 2007.
c.112*40G>A	Intró	NA	-	No	No	Variant infreqüent	Aoki et al., 2006. Kichine et al., 2008. Treball actual
c.113G>T	Exó 2	Arg38Met	-	Sí	-	Variant infreqüent	Tüttelmann et al., 2010.
c.119G>A	Exó 2	Cys40Tyr	-	No	No	Patogenicitat desconeguda	Tüttelmann et al., 2010.
c.138G>A	Exó 2	No	-	Sí	No	Variant infreqüent	Tanaka et al., 2003.
c.139C>A	Exó 2	No	rs737008	No	No	Polimorfisme	Tanaka et al., 2003. Iguchi et al., 2006. Aoki et al., 2006. Ravel et al., 2007.
c.153*41T>A	3' UTR	NA	-	Sí	-	Polimorfisme	Imken et al., 2009. Treball actual
c.153*89C>T	3' UTR	NA	-	Sí	No	Patogenicitat desconeguda	Tüttelmann et al., 2010.
c.153*96A>G	3' UTR	NA	-	No	No	Variant infreqüent	Hammond et al., 2007.
						Variant infreqüent	Tanaka et al., 2003. Hammond et al., 2007.

Font: taula basada en l'article de Jodar et al., 2010 (Veure annex I). "Polymorphisms, haplotypes and mutations in the protamine 1 and 2 genes".

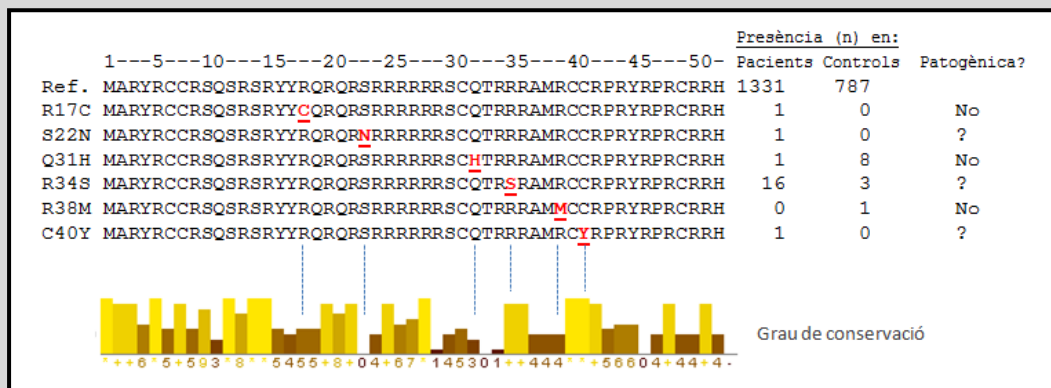
Variant	Regió	Canvi d'aminoàcid	Identitat NCBI	Variants descrites sol en pacients	Diferències significatives entre pacients i controls	Comentaris	Referències
c.-512T>G	5' regió promotora	NA	-	Sí	No	Patogenicitat desconeguda	Treball actual
c.-392G>A	5' regió promotora	NA	-	No	No	Polimorfisme	Hammoud <i>et al.</i> , 2007. Treball actual.
c.-389T>C	5' regió promotora	NA	rs376374	No	No	Polimorfisme	Hammoud <i>et al.</i> , 2007. Treball actual.
c.-371G>C	5' regió promotora	NA	rs8060767	No	No	Polimorfisme	Hammoud <i>et al.</i> , 2007. Treball actual.
c.-321C>T	5' regió promotora	NA	-	No	No	Polimorfisme	Treball actual.
c.-226G>A	5' regió promotora	NA	rs74459443	No	No	Polimorfisme	Hammoud <i>et al.</i> , 2007. Treball actual.
c.-123C>G	5' regió promotora	NA	-	Sí	No	Patogenicitat desconeguda	Treball actual.
c.-67C>T	5' UTR	NA	-	Sí	No	Potencial interferent de transcripció	Imken <i>et al.</i> , 2009.
c.66T>C	Exó 1	No	-	No	No	Variant infreqüent	Aoki <i>et al.</i> , 2006. Treball actual
c.87C>T	Exó 1	No	-	Sí	-	Variant infreqüent	Tüttelmann <i>et al.</i> , 2010.
c.148C>T	Exó 1	Gln50Ter	-	No	No	Variant infreqüent	Imken <i>et al.</i> , 2009.
c.201C>T	Exó 1	No	-	Sí	No	Al·lel nul	Tanaka <i>et al.</i> , 2003.
c.271+10C>T	Intró	No	-	No	No	Variant infreqüent	Aoki <i>et al.</i> , 2006. Imken <i>et al.</i> , 2009. Treball actual
c.271+17G>C	Intró	NA	rs74007626	Sí	-	Variant infreqüent	Tüttelmann <i>et al.</i> , 2010.
c.271+19C>T	Intró	NA	rs74007625	Sí	No	Nou variant splicing?	Aoki <i>et al.</i> , 2006.
c.271+27G>C	Intró	NA	-	No	Sí	Nou variant splicing?	Imken <i>et al.</i> , 2009.
c.271+29A>G	Intró	NA	-	No	No	Variant infreqüent	Treball actual.
c.271+102C>A	Intró	NA	rs1646022	Sí	-	Variant infreqüent	Tüttelmann <i>et al.</i> , 2010.
c.271+106C>A	Intró	NA	-	No	No	Variant infreqüent	Imken <i>et al.</i> , 2009. Treball actual
c.271+107G>A	Intró	NA	-	Sí	-	Polimorfisme	Imken <i>et al.</i> , 2009.
c.271+135C>T	Intró	NA	-	No	No	Variant infreqüent	Tanaka <i>et al.</i> , 2003. Aoki <i>et al.</i> , 2006.
c.309*61G>C	3'UTR	NA	-	No	No	P1/P2 alterat	Imken <i>et al.</i> , 2009.
				No	No	Rare variant	Hammoud <i>et al.</i> , 2007. Treball actual.

Font: taula basada en l'article de Jodar *et al.*, 2010 (Veure annex I). "Polymorphisms, haplotypes and mutations in the *PRM2* and 2 genes".

Taula 3.12. Variants gèniques identificades en el gen *PRM2* en diferents estudis

De totes les variants descrites únicament 6 són variants no sinònimes en el gen de la *PRM1* (Veure figura 3.9) i solament 1 variant no sinònima ha estat descrita en el gen de la *PRM2*.

Figura 3.9. Conservació dels aminoàcids de la protamina 1 on s’han identificat variants no sinònimes en diferents estudis



Font: imatge basada en l'article de Jodar et al., 2010 (Veure annex I). "Polymorphisms, haplotypes and mutations in the protamine 1 and 2 genes".

La variant **R17C** ha estat identificada en el present estudi en un únic pacient infèrtil, però el fet que es trobi localitzada en un aminoàcid no molt conservat, i que hem demostrat que ha estat heretat del pare (el qual era fèrtil) ens indica la no patogenicitat d'aquesta variant.

La variant **S22N** ha estat identificada en un únic pacient infèrtil i en cap control fèrtil, però la baixa conservació extrema de l'aminoàcid on es troba localitzada ens suggereix que aquesta variant pot no ser patogènica.

La variant **Q31H** ha estat identificada en un pacient infèrtil i en 8 controls fèrtils, suggerint que és una variant que no té efectes en la fertilitat masculina.

La variant **R38M** és una variant identificada en el present estudi en un control fèrtil, aquest fet sumat a que es localitza en un aminoàcid no molt conservat ens indica que es tracta d'una mutació no patogènica.

La variant **C40Y** ha estat identificada en un únic pacient infèrtil. Els diferents programes usats *in silico* prediuen que és un canvi altament patogènic ja que es troba localitzat en un aminoàcid molt conservat i pot ser que el fet que destrueixi un cisteïna faci variar els ponts disulfur que s'estableixen entre les protamines.

La variant **R34S** és una variant que es localitza en un aminoàcid altament conservat, però en la literatura hi ha un gran debat sobre la patogènia d'aquesta, ja que diferents estudis determinen la seva patogènia, mentre que d'altres, inclòs el nostre estudi, ha identificat aquesta variant en controls fèrtils, el que posa en dubte la seva associació amb la infertilitat masculina (Veure taula 3.13).

Taula 3.13. Resum dels estudis que han identificat la variant R34S en el gen *PRM1*

Autor (any)	Zona geogràfica	Fenotip		Pacients infèrtils		Controls fèrtils	
				Genotip		Genotip	
		Pacients infèrtils	Controls fèrtils	GG	GT	GG	GT
Tanaka <i>et al.</i> (2003)	Àsia	Azoospermia		153 (100%)	0 (0%)		
		Oligozoospermia severa (<5 x10 ⁶ espermatozoides/ml)	Fèrtils	73 (100%)	0 (0%)	270 (100%)	0 (0%)
Iguchi <i>et al.</i> (2006)	Amèrica	Morfologia alterada (<4,4% FN) i fragmentació alta del DNA	Fèrtils	27 (90%)	3 (10%)	10 (100%)	0 (0%)
Aoki <i>et al.</i> (2006)	Amèrica	P1/P2 alterat (<0.8 or >1.2)		95 (98,95%)	1 (1,05%)		
		Azoospermia Oligozoospermia severa (<5 x10 ⁶ espermatozoides/ml)	Fèrtils	94 (97,91%)	2 (2,09%)	94 (97,91%)	2 (2,09%)
Ravel <i>et al.</i> (2007)	França	Azoospermia		119 (100%)	0 (0%)		
		Oligospermia (<20x10 ⁶ espermatozoides/ml)		161 (99,38%)	1 (0,62%)		
		Normospermia	Fèrtils i normozoospermics	34 (97,14%)	1 (2,86%)	30 (100%)	0 (0%)
			Fèrtils			81 (100%)	0 (0%)
Kichine <i>et al.</i> (2008)	França	Causa coneguda d'infertilitat		60 (98,36%)	1 (1,64%)		
		Oligozoospermia severa (<5 x10 ⁶ espermatozoides/ml)		254 (100%)	0 (0%)		
		Normospermia (5-131 x10 ⁶ espermatozoides/ml)	Fèrtils	46 (100%)	0 (0%)	670 (99,70%)	2 (0,30%)
Imken <i>et al.</i> (2009)	Àfrica	Azoospermia		50 (100%)	0 (0%)		
		Oligozoospermia severa (<1 x10 ⁶ espermatozoides/ml)		56 (100%)	0 (0%)		
		Oligospermia (1-20x10 ⁶ espermatozoides/ml)		29 (100%)	0 (0%)		
		Normospermia	Fèrtils	76 (100%)	0 (0%)	84 (100%)	0 (0%)
Tüttelmann <i>et al.</i> (2010)	Caucasià	Morfologia alterada (<7%FN)		86 (97,7%)	2 (2,3%)		
		Oligospermia (<20x10 ⁶ espermatozoides/ml)		81 (97,6%)	2 (2,4%)		
		Normospermia		75 (97,4%)	2 (2,6%)		
Treball actual	Espanya	Morfologia alterada (≤9%FN)		85 (100%)	0 (0%)		
		Normospermia	Fèrtils	70 (98,59%)	1 (1,41%)	102 (100%)	0 (0%)
	Suècia	Morfologia alterada (≤9%FN)		47 (97,91%)	1 (2,09%)	49 (98%)	1 (2%)
			Fèrtils i normozoospermics				1 (2%)

Font: taula basada en l'article de Jodar *et al.*, 2010 (Veure annex I). "Polymorphisms, haplotypes and mutations in the protamine 1 and 2 genes".

FN: Formes normals

Vam decidir realitzar un metanàlisi amb els estudis que van identificar aquesta variant per tal d'establir la seva patogenicitat. Vam establir els següents criteris d'inclusió i exclusió:

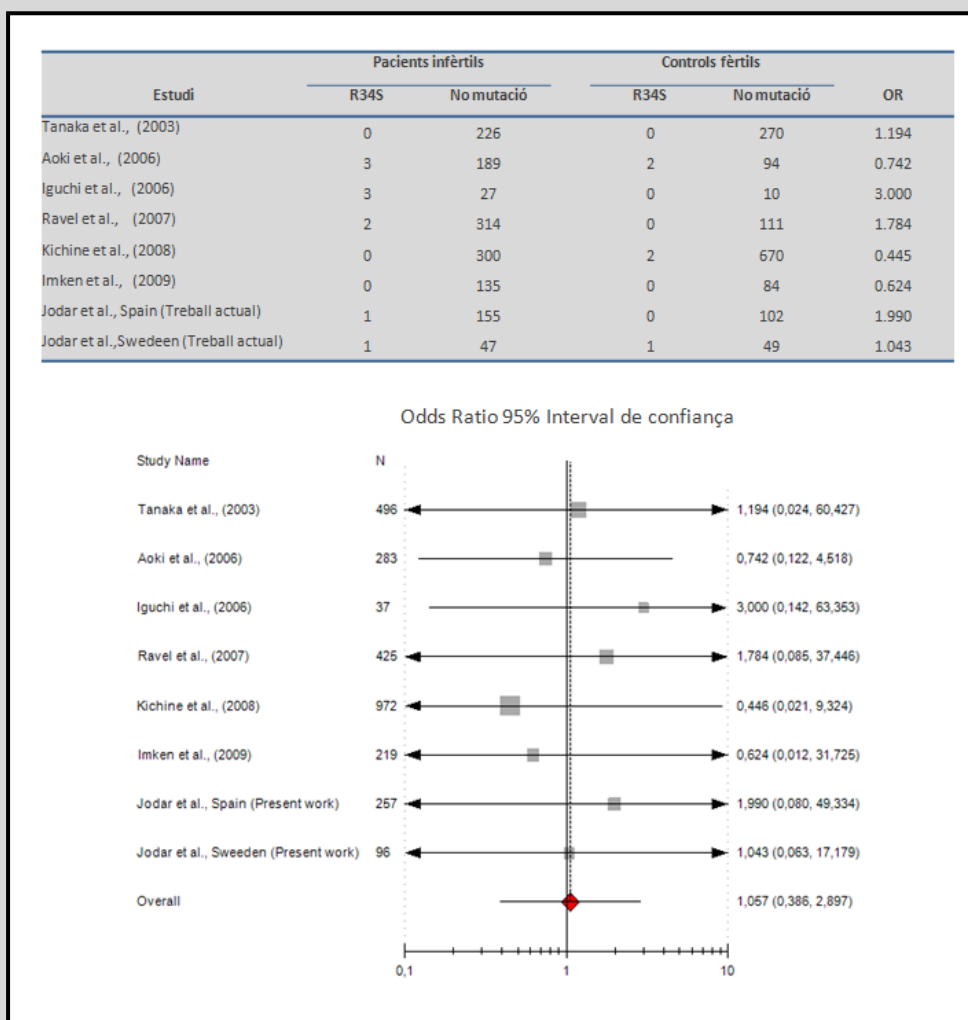
(i) Criteris d'inclusió:

- a. Estudis originals, escrits en anglès i que es trobin en PUBMED.
- b. Estudis que realitzin el genotipatge de la variant R34S ja sigui mitjançant l'ús de la seqüenciació directa o per RFLPs (*restriction fragment length polymorphisms*).
- c. Estudis casos-controls on:
 - i. Els controls siguin fèrtils.
 - ii. Els casos siguin pacients infèrtils que presentin una infertilitat idiopàtica incloent tots els subtipus (azoospermia, oligozoospermia, teratozoospermia i normozoospermia)

D'acord aquest criteris exclourem dos estudis mutacionals del gen *PRM1* que únicament estudien la regió promotora del gen (Hammoud *et al.*, 2007 i Gázquez *et al.*, 2008). L'estudi de Tütelmann *et al.* (2010) també queda exclòs ja que el seu estudi no inclou controls fèrtils. Addicionalment exclourem 61 pacients infèrtils de l'estudi de Kichine *et al.* (2008) ja que presenten una causa coneguda que explica la seva infertilitat, i 76 individus normozoospèrmics del estudi de Imken *et al.* (2009) perquè desconexim el seu estat de fertilitat.

El resultat del metanàlisi no ens indica que la presència de la variant R34S en el gen *PRM1* resulti en un augment en el risc de presentar infertilitat masculina (Veure figura 3.10).

Figura 3.10. Metanàlisi de la variant R34S del gen *PRM1*

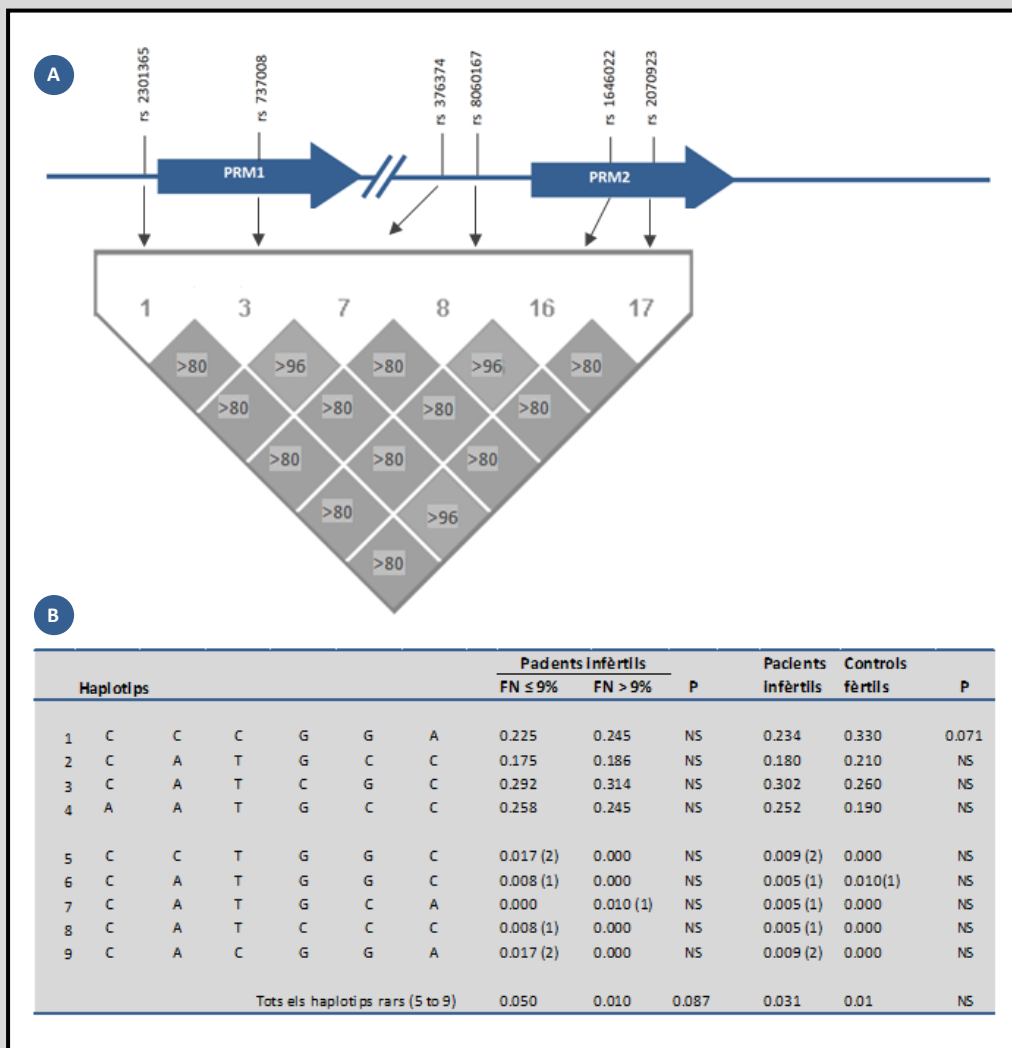


Per tant, fins el moment no s'ha descrit cap variant patogènica d'alta penetrància en els gens de les protamines que causi infertilitat masculina, tot i que ja s'han seqüenciat un total de 1351 pacients infèrtils i 799 controls fèrtils en diferents estudis.

2.1.4. Anàlisi dels haplotips de les variants presents en els gens *PRM1* i *PRM2*

Degut a la proximitat dels 2 gens de les protamines i el fet que hem trobat 2 variants molt comunes en el gen *PRM1* (c.-191C>A, c.139C>A) i 4 en el *PRM2* (c.-389T>C, c.-371G>C, c.271+102C>A, c.271+135C>T), hem pogut establir els haplotips més comuns en la nostra població mitjançant el programa *Haploview Software* (Veure figura 3.11).

Figura 3.11. Determinació dels haplotips del *locus* de les protamines en la població espanyola



Font: imatge basada en l'article de Jodar et al., 2010 (Veure annex I). "Polymorphisms, haplotypes and mutations in the protamine 1 and 2 genes".

Nota:

- A) Mapa que mostra el desequilibri de lligament de les 6 variants més comunes detectades en *PRM1* i *PRM2*.
- B) Els nou haplotips determinats pels gens de les protamines en la població espanyola i les freqüències en que es troben en els diferents grups estudiats.

Amb aquesta informació vam poder definir 4 haplotips presents en el 97,52% dels cromosomes de la població estudiada (haplotips 1-4) i addicionalment, 5 haplotips rars (haplotips 5-9) que es troben presents en el 2,48% dels cromosomes d'aquesta població.

No es van trobar diferències significatives en la proporció dels haplotips comuns entre pacients i controls, tot i que és interessant destacar que en els controls fèrtils la freqüència de l'haplotip més comú (haplotip 1) és més elevada que la que troben en els pacients (Veure figura 3.11.B).

S'ha observat que la freqüència dels haplotips rars combinats junts és superior en pacients infèrtils amb una morfologia alterada comparat amb els de morfologia >9% de FN, tot i que no arriben a ser estadísticament significatiu.

Un estudi recent va determinar que certs haplotips de les protamines basat en 3 variants (PRM1; c.139C>A i PRM2; c.271+102>A, c.271+135C>T), estaven associats amb el comptatge espermàtic (Tütelmann *et al.*, 2010). Per tant, queda un camp obert en l'estudi de les associacions del bloc haplotípic de les protamines (PRM1-PRM2-PRM3-TNP2) en busca d'associacions amb els diferents paràmetres seminals i, finalment, amb la infertilitat.

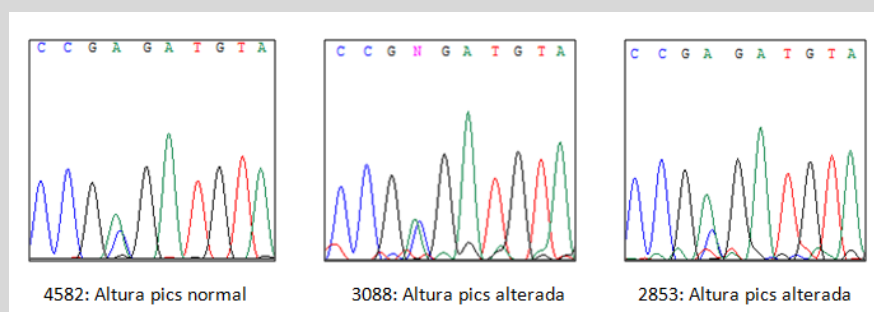
2.1.5. Estudi de CNV (Copy Number Variations) en el gen PRM1

Els resultats que vam obtenir en el genotipatge de la variant c.-191C>A en la població sueca, on observàvem que la distribució genotípica per aquest polimorfisme es trobava desviada de l'equilibri Hardy-Weinberg (Veure punt 2.1.1 del present apartat), ens va portar a observar detalladament el que ocorria en la població espanyola. Vam poder observar que, tot i que el genotip AA per aquesta variant seguia estrictament l'equilibri de Hardy-Weinberg, el valor que detectàvem es trobava al límit de la significança (0,05; Pearson). Això ens va plantejar el dubte de si existia alguna pressió selectiva que induís aquesta desviació en l'equilibri Hardy-Weinberg.

En la literatura està descrit que una possible causa per a que un polimorfisme no segueixi la llei de Hardy-Weinberg podria ser l'existència d'alguna variant estructural, com la presència de CNV en el *locus* genotipat (Lee *et al.*, 2008). En la literatura s'ha descrit que d'un 12 a un 15% del genoma humà presenta CNV i si un polimorfisme es troba en una regió que presenta CNV llavors les freqüències gèniques observades en un estudi mutacional no serien reals.

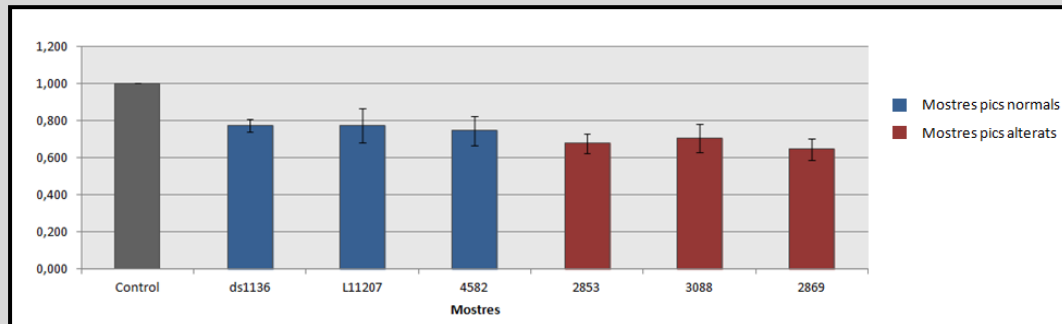
Tot i que s'ha establert que el gens de les protamines són gens de còpia única, vam dissenyar un estudi pilot per confirmar l'absència de CNV en el *locus* del PRM1. Vam seleccionar algunes mostres heterozigotes que en els electroferogrames de la seva seqüència presentaven uns pics amb unes altures diferents que les que trobàvem normalment (Veure figura 3.12).

Figura 3.12. Seqüències del gen PRM1 d'algunes mostres seleccionades per l'estudi de CNV



Vam realitzar l'estudi pilot amb 6 mostres, on tres d'elles presentaven unes altures del pics alterades.

Figura 3.13. Resultats de l'estudi pilot de presència de CNV en el gen de la *PRM1*



Vam analitzar el número de còpies del gen *PRM1* comparant-lo amb un gen que està determinat com a gen de còpia única (*Veure punt 3.5 de l'apartat de Materials i mètodes*), per tant la relació que s'ha de trobar és d'aproximadament d'1. Veiem que la relació en les diferents mostres estudiades es troba en un rang de 0,7 a 0,8, el que ens suggereix que no existeix CNV pel gen de la *PRM1* (*Veure figura 3.13*).

El fet que el nostre estudi pilot no ens ha suggerit que el gen *PRM1* presenta CNV i que en la literatura sempre s'ha descrit que el gen *PRM1* és de còpia única, ens va fer desestimar l'estudi de més mostres.

Podria ser que la raó del desviament de l'equilibri de Hardy-Weinberg pel polimorfisme c.-191C>A que hem observat, sigui degut a una selecció natural, a una mescla de població, a l'endogàmia que podem trobar en els països nòrdics o bé que la població estudiada no fos suficient.

Gran part dels resultats d'aquest estudi han derivat en la següent publicació internacional (*Veure Annex I*):

Jodar M, Oriola J, Mestre G, Castillo J, Giwercman A, Vidal-Taboada JM, Ballescà JL, Oliva R

Polymorphisms, haplotypes and mutations in the protamine 1 and 2 genes.

International Journal of Andrology (FI: 3,601; Q1 Andrology). (2011) vol. 34 núm. 5pt1 pag.470-485.

2.2. Gen de la Heat Shock 70 KDa protein 2 (*HSPA2*)

Un gen candidat a realitzar un estudi mutacional va ser el gen *HSPA2*, aquest codifica per una proteïna membre de la família de les HSP70, que s'expressa específicament en les cèl·lules germinals masculines. Diferents estudis van reforçar la seva selecció com a gen candidat per al seu estudi genètic:

- (i) El ratolins genoanul·lats pel gen *HSPA2* presentaven infertilitat masculina però no femenina. S'observava una aturada del desenvolupament de les cèl·lules espermatogèniques en l'estadi de profase I de la meiosi (Zhu *et al.*, 1997).

- (ii) Diferents estudis han mostrat una desregulació en l'expressió del RNA corresponent al gen *HSPA2*, tant en testicles humans que presenten una espermatogènesi anòmala (Son *et al.*, 2000), com en els espermatozoides de pacients amb algun subtipus d'infertilitat masculina (Cedenho *et al.*, 2006).
- (iii) Els estudis proteòmics realitzats prèviament en el nostre grup mostren alteracions en l'abundància de la proteïna *HSPA2* en certs tipus de pacients infèrtils (de Mateo *et al.*, 2007; Martinez-Heredia *et al.*, 2007).

Vam dissenyar un estudi pilot on es va estudiar la regió codificant del gen *HSPA2* en:

- (i) 29 pacients infèrtils:
 - a. 16 pacients azoospèrmics que presenten parada madurativa de l'espermatogènesi i que no presenten cap microdeleció del cromosoma Y.
 - b. 13 pacients infèrtils que presenten almenys un paràmetre seminal (morfologia i/o concentració) alterat.
- (ii) 4 controls fèrtils que desconeixem els seus paràmetres seminals.

Els resultats que vam obtenir es mostren en la *taula 3.14*.

Taula 3.14. Variants gèniques identificades en el gen *HSPA2*

Variant	Regió del gen	Canvi d'aminoàcid	Freqüència al·lèlica (Distribució genotípica)		
			Pacients azoospèrmics amb parada madurativa (n=16)	Pacients infèrtils amb seminograma alterat (n= 13)	Controls fèrtils (n=4)
c.684T>C (rs11551976)	Exó 1	D228D	0,250 C (0, 8, 8)	0,384 C (2, 6, 5)	0,375 C (0, 3, 1)
c.1444G>C	Exó 1	D482H	0,031 C (0, 1, 15)	0,000 C (0, 0, 13)	0,000 C (0, 0, 4)
c.1653C>T (rs1063391)	Exó 1	N551N	0,062 T (0, 2, 14)	0,038 T (0, 1, 12)	0,000 T (0, 0, 4)
c.1918*25A>C	3' UTR	--	0,031 C (0, 1, 15)	0,000 C (0, 0, 13)	0,000 C (0, 0, 4)

Nota: Es mostren les freqüències al·lèliques de cada variant seguides pels números absoluts dels genotips en parèntesis (homozigot recessiu, heterozigot, homozigot dominant).

En la regió codificant hem identificat tres variants, dues d'elles són variants sinònimes que no afecten a la seqüència d'aminoàcids de la proteïna (**c.684T>C (D228D)**, **c.1653C>T (N551N)**). La variant c.684T>C (D228D) es troba en una freqüència similar entre pacients i controls, suggerint que no es troba associada a la infertilitat, mentre que la variant c.1653C>T (N551N) únicament s'ha identificat en pacients, tot i que restaria augmentar el número de mostres estudiades. En un estudi realitzat per un altre grup, es van identificar aquestes dues variants en unes proporcions similars entre pacients i controls, el que suggereix que aquestes variants es comporten com polimorfismes sense cap conseqüència en la fertilitat masculina.

Hem identificat una variant no sinònima en heterozigosi, **c.1444G>C (D482H)**, en un pacient azoospèrmic que presenta un bloqueig meiòtic de l'espermatogènesi (parada madurativa). Aquesta variant es tradueix en el canvi d'un aminoàcid carregat negativament (àcid aspàrtic; D) en la posició 482 de la proteïna, per un aminoàcid carregat positivament (histidina; H). El programes *in silico* de predicció de patogenicitat suggereixen, amb un alt nivell d'especificitat i sensibilitat (*Veure figura 3.14.A*), que aquesta variant pot ser patogènica, basant-se en diferents punts:

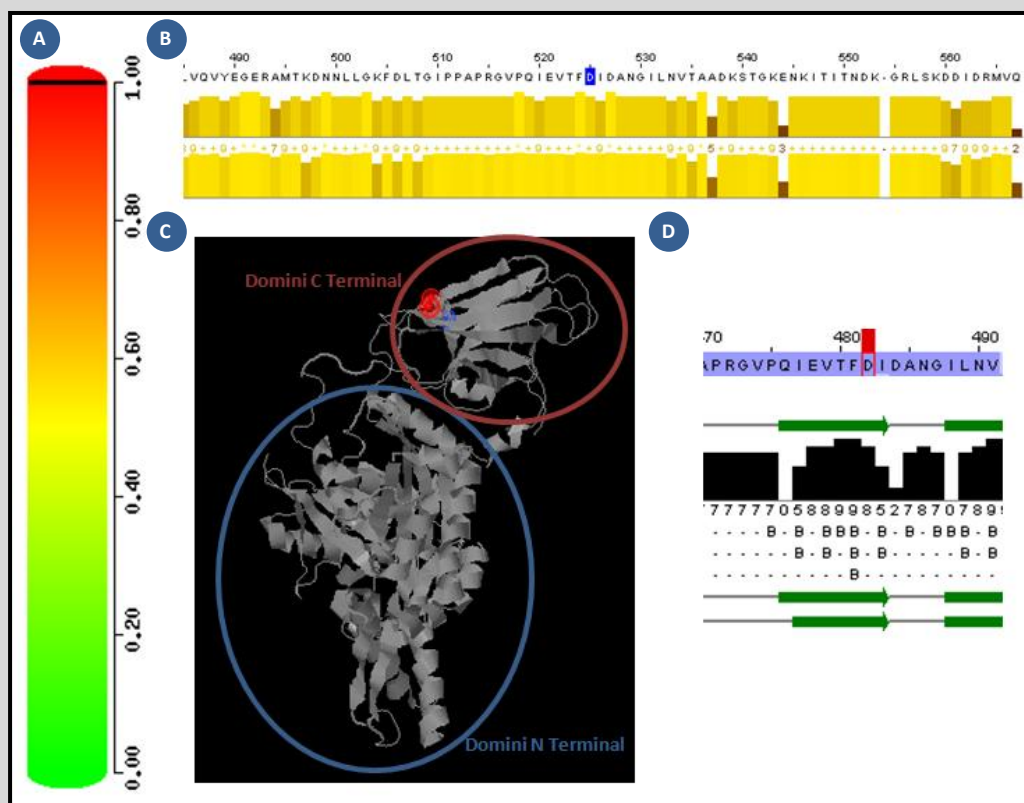
- (i) La seva conservació. Per poder determinar si aquesta variant es localitzava en una regió molt conservada de la proteïna, es va realitzar un alineament amb 284 seqüències, que corresponien a proteïnes homòlogues i ortòlogues de la HSPA2. Els resultats van mostrar que l'aminoàcid 482 de la proteïna HSPA2 és molt conservat en tot l'alineament realitzat. Únicament presentava un canvi d'aminoàcid el gen *HSPA2* d'una espècie de mono, el *Chlorocebus aethiops*, el qual, enlloc d'àcid aspàrtic presentava àcid glutàmic (D>E), tot i que es tracta d'un canvi d'un aminoàcid carregat negativament per un altre carregat negativament, el que ens fa pensar que no varia l'estructura ni la funcionalitat de la proteïna (Veure figura 3.14.B).
- (ii) La seva funcionalitat en l'estructura de la proteïna. La proteïna HSPA2 pertany a la família de les xaperones HSP70 (proteïnes de xoc tèrmic de 70KDa), que es troben involucrades en funcions cel·lulars crucials. Aquesta família es caracteritza per la unió i l'alliberament de proteïnes en un cicle acoblat a l'ATP. L'estructura proteica d'aquesta família es caracteritza per contenir dos dominis diferenciats (Jiang *et al.*, 2005) (Veure figura 3.14.C):
- El domini N-terminal (*nucleotid binding domain*), que correspon al domini que té l'activitat ATPasa.
 - El domini C-terminal (*substrat binding domain*), que correspon al domini on s'uneixen els pèptids diana.

L'aminoàcid que ens interessa (D482) es localitza en el domini C-terminal (Veure figura 3.14.C), tot i no ser un dels aminoàcid més comuns en l'estructura secundària làmina beta, forma part d'una làmina beta conservada del domini C-terminal de la proteïna consens (Veure figura 3.14.D).

El fet que en el nostre pacient l'aminoàcid 482 canviï de Asp a His (D482H), ens suggereix que aquesta variant podria alterar l'estructura terciària de la proteïna HSPA2 que presenta la mutació, ja que està descrit que els aminoàcid carregats negativament, Asp i Glu, participen en els enllaços covalents que determinen l'estructura terciària de les proteïnes, amb la seva unió amb els residus de Lys. Per tant, al canviar un aminoàcid carregat negativament (Asp) per un aminoàcid carregat positivament (His), els enllaços covalents que determinen la correcta estructura terciària de la proteïna HSPA2 podrien variar.

No obstant, hem identificat aquesta variant en heterozigosi, per tant una còpia del gen és correcta, i desconeixem si la presència de la variant en heterozigosi pot ser suficient per variar la funció normal de la proteïna HSPA2 fins el punt de causar un fenotip tant extrem (azoospermia).

Figura 3.14. Estudis *in silico* realitzats per determinar la possible patogenicitat de la variant no sinònima identificada en el gen *HSPA2* (c.1444G>C (D482H))



Nota:

- A) Probabilitat determinada pel *software* Polyphen2 de que la variant sigui patogènica (els valors van de 0 a 1; sent 0 el valor que indica que la variant és tolerable i 1 el valor que indica la gran probabilitat que la variant sigui patogènica).
- B) Alineament de la proteïna HSPA2, on es mostra la conservació de l'aminoàcid D482.
- C) Estructura terciària de la proteïna HSPA2, es mostren els dos dominis proteics (N-terminal i C-terminal). En el C-terminal està marcada la regió on es troba l'aminoàcid D482.
- D) Predicció i conservació de l'estructura secundària de la proteïna HSPA2, es pot observar que l'aminoàcid D482 forma part d'una làmina beta conservada.

Únicament s'ha detectat una variant en la regió 3'UTR en heterozigosi en un pacient azoospermic amb bloqueig meiótic de l'espermatogènesi (c.1918*25A>C), però aquesta no es localitza en una potencial regió diana per cap miRNAs.

En aquest estudi pilot no hem identificat cap variant en el gen *HSPA2* present en un freqüència poblacional elevada que pugui estar associat al bloqueig maduratiu o a l'alteració dels paràmetres seminals en pacients amb dificultats reproductives. Aquests resultats són concordants amb els publicats en un estudi on van estudiar 77 pacients infèrtils i 104 controls fèrtils, i en el que van concloure que no sembla que polimorfismes en el gen *HSPA2* siguin una causa comuna de la infertilitat masculina (Sanderson *et al.*, 2010).

Tot i així queda oberta la possibilitat d'augmentar el número de les mostres a estudiar, per tal de estudiar en especial la variant D482H, enfocant sobretot l'estudi a pacients azoospèrmics amb bloqueig meiòtic de l'espermatogènesi i a controls fèrtils.

S'ha descrit que en pacients azoospèrmics amb bloqueig meiòtic es detectava la proteïna *HSPA2* però amb un nivell més baix que en els controls (Feng *et al.*, 2001). Per aquesta raó, seria interessant determinar el promotor del gen *HSPA2* en les cèl·lules germinals masculines, ja que s'ha descrit dues variants de *splicing* del gen, on una presenta dos exons, tot i que no varia la regió codificant. Això ho podríem realitzar fent un estudi del mRNA del gen *HSPA2* i posteriorment l'estudi mutacional del seu promotor.

2.3. Gen de la subunitat 1 de la Prohibitina (PHB1)

Hem dissenyat un estudi pilot per fer un *screening* inicial de les possibles variants en el gen *PHB1* en diferents tipus de pacients infèrtils. Aquest estudi mutacional estava reforçat per les troballes en:

- (i) Estudis proteòmics previs del nostre grup, on hi havia una alteració en els nivells de la proteïna PHB1 en pacients que presentaven alts graus de degradació de DNA i alteracions en la relació de protamines (de Mateo *et al.*, 2007).

Els resultats que vam obtenir es mostren en la *taula 3.15*.

Taula 3.15. Variants gèniques identificades en el gen *PHB1*

Variant	Regió del gen	Canvi d'aminoàcid	Freqüència al·lèlica (Distribució genotípica)					
			Az (PM) (n=5)	Az (n=5)	OAT (n=6)	TA (n=6)	A (n=7)	N (n=8)
c.128G>T (rs2233665)	Exó 3	R43L	0,000 T (0, 0, 5)	0,000 T (0, 0, 5)	0,000 T (0, 0, 6)	0,000 T (0, 0, 6)	0,000 T (0, 0, 7)	0,062 T (0, 1, 7)
c.393+9A>G	Intró 5	--	0,000 G (0, 0, 5)	0,000 G (0, 0, 5)	0,083 G (0, 1, 5)	0,000 G (0, 0, 6)	0,000 G (0, 0, 7)	0,000 G (0, 0, 8)
c.510+61C>T	Intró 5	--	0,100 T (0, 1, 4)	0,000 T (0, 0, 5)	0,000 T (0, 0, 6)	0,000 T (0, 0, 6)	0,000 T (0, 0, 7)	0,000 T (0, 0, 8)
			(n=5)	(n=5)	(n=6)	(n=6)	(n=7)	(n=8)
c.511-229G>A	Intró 5	--	0,100 A (0, 1, 4)	0,100 A (0, 1, 4)	0,083 A (0, 1, 5)	0,000 A (0, 0, 6)	0,115 A (0, 3, 10)	0,058 A (0, 2, 15)
c.511-70A>G	Intró 5	--	0,100 G (0, 1, 4)	0,100 G (0, 1, 4)	0,083 G (0, 1, 5)	0,000 G (0, 0, 6)	0,115 G (0, 3, 10)	0,058 C (0, 2, 15)
c.511-12C>G	Intró 5	--	0,300 G (0, 3, 2)	0,200 G (0, 2, 3)	0,333 G (2, 0, 4)	0,333 G (0, 4, 2)	0,269 G (1, 5, 7)	0,264 G (2, 5, 10)

Nota: Es mostren les freqüències al·lèliques de cada variant seguides pels números absoluts dels genotips en parèntesis (homozigot recessiu, heterozigot, homozigot dominant).

Az (PM) azoospèrmics que presenten parada madurativa; Az azoospèrmics; OAT oligoastenoteratozoospèrmics; TA teratoastenoazoospèrmics; A astenoazoospèrmics; N normozoospèrmics.

En els 52 pacients infèrtils analitzats vam detectar una única variant en la regió codificant, la qual és una variant no sinònima que canvia l'aminoàcid de la posició 43 d'una arginina a una leucina (**c.128G>T (R43L)**). Aquesta variant s'ha detectat en heterozigosi en un pacient normozoospèrmic, a més a més, els estudis *in silico* per determinar la patogenicitat d'aquesta variant, coincideixen en que es tracta d'una variant benigna sense cap efecte en l'estructura de la proteïna. Aquests fets suggereixen que aquesta variant no es troba associada amb l'alteració dels paràmetres seminals.

La resta de variants identificades corresponen a variants intròniques i cap d'elles s'ha predit que pugui donar lloc a una nova variant de *splicing*. Dues d'elles (**c.393+9A>G** i **c.510+61C>T**) únicament s'han detectat en un pacient oligoastenoteratozoospermic i un azoospermic i, per tant, són considerades variants infreqüents. Les tres que resten (**c.511-229G>A**, **c.511-70A>G** i **c.511-12C>G**) s'han identificat en unes freqüències més elevades, tot i que no s'observen diferències entre els diferents grups estudiats i, per tant, es poden classificar com polimorfismes.

El fet que en aquest estudi pilot no s'hagi identificat cap variant potencialment patogènica, que es tracti d'una proteïna que s'expressa en molt teixits i que té una funció clau en molts processos crucials per la cèl·lula (els ratolins genoanul·lats per aquest gen moren en el període embrionari), ens fa pensar que ens trobem davant d'una proteïna altament conservada, on la presència de variants patogèniques no és compatible amb la vida.

Tot i això, seria interessant l'estudi de la regió promotora del gen per cercar variants en els llocs d'unió de factors de transcripció que modulin l'expressió de la proteïna PHB en les cèl·lules espermatogèniques.

2.4. Gen de la Bromodomain testis-specific (BRDT)

El gen *BRDT* en humans és l'únic gen membre de la família BET que s'expressa exclusivament en les cèl·lules germinals masculines. Està descrit que la família BET es troba implicada en la modulació de la transcripció per diferents mecanismes (Florence & Faller, 2001). Un tret característic de la família BET és la presència de dos dominis *bromodomains* els quals s'uneixen a la cromatina acetilada modulant la seva estructura (Pivot *et al.*, 2003) i afectant a la transcripció mitjançant un mecanisme independent de seqüència.

El primer domini *bromodomain* de la proteïna BRDT és l'únic que reconeix la histona H4 hiperacetilada en les lisines 5 i 8 (Morinière *et al.*, 2009), mentre que el segon *bromodomain* reconeix la lisina 18 de la histona H3 acetilada, podent regular així els processos transcripcionals de l'espermatogènesi.

El grup de recerca de la Dr. Sophie Rousseaux (França) va realitzar un estudi mutacional del gen *BRDT*. Aquest estudi venia reforçat pels resultats obtinguts en el ratolí genoanul·lat que presentava una deleció en homozigosi del primer *bromodomain* del gen *BRDT*. Aquest ratolí mostrava una infertilitat masculina deguda al no reemplaçament de les histones per les protamines, tot i que l'expressió de les proteïnes de transició i les protamines no es trobava alterada (Shang *et al.*, 2007).

En el estudi mutacional realitzat, es va identificar una variant no sinònima en la lisina 62 de la proteïna, que canviava a una glutamina (**c.602A>T (K62Q)**). La rellevància d'aquesta troballa era que aquest aminoàcid es trobava localitzat en la zona corresponent al *bromodomain* 1 de la proteïna BRDT. A més a més, aquesta variant únicament es trobava en homozigosi en un 1,6% de pacients infèrtils amb una oligozoospermia severa i en cap control estudiat. Tot i que els estudis predictius d'aquesta variant *a priori* no mostraven la seva potencial patogenicitat, els estudis funcionals realitzats pel grup francès suggeria que tot i que la variant no es localitzava directament en una de les regions d'unió del BRDT amb les histones acetilades, hi havia una desestabilització de la unió de la proteïna alterada amb la cromatina acetilada *in vivo*.

Es va proposar un estudi de genotipatge per aquesta variant en la població espanyola, amb la finalitat d'identificar-la en homozigosi en certs pacients infèrtils, per poder estudiar la possibilitat que aquests pacients presentessin una relació de les protamines alterada.

Hem estudiat un total de 149 pacients infèrtils (15 pacients normozoospermics, 28 astenozoospermics, 9 oligozoospermics, 60 oligoastenozoospermics, 25 oligoastenozoospermics severos (presenten una concentració ≤ 5 milions d'espermatozoides per mil·lilitre) i 12 azoospermics amb parada madurativa). Els resultats es mostren en la taula 3.16.

Taula 3.16. Estudi de la variant gènica c.602A>T (K62Q) del gen *BRDT* en la població espanyola

Variant	Regió del gen	Canvi d'aminoàcid	Freqüència al·lèlica (Distribució genotípica)					
			Az (PM) (n=12)	OAT (n=60)	OAT severos (n=25)	O (n=9)	A (n=28)	N (n=15)
c.602A>T	Exó 3	K62Q	0,125 C (0, 3, 9)	0,083 C (0, 10, 50)	0,040 C (0, 2, 23)	0,000 C (0, 0, 9)	0,071 C (0, 3, 9)	0,030 C (0, 1, 14)

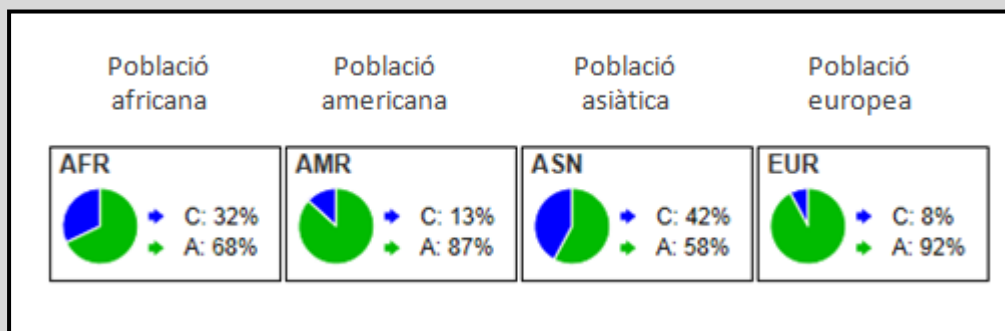
Nota: Es mostren les freqüències al·lèliques de cada variant seguides pels números absoluts dels genotips en parèntesis (homozigot recessiu, heterozigot, homozigot dominant).

Az(PM) azoospermics que presenten parada madurativa; OAT oligoastenoteratozoospermics; OAT severos oligoastenoteratozoospermics severos; O oligozoospermics; A astenozoospermic; N normozoospermics.

De la totalitat dels pacients estudiats hem identificat en 20 d'ells la variant K62Q en heterozigosi però en cap en homozigosi. La presència d'aquesta variant en heterozigosi no es veu augmentada significativament en cap dels fenotips estudiats.

La identitat NCBI d'aquesta variant és rs10783071 i en la figura 3.15 podem observar les freqüències al·lèliques d'aquesta variant per les diferents ètnies estudiades. Podem veure que la freqüència al·lèlica d'aquesta variant en la població africana i asiàtica és molt més elevada que la que trobem en la població europea. Aquestes dades, sumat a que aquest aminoàcid no es troba en una regió molt conservada del gen, ens fan dubtar de la patogenicitat de la variant, suggerint que podria trobar-se en desequilibri de lligament amb altres variants que podrien ser la causa real de la patogenicitat dels individus europeus homozigots.

Figura 3.15. Freqüències al·lèliques poblacionals de la variant gènica c.602 A>T del gen *BRDT*

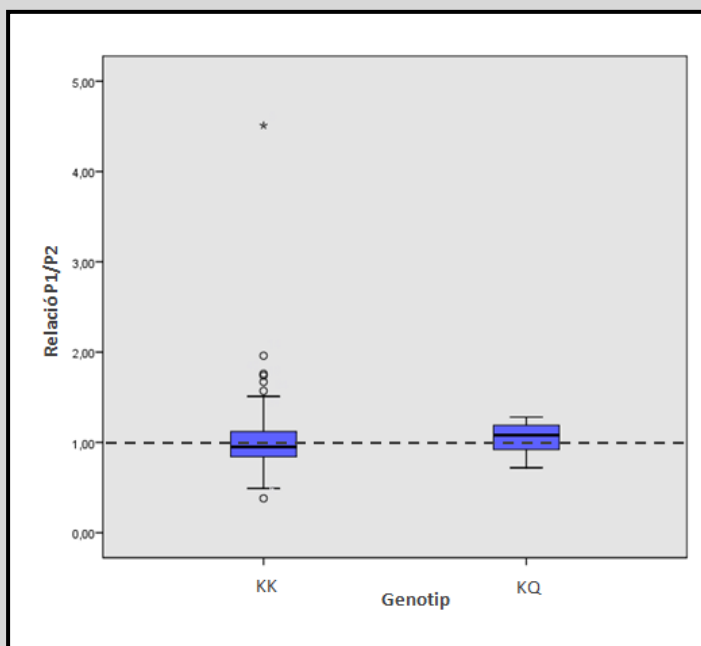


Font: Modificat de la pagina web ensembl.org.

El fet que els estudis funcionals observaven que la presència d'aquesta variant en homozigosi alterava el reemplaçament d'histones per protamines, ens va animar a estudiar la relació de les protamines en alguns dels pacients genotipats, per determinar si la variant en heterozigosi podia tenir algun efecte a nivell proteic.

Vam estudiar la relació de protamines (P1/P2) en 101 pacients amb el genotip AA (normal) i 16 amb el genotip AC (heterozigots). Els resultats no ens van mostrar cap diferència significativa pels dos grups (Veure figura 3.16). Seria interessant continuar la cerca d'un pacient amb la variant K62Q en homozigosi per poder veure si hi ha diferències en el reemplaçament de les histones per protamines.

Figura 3.16. Representació en diagrama de caixes de la relació de protamines (P1/P2) en els diferents genotips estudiats



El nostres resultats sumats als resultats d'un estudi recent que va estudiar el genotip de la variant K62Q del gen *BRDT* en 158 pacients normozoospèrmics, 139 pacients oligozoospèrmics severs, 63 pacients oligozoospèrmics moderats i 80 pacients azoospèrmics, on no van trobar cap associació significativa entre la presència d'aquesta variant i la infertilitat masculina (Aston *et al.*, 2010), ens van fer replantejar la real patogenicitat d'aquesta variant.

No obstant, en el mencionat estudi si es va observar una associació significativa entre la variant no sinònima rs3088232 (c.1230C>G (N410K)) del gen *BRDT* i la oligozoospèrmia severa. Per tant, seria interessant continuar l'estudi mutacional per aquesta variant (N410K) i també estudiar la regió promotora del gen, ja que s'ha descrit que una alteració en el RNA corresponent al gen *BRDT* es troba associat a pacients infèrtils (Steilmann *et al.*, 2010).

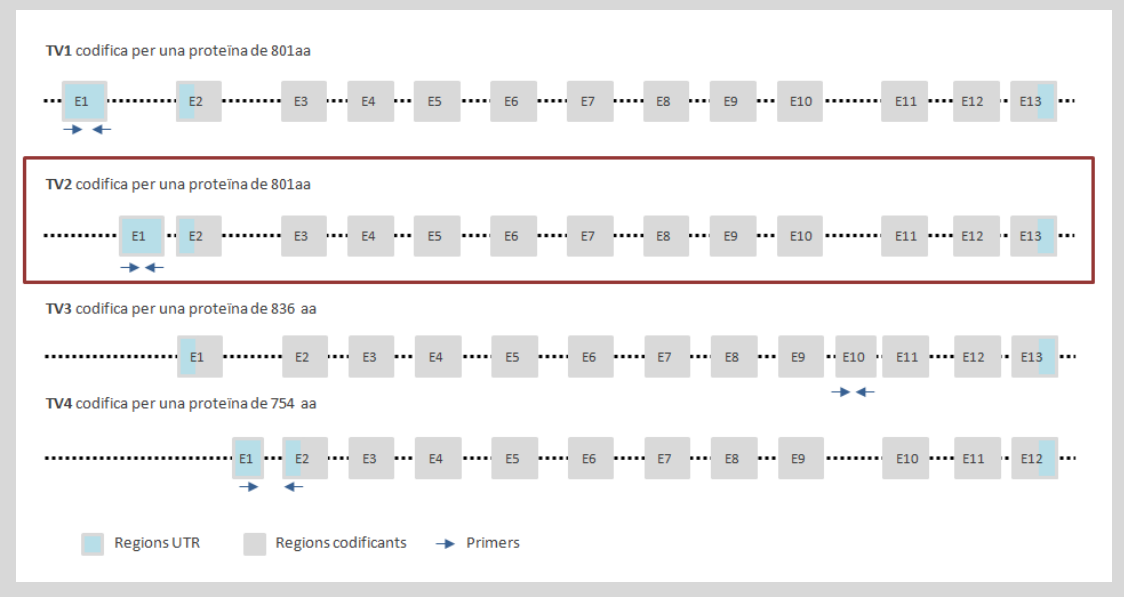
2.5. Gens candidats derivats del primer objectiu, Bromodomain containing 2 (BRD2)

La proteïna BRD2 és un altre membre de la família BET que, tot i ser àmpliament expressada en un gran número de teixits, s'ha descrit la seva expressió en testicle. Els seus dominis *bromodomains* també interactuen amb les histones acetilades de la cromatina, específicament s'ha descrit la seva afinitat amb les lisines 12 i 5 acetilades de la histona H4 (Umehara *et al.*, 2010).

Tot i que desconeixem l'efecte de l'absència d'aquesta proteïna sobre la fertilitat, ja que els ratolins genoanul·lats per aquest gen moren en l'etapa embrionària (Gyuris *et al.*, 2008), el fet que estigui implicat en el procés de l'espermatogènesi sumat als resultats obtinguts en el primer objectiu (on observàvem que el transcrit corresponent al gen *BRD2* estava disminuït en pacients astenozoospèrmics), ens va animar a iniciar un estudi pilot de les variants presents en les regions codificants i promotores del gen *BRD2*.

El gen *BRD2* codifica per diferents variants de *splicing*, per tant, el primer pas va ser determinar quin dels 4 transcrits possibles del gen *BRD2* es trobava en l'espermatozoide. Vam extreure el RNA d'una mostra de semen (Veure punt 4.1 de l'apartat de Materials i mètodes) i vam dissenyar 4 parelles de *primers* que ens permetessin discriminar mitjançant RT-PCRs les 4 variants principals descrites pel gen *BRD2* (Veure figura 3.17). Els resultats que vam obtenir ens van mostrar que en espermatozoides es transcrivía la variant de transcrit número 2 (Veure requadre vermell de la figura 3.17).

Figura 3.17. RT-PCRs dissenyades per discriminar les quatre variants de transcrit més comunes descrites pel gen *BRD2*



Vam dissenyar els *primers* idonis per l'estudi mutacional de les regions del gen que codifiquen per la variant de transcrit que vam seleccionar amb anterioritat (TV2), i la regió promotora que regula la transcripció d'aquesta variant.

Vam seleccionar 22 pacients astenozoospèrmics per tal d'iniciar el nostre estudi pilot. Posteriorment vam augmentar l'estudi mutacional de la zona promotora del gen i de l'exó 9 en un número més elevat de mostres de pacients astenozoospèrmics i també vam incloure 12 controls fèrtils normozoospèrmics.

Els resultats que vam obtenir de l'estudi mutacional realitzat es mostren en la taula 3.17.

Taula 3.17. Variants gèniques identificades en el gen *BRD2*

Variant	Regió del gen	Canvi d'aminoàcid	Freqüència al·lèlica (Distribució genotípica)	
			Astenozoospèrmics (n=27)	Controls fèrtils normozoospèrmics (n=12)
c.-2479G>A	5' regió promotora	--	0,055 A (1, 1, 25)	0,041 A (0,1,11)
c.-2417T>G	5' regió promotora	--	0,018 G (0, 1, 26)	0,000 G (0, 0, 12)
c.-2387C>G	5' regió promotora	--	0,055 G (0, 3, 24)	0,000 G (0, 0, 12)
c.-2380addG	5' regió promotora	--	0,055 add (1, 1, 25)	0,041 addG (0,1,11)
c.-2368C>T	5' regió promotora	--	0,074 T (0, 4, 23)	0,000 T (0, 0, 12)
c.-2314delTTG	5' regió promotora	--	0,055 del (0, 3, 26)	0,083 del TTG (0,2,10)
c.-2239G>T	5' regió promotora	--	0,055 T (0, 3, 26)	0,083 T (0,2,10)
c.-59G>A	5'UTR	--	0,024 A (0, 1, 20)	--
c.-55C>T	5'UTR	--	0,048 (0, 2, 19)	--
c.30-15addT	Intró 2	--	0,048 (0, 2, 19)	--
c.68G>A	Exó 3	G23D	0,024 A (0, 1, 20)	--
c.93A>G	Exó 3	K31K	0,476 (7, 6, 8)	--
c.177C>A	Exó 3	A59A	0,024 T (0, 1, 20)	--
c.201C>T	Exó 3	S67S	0,024 A (0, 1, 20)	--
c.334-19C>G	Intró 3	--	0,068 G (0,3,19)	--
c.334-10T>C	Intró 3	--	0,545 C (8, 8, 6)	--
c.471+9delTT	Intró 4	--	0,023 del (0, 1, 21)	--
c.471+47C>T	Intró 4	--	0,333 T (2, 10, 10)	--
c.471+59C>T	Intró 4	--	0,023 T (0, 1, 21)	--
c.1200+33G>A	Intró 7	--	0,200 A (0, 8, 12)	--
c.1330-4G>C	Intró 8	--	0,055 C (0, 3, 24)	0,000 G (0, 0, 11)
c.1421C>T	Exó 9	A474V	0,074 T (1, 2, 24)	0,045 T (0, 1, 10)
c.1500delGGA	Exó 9	E500-	0,000 del (0, 0, 27)	0,045 (0,1,10)
c.1709T>C	Exó 10	D570D	0,083 C (0,2,10)	--
c.1809C>T	Exó 10	S603S	0,666 T (6, 4, 2)	--
c.2270-26C>T	Intró 12	--	0,023 T (0, 1, 21)	--
c.2337C>T	Exó 13	S779S	0,023 T (0, 1, 21)	--
c.2373G>A	Exó 13	S791S	0,091 A (1, 2, 19)	--
c.2406*107delC	3'UTR	--	0,159 del (0, 7, 15)	--
c.2406*115C>T	3'UTR	--	0,704 T (11, 9, 2)	--

Nota: Es mostren les freqüències al·lèliques de cada variant seguides pels números absoluts dels genotips en parèntesis (homozigot recessiu, heterozigot, homozigot dominant).

Ens els individus estudiats hem identificat 10 variants en la regió codificant, 7 d'elles corresponen a variants sinònimes (**c.93A>G (K31K)**, **c.177C>A (A59A)**, **c.201C>T (S67S)**, **c.1709T>C (D570D)**, **c.1809C>T (S603S)**, **c.2337C>T (S779S)** i **c.2373G>A (S791S)**) que no tenen cap efecte en la seqüència d'aminoàcids de la proteïna.

Tres de les variants identificades en la regió codificant corresponen a variants no sinònimes:

La variant **c.68G>A (G23D)** s'ha identificat en heterozigosi en un pacient astenozoospèrmic. Aquest canvi fa que l'aminoàcid que es troba en la posició 23, una glicina, canviï a un àcid aspàrtic. Tot i que *a priori* sembla que aquesta variant pugui afectar a l'estructura de la proteïna, ja que es tracta d'un aminoàcid hidrofòbic que varia a un aminoàcid carregat negativament, els estudis de predicció suggereixen que es tracta d'una variant benigna, degut a que no es troba en una regió molt conservada de la proteïna.

La variant **c.1421C>T (A474V)** s'ha identificat en homozigosi en un pacient astenozoospèrmic i en heterozigosi en dos pacients astenozoospèrmics i en un donant fèrtil normozoospèrmic. Aquesta variant indueix que l'aminoàcid que es troba en la posició 474, una alanina, variï a una valina. El fet que es canviï un aminoàcid petit hidrofòbic (Ala) per un altre que té unes propietats físico-químiques molt similars (Val), ens suggereix que es tracta d'una variant benigna. Aquest fet es confirma amb els resultats de no patogenicitat que ens faciliten els programes de predicció.

La variant **c.1500delGGA (E500-)**, s'ha identificat en heterozigosi en un donant fèrtil normozoospèrmic. Aquesta variant fa que es perdi un àcid glutàmic (Glu) en la posició 500 d'un domini característic de les proteïnes de la família BET (domini *poly-glu*). Aquest domini *poly-glu* ens està indicant que les proteïnes de la família BET tenen un canvi de conformació ràpid, el que és necessari per la seva correcta funció. No obstant, si observem les proteïnes homòlogues i ortòlogues de la BRD2, veiem que el número de residus d'àcid glutàmic del domini *poly-glu* és diferent, per exemple, mentre que en l'humà aquest domini consta de 15 residus de glutàmic, en rata i ratolí és de 5. El fet que aquesta variant s'hagi identificat únicament en un donant fèrtil ens suggereix que el número de residus d'àcid glutàmic del domini *poly-glu* no és essencial per l'estructura i/o funció de la proteïna.

Hem identificat nou variants en les regions intròniques del gen (**c.30-15addT**, **c.334-19C>G**, **c.334-10T>C**, **c.471+9delTT**, **c.471+47C>T**, **c.471+59C>T**, **c.1200+33G>A**, **c.1330-4G>C** i **c.2270-26C>T**). Cap d'aquestes variants intròniques sembla ser causa de la síntesis de noves variants de *splicing* segons els estudis predictius realitzats. No obstant, és interessant destacar que la variant **c.1330-4G>C** s'ha identificat en heterozigosi en 3 pacients astenozoospèrmics i en cap control fèrtil estudiat. Aquest fet, sumat a que es troba en una regió molt pròxima a la regió exònica, ens suggereix que podria tenir cert paper en la regulació de la maduració del transcrit, fet que es podria confirmar primer augmentant el número de mostres en l'estudi mutacional i després fent l'estudi del RNA dels pacients que presentin aquesta variant.

En les regions UTR hem identificat quatre variants, dues en la regió 5'UTR (**c.-59G>A** i **c.-55C>T**) i dues en la regió 3'UTR (**c.2406*107delC** i **c.2406*115C>T**), cap d'elles sembla trobar-se en cap regió reguladora ni d'unió a miRNAs.

En la regió promotora que hem determinat per la variant de transcrit 2 (*Veure figura 3.17*) hem identificat 7 variants, quatre d'elles es troben en unes proporcions similars tant en els pacients com en els controls estudiats (**c.-2479G>A**, **c.-2380addG**, **c.-2314delTTG** i **c.-2239G>T**). Cap de les variants, excepte la **c.-2239G>T**, sembla destruir el lloc d'unió d'un factor de transcripció. La variant **c.-2239G>T** destrueix el lloc d'unió del factor de transcripció Wt1 (*Wilms' tumor suppressor gene*), s'ha descrit que aquest factor de transcripció es troba en testicle i té un rol en el desenvolupament de cèl·lules germinals masculines (Natoli *et al.*, 2004). Seria interessant augmentar el número de mostres en estudi per poder determinar la freqüència en que es troba aquesta variant i veure si en algun cas la trobem en homozigosi, ja que s'ha trobat en heterozigosi en pacients i controls.

Tres variants de la regió promotora s'han determinat únicament en pacients astenozoospèrmics (c.-2417T>G, c.-2387C>G i c.-2368C>T). La variant c.-2387C>G s'ha identificat en heterozigosi en tres pacients astenozoospèrmics, no obstant, la presència d'aquesta variant no destrueix cap lloc d'unió de factors de transcripció descrits en testicle. La variant c.-2417T>G es va identificar en heterozigosi en un únic pacient astenozoospèrmic, aquesta variant fa que es perdi el lloc d'unió d'un factor de transcripció que es troba en testicle, el COUP-TFII (*Chicken Ovalbumin Upstream Promoter-Transcription Factor II*). S'ha descrit que aquest factor de transcripció té un rol essencial en les cèl·lules de Leydig i s'ha associat amb la infertilitat masculina (Qin *et al.*, 2008). La variant c.-2368C>T s'ha identificat en heterozigosi en quatre pacients astenozoospèrmics, els estudis *in silico* prediuen que aquesta variant fa que es perdi un lloc d'unió al factor de transcripció TLX1 (*T-cell leukemia homeobox protein 1*) o també anomenat HOX11. S'ha vist que ratolins mutants pel gen que codifica HOX11 presenten tant infertilitat femenina com masculina (Hsieh-Li *et al.*, 1995).

En aquest estudi mutacional pilot del gen *BRD2* no s'ha detectat cap variant en la regió codificant que pugui estar associada al fenotip d'astenozoospèrmia. El fet que els ratolins genoanul·lats pel gen *BRD2* morin en l'etapa embrionària ens suggereix que qualsevol canvi patogènic en la regió codificant del gen pot no ser viable amb la vida.

No obstant, cal destacar la presència d'una variant intrònica (c.1330-4G>C) i certes variants en la regió promotora del transcrit identificat en espermatozoides (c.-2417T>G, c.-2387C>G i c.-2368C>T) que únicament s'han detectat en els pacients astenozoospèrmics. Podríem augmentar l'estudi de mostres específicament per aquestes variants per tal de poder determinar la seva associació amb l'astenozoospèrmia i/o la infertilitat masculina.

Hem utilitzat tres estratègies per identificar possibles gens candidats pel seu estudi mutacional: transcriptòmica diferencial, proteòmica diferencial i recerca bibliogràfica dels seus corresponents ratolins genoanul·lats.

Podem dividir els gens candidats seleccionats en dos tipus: (i) Gens candidats que la seva deleció en animals únicament comporten fallides en la fertilitat (*PRM1*, *PRM2*, *HSPA2* i *BRDT*) i (ii) gens que els seus genoanul·lats presenten mort embrionària (*PHB1* i *BRD2*).

En els estudis mutacionals dels gens que les seves corresponents proteïnes són específiques de testicle hem identificat variants en la regió codificant potencialment patogèniques, tot i que sempre en heterozigosi. Per altra banda, en els gens amb una expressió inespecífica de teixits no hem trobat cap variant potencialment patogènica en la regió codificant, suggerint que qualsevol canvi en la seqüència de la proteïna pot no ser viable amb la vida.

En el gens de la *PRM1*, *PRM2* i *BRD2* hem inclòs l'estudi mutacional de les regions promotores i 3'UTR, i hem pogut detectar variants que poden tenir cert rol en la regulació de la transcripció del gen (variants en les regions d'unió de factors de transcripció i miRNAs). Es coneix que l'espermatogènesi és un procés altament regulat a nivell transcripcional amb etapes específiques de control transcripcional. Molts dels factors de transcripció responsables d'aquesta regulació s'expressen també en altres tipus cel·lulars, però en testicles s'ha descrit que aquests poden regular la transcripció de transcrits únic o noves variants de *splicing* (Freiman, 2009), de fet, en testicle és prevalent l'ús de promotors específics i *splicing* alternatius, tot i que els mecanismes que ho provoquen no es coneixen molt bé. Recentment, s'ha descrit una nova forma de control transcripcional en l'espermatogènesi murina que es basa en les modificacions de les regions 3'UTR de molts transcrits, on es seleccionen específicament el que presenten la regió 3'UTR truncada (Liu *et al.*, 2007). Aquests fets ens suggereixen la necessitat de l'estudi d'aquestes regions (promotor i regions UTR) en tots els futurs estudis mutacionals.

Els nostres resultats dels estudis mutacionals realitzats ens mostren que l'existència de variants potencialment patogèniques i d'alta penetrància són una causa infreqüent de la infertilitat masculina. Els nostres resultats van en concordança amb els resultats del primer estudi *genome-wide* en pacients azoospermics i oligozoospermics severos (Aston & Carrell, 2009), en el que es va determinar certs SNPs associats a la infertilitat masculina. Posteriorment, per tal de validar els resultats de l'*array* d'aquest estudi el mateix grup d'investigació van analitzar el genotips d'aquests SNPs identificats més SNPs associats a la fallida de l'espermatogènesi descrits en la literatura (per exemple, es va incloure la variant del promotor de la *PRM1* que nosaltres hem determinat com factor de risc de l'alteració de la morfologia dels espermatozoides, c.-191C>A) i variants no sinònimes que es localitzen en gens importants de l'espermatogènesi (per exemple la variant estudiada en el gen *BRDT*, c.602A>T (K62Q)), en un número més elevat de pacients i controls. Van concloure que els SNPs associats a la infertilitat masculina es troben majoritàriament en regions intergèniques (Aston *et al.*, 2010).

Aquests SNPs en regions intergèniques es poden trobar en desequilibri de lligament amb variants que realment siguin la causa de la infertilitat o bé poden localitzar-se en regions funcionals del genoma que encara no s'han caracteritzat.

Per tant, podem concloure que la infertilitat masculina possiblement sigui similar a la majoria de malalties complexes, degudes a un problema multigènic/multifactorial, on cap SNP sembla ser responsable d'una proporció considerable de casos d'infertilitat masculina idiopàtica. Per tant, cada variant rara que s'ha descrit pot tenir un petit efecte en el fenotip, però és el conjunt possiblement unit a l'ambient el que resulta en la infertilitat. Per tant, es necessita de més estudis en un nombre molt més gran de individus, possiblement fent servir una estratègia de seqüenciació completa del genoma, per determinar els *backgrounds* genètics, possibles interaccions o efecte additiu entre variants i així començar a identificar les combinacions de factors responsables de la infertilitat masculina.

3. Descripció dels miRNAs més abundants presents en els espermatozoides i la seva possible implicació en la infertilitat masculina

Fins ara, el número de mutacions gèniques que inequívocament es troben associades amb fallides de l'espermatogènesi és baix. No obstant, nous avanços en el camp de la biologia molecular de les cèl·lules germinals ens han obert un ventall d'estudis per la identificació de causants de la infertilitat masculina.

El fet de que certes proteïnes tinguin un nivell d'expressió baix i no s'hagi pogut relacionar amb l'existència d'alguna variant gènica en el seu gen, ens podria suggerir que podria haver-hi una regulació anòmala a nivell post-transcripcional. Un mecanisme de regulació post-transcripcional que s'ha descrit és la unió de miRNAs a les regions 3'UTR dels mRNAs diana induint la seva degradació.

Estudis recents mostren la importància d'aquests miRNAs durant l'espermatogènesi i també en les primeres fases del desenvolupament embrionari. Els estudis més destacats són:

- (i) La creació d'un ratolí genoanul·lat de la RNA polimerasa anomenada DICER (participa en el processament dels miRNAs) específic de cèl·lules germinals masculines (Korhonen *et al.*, 2011). Aquest ratolí presentava una reducció en la mida dels testicles i el procés d'espermatogènesi es trobava interromput. No obstant, en l'epidídim es trobaven una ínfima quantitat d'espermatozoides madurs on la majoria presentaven greus anomalies morfològiques.
- (ii) Els estudis que mostren que un miRNA específic, el miR34c, pot tenir un paper rellevant en les últimes etapes de l'espermatogènesi (Bouhallier *et al.*, 2010) i també pot ser crucial en la primera divisió cel·lular del zigot (Liu *et al.*, 2012).
- (iii) L'estudi que mostra una desregulació de miRNAs en testicles de pacients amb una azoospermia no obstructiva (Lian *et al.*, 2009), el que suggereix que els miRNAs tenen un rol crucial en l'espermatogènesi humana.

Per tant, el primer pas va ser descriure els miRNAs que es troben en l'espermatozoide humà, tot i que durant el transcurs d'aquesta determinació va aparèixer un estudi que determinava els sncRNAs presents en l'espermatozoide humà (Krawetz *et al.*, 2011). No obstant, el mètode utilitzat en l'extracció de miRNAs va ser diferent al nostre (*Veure punt 4.5 de l'apartat Materials i mètodes*).

Vam extreure els miRNAs presents en els espermatozoides madurs de dos controls fèrtils normozoospermics.

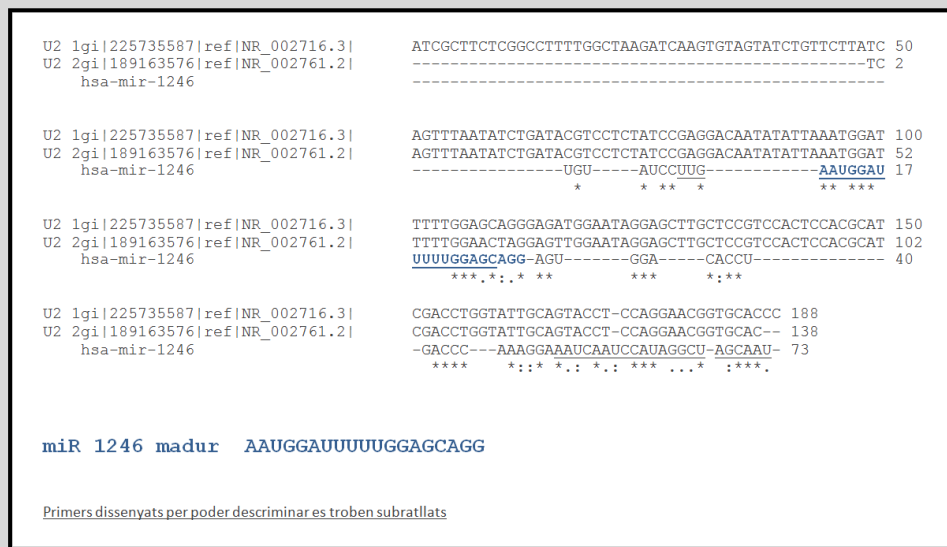
En els resultats preliminars que hem obtingut (*resultats no publicats*), vam descriure 389 miRNAs en una de les mostres i 345 en l'altra. Hi ha una gran correlació en 259 miRNAs presents en ambdues mostres, mentre que els miRNAs que es trobaven solament en una de les mostres estudiades eren miRNAs molt poc abundants.

Els miRNAs més abundants que hem descrit corresponen a una família altament conservada com són el membres de la família let-7, dels quals està descrit que participen en la diferenciació cel·lular de tots els animals, i els miRNAs associats als *clusters* HOX (miR-10a i miR-10b) importants en el desenvolupament embrionari. És important destacar un dels miRNAs més expressats el miR34c, que com hem descrit anteriorment, s'ha observat que té una gran implicació en les últimes fases de l'espermatogènesi i en els primers passos del desenvolupament embrionari.

No obstant, el miRNA més abundant en les dues mostres va ser el miRNA 1246, la seqüència madura del qual és molt similar a snRNA (*small nuclear RNA*) U2. Aquest snRNA forma part del *spliceosome* involucrat en el processament de *splicing* dels pre-mRNAs.

Es van dissenyar uns *primers* per poder diferenciar entre la forma immadura del miRNA 1246 i el snRNA U2 (Veure figura 3.18).

Figura 3.18. Alineament de dues variants del snRNA U2 (U2 1 i U2 2) i el miRNA immadur 1246



En una mostra es va extreure el miRNAs, es va fer una RT-PCR amb els *primers* dissenyats i es va seqüenciar el producte, comprovant l'existència en les nostres mostres del pre-miRNA 1246 i discriminant la possible detecció del snRNA U2.

Aquests resultats són molt preliminars, actualment s'estan estudiant les possibles dianes del miRNA més abundant, el miR1246 i els resultats *in silico* realitzats fins ara mostren que una expressió alterada d'aquest miRNA podria estar involucrada en la infertilitat masculina, ja que molts dels mRNA diana identificats tenen un rol en el procés d'espermatogènesi.

Per tant, ara ens queda un camí obert en la cerca de miRNAs que puguin estar implicats en l'espermatogènesi, comparant els miRNAs diferencials entre pacients i controls.

Tal com hem mostrat en l'estudi mutacional del gen *PRM1* (Veure punt 2.1.2 del present apartat), hem identificat una variant en la regió 3'UTR que es localitza en el lloc d'unió de dos miRNAs (miR19a i miR19b) que han estat descrits en aquest estudi preliminar, tot i que no són dels més expressats.

Recentment, ha aparegut un estudi que demostra l'associació d'una variant que es localitza en la regió 3'UTR del gen *CGA* (*Glycoprotein hormones alpha chain*), que és el lloc d'unió d'un miRNA, amb la infertilitat masculina. Estudis *in vitro* han demostrat que la presència d'aquesta variant en la regió 3'UTR del gen *CGA* disminueix l'afinitat d'unió del miRNA 1302 que resulta amb una sobreexpressió del gen *CGA in vitro* (Zhang *et al.*, 2011).

Per tant, en els estudi mutacionals és important incloure l'estudi de la regió 3'UTR, ja que variants en aquesta regió poden crear o destruir llocs d'unió de miRNAs i una desregulació del mRNA del gen estudiat podria ser la causa de la infertilitat

El fet de trobar un *pool* de miRNAs estables en els espermatozoides madurs de diferents mostres ens fa pensar que aquests poden tenir una funció en els primers passos del desenvolupament embrionari o bé ens poden explicar fets passats durant l'espermatogènesi. Per tant tenim tot un ampli camp a explorar per veure si alteracions en certs miRNAs poden estar associats a la infertilitat masculina.

També és important concloure que en estudis mutacionals futurs s'ha d'incloure l'estudi de les regions 3'UTR, ja que la presència d'una variant en aquesta regió podria disminuir l'afinitat de certs miRNAs i alterar així l'expressió final del gen mitjançant la desregulació de mecanismes post-transcripcionals.

Conclusions

CONCLUSIONS

- 1.- S'han identificat 19 transcrits presents en una abundància diferencial en els espermatozoides de pacients infèrtils astenozoospèrmics comparat amb els presents en controls fèrtils normozoospèrmics. Tres d'ells (ANXA2, BRD2 i OAZ3) s'han validat en un major número de mostres per PCR quantitativa. Podem considerar aquests gens com a candidats pel seu estudi mutacional i/o factors que intervinguin en la seva regulació.
- 2.- L'expressió dels transcrits ANXA2 i BRD2 en pacients infèrtils normozoospèrmics mostren una situació intermèdia entre els resultats obtinguts en els pacients infèrtils astenozoospèrmics i els controls fèrtils normozoospèrmics, (la qual cosa reafirma la conclusió 1) indicant cert grau de disfunció d'aquests gens en el grup de pacients infèrtils normozoospèrmics. Aquests resultats obren la possibilitat de considerar aquests transcrits com a potencials biomarcadors de la fertilitat.
- 3.- S'ha detectat que l'abundància dels transcrits corresponents a les protamines és més elevada en controls fèrtils que en pacients infèrtils astenozoospèrmics i normozoospèrmics. Cal considerar també aquests transcrits com a potencials biomarcadors de la fertilitat.
- 4.- L'estudi mutacional del gen *PRM1* ha permès la identificació de 9 variants. La variant de la regió promotora (c.-191C>A), actua com a factor de risc per la morfologia alterada dels espermatozoides en la població espanyola. L'estudi "*in silico*" d'algunes de les altres variants ens indica que destrueixen llocs d'unió de potencials reguladors de la protamina 1.
- 5.- S'han identificat 15 variants en l'estudi mutacional del gen *PRM2*, però cap d'elles l'hem trobada associada a la infertilitat masculina.
- 6.- Respecte als gens de les protamines, el 97,2% de la població estudiada està representada per 4 haplotips. La resta (8 casos) està representat per 5 haplotips, dels que 7 casos corresponen a pacients infèrtils. Tot i que no assoleix significància estadística els resultats suggereixen que una anomalia en el bloc haplotípic podria ser responsable d'alguns dels casos de infertilitat masculina.
- 7.- S'han identificat 4 variants en l'estudi pilot del gen *HSPA2*. Només la variant c.1444G>C (D482H) trobada en un pacient, mostra alteracions "*in silico*" que afecten a la seva estructura/funcionalitat.
- 8.- S'han identificat 6 variants en l'estudi pilot del gen *PHB1*. Cap d'elles sembla ser potencialment patogènica.
- 9.- No s'ha confirmat l'associació entre la variant c.602A>T (K62Q) del gen *BRDT* i l'oligozoospèrmia severa descrita per altres grups.
- 10.- Hem identificat 2 variants en la regió promotora del gen *BRD2* en pacients astenozoospèrmics que podrien implicar una desregulació en la transcripció d'aquest gen.
- 11.- Els resultats dels nostres estudis mutacionals indiquen que la presència de variants patogèniques d'alta penetrància en gens actualment coneguts com a claus del procés d'espermatogènesi són una causa molt infreqüent de la infertilitat masculina.
- 12.- Hem identificat 475 miRNAs en els espermatozoides de dos controls fèrtils normozoospèrmics, dels que 259 miRNAs son comuns als dos. La presència d'aquests miRNAs comuns recolza la hipòtesi actual de la seva implicació en la espermatogènesi i/o desenvolupament embrionari primerenc.

Bibliografia

BIBLIOGRAFIA

- Aarabi M, Yu Y, Xu W, Tse MY, Pang SC, *et al.* The Testicular and Epididymal Expression Profile of PLC ζ in Mouse and Human Does Not Support Its Role as a Sperm-Borne Oocyte Activating Factor. *PLoS ONE* 2012; **7(3)**: e33496.
- Amaral A, Ramalho-Santos J, St John JC. The expression of polymerase gamma and mitochondrial transcription factor A and the regulation of mitochondrial DNA content in mature human sperm. *Hum Reprod* 2007; **22**:1585–1596.
- Aoki VW, Christensen GL, Atkins JF, Carrell DT. Identification of novel polymorphisms in the nuclear protein genes and their relationship with human sperm protamine deficiency and severe male infertility. *Fertil Steril* 2006; **86**:1416–1422.
- Arpanahi A, Brinkworth M, Iles D, Krawetz SA, Paradowska A, *et al.* Endonuclease-sensitive regions of human spermatozoal chromatin are highly enriched in promoter and CTCF binding sequences. *Genome Res* 2009; **19**:1338–1349.
- Aston KI, Carrell DT. Genome-wide study of single-nucleotide polymorphisms associated with azoospermia and severe oligozoospermia. *J Androl* 2009; **30**:711–725.
- Aston KI, Krausz C, Laface I, Ruiz-Castane E, Carrell DT. Evaluation of 172 candidate polymorphisms for association with oligozoospermia or azoospermia in a large cohort of men of european descent. *Hum Reprod* 2010; **25**:1383–1397.
- Avendano C, Franchi A, Jones E, Oehninger S. Pregnancy-specific {beta}-1-glycoprotein 1 and human leukocyte antigen-E mRNA in human sperm: differential expression in fertile and infertile men and evidence of a possible functional role during early development. *Hum Reprod* 2009; **24**:270–277.
- Baccetti B, Capitani S, Collodel G, DiCairano G, Gambera L, *et al.* Genetic sperm defects and consanguinity. *Hum Reprod* 2001; **16**: 1365-1371.
- Balhorn R, Weston S, Thomas C, Wyrobek A. DNA packaging in mouse spermatids. Synthesis of protamine variants and four transition proteins. *Exp Cell Res* 1984; **150**: 298–308.
- Behr R, Sackett SD, Bochkis IM, Le PP, Kaestner KH. Impaired male fertility and atrophy of seminiferous tubules caused by haploinsufficiency for Foxa3. *Dev Biol* 2007; **306**: 636–645.
- Botta T, Blescia S, Martínez-Heredia J, Lafuente R, Brassesco M, *et al.* Identificación de diferencias proteómicas en muestras oligozoospermicas. *Revista Internacional de Andrología* 2009; **7 (1)**: 14-19.
- Bouhallier F, Allioli N, Laval F, Chalmel F, Perrard MH, *et al.* Role of miR-34c microRNA in the late steps of spermatogenesis. *Rna* 2010; **16**:720–731.
- Bourc'his D, Voinnet O. A Small-RNA Perspective on Gametogenesis, Fertilization, and Early Zygotic Development. *Science* 2010; **330**:617–622.
- Braun RE, Behringer RR, Peschon JJ, Brinster RL, Palmiter RD. Genetically haploid spermatids are phenotypically diploid. *Nature* 1989; **337**:373–376.

Castillo J, Simon L, de Mateo S, Lewis S, Oliva R. Protamine/DNA ratios and DNA damage in native and density gradient centrifuged sperm from infertile patients. *J Androl* 2011; **32**:324–332..

Cedenho AP, Lima SB, Cenedeze MA, Spaine DM, Ortiz V, *et al.* Oligozoospermia and heat-shock protein expression in ejaculated spermatozoa. *Hum Reprod* 2006; **21**:1791–1794.

Cho C, Willis WD, Goulding EH, Jung-Ha H, Choi YC, *et al.* Haploinsufficiency of protamine-1 or -2 causes infertility in mice. *Nat Genet* 2001; **28**:82–86.

Christensen GL, Ivanov IP, Wooding SP, Atkins JF, Mielnik A, *et al.* Identification of polymorphisms and balancing selection in the male infertility candidate gene, ornithine decarboxylase antizyme 3. *BMC Med Genet* 2006; **16**: 7-27.

Cox LJ, Larman MG, Saunders CM, Hashimoto K, Swann K, *et al.* Sperm phospholipase C ζ from humans and cynomolgus monkeys triggers Ca²⁺ oscillations, activation and development of mouse oocytes. *Reproduction* 2002; **124**:611–623

Depa-Martynow M, Kempisty B, Lianeri M, Jagodzinski PP, Jedrzejczak P. Association between fertilin beta, protamines 1 and 2 and spermatid-specific linker histone H1-like protein mRNA levels, fertilization ability of human spermatozoa, and quality of preimplantation embryos. *Folia Histochem Cytobiol* 2007; **45(Suppl1)**:S79–S85.

Evers JL. Female subfertility. *Lancet*, 2002; **360**: 151-159.

Feinberg JM, Rainteau DP, Kaetzel MA, Dacheux JL, Dedman JR, *et al.* Differential localization of annexins in ram germ cells: a biochemical and immunocytochemical study. *J Histochem Cytochem* 1991; **39**:955–963.

Feng HL, Sandlow JI, Sparks AE. Decreased expression of the heat shock protein HSP70-2 is associated with the pathogenesis of male infertility. *Fertil Steril* 2001; **76**:1136-1139.

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

Florence B, Faller DV. You bet-cha: a novel family of transcriptional regulators. *Front Biosci* 2001; **6**: 1008–1018.

Freiman RN. Specific variants of general transcription factors regulate germ cell development in diverse organisms. *Biochim Biophys Acta* 2009; **1789**: 161–166.

Gangaraju VK, Lin H. MicroRNAs: key regulators of stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009;**10(2)**:116–125.

Garcia-Herrero S, Garrido N, Martinez-Conejero JA, Remohi J, Pellicer A, *et al.* Ontological evaluation of transcriptional differences between sperm of infertile males and fertile donors using microarray analysis. *J Assist Reprod Genet* 2010; **27**:111–120.

Gázquez C, Oriola J, de Mateo S, Vidal-Taboada JM, Balleca JL, *et al.* A common protamine 1 promoter polymorphism (-190 C>A) correlates with abnormal sperm morphology and increased protamine P1 / P2 ratio in infertile patients. *J Androl* 2008; **29**:540–548.

Girard A, Sachidanandam R, Hannon GJ, Carmell MA. A germline-specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins. *Nature* 2006; **442**:199–202.

Gnoth C, Godehardt E, Frank-Herrmann O, Kriol K, Tigges J, *et al.* Definition and prevalence of subfertility and infertility. *Hum Reprod* 2005; **20**: 1144-1147.

- Goodrich R, Johnson G, Krawetz SA. The preparation of human spermatozoal RNA for clinical analysis. *Arch Androl* 2007; **53**:161–167.
- Govin J, Caron C, Escoffier E, Ferro M, Kuhn L, *et al.* Post-meiotic shifts in HSPA2/HSP70.2 chaperone activity during mouse spermatogenesis. *J Biol Chem* 2006; **281**: 37888–37892.
- Guo X, Gui YT, Tang AF, Lu LH, Gao X, *et al.* Differential expression of VASA gene in ejaculated spermatozoa from normozoospermic men and patients with oligozoospermia. *Asian J Androl* 2007; **9**:339–344.
- Gur Y, Breitbart H. Mammalian sperm translate nuclear-encoded proteins by mitochondrial-type ribosomes. *Genes Dev* 2006; **20**:411–416.
- Gyuris A, Donovan DJ, Seymour KA, Lovasco LA, Smilowitz NR, *et al.* The chromatin-targeting protein Brd2 is required for neural tube closure and embryogenesis. *BiochimBiophys Acta* 2009; **1789**:413–421.
- Halmekyto M, Hyttinen JM, Sinervirta R, Utriainen M, Myohanen S, *et al.* Transgenic mice aberrantly expressing human ornithine decarboxylase gene. *J Biol Chem* 1991; **266**:19746–19751.
- Hammoud S, Emery BR, Aoki VW, Carrell DT. Identification of genetic variation in the 5' and 3' non-coding regions of the protamine genes in patients with protamine deregulation. *Andrology* 2007; **53**:267–274.
- Hammoud SS, Nix DA, Zhang H, Purwar J, Carrell DT *et al.* Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development. *Nature* 2009; **460**: 473–478.
- Hammoud SS, Nix DA, Hammoud AO, Gibson M, Cairns BR, *et al.* Genome-wide analysis identifies changes in histone retention and epigenetic modifications at developmental and imprinted gene loci in the sperm of infertile men. *Hum Reprod* 2011; **26(9)**:2558–2569.
- Hossain AM, Rizk B, Behzadian A, Thorneycroft IH. Modified guanidinium thiocyanate method for human sperm DNA isolation. *Mol Hum Reprod* 1997; **3**:953–956.
- Hsieh-Li HM, Witte DP, Weinstein M, Branford W, Li H, *et al.* Hoxa 11 structure, extensive antisense transcription, and function in male and female fertility. *Development* 1995; **121**:1373–1385.
- Hud NV, Allen MJ, Downing KH, Lee J, Balhorn R. Identification of the elemental packing unit of DNA in mammalian sperm cells by atomic force microscopy. *Biochem Biophys Res Co* 1993; **193**:1347–1354.
- Imken L, Rouba H, El Houate B, Louanjli N, Barakat A, *et al.* Mutations in the protamine locus: association with spermatogenic failure?. *Mol Hum Reprod* 2009; **15**:733–738.
- Iguchi N, Yang S, Lamb DJ, Hecht NB. An SNP in protamine 1: a possible genetic cause of male infertility? *J Med Genet* 2006; **43**:382–384.
- Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, *et al.* Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* 2003; **4**:249–264.
- Jedrzejczak P, Kempisty B, Bryja A, Mostowska M, Depa-Martynow M, *et al.* Quantitative assessment of transition proteins 1, 2 spermatid-specific linker histone H1-like protein transcripts in spermatozoa from normozoospermic and asthenozoospermic men. *Arch Androl* 2007; **53**:199–205.
- Jiang J, Prasad K, Lafer EM, Sousa R. Structural basis of interdomain communication in the Hsc70 chaperone. *Molecular Cell* 2005; **20(4)**:513–524.

- Johnson GD, Lalancette C, Linnemann AK, Leduc F, Boissonneault G, *et al.* The sperm nucleus: chromatin, RNA, and the nuclear matrix. *Reproduction* 2011; **141**:21–36.
- Kanno T, Kanno Y, Siegel RM, Jang MK, Lenardo MJ, *et al.* Selective recognition of acetylated histones by bromodomain proteins visualized in living cells. *Mol Cell* 2004; **13**:33–43.
- Kempisty B, Depa-Martynow M, Lianeri M, Jedrzejczak P, Darul-Wasowicz A, *et al.* Evaluation of protamines 1 and 2 transcript contents in spermatozoa from asthenozoospermic men. *Folia Histochem Cytobiol* 2007; **45(Suppl 1)**:S109–S13.
- Kichine E, Msaidie S, Bokilo AD, Ducourneau A, Navarro A, *et al.* Low-frequency protamine 1 gene transversions c.102G->T and c.-107G->C do not correlate with male infertility. *J Med Genet* 2008; **45**:255–256.
- Korhonen HM, Meikar O, Yadav RP, Papaioannou MD, Romero Y, *et al.* Dicer Is Required for Haploid Male Germ Cell Differentiation in Mice. *PLoS ONE* 2011; **6(9)**: e24821.
- Krausz C, Giachini C, Xue Y, O'Bryan MK, Gromoll J, *et al.* Phenotypic variation within European carriers of the Y-chromosomal gr/gr deletion is independent of Y-chromosomal background. *J Med Genet* 2009; **46**: 21–31.
- Krawetz SA. Paternal contribution: new insights and future challenges. *Nat Rev Gen* 2005; **6**: 633-642.
- Krawetz SA, Kruger A, Lalancette C, Tagett R, Anton E, *et al.* A survey of small RNAs in human sperm. *Hum Reprod* 2011; **12**:3401-3412.
- Kruger TF, Ackerman SB, Simmons KF, Swanson RJ, Brugo SS, *et al.* A quick, reliable staining technique for human sperm morphology. *Arch Androl* 1987; **18**:275-277.
- Lalancette C, Miller D, Li Y, Krawetz SA. Paternal contributions: new functional insights for spermatozoal RNA. *J Cell Biochem* 2008; **104**:1570–1579.
- Lalancette C, Platts AE, Johnson GD, Emery BR, Carrell DT, *et al.* Identification of human sperm transcripts as candidate markers of male fertility. *J Mol Med (Berl)* 2009; **87**:735–748.
- Lambard S, Galeraud-Denis I, Martin G, Levy R, Chocat A, *et al.* Analysis and significance of mRNA in human ejaculated sperm from normozoospermic donors: relationship to sperm motility and capacitation. *Mol Hum Reprod* 2004; **10**:535–541.
- Lee S, Kasif S, Weng Z, Cantor CR. Quantitative analysis of single nucleotide polymorphisms within copy number variation. *PLoS ONE* 2008; **3**:e3906.
- LeRoy G, Rickards B, Flint SJ. The double bromodomain proteins Brd2 and Brd3 couple histone acetylation to transcription. *Mol Cell* 2008; **30**: 51–60.
- Lian J, Zhang X, Tian H, Liang N, Wang Y, *et al.* Altered microRNA expression in patients with non-obstructive azoospermia. *Reprod Biol Endocrinol* 2009; **7**:13.
- Liao TT, Xiang Z, Zhu WB, Fan LQ. Proteome analysis of round-headed and normal spermatozoa by 2-D fluorescence difference gel electrophoresis and mass spectrometry. *Asian J Andro* 2009; **11(6)**:683-693.
- Liu D, Brockman JM, Dass B, Hutchins LN, Singh P, *et al.* Systematic variation in mRNA 3'-processing signals during mouse spermatogenesis. *Nucleic Acids Res* 2007; **35**:234-246.

- Liu WM, Pang RT, Chiu PC, Wong BP, Lao K, *et al.* Sperm-borne microRNA-34c is required for the first cleavage division in mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2012; **109**: 490–494.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) method. *Methods* 2001; **25**:402–408.
- Manandhar G, Schatten H, Sutovsky P. Centrosome reduction during gametogenesis and its significance. *Biol Reprod* 2005; **72**:2-13.
- Margarit E, Soler A, Carrió A, Oliva R, Costa D, *et al.* Molecular, cytogenetic and clinical characterization of six XX males including one prenatal diagnosis. *J Med Genet* 1998; **35**:727-730.
- Martínez-Heredia J, de Mateo S, Vidal-Taboada J.M, Ballescà J.L, Oliva R. Identification of proteomic differences in asthenozoospermic sperm samples. *Hum Reprod* 2008; **23**(4):783-791.
- Massart, A., Lissens, W., Tournaye, H., Stouffs, K. Genetic causes of spermatogenic failure. *Asian J Andro* 2012; **14** (1):40-48.
- de Mateo S, Martínez-Heredia J, Estanyol JM, Domínguez-Fandos D, Vidal-Taboada JM, *et al.* Marked correlations in protein expression identified by proteomic analysis of human spermatozoa. *Proteomics* 2007; **7**:4264-4277.
- de Mateo S, Castillo J, Estanyol JM, Ballesca JL, Oliva R. Proteomic characterization of the human sperm nucleus. *Proteomics* 2011; **11**:2714–2726.
- Matsuzaka Y, Makino S, Okamoto K, Oka A, Tsujimura A, *et al.* Susceptibility locus for non-obstructive azoospermia is localized within the HLA-DR/DQ subregion: primary role of DQB1*0604. *Tissue Antigens* 2002; **60**:53-63.
- Matzuk MM, Lamb DJ. The biology of infertility: research advances and clinical challenges. *Nat Med* 2008; **14**:1197–1213.
- Mezquita C. Chromatin composition, structure and function in spermatogenesis. *Revis Biol Celular* 1985; **5**:V-XIV:1-124.
- Miller, D., Briggs, D., Snowden, H., Hamlington, J., Rollinson, *et al.* A complex population of RNAs exists in human ejaculate spermatozoa: Implications for understanding molecular aspects of spermiogenesis. *Gene* 1999; **237**:385–392.
- Misell LM, Holochwost D, Boban D, Santi N, Shefi N, *et al.* A stable isotope-mass spectrometric method for measuring human spermatogenesis kinetics in vivo. *J Urol* 2006; **175**: 242-246.
- Miyagawa Y, Nishimura H, Tsujimura A, Matsuoka Y, Matsumiya K, *et al.* Single-nucleotide polymorphisms and mutation analyses of the TNP1 and TNP2 genes of fertile and infertile human male populations. *J Androl* 2005; **26**:779–786.
- Moazed D. Small RNAs in transcriptional gene silencing and genome defence. *Nature* 2009; **457**:413–420.
- Moldenhauer JS, Ostermeier GC, Johnson A, Diamond MP & Krawetz S.A. Diagnosing male factor infertility using microarrays. *J Andro* 2003; **24**:783–789.
- Morinière J, Rousseaux S, Steuerwald U, Soler-López M, Curtet S, *et al.* Cooperative binding of two acetylation marks on a histone tail by a single bromodomain. *Nature* 2009; **461**:664–668.

Nanassy L, Liu L, Griffin J, Carrell DT. The clinical utility of the protamine 1/protamine 2 ratio in sperm. *Protein Pept Lett* 2011; **18(8)**:772-777.

Natoli TA., Alberta JA, Bortvin A, Taglienti ME, Menke DB, *et al.* Wt1 functions in the development of germ cells in addition to somatic cell lineages of the testis. *Dev Biol* 2004; **268**:429-440.

Navarro-Costa P, Nogueira P, Carvalho M, Leal F, Cordeiro I, *et al.* Incorrect DNA methylation of the DAZL promoter CpG island associates with defective human sperm. *Hum Reprod* 2010; **25(10)**:2647-2654.

Oliva R, Dixon GH. Vertebrate protamine genes and the histone-to-protamine replacement reaction. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1991; **40**:25-94.

Oliva R, Balleascà JL. Valoración genética de la pareja estéril o infértil. *Temas de actualidad en Andrología* 1999; 61-92.

Oliva R. Protamines and male infertility. *Hum Reprod Update* 2006; **12**:417-435.

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

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

Ostermeier GC, Goodrich RJ, Diamond MP, Dix DJ, Krawetz SA. Toward using stable spermatozoal RNAs for prognostic assessment of malefactor fertility. *Fertil Steril* 2005; **83**:1687-1694.

Piechota J, Tomecki R, Gewartowski K, Szczesny R, Dmochowska A, *et al.* Differential stability of mitochondrial mRNA in HeLa cells. *Acta Biochim Pol* 2006; **53**:157-168.

Pivot-Pajot C, Caron C, Govin J, Vion A, Rousseaux S, *et al.* Acetylation-dependent chromatin reorganization by BRDT, a testis-specific bromodomain-containing protein. *Mol Cell Biol* 2003; **23**: 5354-5365

Platts AE, Dix DJ, Chemes HE, Thompson KE, Goodrich R, *et al.* Success and failure in human spermatogenesis as revealed by teratozoospermic RNAs. *Hum Mol Genet* 2007; **16**:763-773.

Poplinski A, Tuttelmann F, Kanber D, Horsthemke B, Gromoll J. Idiopathic male infertility is strongly associated with aberrant methylation of MEST and IGF2/H19 ICR1. *Int J Androl* 2009; **33(4)**:642-649.

Qin J, Tsai MJ, Tsai SY. Essential roles of COUP-TFII in Leydig cell differentiation and male fertility. *PLoS One* 2008; **3(9)**:e3285.

Rassoulzadegan M, Grandjean V, Gounon P, Vincent S, Gillot I, *et al.* RNA-mediated non-mendelian inheritance of an epigenetic change in the mouse. *Nature* 2006; **441**:469-474.

Ravel C, Chantot-Bastaraud S, El Houate B, Berthaut I, Verstraete L, *et al.* Mutations in the protamine 1 gene associated with male infertility. *Mol Hum Reprod* 2007; **13**:461-464.

Repping S, Skaletsky H, Brown L, van Daalen SK, Korver CM, *et al.* Polymorphism for a 1.6-Mb deletion of the human Y chromosome persists through balance between recurrent mutation and haploid selection. *Nat Genet* 2003; **35**:247-251.

- Ribas-Maynou J, García-Peiró A, Abad C, Amengual MJ, Navarro J *et al.* Alkaline and neutral Comet assay profiles of sperm DNA damage in clinical groups. *Hum Reprod* 2012; **27**(3):652-658.
- Rozen S, Skaletsky J. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. En: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, 2000; 365-386
- Rousseaux, S., Caron, C., Govin, J., Lestrat, C., Faure, A. K. *et al.* Establishment of male-specific epigenetic information. *Gene* 2005; **345**, 139-153.
- Runft LL, Jaffe LA, Mehlmann LM. Egg activation at fertilization: where it all begins. *Dev Biol* 2002; **245**: 237-254.
- Saeed AI, Bhagabati NK, Braisted JC, Liang W, Sharov V, *et al.* TM4 microarray software suite. *Methods Enzymol* 2006; **411**:134-193.
- Sanderson ML, Griffin J, Carrell DT. Novel polymorphisms in the HSPA2 gene among a population of infertile men. *Proceedings of the 4th Utah/Florence symposium on the Genetics of Male Infertility*. Salt Lake City, USA. 2010.
- Sasaki H, Matsui Y. Epigenetic events in mammalian germ-cell development: reprogramming and beyond. *Nat Rev Genet* 2008; **9**:129-140.
- Saunders CM, Larman MG, Parrington J, Cox LJ, Royse J, *et al.* PLC zeta: a sperm-specific trigger of Ca(2+) oscillations in eggs and embryo development. *Development* 2002; **129**: 3533-3544.
- Schleicher M, Shepherd BR, Suarez Y, Fernandez-HernandoC, Yu J, *et al.* Prohibitin-1 maintains the angiogenic capacity of endothelial cells by regulating mitochondrial function and senescence. *J Cell Biol* 2008; **180**: 101-112.
- Shamsi MB, Kumar R, Bhatt A, Bamezai RN, Kumar R, *et al.* Mitochondrial DNA mutations in etiopathogenesis of male infertility. *Indian J Urol* 2008; **24**:150-154.
- Shang E, Salazar G, Crowley TE, Wang X, Lopez RA, *et al.* Identification of unique, differentiation stage-specific patterns of expression of the bromodomain-containing genes Brd2, Brd3, Brd4, and Brdt in the mouse testis. *Gene Expr Patterns* 2004; **4**:513-519.
- Shang E, Nickerson H D, Wen D, Wang X, Wolgemuth D J. The first bromodomain of Brdt, a testis-specific member of the BET sub-family of double-bromodomain-containing proteins, is essential for male germ cell differentiation. *Development* 2007; **134**:3507-3515.
- Simon L, Castillo J, Oliva R, Lewis S. Relationships between human sperm protamines, DNA damage and assisted reproduction outcomes. *Reprod BioMed Online* 2011; **23**:724-734.
- Son W. Y., Han C. T., Hwang S. H., Lee J. H., Kim S., *et al.* Repression of HSPA2 messenger RNA in human testes with abnormal spermatogenesis. *Fertil Steril* 2000; **73**, 1138-1144.
- Sone Y, Ito M, Shirakawa H, Shikano T, Takeuchi H, *et al.* Nuclear translocation of phospholipase C-zeta, an egg-activating factor, during early embryonic development. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; **330**:690-694.
- Steger K, Wilhelm J, Konrad L, Stalf T, Greb R, *et al.* Both protamine-1 to protamine-2 mRNA ratio and Bcl2 mRNA content in testicular spermatids and ejaculated spermatozoa discriminate between fertile and infertile men. *Hum Reprod* 2008; **23**:11-16.

- Steilmann C, Cavalcanti MC, Bartkuhn M, Pons-Kühnemann J, Schuppe HC, *et al.* The interaction of modified histones with the bromodomain testis-specific (BRDT) gene and its mRNA level in sperm of fertile donors and subfertile men. *Reproduction* 2010; **140**:435–443.
- Suau P and Subirana JA. X-ray diffraction studies of nucleoprotamine structure. *J Mol Biol* 1977; **117**:909-926.
- Tanaka H, Miyagawa Y, Tsujimura A, Matsumiya K, Okuyama A, *et al.* Single nucleotide polymorphisms in the protamine-1 and -2 genes of fertile and infertile human male populations. *Mol Hum Repro* 2003; **9**:69–73.
- Thompson WE, Ramalho-Santos J, Sutovsky P. Ubiquitination of prohibitin in mammalian sperm mitochondria: possible roles in the regulation of mitochondrial inheritance and sperm quality control. *Biol Reprod* 2003; **69**:254–260.
- Tiepolo L, Zuffardi O. Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm. *Hum Genet* 1976; **34**:119–124.
- Tokuhiro K, Isotani A, Yokota S, Yano Y, Oshio S, *et al.* OAZ-t/OAZ3 is essential for rigid connection of sperm tails to heads in mouse. *PLoS Genet* 2009; **5**:e1000712.
- Tsutsumi H, Komuro T, Mukoyama R, Nogami H. Hypervariable región structure and polymorphism of mtDNA from dental pulp and a family analysis. *J Oral Sci* 2006; **48**:145–152.
- Tüttelmann F, Krenkova P, Römer S, Nestorovic AR, Ljujic MS, *et al.* A common haplotype of protamine 1 and 2 genes is associated with higher sperm counts. *Int J Androl* 2010; **33**:240–248.
- Tüttelmann F, Simoni M, Kliesch S, Ledig S, Dworniczak B, *et al.* Copy Number Variants in Patients with Severe Oligozoospermia and Sertoli-Cell-Only Syndrome. *PLoS ONE* 2011; **6**(4):e19426.
- Umehara T, Nakamura Y, Wakamori M, Ozato K, Yokoyama S, *et al.* Structural implications for K5/K12-di-acetylated histone H4 recognition by the second bromodomain of BRD2. *FEBS letters* 2010; **584**(18):3901–3908.
- Vanrell JA. Esterilidad, subfertilidad e infertilidad: definición, frecuencia y etiología. Fertilidad y esterilidad humanas. *Ediciones Científicas y Técnicas, S.A.* 1992; 1-43.
- Wallace BC, Schmid CH, Lau J, Trikalinos TA. Meta-Analyst: software for meta-analysis of binary, continuous and diagnostic data. *BMC Med Res Methodol* 2009; **9**, 80; doi: 10.1186/1471-2288-9-80.
- Wang H, Zhou Z, Xu M, Li J, Xiao J, *et al.* A spermatogenesis-related gene expression profile in human spermatozoa and its potential clinical applications. *J Mol Med (Berl)* 2004;**82**:317–324.
- Ward WS. Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development. *Mol Hum Reprod* 2010; **16**:30–36.
- World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen, 5th edn. *Switzerland: World Health Organization*, 2010.
- Wykes, S.M., Visscher, D.M., Krawetz, S.A. Haploid expressed transcripts persist in mature human spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 1997; **3**:15-19.
- Yamauchi Y, Shaman JA, Ward WS. Non-genetic contributions of the sperm nucleus to embryonic development. *Asian J Androl* 2011; **13**:31–35.
- de Yebra L, Balleca JL, Vanrell JA, Corzett M, Balhorn R, *et al.* Detection of P2 precursors in the sperm cells of infertile patients who have reduced protamine P2 levels. *Fertil Steril* 1998; **69**:755-759.

Zhang H, Liu Y, Su D, Yang Y, Bai G, *et al.* A single nucleotide polymorphism in a miR-1302 binding site in CGA increases the risk of idiopathic male infertility. *Fertil Steril* 2011; **96(1)**:34-39.

Zhao M, Shirley CR, Hayashi S, Marcon L, Mohapatra B, *et al.* Transition nuclear proteins are required for normal chromatin condensation and functional sperm development. *Genesis* 2004; **38**:200–213.

Zhu D, Dix DJ, Eddy E.M. HSP70-2 is required for CDC2 kinase activity in meiosis I of mouse spermatocytes. *Development* 1997; **124(15)**:3007-3014.

Abreviatures

ABREVIATURES

#

μ l	Microlitre
μ m	Micrometre
Δ Ct	Diferencial de Ct
$\Delta\Delta$ Ct	Doble diferencial de Ct

A

A	Absorbància
ABP	Androgen binding protein
ACTB	β -actine
Ad	Type A dark spermatogonia (Espermatogònies de tipus A de nucli fosc)
add	addició
ANXA2	Annexin A2
Ala o A	Alanina
Ap	Type pale A spermatogonia (Espermatogònies de tipus A de nucli pàl·lid)
APS	Ammonium persulfate
AR	Androgen receptor
Arg o R	Arginina
aRNA	Amplified RNA
Asn o N	Asparagina
Asp o D	Àcid aspàrtic
ATP	Adenosine triphosphate
AZF	Azoospermia factor

B

BET	Bromodomain and extraterminal-domain
BRD2	Bromodomain containing 2
BRDT	Bromodomain testis-specific protein

C

CASA	Computer assisted sperm analysis
CD45	Leukocyte common antigen
cDNA	Complementary DNA
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CG	Cèl·lula germinal
CGA	Glycoprotein hormones alpha chain
CL	Cèl·lula de Leydig
cm	Centímetres

CNV	Copy number variations
COUP-TFII	Chicken Ovalbumin Upstream Promoter-Transcription Factor II
CREM	cAMP- responsive element modulator
cRNA	Complementary RNA
CS	Cèl·lula de Sertoli
Ct	Threshold cycle
Cys o C	Cisteïna

D

DAZ	Deleted in azoospermia
DAZL	Deleted in azoospermia-like
del	Deleció
der	Derivatiu
DMSO	Dimetil sulfòxid
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTPs	Deoxyribonucleotides triphosphate.
DTT	Dithiothreitol

E

EDTA	Ethylendiaminetetraacetic acid
ER	Estrogen receptor

F

fg	Femtograms
FN	Formes normals
FSH	Follicle-stimulating hormone
FSHR	Follicle-stimulating hormone receptor

G

G (centrifugació)	Factor centrífug
g (pes)	Grams
Gln o Q	Glutamina
Glu o E	Àcid glutàmic
Gly o G	Glicina
GnRH	Gonadotropin-releasing hormone
GP	Gen problema
GR	Gen de referencia
GSTM1	GlutathioneS-transferase

Abreviatures

H

<i>HILS1</i>	<i>Spermatid-specific linker histone H1-like protein</i>
<i>His o H</i>	Histidina
<i>HNF3</i>	<i>Hepatocyte nuclear factor 3</i>
<i>HSP70</i>	<i>Heat Shock 70 KDa protein</i>
<i>HSPA2</i>	<i>Heat Shock 70 KDa protein 2</i>

I

<i>ICSI</i>	<i>Intracytoplasmic sperm injection</i>
<i>IGF2</i>	<i>Insuline-like growth factor II</i>
<i>INSL3</i>	<i>Insuline-like factor 3</i>

K

<i>Kb</i>	Kilobase
<i>KDM5A</i>	<i>Lysine (K)-specific demethylase 5A</i>
<i>Kit</i>	<i>Mast/stem cell growth factor receptor Kit</i>
<i>KLF6</i>	<i>Krueppel-like factor 6</i>
<i>kV</i>	Kilovoltio

L

<i>LACZ</i>	<i>Beta-galactosidase</i>
<i>LDHC</i>	<i>L-lactate dehydrogenase C chain</i>
<i>LGR8</i>	<i>Leucine-rich-repeat-containing G protein-coupled receptor 8</i>
<i>LH</i>	<i>Luteinizing hormone</i>
<i>Lys o K</i>	Lisina

M

<i>M</i>	Molar
<i>mA</i>	Mil·liampers
<i>MARs</i>	<i>Matrix Attached Regions</i>
<i>MEST</i>	<i>Mesoderm-specific transcript homolog protein</i>
<i>Met o M</i>	Metionina
<i>mg</i>	Mil·ligrams
<i>MGI</i>	<i>Mouse Genome Informatics</i>
<i>MgCl₂</i>	Clorur de magnesi
<i>miRNA</i>	<i>MicroRNA</i>
<i>ml</i>	Mil·lilitres
<i>mM</i>	Mil·limolar
<i>mm</i>	Mil·limetres
<i>mm²</i>	Mil·limetres quadrats
<i>mRNA</i>	<i>Messenger RNA</i>

MTHFR *Methylenetetrahydrofolate reductase*

MT-ND2 *NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 2*

MT-ND3 *NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 3*

N

<i>N</i>	Normal
<i>NaHCO₃</i>	Bicarbonat sòdic
<i>ng</i>	Nanogram
<i>nm</i>	Nanometre
<i>NS</i>	No significatiu

O

<i>OAZ3</i>	<i>Ornithine decarboxylase antizyme 3</i>
<i>°C</i>	Graus centrigrads
<i>ODC</i>	<i>Ornithine decarboxylase</i>
<i>OMIM</i>	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
<i>OR</i>	<i>Odd ratio</i>

P

<i>P1</i>	Proteina - Protamina 1
<i>P2</i>	Proteina - Protamina 2
<i>pb</i>	Parell de bases
<i>PBS</i>	<i>Phosphate buffered saline</i>
<i>PCR</i>	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
<i>PGC</i>	<i>Primordial germinal cells</i>
<i>pH</i>	Potencial d'hidrogen
<i>PHB1</i>	<i>Prohibitine 1</i>
<i>piRNA</i>	<i>Piwi-interacting RNA</i>
<i>PLCzeta</i>	<i>Phospholipase C zeta</i>
<i>PMSF</i>	<i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i>
<i>POLG</i>	<i>Mitochondrial DNA polymerase γ</i>
<i>PRM</i>	<i>Protamine</i>
<i>PRM1</i>	<i>Protamine 1 gene</i>
<i>PRM2</i>	<i>Protamina 2gene</i>

R

<i>r²</i>	Desequilibri de lligament
<i>RFLPs</i>	<i>Restriction fragment length polymorphisms</i>
<i>RIN</i>	<i>RNA Integrity Number</i>
<i>RISC</i>	<i>RNA-induced silencing complex</i>
<i>RNA</i>	<i>Ribonucleic acid</i>
<i>ROS</i>	<i>Reactive oxygen species</i>

<i>rpm</i>	Revolucions per minut
<i>rRNA</i>	<i>Ribosomic RNA</i>
<i>Rs</i>	Correlació de <i>Spearman</i>
<i>RT</i>	<i>Retrotranscription</i>
<i>RT-PCR</i>	<i>Retrotranscription-PCR</i>

S

<i>SCLB</i>	<i>Somatic cell Lysis Buffer</i>
<i>SCOS</i>	<i>Sertoli cell-only syndrome</i>
<i>SDS</i>	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
<i>Seg.</i>	Segon
<i>Ser o S</i>	Serina
<i>siRNA</i>	<i>Small interfering RNA</i>
<i>sncRNA</i>	<i>Small non coding RNA</i>
<i>SNP</i>	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
<i>snRNA</i>	<i>small nuclear RNA</i>
<i>SOAF</i>	<i>Sperm-borne oocyte activating factor</i>
<i>SRY</i>	<i>Sex-determining Region Y</i>

T

<i>TBE</i>	<i>Tris/Borate/EDTA</i>
<i>TCA</i>	<i>Trichloroacetic acid</i>
<i>TEM</i>	<i>Transmission electron microscopy</i>
<i>TEMED</i>	<i>Tetranethylethyldiamine</i>
<i>TLX1</i>	<i>T-cell leukemia homeobox protein 1</i>
<i>TNP</i>	<i>Transition nuclear protein</i>
<i>TPX</i>	<i>Testis-specific protein</i>
<i>Tris</i>	<i>Tris(hidroxymethyl)aminomethne</i>
<i>tRNAs</i>	<i>Transfer RNA</i>
<i>TUNEL</i>	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated fluorescein-dUTP nick end labeling.</i>
<i>TV</i>	<i>Transcript variant</i>
<i>Tyr o Y</i>	Tirosina

U

<i>UV</i>	Ultravioleta
-----------	--------------

V

<i>Val o V</i>	Valina
<i>V</i>	Volts

W

<i>WHO</i>	<i>World Health Organization</i>
<i>Wt1</i>	<i>Wilms' tumor suppressor gene</i>

Materials i *software* utilitzat

MATERIAL I SOFTWARE UTILITZAT

2-Propanol	Merck KGaA, Darmstadt, Alemanya	Reactiu
Acetona	Merck KGaA, Darmstadt, Alemanya	Reactiu
Àcid acètic	Panreac, Castellar del Vallès, Espanya	Reactiu
Agarosa D1 Low EEO	Laboratorios Conda S.A., Madrid, Espanya	Reactiu
Agarose LM Sieve SA	Laboratorios Conda S.A., Madrid, Espanya	Reactiu
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, Palo Alto, USA	Maquinaria
BioTherm Taq Polymerase Bio3-500	GeneCraft, Munster, Alemanya	Reactiu
Blau de bromofenol 0,25%	Merck KGaA, Darmstadt, Alemanya	Reactiu
Blau de Coomassie EZBlue	Sigma-Aldrich, St Louis, USA	Reactiu
Cambra de comptatge Makler	Sefi Medical Instruments, Hainfa, Israel	Maquinaria
ChromasPro	Technelysium Pty Ltd, Helensvale, Australia	Software
Citrat sòdi	Biosciencies, Inc., La Jolla, USA	Reactiu
Cloroform	Merck KGaA, Darmstadt, Alemanya	Reactiu
ClustalW program	http://www.ebi.ac.uk/clustalw/	Software
Columnes Illustra AutoSeq G-50Dye Terminator Removal Kit	GE Healthcare, Buckinghamshire, Regne Unit	Kit
Desoxiribonucleòtids dATP Li-Salt	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanya	Reactiu
Desoxiribonucleòtids dCTP Li-Salt	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanya	Reactiu
Desoxiribonucleòtids dGTP Li-Salt	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanya	Reactiu
Desoxiribonucleòtids dTTP Li-Salt	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanya	Reactiu
DTT	Sigma-Aldrich, St Louis, USA	Reactiu
EDTA	Merck KGaA, Darmstadt, Alemanya	Reactiu
Equip MagNA Pure LC	Roche Diagnostic, Almere, Països Baixos	Maquinaria
ESEfinder	http://rulai.cshl.edu/cgibin/tools/ESE3/esefinder.cgi?process=home	Software
Etanol 70%	Merck KGaA, Darmstadt, Alemanya	Reactiu
Etanol absolut	Merck KGaA, Darmstadt, Alemanya	Reactiu
EXOSAP-IT	USB Corporation, Cleveland, USA	Reactiu
Finetti	http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl	Software
Font d'alimentació Consort E734 Model 200/2.0 Powersupply	Bio-rad laboratories, Hercules, USA	Maquinaria
Formamida	Merck KGaA, Darmstadt, Alemanya	Reactiu
Gel Red Nucleic Acid Gel Stain	Biotium, Hayward, USA	Reactiu
GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array	Affymetrix Inc, Santa Clara, USA	Kit
GeneChip® 3' IVT Express Kit	Affymetrix Inc, Santa Clara, USA	Maquinaria
Glicerol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	Solució
HAM F10 10x	Biological Industries, Haemek, Israel	Reactiu
Haploview	http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview	Software
HCl 0,5M	Merck KGaA, Darmstadt, Alemanya	Reactiu
Illumina's GAI sequencer	Illumina Inc, San Diego, USA	Maquinaria
Illumina's Small RNA DGE v1.0 kit	Illumina Inc, San Diego, USA	Maquinaria
Kit de seqüenciació cíclica BigDye® Terminator v3.1	Applied Biosystems, Foster City, USA	Kit

Material i software utilitzat

Kit High Capacity cDNA Reverse Transcription	Applied Biosystems, Foster City, USA	Kit
Kit MagNa Pure LC DNA Isolation	Roche Diagnostic, Almere, Països Baixos	Kit
Kit miRNeasy	QIAGEN GmbH, Hilden, Alemanya	Kit
Kit Oragene-DNA	DNA Genotek Inc, Ottawa, Canadà	Kit
Lightcycler 2.0 instrument	Roche Applied Science, Indianapolis, USA	Maquinaria
Marcador de tamany d'1Kb	Invitrogen, Paisley, Escòcia	Reactiu
Medi de muntatge DPX	Merck KGaA, Darmstadt, Alemanya	Solució
Medi nutritiu HAM F10 1x	Invitrogen, Paisley, Escòcia	Solució
MgCl ₂ 1M	Merck KGaA, Darmstadt, Alemanya	Reactiu
Microscopi òptic de contrast de fases Olympus BX50	Olympus Corporation, Tokyo, Japó	Maquinaria
MutPred	http://mutpred.mutdb.org	Software
NanoDrop 1000 Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA	Maquinaria
N-Lauroylsarcosine	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	Reactiu
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man	Software
Paquet estadístic SPSS	SPSS Corp., Chicago, USA	Software
PBS	Biomérieux, Marcy l'Etoile, França	Reactiu
Percoll comercial	Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suècia	Reactiu
Placa MicroAmp de 96 pous	Applied Biosystems, Singapore, Xina	Maquinaria
PMSF 100mM	Sigma-Aldrich, St Louis, USA	Reactiu
PolyPhen 2	http://genetics.bwh.harvard.edu/pph	Software
Power SYBR Green PCR Master Mix	Applied Biosystems, Foster City, USA	Reactiu
Proteïnasa K	Promega, Madison, USA	Reactiu
APS al 10%	Serva, Heidelberg, Alemanya	Reactiu
Quantity One	Biorad Laboratories, Hercules, USA	Software
SDS	Calbiochem, La Jolla, USA	Reactiu
Seqüenciador automàtic DNA 3100	Applied Biosystems, Foster City, USA	Maquinaria
Sistema informatitzat CASA per l'anàlisi del semen	Proiser, València, Espanya	Maquinaria
SNPInspector	http://www.genomatix.de/online_help/help_gems/SNPInspector.html	Software
Solució de 30% acrilamida – 0,2% bisacrilamida	Sigma-Aldrich, St Louis, USA	Solució
Solució Diff-Quick Fix	Medion Diagnostics, Düdingen, Suïssa	Solució
Solució tenyidora Diff-Quick I	Medion Diagnostics, Düdingen, Suïssa	Solució
Solució tenyidora, Diff Quick II	Medion Diagnostics, Düdingen, Suïssa	Solució
Suite	Saeed et al., 2006	Software
Tampó d'àcid acètic 0,9N	Panreac, Castellar del Vallès, Espanya	Reactiu
TAQ DNA Polymerase Industrial GMP Grade	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanya	Reactiu
TBE 1x	Life Technologies Corporation, Grand Island, USA	Reactiu
TCA 100%	Merck KGaA, Darmstadt, Alemanya	Reactiu
TEM Jeol 1010	JEOL Ltd., Tokyo, Japó	Maquinaria
TEMED	GE Healthcare, Uppsala, Suècia	Reactiu
Termociclador 7300 Real Time PCR System	Applied Biosystems, Carlsbad, USA	Maquinaria
Termociclador PTC-100TM Programmable Thermal Controller	MJ Research, Inc, Waltham, USA	Maquinaria
Tris	USB Corporation, Cleveland, USA	Reactiu
Tris-HCl 10 mM pH 8	USB Corporation, Cleveland, USA	Reactiu
Tritó X-100	Sigma Chemical CO, St Louis, USA	Reactiu

Urea 5,5M	Biorad Laboratories, Hercules, USA	Reactiu
Xilencianol 5%	Merck KGaA, Darmstadt, Alemanya	Reactiu
β -mercaptoetanol	MERCK schuchardt OHG, Hohenbrunn, Alemanya	Reactiu

Annex I

Polymorphisms, haplotypes and mutations in the protamine 1 and 2 genes

ORIGINAL ARTICLE

Polymorphisms, haplotypes and mutations in the protamine 1 and 2 genes

M. Jodar,* J. Oriola,* G. Mestre,* J. Castillo,* A. Giwercman,† J. M. Vidal-Taboada,‡ J. L. Ballescà§ and R. Oliva*

*Human Genetics Research Group, IDIBAPS, Faculty of Medicine, University of Barcelona, Biochemistry and Molecular Genetics Service, Hospital Clinic, Barcelona, Spain, †Reproductive Medicine Center, Molecular Reproductive Medicine Research Unit, Skåne University Hospital Malmö, Lund University, Malmö, Sweden, ‡Biochemistry Unit, Faculty of Medicine, University of Barcelona, and §Institut Clínic de Ginecologia, Obstetricia i Neonatologia, Hospital Clínic i Provincial, Barcelona, Spain

Summary

Keywords:

haplotype, infertility, mutation, P1, P2, *PRM1*, *PRM2*, protamine, SNP, spermatozoa

Correspondence:

Rafael Oliva, Human Genetics Research Group, IDIBAPS, Faculty of Medicine, University of Barcelona, C./Casanova 143, 08036 Barcelona, Spain.
E-mail: roliva@ub.edu

Received 8 April 2010; revised 28 July 2010; accepted 17 August 2010

doi:10.1111/j.1365-2605.2010.01115.x

Protamines are the most abundant nuclear proteins and alterations in their expression have been described in infertile patients. Also, protamine haplo-insufficient mice have been described as infertile. Therefore, the protamine 1 and 2 genes have been considered important candidates in different mutational studies. In this article, we review all published articles related to protamine gene mutations and report new data on mutations from patients and controls drawn from the Spanish and Swedish populations. Sequencing of the protamine 1 and 2 genes in a total of 209 infertile patients and 152 fertility-proven controls from the Spanish and Swedish populations identified two novel and rare non-pathogenic missense mutations (R17C and R38M) in the protamine 1 gene and several additional polymorphisms. Furthermore, we have identified and we report for the first time five novel rare haplotypes encompassing the protamine 1 and 2 genes. A review of all available protamine gene mutational studies indicates that none of the reported missense mutations can be considered of proven pathogenicity. However, it is interesting to note that rare protamine 1 promoter variants have been reported only in infertile patients, but not in fertile control groups. Pathogenic high penetrance protamine gene missense mutations, if any, must be extremely rare. However, the detected presence of rare variants and haplotypes in infertile patients deserves further investigation.

Introduction

Protamines are the most abundant nuclear proteins packaging the male genome in the sperm nucleus (Oliva & Dixon, 1991; Engel *et al.*, 1992; Choi *et al.*, 1997; Kramer *et al.*, 1998; Steger *et al.*, 2000; Eirin-Lopez *et al.*, 2006; Balhorn, 2007; Li *et al.*, 2008; Oliva *et al.*, 2008, 2009). The main proposed functions of these proteins are condensation and streamlining of the sperm cell, protection of the genetic message and epigenetic organization of the paternal genome (Bloch, 1969; Ando *et al.*, 1973; Calvin, 1976; Oliva & Mezquita, 1986; Oliva *et al.*, 1987, 2008, 2009; Oliva & Dixon, 1990, 1991; Oliva, 2006; Balhorn, 2007; Arpanahi *et al.*, 2009; Eirín-López & Ausió, 2009; Hammoud *et al.*, 2009; Björndahl & Kvist, 2010). For reasons of their abundance and specific expression in the

spermatozoa, they have been considered important candidates to explain some of the male idiopathic infertility cases. Indeed, many different studies have demonstrated the presence of an altered expression of protamines in some infertile patients (Balhorn *et al.*, 1988; Bach *et al.*, 1990; Blanchard *et al.*, 1990; Belokopytova *et al.*, 1993; de Yebra *et al.*, 1993, 1998; Bench *et al.*, 1998; Mengual *et al.*, 2003; Aoki *et al.*, 2005, 2006a,b,c,d; Mitchell *et al.*, 2005; Oliva, 2006; Torregrosa *et al.*, 2006; Carrell *et al.*, 2007; de Mateo *et al.*, 2008; Steger *et al.*, 2008; de Mateo *et al.*, 2010). Furthermore, it has been shown in mice that protamine or transition protein haplo-insufficiency results in infertility, abnormal chromatin packaging, DNA damage and altered sperm morphology (Cho *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2004; Suganuma *et al.*, 2005). Therefore, many different groups have performed mutational studies

in infertile patients in search of mutations in the protamine genes that could explain the abnormalities found in protamine expression (Queralt & Oliva, 1993; Queralt *et al.*, 1993, 1995; de Yebra *et al.*, 1993; Schlicker *et al.*, 1994; Schnulle *et al.*, 1994; Kramer *et al.*, 1997; Adroer & Oliva, 1998; Van Den Bussche *et al.*, 2002; Tanaka *et al.*, 2003; Aoki *et al.*, 2006a; Iguchi *et al.*, 2006; Hammoud *et al.*, 2007; Ravel *et al.*, 2007; Gázquez *et al.*, 2008; Kichine *et al.*, 2008; Imken *et al.*, 2009; Tüttelmann *et al.*, 2010). We initiated the present work to perform a review of the literature of all mutations and polymorphisms reported so far and to contribute further with additional data by performing a mutational study of the protamine 1 and 2 genes in the Spanish and Swedish populations.

Materials and methods

Study population and sample collection

Sperm samples were obtained after informed consent from 156 infertility patients defined as 'unexplained sub-fertile men' and with a normal sperm count undergoing intracytoplasmic sperm injection or in vitro fertilization treatment at the Assisted Reproduction Unit of the Hospital Clinic of Barcelona. The criteria for unexplained sub-fertility were the following: 1 year of unprotected intercourse without pregnancy, no known cause of male sub-fertility (cryptorchidism, present or past cancer treatment, genetic abnormality such as Klinefelter's syndrome or Y-chromosome microdeletion, hypogonadotropic hypogonadism, drug abuse, varicocele, recent fever episode), no history of female-related cause of sub-fertility (endometriosis, tubal occlusion, ovulatory disturbance) and no attempt at surgical or medical infertility treatment in the 3 months before the semen analysis. Semen samples were collected in specific sterile containers after at least 3 days of sexual abstinence and were allowed to liquefy. After liquefying the semen, we evaluated sperm parameters according to published recommendations (WHO, 1999) using a computer-assisted semen analyser (CASA; Proiser SL, Valencia, Spain). Sperm morphology was evaluated using Kruger *et al.*'s (1987) strict criteria and at least 100 cells were examined per slide. The average sperm count in the patient group was 60.8 million spermatozoa/mL (range: 8.90–229.20) or 194.26 million of total spermatozoa (range: 15.96–693.12). All patients met at least one of the two conditions for normozoospermia (>20 million spermatozoa/mL or >40 million total spermatozoa) and therefore none was oligozoospermic. The average motility in the patient group was 53.0 ± 23.2 (range: 11.6–100). These infertile patients were divided into subgroups according to the sperm morphology $\leq 9\%$ or $> 9\%$ of normal forms (NF; Gázquez *et al.*, 2008). Of the 156 patients, 85 had sperm morphology $\leq 9\%$ NF and 71 had

sperm morphology $> 9\%$ NF. The average motility in each of these sub-groups was 47.7 ± 19.1 (range: 11.6–83.7) for the patient group with $\leq 9\%$ NF, and 57.1 ± 21.4 (range: 26.1–100) for the patient group with $> 9\%$ NF. In addition, DNA from 102 men of known paternity was obtained from department of Legal Medicine of University of Barcelona and included as fertile controls. No semen parameters were known for this fertile control group. In addition, with the initial goal of assessing the c.-191 C > A variation in the protamine 1 gene in an independent population, we included a total of 53 infertile patients from southern Sweden aged 18–45 years, referred to the outpatient clinic of the Reproductive Medicine Centre (Malmö, Sweden) for infertility work up and defined as 'unexplained sub-fertile men' based on the aforesaid criteria. The average sperm count in the patient group was 60.2 million spermatozoa/mL (range: 8.90–229.20 million) or 221.39 million of total spermatozoa (range: 15.96–693.12 million). All patients met at least one of the two conditions for normozoospermia and therefore none was oligozoospermic. Five of these patients had more than 9% of NFs and 48 had less than 9% of NFs. As controls for the Swedish population, 50 men aged 18–45 years were recruited at the antenatal care clinic of the Department of Gynaecology (Skåne University Hospital, Malmö, Sweden) at the time of routine second trimester ultrasound of the ongoing pregnancy of their partners. Men with conditions known to affect male fertility were excluded from the study. The average sperm count in the control group was 100.53 million spermatozoa/mL (range: 25.8–298) or 314.72 million of total spermatozoa (range: 36.9–1298.9). All controls met at least one of the two conditions for normozoospermia. All controls had more than 9% of NFs.

Isolation of DNA from sperm samples

DNA was extracted from an aliquot of the semen samples using a modified guanidinium thiocyanate method (Hossain *et al.*, 1997). The spermatozoa were separated from seminal plasma by centrifugation (3000 g) during 10 min at 4 °C and washed with 1× phosphate-buffered saline. The sperm pellet was lysed in a lysis buffer (5×10^6 to 10×10^6 spermatozoa/mL) containing 6 M guanidinium, 30 mM sodium citrate (pH 7.0), 0.5% sarkosyl, 0.20 mg/mL proteinase K and 0.3 M β -mercaptoethanol, and incubated at 55 °C for 3 h. Isopropyl alcohol (half of the volume of lysate) was added directly to the lysate and the tube containing the mix was inverted back and forth until the DNA fibres clumped together. After a centrifugation (12 000 g) for 10 min at room temperature, the DNA pellet was washed in 1 mL of 70% ethanol twice. The recovered DNA was dissolved in 50 mM of Tris-EDTA buffer.

Sequencing of the protamine 1 and 2 genes

Coding and non-coding regions of the protamine genes were amplified using standard polymerase chain reaction (PCR) techniques (Tanaka *et al.*, 2003; Hammoud *et al.*, 2007; Gázquez *et al.*, 2008). The sequences of the primers used have been previously described (Tanaka *et al.*, 2003; Hammoud *et al.*, 2007). The PCR conditions were as follows: 96 °C for 5 min followed by 35 cycles of 96 °C for 30 s, annealing temperature for 30 s (P1: 62 °C; P2: 56 °C), base extension at 72 °C (P1: 1 min; P2: 5 min) and a final extension of 5 min at 72 °C. The PCR-amplified fragments were purified using ExoSAP-IT (USB, Cleveland, OH, USA) and directly sequenced using the BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), and analysed using a 3100 automated DNA sequencer (Applied Biosystems).

Transmission electron microscopy

An aliquot of 15 million of sperm cells corresponding to the patient with the *PRM1* R17C mutation and to a fertility-proven normozoospermic sperm donor was fixed with 2% paraformaldehyde (PF) and 5% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) overnight at 4 °C and centrifuged at 8950 g for 10 min. The pellet was washed with the same buffer several times and postfixed in a 1% osmium tetroxide solution with 0.8% potassium ferrocyanide, and dehydrated in acetone gradients. Finally, the sample was incorporated into an epoxy Spurr resin. Sections of approximately 80 nm were obtained using the Ultracut E (Reichert-Jung, Vienna, Austria) and a diamond knife (Diatome, Biel, Switzerland). The sections were kept in a copper grid and contrasted in 2% uranyl acetate and lead citrate for observation under a Jeol 1010 microscope (Jeol Ltd, Tokyo, Japan) at 8 kv acceleration. The images were captured using the Bioscan camera (Gatan, Pleasanton, CA, USA).

Evaluation of the sperm P1/P2 ratio

A total of 159 sperm samples (97 already previously genotyped by Gázquez *et al.*, 2008; but without knowledge of the protamine P1/P2 ratio, and 62 from new patients included in the present study) corresponding to infertility patients from the Assisted Reproduction Unit of the Hospital Clinic of Barcelona were further processed for analysis of protamines (17 of those were c.-191 *PRM1* AA homozygotes, 58 AC heterozygotes and 84 CC homozygotes). An aliquot of the semen sample containing 10 million spermatozoa was washed twice with Ham F10 1×. The sediment was resuspended in 200 µL of 20 mM EDTA, 1 mM phenylmethyl sulphonyl fluoride (PMSF;

Sigma Chemicals, St Louis, MO, USA) and 100 mM of Tris-HCl (pH 8), and then processed as described in de Yebra & Oliva (1993), with the variant that no iodoacetate treatment was performed (Mengual *et al.*, 2003; Torregrosa *et al.*, 2006; de Mateo *et al.*, 2008). Nuclear proteins were analysed in acid-urea polyacrylamide gels as described previously (Torregrosa *et al.*, 2006) with the exception that the staining of the gels was performed with EzBlue Gel Staining Reagent (Sigma) following the manufacturer's instructions. The stained gels were then scanned and the intensity of the bands was quantified using the QUANTITY ONE software (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The P1/P2 ratio was finally calculated by performing the direct quotient of the intensities of the P1 and P2 bands (Mengual *et al.*, 2003; Aoki *et al.*, 2005; Torregrosa *et al.*, 2006; de Mateo *et al.*, 2008).

Statistical analysis

The genotype distribution in the different populations (Spanish and Sweden) was analysed for Hardy–Weinberg equilibrium using the FINETTI software (<http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>) and performing the Pearson test. Subsequently, the SPSS 16.0 statistical software package (SPSS Corp., Chicago, IL, USA) was used to search for statistical differences in the frequency of the detected changes between groups. The single nucleotide polymorphism (SNP) frequencies were compared among the different groups using chi-squared test to determine if there was a significant difference in the occurrence of SNPs. The haplotypes were determined using the genotyping data of the SNPs located in the PRM1–PRM2 region and analysed using the HAPLOVIEW software (Barrett *et al.*, 2005). A non-parametric Mann–Whitney test was used to detect differences in the sperm P1/P2 ratio in the patients grouped according to genotype. All statistical tests were evaluated by using at least a significance level of 0.05. In addition, adjusted logistic regression analyses for the single SNP markers identified in the Spanish patients were performed for different inheritance models (dominant, recessive, additive, codominant or overdominant) taking into account the sperm parameters (morphology, motility) using the SNPASSOC software (González *et al.*, 2007), and the odds ratio (OR), the 95% confidence interval (CI) and the Akaike's information criterion were calculated using Bonferroni correction for multiple testing (corrected $\alpha = 0.0083$).

Meta-analysis of the protamine 1 R34S mutation

The inclusion criteria to perform the R34S meta-analysis were the following: (i) original articles, published in English and listed in PubMed; (2) studying the protamine

1 R34S mutation either by directly sequencing methodology or restriction fragment length polymorphisms (RFLPs); (iii) being case-control studies where the controls were fertile; and (iv) the cases were infertile patients with idiopathic infertility and including all subtypes (azoospermia, oligozoospermia, teratozoospermia and normozoospermia). In accordance with these inclusion criteria, the studies by Hammoud *et al.* (2007) and Gázquez *et al.* (2008) were excluded because they only studied the protamine 1 promoter region. The study by Tüttelmann *et al.* (2010) was also excluded because it did not include fertile controls. In addition, 61 patients from Kichine *et al.* (2008) were also excluded because they had a known cause of infertility and 76 controls from Imken *et al.* (2009) were excluded because the fertility status was unknown. The study-by-study comparisons were synthesized with a standard meta-analytical approach applied to the ORs of the individual 2×2 tables (Egger *et al.*, 2001). We tested the study homogeneity and depending on whether homogeneity was accepted or rejected, we used the fixed or the random effect model for meta-analysis to calculate an overall OR and its 95% CI. We used the Q statistics to test between study homogeneity: homogeneity was rejected when the Q statistic *p*-value was <0.10. A meta-regression was used to evaluate the overall conclusions if the infertility was affected by the presence of specific mutation (Egger *et al.*, 2001). The meta-analysis was conducted using META-ANALYST 3.13 statistical software (Tufts Medical Center, Boston, MA, USA; Wallace *et al.*, 2009).

Meta-analysis of the rare protamine 1 promoter variants

Rare variants are defined as SNPs having an allelic frequency of <1%. The inclusion criteria for the meta-analysis were the following: (i) original articles, published in English and listed in PubMed; (ii) completely studying by direct sequencing of the protamine 1 promoter region up to -512 bp; (iii) being case-control studies where the controls were fertile; and (iv) the cases were infertile patients with idiopathic infertility and including all subtypes (azoospermia, oligozoospermia, teratozoospermia and normozoospermia). To fulfil these inclusion criteria, the studies by Tanaka *et al.* (2003), Aoki *et al.* (2006a), Iguchi *et al.* (2006) and Tüttelmann *et al.* (2010) were excluded because they only studied the coding regions of the protamine 1 gene. The studies by Gázquez *et al.* (2008) and Kichine *et al.* (2008) were also excluded because they only studied one variant of the protamine 1 promoter using RFLPs. Finally, 76 controls from the Imken *et al.* (2009) study were also excluded because they had an unknown fertility state. The rest of the procedure to perform the rare protamine 1 promoter variants

meta-analysis was identical to that described before for the R34S mutation.

Results

Mutational study of the protamine 1 gene

A total of seven SNPs were identified in the protamine 1 gene in the Spanish population (two in the 5' promoter region, three in the coding region, one in the intronic region and one in the 3' untranslated region) in a total of 258 human men, including 156 infertile patients and 102 fertile controls (Table 1). We also identified five SNPs in the Swedish population (one in the 5' promoter region, three in the coding region and one in the 3' untranslated region) in a total of 103 human men, including 53 infertile patients and 50 fertile controls (Table 1).

Of all the SNPs identified, three corresponded to missense mutations in the coding region at positions c.49 C > T (R17C), c.102 G > T (R34S; rs 35576928) and c.113 G > T (R38M). Also, the c.139 C > A (R47R; rs 737008) common silent polymorphism located in exon 2 was detected. Of the three missense mutations identified, one was previously described and the other two are novel variants. The c.102 G > T mutation causes an amino acid change of arginine to serine (R34S) and was detected in fertile controls and patients at similar allelic frequencies. The c.49 C > T SNP causes an amino acid change of arginine to cysteine (R17C) and was detected in an infertile patient with normal sperm count, but with abnormal morphology and motility. In this patient, the presence of immature cells and sperm with coiled tails was observed (Fig. 1A). Genotyping of the mother of the patient excluded her as the carrier of this mutation, implying that this mutation had been most likely inherited from the fertile father (three daughters and one son) who was unavailable for study (Fig. 1C). This R17C mutation was also detected in one of the sisters of the patient (Fig. 1C). The c.113 G > T that causes an amino acid change of arginine to methionine (R38M) was detected in a fertile control, and may also represent a rare polymorphic variant with little or no impact on fertility.

Only one change was detected in the intronic region at position c.112 + 40 G > A. This variant was detected in an infertile asthenoteratozoospermic patient. In silico studies did not provide evidence for the generation of potential new splicing variants (data not shown). Two changes were identified in the 3' untranslated region. The variant c.153*96 A > G was reported previously (Tanaka *et al.*, 2003; Hammoud *et al.*, 2007) as a rare variant present in infertile patients and fertile controls and our data are consistent with this hypothesis. The other variant, c.153*4 T > A, is a newly identified SNP detected in an infertile asthenoteratozoospermic patient.

Table 1 Identified single nucleotide polymorphisms in the protamine 1 gene. The allelic frequencies of the different polymorphisms are shown followed by genotype absolute numbers in parentheses (rare homozygous, heterozygous, wild-type homozygous)

Mutation	Gene region	Amino acid change	Allele frequency (genotype distribution)	
			Infertile patients	Fertile controls
Spanish population			<i>n</i> = 156	<i>n</i> = 102
c.-248 C > A	5' promoter region	–	0.003 A (0, 1, 155)	0.000 A (0, 0, 102)
c.-191 C > A	5' promoter region	–	0.260 A (13, 55, 88)	0.225 A (4, 38, 60)
c. 49 C > T	Exon 1	R17C	0.003 T (0, 1, 155)	0.000 T (0, 0, 102)
c.102 G > T	Exon 1	R34S	0.003 T (0, 1, 155)	0.000 T (0, 0, 102)
c.112 + 40 G > A (g.152 G > A)	Intron	–	0.003 A (0, 1, 155)	0.000 A (0, 0, 102)
c.139 A > C (g.230 A > C)	Exon 2	R47R	0.282 C (12, 64, 80)	0.339 C (14, 41, 47)
c.153*4 T > A (g.248 T > A)	3' UTR	–	0.003 A (0, 1, 155)	0.000 A (0, 0, 102)
Swedish population			<i>n</i> = 53	<i>n</i> = 50
c.-191 C > A	5' promoter region	–	0.274 A (1, 27, 25)	0.310 A (7, 17, 26)
c.102 G > T	Exon 1	R34S	0.009 T (0, 1, 52)	0.010 T (0, 1, 49)
c.113 G > T	Exon 2	R38M	0.000 T (0, 0, 53)	0.010 T (0, 1, 49)
c.139 A > C (g.230 A > C)	Exon 2	R47R	0.302 C (2, 28, 23)	0.280 C (4, 20, 26)
c.153*96 A > G (g.340 A > G)	3' UTR	–	0.000 G (0, 0, 53)	0.010 G (0, 1, 49)

UTR, untranslated region.

In the promoter region, two different changes have been detected (Table 1). The -248C > A is a rare variant detected only in one of the patients. The other change (-191C > A) corresponds to a frequent polymorphism previously reported by our group as a risk factor for abnormal sperm morphology (Gázquez *et al.*, 2008). Our results on the present independent set of patients and controls from the Spanish population indicate that the c.-191AA genotype is also more frequent in patients with abnormal morphology ($\leq 9\%$ NF; 10.6%, 9/85) as compared with patients with $> 9\%$ NF (5.63%, 4/71), although the differences did not reach statistical significance. However, pooling our presently analysed samples to the previously reported series (Gázquez *et al.*, 2008) further confirms the -191AA genotype as a risk factor for altered sperm morphology in the Spanish population (10.5%, 13/124, in $\leq 9\%$ NF as compared with 4.6%, 9/198, in $> 9\%$ NF; $p < 0.05$ Table 2). An independent population, the Swedish population, was also genotyped and the results are also shown in Table 1. In this independent population, the AA genotype turns out to be present in a lower frequency in patients (1.9%, 1/53) as compared with controls (14%, 7/50). However, we found that the genotype data for this polymorphism in the Swedish population deviated from the Hardy–Weinberg equilibrium ($p < 0.05$). This result prompted us to look into greater detail the test results for the Hardy–Weinberg equilibrium in the Spanish population. The results indicate that although the AA genotype strictly followed the Hardy–Weinberg equilibrium in the Spanish population, the detected p -value (0.08; Pearson) was not far away from the conventional value for significance.

The association analysis of the -191C > A SNP in the Spanish infertile patient group with the total sperm motility indicated that this sperm parameter was not associated with the genotypes of this SNP under any of the inheritance models. However, the genetic association analysis for the -191C > A SNP and the morphology when it is adjusted by the total sperm motility indicates that this SNP is distributed differentially between the patients with $\leq 9\%$ NF as compared with patients with $> 9\%$ and that these differences have a statistical significance under recessive ($p = 0.0058$) and codominant ($p = 0.0219$) models of inheritance. The best Akaike's information criterion for the -191C > A association with the disease models of inheritance was that corresponding to the recessive model. In our infertile group, under a recessive model, the c.-191AA genotype is a genetic risk factor for the teratozoospermic phenotype (OR = 6.73, 95% CI = 1.65–27.42, $p = 0.0058$). After applying the Bonferroni correction for multiple testing, this association remained statistically significant.

Mutational study of the protamine 2 gene

A total of 15 variants were identified in the protamine 2 gene in the Spanish population (Table 3). Seven of the variants are present in the 5' promoter region, two in the coding region, five in the intronic region and one in the 3' untranslated region. Four of the variants detected in the 5' promoter region [-392G > A, -389T > C (rs376374), -371G > C (rs8060767), -226G > A (rs74459443); Table 3] have been detected at a similar frequency in patients and controls consistently with the previous description of these variants as polymorphisms (Hammoud *et al.*, 2007).

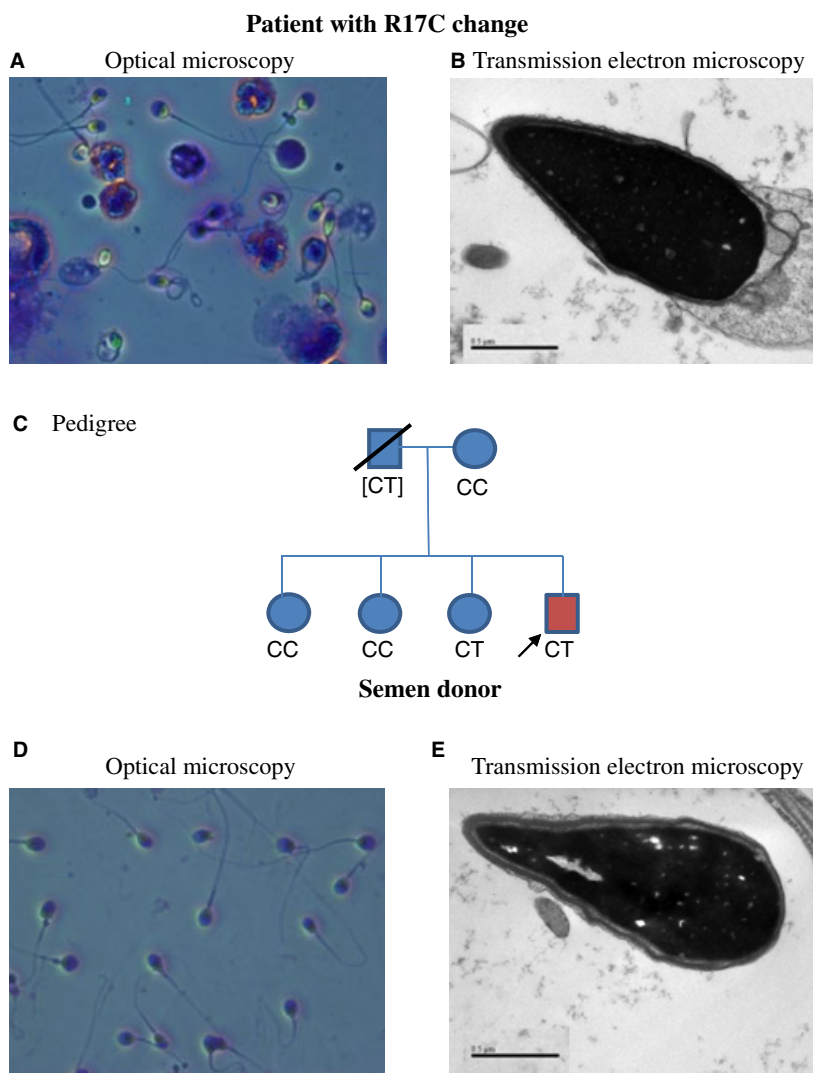


Figure 1 Morphology of the sperm cells and pedigree of the patient with the protamine 1 c.49C > T single nucleotide polymorphism (R17C) as compared with the morphology of a semen donor. (A) Optical microscopy of the sperm cells in the patient with the R17C change. (B) Transmission electron microscopy of one representative sperm cell of the patient with the R17C variant. (C) Pedigree of the patient with the R17C mutation. (D) Optical microscopy image of the sperm cells in a semen donor (control sample). (E) Transmission electron microscopy image of the one sperm cell in semen donor (control sample).

The other three variants detected are novel so far unreported SNPs (Table 3). The heterozygous variants c.-512 T > G and c.-123 C > G have been detected only in one patient each. The variant c.-321C > T was detected in seven patients and in one fertile control, although the differences did not reach statistical significance.

The two variants detected in coding region are both rare silent heterozygous synonymous polymorphisms located in exon 1 (c.66 T > C and c.201 C > T) and have been previously reported (Aoki *et al.*, 2006a; Imken *et al.*, 2009). The five variants detected in the intronic region have also been previously reported (Tanaka *et al.*, 2003; Aoki *et al.*, 2006a; Imken *et al.*, 2009; Tüttelmann *et al.*, 2010). The variant c.309*61 G > C present in the 3' untranslated region has been detected both in patients and in fertile controls, consistent with previously reported data (Hammoud *et al.*, 2007).

Haplotype analysis of the SNPs present in the protamine 1 and 2 genes

One of the goals of the present study has been to establish the most common haplotypes present in the protamine 1 and 2 genes in our population, taking advantage of the proximity of the two protamine genes and the fact that we have detected two common SNPs in protamine 1 gene and four common SNPs in the protamine 2 gene. With this information, we have defined four haplotypes (1–4) present in 97.52% of the chromosomes in the Spanish population, and five additional rare haplotypes (5–9) present in 2.48% of the chromosomes in our population (Fig. 2B). The frequency of the common haplotypes was not significantly different between infertile patients with NF ≤ 9% and infertile patients with NF > 9% (Fig. 2C). However, it is interesting to point out the

Table 2 Genotype and allelic frequencies of the promoter c.-191 CA polymorphism in the infertile patients from the Spanish population who were divided into two subgroups regarding altered sperm morphology. The different genotype frequencies are shown next to the absolute numbers in parentheses. The patients included in this table ($n = 322$) correspond to 156 new patients included in the present study pooled to 166 patients previously reported (Gázquez *et al.*, 2008)

	Morphology (infertile patients)			
	NF \leq 9%		NF $>$ 9%	
Spanish population	(n = 124)		(n = 198)	
Genotype				
CC% (n)	54	(67)	54	(107)
CA% (n)	35.5	(44)	41.4	(82)
AA% (n)	10.5 ^a	(13)	4.6	(9)
Allelic frequency				
C (n)	0.718	(178)	0.747	(296)
A (n)	0.282	(70)	0.253	(100)

^aAA genotype frequency in patients with \leq 9% NF significantly higher than that present in patients with $>$ 9% NF ($p < 0.05$) as compared with the CC and CA genotype frequencies.
NF, normal forms.

presence of an increased frequency of the most common haplotype in fertile controls as compared with infertile patients (Fig. 2D). Also, it is interesting that the frequency of all rare haplotypes (5–9) combined was found to be more in patients with abnormal sperm morphology (0.050) as compared with patients with normal sperm morphology (0.010), although the differences did not

reach significance ($p = 0.087$). We also noticed that the presence of rare SNP variants (SNPs with an allelic frequency $<$ 1%) was overrepresented among the rare haplotypes (four rare variants present in 28 individuals with rare haplotypes as compared with four rare variants in 286 individuals with common haplotypes; $p < 0.0001$). The rare variants *PRM1* c.153*4 T $>$ A and *PRM2* c.271 + 135 C $>$ T were associated with the infrequent haplotype 5, and the rare variants *PRM2* c.271 + 10 C $>$ T and *PRM2* c.271 + 19 C $>$ T were associated with the rare haplotype 6.

Correlation of the protamine 1 promoter -191C $>$ A polymorphism with the protamine P1/P2 ratio

The protamine P1/P2 ratio was determined in 62 of the 156 infertile Spanish patients genotyped in the present study. In addition, the P1/P2 ratio was determined in 97 infertile patients previously genotyped for the c.-191C $>$ A polymorphism, but without knowledge of the protamine P1/P2 ratio (Gázquez *et al.*, 2008). In this group of 159 (62 + 97) patients, an increased protamine P1/P2 ratio was detected in patients with the protamine 1 promoter -191AA genotype (P1/P2 ratio = 1.49 in the AA patients, 1.40 in the AC patients and 1.31 in the CC patients; $p < 0.05$; Mann–Whitney). This result confirms the previously reported association between the presence of the protamine 1 -191C $>$ A polymorphism and the protamine ratio (Gázquez *et al.*, 2008) in an independent group of patients from the Spanish population.

Table 3 Identified single nucleotide polymorphisms in the protamine 2 gene in the present work. The allelic frequencies of the different polymorphisms are shown followed by genotype absolute numbers in parenthesis (rare homozygous, heterozygous, wild-type homozygous)

Mutation	Gene region	Amino acid change	Allele frequency (genotype distribution)	
			Infertile patients	Fertile controls
Spanish population			$n = 111$	$n = 50$
c.-512 T $>$ G	5' promoter region	–	0.004 G (0, 1, 110)	0.000 G (0, 0, 50)
c.-392 G $>$ A	5' promoter region	–	0.022 A (0, 5, 106)	0.010 A (0, 1, 49)
c.-389 T $>$ C	5' promoter region	–	0.243 C (8, 38, 65)	0.330 C (5, 23, 22)
c.-371 G $>$ C	5' promoter region	–	0.306 C (9, 50, 52)	0.260 C (4, 18, 28)
c.-321 C $>$ T	5' promoter region	–	0.031 T (0, 7, 104)	0.010 T (0, 1, 49)
c.-226 G $>$ A	5' promoter region	–	0.059 A (0, 13, 98)	0.100 A (0, 10, 40)
c.-123 C $>$ G	5' promoter region	–	0.004 G (0, 1, 110)	0.000 G (0, 0, 50)
c.66 T $>$ C	Exon 1	H22H	0.004 C (0, 1, 110)	0.000 C (0, 0, 50)
c.201 C $>$ T	Exon 1	H52H	0.000 T (0, 0, 111)	0.010 T (0, 1, 49)
c.271 + 10 C $>$ T (g.281 C $>$ T)	Intron	–	0.004 T (0, 1, 110)	0.010 T (0, 1, 49)
c.271 + 19 C $>$ T (g.290 C $>$ T)	Intron	–	0.004 T (0, 1, 110)	0.010 T (0, 1, 49)
c.271 + 27 G $>$ C (g.298 G $>$ C)	Intron	–	0.441 C (22, 54, 35)	0.400 C (11, 18, 21)
c.271 + 102 C $>$ A (g.373 C $>$ A)	Intron	–	0.248 A (8, 39, 64)	0.330 A (5, 23, 22)
c.271 + 135 C $>$ T (g.406 C $>$ T)	Intron	–	0.004 T (0, 1, 110)	0.000 T (0, 0, 50)
c.309*61 G $>$ C (g.532 G $>$ C)	3' UTR	–	0.009 C (0, 2, 109)	0.010 C (0, 1, 49)

UTR, untranslated region.

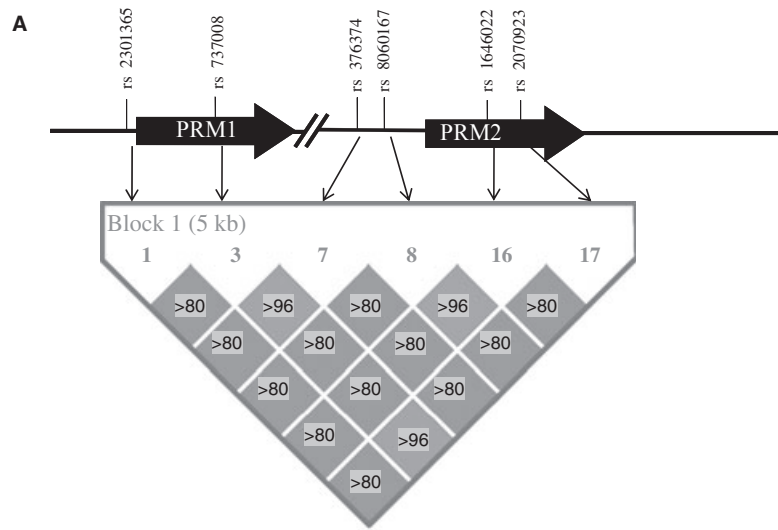


Figure 2 Protamine locus haplotypes defined in the Spanish population. The haplotypes were determined using the genotyping data of the single nucleotide polymorphisms (SNPs) located in the PRM1–PRM2 region and analysed using the Haploview software. (A) The pair wise linkage disequilibrium of the six common SNPs is shown. (B) The nine haplotypes detected in the Spanish population are shown along with their sequence. The first four (1–4) haplotypes were present in 97.52% of the chromosomes. (C) Haplotype frequency in infertile patients with abnormal morphology ($\leq 9\%$) as compared with patients with $>9\%$ natural form. It is interesting to note the non-significant tendency for the rare haplotypes (5–9) to be increased in patients with abnormal morphology. (D) Frequency of the nine haplotypes in the infertile patient group as compared with the fertile controls.

Haplotypes	rs 2301365	rs 737008	rs 376374	rs 8060167	rs 1646022	rs 2070923	Infertile patients			Infertile patients	Fertile controls	P
							NF $\leq 9\%$	NF $> 9\%$	P			
1	C	C	C	G	G	A	0.225	0.245	NS	0.234	0.330	0.071
2	C	A	T	G	C	C	0.175	0.186	NS	0.180	0.210	NS
3	C	A	T	C	G	C	0.292	0.314	NS	0.302	0.260	NS
4	A	A	T	G	C	C	0.258	0.245	NS	0.252	0.190	NS
5	C	C	T	G	G	C	0.017 (2)	0.000	NS	0.009 (2)	0.000	NS
6	C	A	T	G	G	C	0.008 (1)	0.000	NS	0.005 (1)	0.010 (1)	NS
7	C	A	T	G	C	A	0.000	0.010 (1)	NS	0.005 (1)	0.000	NS
8	C	A	T	C	C	C	0.008 (1)	0.000	NS	0.005 (1)	0.000	NS
9	C	A	C	G	G	A	0.017 (2)	0.000	NS	0.009 (2)	0.000	NS
All rare haplotypes (5 to 9)							0.050	0.010	0.087	0.031	0.01	NS

Review of all published protamine 1 and 2 gene mutational studies

A summary of all reported mutational studies in the protamine 1 and 2 genes is given in Tables 4 and 5. A total of 22 changes have been reported in the protamine 1 gene and 23 in the protamine 2 gene. However, of all these changes, only six (of which four had been previously reported and two are novel and reported in the present work) result in missense mutations in the protamine 1 gene, and only one nonsense change has been detected in the protamine 2 gene. The location of the missense mutations so far reported in the protamine 1 gene is shown in Fig. 3 along with an alignment of the protamine 1 amino acid sequences in different mammals and the conservation of the different amino acid positions (Retief et al., 1993; Queralt et al., 1995). There is a low conservation score in mammals in the sites corresponding to the mutations indicated as non-pathogenic (Fig. 3A) as derived from segregation analysis (Fig. 1C) or presence in controls (Fig. 3A). The S22N mutation has so far only been reported in one infertile patient and in none of the controls (Fig. 3A). While this fact is com-

patible with (but does not prove) pathogenicity for this mutation, the extremely low conservation score (Fig. 3B) adds support to the possibility that it may be a non-pathogenic polymorphism. The C40Y mutation corresponds to a quite well-conserved residue in mammals and has so far only been described in one infertile patient (Fig. 3A). Thus, this C40Y mutation could be pathogenic mutation, although a formal demonstration of pathogenicity would require detecting this mutation in an independent set of patients or performing functional studies. Apart from the indicated resequencing studies, the most frequent missense mutation (R34S) was specifically studied by RFLP in one additional study (Kichine et al., 2008). A summary of all published reports on the R34S mutation is given in Table 6 with specification of the phenotypes studied. This mutation corresponds to a quite well-conserved residue (Fig. 3B). The result of the meta-analysis of the R34S mutation including all types of patients is shown in Fig. S1, and indicates that the presence of this variant does not result in increased risk of infertility. In addition, as this variant cannot be predicted to result in azoospermia, we repeated the meta-analysis excluding the azoospermic

Table 4 Identified single nucleotide polymorphisms in the protamine 1 gene in different studies

Nucleotide change	Region	Amino acid change	NCBI ID	Mutation described only in patients	Statistically significant differences between control vs. patients	Comments	References
c.-275 G > T	5' promoter region	NA	rs 74007631	Yes	No	Rare variant	Hammoud et al. (2007)
c.-248 C > A	5' promoter region	NA		Yes	No	Rare variant	Hammoud et al. (2007), present work
c.-238 G > A	5' promoter region	NA		Yes	No	Rare variant	Hammoud et al. (2007)
c.-191 C > A	5' promoter region	NA	rs 2301365	No	No	Polymorphism	Hammoud et al. (2007), Ravel et al. (2007), Imken et al. (2009)
				No	Yes	Risk factor for abnormal morphology	Gázquez et al. (2008), present work
c.-114 C > T	5' promoter region	NA		Yes	No	Rare variant	Hammoud et al. (2007)
c.-107 G > C	5' UTR	NA	rs 74007629	Yes	No	Rare variant	Hammoud et al. (2007)
				Yes	No	Create new binding site?	Ravel et al. (2007), Imken et al. (2009)
				No	No	Population-specific variant	Kichine et al. (2008)
c.-102 C > T	5' UTR	NA		Yes	No	Rare variant	Hammoud et al. (2007)
c.42 A > G	Exon 1	None		No	No	Rare variant	Tanaka et al. (2003)
c.49 C > T	Exon 1	Arg17Cys		Yes	No	Pathogenicity unknown	Present work
c.54 G > A	Exon 1	None	rs 3526993	No	No	Rare variant	Aoki et al. (2006a), Ravel et al. (2007), Imken et al. (2009)
c.65 G > A	Exon 1	Ser22Asn		Yes	-	Rare variant	Tüttelmann et al. (2010)
				Yes	No	Pathogenicity unknown	Imken et al. (2009)
c.69 C > A	Exon 1	None		No	No	Rare variant	Tanaka et al. (2003)
c.93 G > C	Exon 1	Gln31His		No	No	Rare variant	Ravel et al. (2007)
c.102 G > T	Exon 1	Arg34Ser	rs 35576928	Yes	No	Create a new site for phosphorylation?	Iguchi et al. (2006), Ravel et al. (2007)
				No	No	Rare variant	Aoki et al. (2006a), Kichine et al. (2008), present work
				Yes	-	Rare variant	Tüttelmann et al. (2010)
c.112 + 40 G > A	Intron	NA		Yes	No	Pathogenicity unknown	Present work
c.113 G > T	Exon 2	Arg38Met		No	No	Rare variant	Present work
c.119 G > A	Exon 2	Cys40Tyr		Yes	No	Pathogenicity unknown	Ravel et al. (2007)
c.138 G > A	Exon 2	None		Yes	No	Rare variant	Tanaka et al. (2003)
c.139 C > A	Exon 2	None	rs 737008	No	No	Polymorphism	Tanaka et al. (2003), Iguchi et al. (2006), Aoki et al. (2006a), Ravel et al. (2007), Imken et al. (2009), present work
				Yes	-	Polymorphism	Tüttelmann et al. (2010)
c.153*4 T > A	3' UTR	NA		Yes	No	Pathogenicity unknown	Present work
c.153*89 C > T	3' UTR	NA		Yes	No	Rare variant	Hammoud et al. (2007)
c.153*96 A > G	3' UTR	NA		No	No	Rare variant	Tanaka et al. (2003), Hammoud et al. (2007), present work

NA, not applicable; UTR, untranslated region.

Table 5 Identified single nucleotide polymorphisms in the protamine 2 gene in different studies

Nucleotide change	Region	Amino acid change	NCBI ID	Mutation described only in patients	Statistically significant differences between control vs. patients	Comments	References
c.-512 T > G	5' promoter region	NA		Yes	No	Rare variant	Present work
c.-392 G > A	5' promoter region	NA		No	No	Polymorphism	Hammoud et al. (2007), present work
c.-389 T > C	5' promoter region	NA	rs 376374	No	No	Polymorphism	Hammoud et al. (2007), present work
c.-371 G > C	5' promoter region	NA	rs 8060767	No	No	Polymorphism	Hammoud et al. (2007), present work
c.-321 C > T	5' promoter region	NA		No	No	Polymorphism	Present work
c.-226 G > A	5' promoter region	NA	rs 74459443	No	No	Polymorphism	Hammoud et al. (2007), present work
c.-123 C > G	5' promoter region	NA		Yes	No	Pathogenicity unknown	Present work
c.-67 C > T	5' UTR	NA		Yes	No	Potential interference transcription	Imken et al. (2009)
c.66 T > C	Exon 1	None		No	No	Rare variant	Aoki et al. (2006a), present work
c.87 C > T	Exon 1	None		Yes	–	Rare variant	Tüttelmann et al. (2010)
c.148 C > T	Exon 1	Gln50Ter		No	No	Rare variant	Imken et al. (2009)
c.201 C > T	Exon 1	None		Yes	No	Null allele	Tanaka et al. (2003)
				No	No	Rare variant	Aoki et al. (2006a), Imken et al. (2009), present work
c.271 + 10 C > T	Intron	NA	rs 74007626	Yes	–	Rare variant	Tüttelmann et al. (2010)
				Yes	No	Novel donor splice site?	Aoki et al. (2006a)
				Yes	Yes	Novel donor splice site?	Imken et al. (2009)
				No	No	Rare variant	Present work
c.271 + 17 G > C	Intron	NA		Yes	–	Rare variant	Tüttelmann et al. (2010)
c.271 + 19 C > T	Intron	NA	rs 74007625	No	No	Rare variant	Imken et al. (2009)
				Yes	No	Novel donor splice site?	Aoki et al. (2006a)
				No	No	Rare variant	Imken et al. (2009), present work
c.271 + 27 G > C	Intron	NA	rs 1646022	Yes	–	Rare variant	Tüttelmann et al. (2010)
				No	No	Polymorphism	Tanaka et al. (2003), Aoki et al. (2006a), Imken et al. (2009), present work
c.271 + 27 G > A	Intron	NA		Yes	–	Polymorphism	Tüttelmann et al. (2010)
c.271 + 29 A > G	Intron	NA		No	No	Rare variant	Tanaka et al. (2003)
c.271 + 102 C > A	Intron	NA	rs 2070923	Yes	–	Rare variant	Tüttelmann et al. (2010)
				No	No	Polymorphism	Tanaka et al. (2003), Aoki et al. (2006a), Imken et al. (2009), present work
c.271 + 106 C > A	Intron	NA		Yes	–	Polymorphism	Tüttelmann et al. (2010)
c.271 + 107 G > A	Intron	NA		Yes	–	Rare variant	Tüttelmann et al. (2010)
				Yes	No	Novel donor splice site?	Imken et al. (2009)
c.271 + 135 C > T	Intron	NA		Yes	No	Novel donor splice site?	Aoki et al. (2006a), present work
				Yes	No	Novel donor splice site?	Aoki et al. (2006a), present work
c.309*61 G > C	3' UTR	NA	rs 79674436	No	No	Rare variant	Imken et al. (2009)
				No	No	Abnormal P1/P2	Hammoud et al. (2007)
				No	No	Rare variant	Present work

UTR, untranslated region.

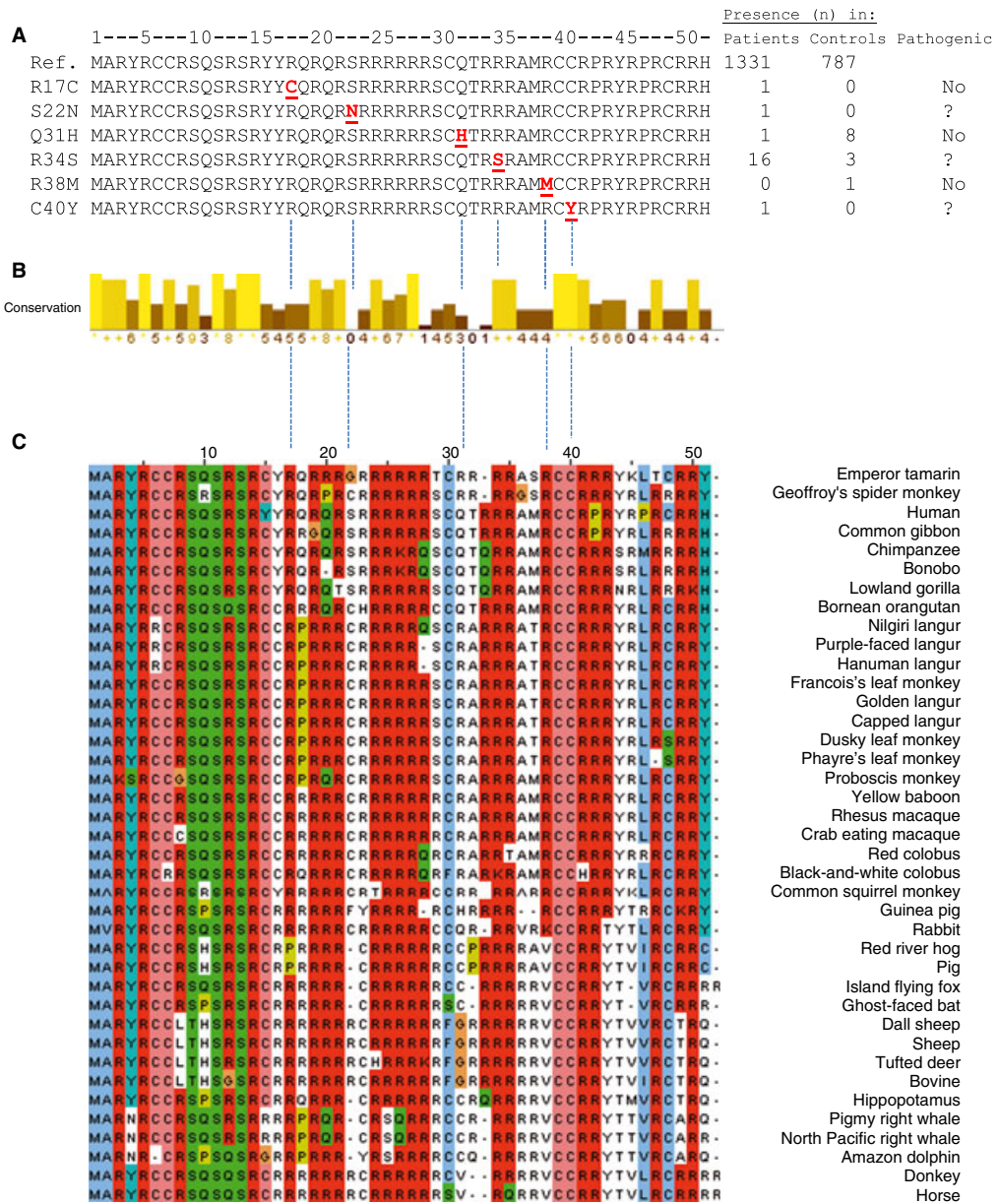


Figure 3 Missense mutations reported in the protamine 1 gene. (A) Alignment of the predicted missense mutations (underlined) reported so far in the protamine 1 gene based on the complete sequencing of the protamine 1 coding region. Apart from the numbers indicated in this figure, the R34S mutation was specifically studied by restriction fragment length polymorphism in one additional study (Table 4; Kichine *et al.*, 2008). (B, C) Conservation of the amino acid positions and alignment of mammalian protamine 1 amino acid sequences using the ClustalW program (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>).

patients. In this case, the results failed to detect an association of the R34S variant and infertility (not shown).

We finally focused on all rare promoter variants (SNPs with a frequency <1%) detected in the studies resequencing the promoter region of the protamine 1 gene (Table S1). It is interesting to note that the promoter rare variants have only been described in infertile patients (27/874), but not in controls (0/519). A meta-analysis of

all reported studies indicated an increased but not significant association of the rare promoter variants and infertility (Fig. S2). In addition, as the presence of rare protamine 1 promoter variants cannot be predicted to result in azoospermia, we repeated the meta-analysis excluding the azoospermic patients. In this case, the presence of rare promoter variants was associated with infertility (Fig. S3).

Table 6 Summary of the reports of the R34S mutation

Author (year)	Country	Phenotype		Genotype			
		Infertile patients	Controls	Infertile patients		Controls	
				GG	GT	GG	GT
Tanaka <i>et al.</i> (2003)	Asian	Azoospermia Severe oligospermia ($<5 \times 10^6$ sperms/mL)		153 (100%) 73 (100%)	0 (0%) 0 (0%)		
Iguchi <i>et al.</i> (2006)	American	Abnormal morphology ($<4.4\%$ NF) and abnormal fragmentation ($>27\%$)	Fertile	27 (90%)	3 (10%)	270 (100%)	0 (0%)
Aoki <i>et al.</i> (2006a)	American	Abnormal P1/P2 ratio (<0.8 or >1.2) Azoospermia Severe oligospermia ($<5 \times 10^6$ sperms/mL)	Fertile	95 (98.95%) 94 (97.91%)	1 (1.05%) 2 (2.09%)	10 (100%)	0 (0%)
Ravel <i>et al.</i> (2007)	France	Azoospermia Oligospermia ($<20 \times 10^6$ sperms/mL) Normospermia	Fertile	119 (100%) 161 (99.38%) 34 (97.14%)	0 (0%) 1 (0.62%) 1 (2.86%)	94 (97.91%)	2 (2.09%)
Kichine <i>et al.</i> (2008)	France	Known cause of infertility Severe oligospermia ($<5 \times 10^6$ sperms/mL) Normospermia ($5-131 \times 10^6$ sperms/mL)	Fertile and normospermic Fertile	60 (98.36%) 254 (100%) 46 (100%)	1 (1.64%) 0 (0%) 0 (0%)	30 (100%) 81 (100%)	0 (0%) 0 (0%)
Imken <i>et al.</i> (2009)	African	Azoospermia Severe oligospermia ($<1 \times 10^6$ sperms/mL) Oligospermia ($1-20 \times 10^6$ sperms/mL)	Fertile	50 (100%) 56 (100%) 29 (100%)	0 (0%) 0 (0%) 0 (0%)	670 (99.70%)	2 (0.30%)
Tüttelmann <i>et al.</i> (2010)	Caucasians	Abnormal morphology ($<7\%$ NF) Oligospermia ($<20 \times 10^6$ sperms/mL) and abnormal morphology ($<7\%$ NF) Normospermia	Fertile	86 (97.7%) 81 (97.6%) 75 (97.4%)	2 (2.3%) 2 (2.4%) 2 (2.6%)	76 (100%) 84 (100%)	0 (0%) 0 (0%)
Present work	Spain	Abnormal morphology ($<9\%$ NF) Normospermia	Fertile	85 (100%) 70 (98.59%)	0 (0%) 1 (1.41%)	102 (100%)	0 (0%)
	Sweden	Abnormal morphology ($<9\%$ NF)	Fertile and normospermic	47 (97.91%)	1 (2.09%)	49 (98%)	1 (2%)

NF, normal forms.

Discussion

In the present work, we performed a mutational study in the protamine 1 and 2 genes in patients and controls from the Spanish and Swedish populations, and we have reviewed all mutational studies available up-to-date for these genes.

Two novel missense mutations have been identified in the coding region of the protamine 1 gene at positions c.49 C > T (R17C) and c.113 G > T (R38M). The novel R17C mutation has been identified in a heterozygous state in the protamine 1 gene in one Spanish infertile patient (Table 1). It is interesting to note that the phenotype of the sperm cells present in semen in this patient is characterized by the presence of immature cells and the presence of 24% of the sperm cells with a coiled tail (Fig. 1). Of potential relevance, the presence of sperm cells with the flagellum tightly wrapped around the head has also been reported in protamine 1 and 2 knock-out mice (Cho *et al.*, 2001), and in transition protein 2 knock-out mice (Zhao *et al.*, 2001; Yeung *et al.*, 2009). The fact that this R17C mutation creates a new cysteine raised the possibility of an abnormal or alternative cross-linking of the cysteines in the sperm head. However, the fact that no differences could be detected in the electron microscopy density of the sperm nucleus of this patient as compared with a control provides evidence against a gross structural nuclear abnormality (Fig. 1). Furthermore, the fact that this mutation was most likely transmitted from the father (unavailable) who was perfectly fertile, as he had one son and three daughters without the need for assisted reproduction, strongly suggests that this mutation is non-pathogenic rare variant. The other novel missense mutation (R38M) in the present study has been found in one of the fertile Swedish controls (Table 1) and therefore it is also most likely a rare polymorphic variant with little or no impact on fertility. A third missense mutation (R34S; initially reported by Iguchi *et al.*, 2006) has also been found in the present study in one Spanish infertile patient, in one Swedish infertile patient and in one Swedish fertile control (Table 1).

A summary of all protamine 1 gene missense mutations reported so far is shown in Table 4 and in Fig. 3 along with the mammalian protamine 1 gene amino acid sequence alignments and the conservation score of the different residues. Subsequently, we focused on the most frequent missense mutation (R34S) detected to consider also the phenotype of the different patients studied (Table 6) and to perform a meta-analysis of all published studies (Fig. S1). No overall association was detected in this meta-analysis. Therefore, the data so far available do not support the hypothesis that this mutation is a risk factor for infertility.

In addition to the previously indicated missense mutations, several rare and common SNPs have been detected in the protamine 1 gene in the present study (Table 1). One of the common changes (-191C > A) corresponded to a polymorphism previously reported as a risk factor for abnormal sperm morphology (Gázquez *et al.*, 2008). Consistent with our previous observations, the present results also indicate that this polymorphism is more frequent in patients with abnormal morphology ($\leq 9\%$ NF) as compared with patients with $> 9\%$ NF, although in this case, the differences did not reach statistical significance. However, pooling of the present results with those of the previously reported (Gázquez *et al.*, 2008) indicates the presence of an increased frequency of the AA genotype in patients with $\leq 9\%$ NF as compared with patients with $> 9\%$ NF (Table. 2). The present results also indicate that the c.-191AA genotype is correlated with an increased P1/P2 ratio ($p < 0.05$).

Genotyping this polymorphism in an independent population, the Swedish population, resulted in the detection of a lower frequency of the AA genotype in patients as compared with controls (Table 1), although the genotype proportions did not follow the Hardy–Weinberg equilibrium in this Swedish population. Thus, the effect of this polymorphism is so far not clear, although it is intriguing that this polymorphism does not follow the Hardy–Weinberg equilibrium in this Swedish population. One of the reported common causes for deviation from the Hardy–Weinberg equilibrium in genotyping results is the presence of copy number variations in the loci tested (Lee *et al.*, 2008). Therefore, it would be interesting to test for potential presence of copy number variations in the protamine 1 genes in future studies.

Concerning the protamine 2 gene, no missense mutations have been detected in the present study, although a total of 15 SNPs have been identified (Table 3). It is interesting to note that c.309*61 G > C variant was detected in the present study in one patient with normal P1/P2 ratio, which is in contrast to previous observations (Hammoud *et al.*, 2007), which described that this variant was only detected in samples with abnormal P1/P2 ratio. None of the other SNPs detected could be associated individually with infertility (Table 3). However, four of the common SNPs in the protamine 2 gene together with two common SNPs of the protamine 1 gene have allowed us to establish nine different haplogroups (Fig. 2). Four of the haplogroups (1–4) are present in 97.52% of the chromosomes in our population and five additional rare haplogroups (5–9) are present in the remaining 2.48% of the chromosomes in our population (Fig. 2). Of interest, the frequency of all rare haplotypes (5–9) combined was found to be more in patients with abnormal sperm morphology (0.050) as compared with patients with normal

sperm morphology (0.010), although the differences did not reach significance ($p = 0.087$). However, it is interesting to note that the presence of rare haplotypes was found to be linked to the presence of rare variants ($p < 0.0001$). Finally, it should be noted that the presence of rare protamine 1 promoter variants has only been reported in infertile patients, but not in controls (Table S1). Of interest, a meta-analysis of all published studies (excluding azoospermic patients) indicates that the presence of rare promoter variants is a risk factor for infertility (Fig. S3). Of interest, and complementary to our observations, the presence of six haplogroups based on three protamine SNPs (PRM1 230A > C, PRM2 298G > C and 373C > A) was recently reported to be associated with sperm counts (Tüttelmann *et al.*, 2010). We could not test whether the novel haplotypes described in the present work were also associated with sperm counts, as the presence of a normal sperm count was one of the criteria for the inclusion of patients in the present study, although it will be interesting to investigate this point in future studies.

In summary, no pathogenic high penetrance mutations have been demonstrated until now in the protamine 1 gene causing male infertility, after having resequenced completely the coding regions in a total of 1351 patients and 799 controls in different studies (Table 4). Also a similar conclusion can be derived for the protamine 2 gene (Table 5). This means that if such mutations are present, they are likely to be extremely rare. However, the data available so far also indicate that some of these variations in the protamine genes may behave as a risk factor for infertility. Also, the fact that the presence of rare protamine 1 promoter variants has only been described in infertile patients suggests that the protamine locus (or a gene nearby gene) may be a risk factor for infertility. The opportunity is now open to clarify further these associations in studies targeting a wider region within the genomic haplotype block where the protamine genes are located, taking also into account the potential presence of copy number variations (Schlüter *et al.*, 1996; Martins *et al.*, 2004; Oliva, 2006; Grzmil *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2008; Tüttelmann *et al.*, 2010). It will also be interesting to explore further the potential correlation of variation in the protamine genes with other sperm phenotypic parameters such as the DNA integrity (Dominguez-Fandos *et al.*, 2007; de Mateo *et al.*, 2007), and the potential correlation or interaction with the sperm proteome (Martínez-Heredia *et al.*, 2006, 2008; Oliva *et al.*, 2009) and epigenome (Arpanahi *et al.*, 2009; Hammoud *et al.*, 2009).

Acknowledgements

This study was supported by a grant from the Ministerio de Educación y Ciencia (BFU2009-07118), fondos FEDER, to R.O.

References

- Adroer R & Oliva R. (1998) Nucleosome positioning in the rat protamine 1 gene *in vivo* and *in vitro*. *Biochim Biophys Acta* 1442, 252–260.
- Ando T, Yamasaki M & Suzuki K. (1973) Protamines. Isolation, characterization, structure and function. *Mol Biol Biochem Biophys* 12, 1–114.
- Aoki VW, Liu L & Carrell DT. (2005) Identification and evaluation of a novel sperm protamine abnormality in a population of infertile males. *Hum Reprod* 20, 1298–1306.
- Aoki VW, Christensen GL, Atkins JF & Carrell DT. (2006a) Identification of novel polymorphisms in the nuclear protein genes and their relationship with human sperm protamine deficiency and severe male infertility. *Fertil Steril* 86, 1416–1422.
- Aoki VW, Emery BR, Liu L & Carrell DT. (2006b) Protamine levels vary between individual sperm cells of infertile human males and correlate with viability and DNA integrity. *J Androl* 27, 890–898.
- Aoki VW, Liu L & Carrell DT. (2006c) A novel mechanism of protamine expression deregulation highlighted by abnormal protamine transcript retention in infertile human males with sperm protamine deficiency. *Mol Hum Reprod* 12, 41–50.
- Aoki VW, Liu L, Jones KP, Hatasaka HH, Gibson M, Peterson CM & Carrell DT. (2006d) Sperm protamine 1/protamine 2 ratios are related to *in vitro* fertilization pregnancy rates and predictive of fertilization ability. *Fertil Steril* 86, 1408–1415.
- Arpanahi A, Brinkworth M, Iles D, Krawetz SA, Paradowska A, Platts AE *et al.* (2009) Endonuclease-sensitive regions of human spermatozoal chromatin are highly enriched in promoter and CTCF binding sequences. *Genome Res* 19, 1338–1349.
- Bach O, Glander HJ, Scholz G & Schwarz J. (1990) Electrophoretic patterns of spermatozoal nucleoproteins (NP) in fertile men and infertility patients and comparison with NP of somatic cells. *Andrology* 22, 217–224.
- Balhorn R. (2007) The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome Biol* 8, 227.1–227.8.
- Balhorn R, Reed S & Tanphaichitr N. (1988) Aberrant protamine 1/protamine 2 ratios in sperm of infertile human males. *Experientia* 44, 52–55.
- Barrett JC, Fry B, Maller J & Daly MJ. (2005) Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 21, 263–265.
- Belokopytova IA, Kostyleva EI, Tomilin AN & Vorob'ev VI. (1993) Human male infertility may be due to a decrease of the protamine P2 content in sperm chromatin. *Mol Reprod Dev* 34, 53–57.
- Bench G, Corzett MH, De Yebra L, Oliva R & Balhorn R. (1998) Protein and DNA contents in sperm from an infertile human male possessing protamine defects that vary over time. *Mol Reprod Dev* 50, 345–353.
- Björndahl L & Kvist U. (2010) Human sperm chromatin stabilization: a proposed model including zinc bridges. *Mol Hum Reprod* 16, 23–29.
- Blanchard Y, Lescoat D & Le Lannou D. (1990) Anomalous distribution of nuclear basic proteins in round-headed human spermatozoa. *Andrology* 22, 549–555.
- Bloch DP. (1969) A catalog of sperm histones. *Genetics* 61(Suppl), 93–111.
- Calvin HI. (1976) Comparative analysis of the nuclear basic proteins in rat, human, guinea pig, mouse and rabbit spermatozoa. *Biochim Biophys Acta* 434, 377–389.

- Carrell DT, Emery BR & Hammoud S. (2007) Altered protamine expression and diminished spermatogenesis: what is the link?. *Hum Reprod Update* 13, 313–327.
- Cho C, Willis WD, Goulding EH, Jung-Ha H, Choi YC, Hecht NB & Eddy EM. (2001) Haploinsufficiency of protamine-1 or -2 causes infertility in mice. *Nat Genet* 28, 82–86.
- Choi YC, Aizawa A & Hecht NB. (1997) Genomic analysis of the mouse protamine 1, protamine 2, and transition protein 2 gene cluster reveals hypermethylation in expressing cells. *Mamm Genome* 8, 317–323.
- Domínguez-Fandos D, Camejo MI, Balleca JL & Oliva R. (2007) Human sperm DNA fragmentation: correlation of TUNEL results as assessed by flow cytometry and optical microscopy. *Cytometry A* 71, 1011–1018.
- Egger M, Smith GD & Altman DG. (2001) Systematic Reviews in Health Care: Meta-Analysis in Context, 2nd edn BMJ Publishing, London.
- Eirín-López JM & Ausió J. (2009) Origin and evolution of chromosomal sperm proteins. *Bioessays* 31, 1062–1070.
- Eirín-López JM, Frehlick LJ & Ausio J. (2006) Protamines, in the footsteps of linker histone evolution. *J Biol Chem* 281, 1–4.
- Engel W, Keime S, Kremling H, Hameister H & Schlüter G. (1992) The genes for protamine 1 and 2 (PRM1 and PRM2) and transition protein 2 (TNP2) are closely linked in the mammalian genome. *Cytogenet Cell Genet* 61, 158–159.
- Gázquez C, Oriola J, de Mateo S, Vidal-Taboada JM, Balleca JL & Oliva R. (2008) A common protamine 1 promoter polymorphism (-190 C → A) correlates with abnormal sperm morphology and increased protamine P1/P2 ratio in infertile patients. *J Androl* 29, 540–548.
- González JR, Armengol L, Solé X, Guinó E, Mercader JM, Estivill X & Moreno V. (2007) SNPpass: an R package to perform whole genome association studies. *Bioinformatics* 23, 644–645.
- Grzmil P, Boinska D, Kleene KC, Adham I, Schlüter G, Kämper M et al. (2008) Prm3, the fourth gene in the mouse protamine gene cluster, encodes a conserved acidic protein that affects sperm motility. *Biol Reprod* 78, 958–967.
- Hammoud S, Emery BR, Aoki VW & Carrell DT. (2007) Identification of genetic variation in the 5' and 3' non-coding regions of the protamine genes in patients with protamine deregulation. *Andrology* 53, 267–274.
- Hammoud SS, Nix DA, Zhang H, Purwar J, Carrell DT & Cairns BR. (2009) Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development. *Nature* 460, 473–478.
- Hossain AM, Rizk B, Behzadian A & Thorncroft IH. (1997) Modified guanidinium thiocyanate method for human sperm DNA isolation. *Mol Hum Reprod* 3, 953–956.
- Iguchi N, Yang S, Lamb DJ & Hecht NB. (2006) An SNP in protamine 1: a possible genetic cause of male infertility? *J Med Genet* 43, 382–384.
- Imken L, Rouba H, El Houate B, Louanjli N, Barakat A, Chafik A & McElreavey K. (2009) Mutations in the protamine locus: association with spermatogenic failure?. *Mol Hum Reprod* 15, 733–738.
- Kichine E, Msaidie S, Bokilo AD, Ducourneau A, Navarro A, Levy N et al. (2008) Low-frequency protamine 1 gene transversions c.102G→T and c.-107G→C do not correlate with male infertility. *J Med Genet* 45, 255–256.
- Kramer JA, Zang S, Yaron Y, Zhao Y & Krawetz SA. (1997) Genetic testing for male infertility: a postulated role for mutations in sperm nuclear matrix attachment regions. *Genet Test* 1, 125–129.
- Kramer JA, Adams MD, Singh GB, Doggett NA & Krawetz SA. (1998) Extended analysis of the region encompassing the PRM1→PRM2→TNP2 domain: genomic organization, evolution and gene identification. *J Exp Zool* 282, 245–253.
- Kruger TF, Ackerman SB, Simmons KF, Swanson RJ, Brugo SS & Acosta AA. (1987) A quick, reliable staining technique for human sperm morphology. *Arch Androl* 18, 275–277.
- Lee S, Kasif S, Weng Z & Cantor CR. (2008) Quantitative analysis of single nucleotide polymorphisms within copy number variation. *PLoS ONE* 3, e3906.
- Li Y, Lalancette C, Miller D & Krawetz SA. (2008) Characterization of nucleohistone and nucleoprotamine components in the mature human sperm nucleus. *Asian J Androl* 10, 535–541.
- Martínez-Heredia J, Estanyol JM, Balleca JL & Oliva R. (2006) Proteomic identification of human sperm proteins. *Proteomics* 6, 4356–4369.
- Martínez-Heredia J, de Mateo S, Vidal-Taboada JM, Estanyol JM, Balleca JL & Oliva R. (2008) Proteomic expression differences between asthenozoospermic and normozoospermic sperm samples. *Hum Reprod* 23, 783–791.
- Martins RP, Ostermeier GC & Krawetz SA. (2004) Nuclear matrix interactions at the human protamine domain: a working model of potentiation. *J Biol Chem* 279, 51862–51868.
- de Mateo S, Martínez-Heredia J, Estanyol JM, Domínguez-Fandos D, Vidal-Taboada JM, Balleca JL & Oliva R. (2007) Marked correlations in protein expression identified by proteomic analysis of human spermatozoa. *Proteomics* 7, 4264–4277.
- de Mateo S, Gázquez C, Guimerà M, Balasch J, Meistrich ML, Balleca JL & Oliva R. (2008) Protamine 2 precursors (pre-P2), protamine 1 to protamine 2 ratio (P1/P2), and assisted reproduction outcome. *Fertil Steril* 91, 715–722.
- de Mateo S, Ramos L, van der Vlag J, de Boer P & Oliva R. (2010) Improvement in chromatin maturity of human spermatozoa selected through density gradient centrifugation. *Int J Androl*; doi: 10.1111/j.1365-2605.2010.01080.x.
- Mengual L, Balleca JL, Ascaso C & Oliva R. (2003) Marked differences in protamine content and P1/P2 ratios in sperm cells from Percoll fractions between patients and controls. *J Androl* 24, 438–447.
- Mitchell V, Steger K, Marchetti C, Herbaut JC, Devos P & Rigot JM. (2005) Cellular expression of protamine 1 and 2 transcripts in testicular spermatids from azoospermic men submitted to TESE-ICSI. *Mol Hum Reprod* 11, 373–379.
- Oliva R. (2006) Protamines and male infertility. *Hum Reprod Update* 12, 417–435.
- Oliva R & Dixon GH. (1990) Vertebrate protamine gene evolution I sequence alignments. *J Mol Evol* 30, 333–346.
- Oliva R & Dixon GH. (1991) Vertebrate protamine genes and the histone to protamine replacement reaction. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 40, 25–94.
- Oliva R & Mezquita C. (1986) Marked differences in the ability of distinct protamines to disassemble nucleosomal core particles “in vitro”. *Biochemistry* 25, 6508–6511.
- Oliva R, Bazett Jones D, Mezquita C & Dixon GH. (1987) Factors affecting nucleosome disassembly by protamines “in vitro” histone hyperacetylation and chromatin structure, time dependence, and the size of the sperm nuclear proteins. *J Biol Chem* 262, 17016–17025.
- Oliva R, Martínez-Heredia J & Estanyol JM. (2008) Proteomics in the study of the sperm cell composition, differentiation and function. *Syst Biol Reprod Med* 54, 23–36.

- Oliva R, de Mateo S & Estanyol JM. (2009) Sperm cell proteomics. *Proteomics* 9, 1004–1017.
- Queralt R & Oliva R. (1993) Demonstration of conserved potential regulatory sequences of the protamine-encoding P1 genes from the different mammals. *Gene* 133, 197–204.
- Queralt R, de Fàbregues-Boixar O, Adroer R, Gené M, Gómez-Catalán J, Huguet E & Oliva R. (1993) Direct sequencing of the human protamine P1 gene and application in forensic medicine. *J Forensic Sci* 38, 1491–1501.
- Queralt R, Adroer R, Oliva R, Winkfein RJ, Retief JD & Dixon GH. (1995) Evolution of protamine P1 genes in mammals. *J Mol Evol* 40, 601–607.
- Ravel C, Chantot-Bastaraud S, El Houate B, Berthaut I, Verstraete L, De Larouziere V et al. (2007) Mutations in the protamine 1 gene associated with male infertility. *Mol Hum Reprod* 13, 461–464.
- Retief JD, Winkfein RJ, Dixon GH, Adroer R, Queralt R, Ballabriga J & Oliva R. (1993) Evolution of protamine P1 genes in primates. *J Mol Evol* 37, 426–434.
- Schlicker M, Schnulle V, Schnepfel L, Vorob'ev VI & Engel W. (1994) Disturbances of nuclear condensation in human spermatozoa: search for mutations in the genes for protamine 1, protamine 2 and transition protein 1. *Hum Reprod* 9, 2313–2317.
- Schlüter G, Celik A, Obata R, Schlicker M, Hofferbert S, Schlung A et al. (1996) Sequence analysis of the conserved protamine gene cluster shows that it contains a fourth expressed gene. *Mol Reprod Dev* 43, 1–6.
- Schnulle V, Schlicker M & Engel W. (1994) A (GA)_n repeat polymorphism in the human protamine 2 (PRM 2) gene. *Hum Mol Genet* 3, 1445.
- Steger K, Pauls K, Klonisch T, Franke FE & Bergmann M. (2000) Expression of protamine-1 and -2 mRNA during human spermiogenesis. *Mol Hum Reprod* 6, 219–225.
- Steger K, Wilhelm J, Konrad L, Staf T, Greb R, Diemer T et al. (2008) Both protamine-1 to protamine-2 mRNA ratio and Bcl2 mRNA content in testicular spermatids and ejaculated spermatozoa discriminate between fertile and infertile men. *Hum Reprod* 23, 11–16.
- Suganuma R, Yanagimachi R & Meistrich ML. (2005) Decline in fertility of mouse sperm with abnormal chromatin during epididymal passage as revealed by ICSI. *Hum Reprod* 20, 3101–3108.
- Tanaka H, Miyagawa Y, Tsujimura A, Matsumiya K, Okuyama A & Nishimune Y. (2003) Single nucleotide polymorphisms in the protamine-1 and -2 genes of fertile and infertile human male populations. *Mol Hum Reprod* 9, 69–73.
- Torregrosa N, Domínguez-Fandos D, Camejo MI, Shirley C, Meistrich ML, Balleca JL & Oliva R. (2006) Protamine 2 precursors, protamine 1/protamine 2 ratio, DNA integrity and other sperm parameters in infertile patients. *Hum Reprod* 21, 2084–2089.
- Tüttelmann F, Křenková P, Römer S, Nestorovic AR, Ljujic M, Štambergová A et al. (2010) A common haplotype of protamine 1 and 2 genes is associated with higher sperm counts. *Int J Androl* 33, 240–248.
- Van Den Bussche RA, Hoofer SR & Hansen EW. (2002) Characterization and phylogenetic utility of the mammalian protamine p1 gene. *Mol Phylogenet Evol* 22, 333–341.
- Wallace BC, Schmid CH, Lau J & Trikalinos TA. (2009) Meta-Analyst: software for meta-analysis of binary, continuous and diagnostic data. *BMC Med Res Methodol* 9, 80; doi: 10.1186/1471-2288-9-80.
- WHO. (1999) WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm–Cervical Mucus Interaction, 4th edn. Cambridge University Press, Cambridge.
- de Yebra L & Oliva R. (1993) Rapid analysis of mammalian sperm nuclear proteins. *Anal Biochem* 209, 201–203.
- de Yebra L, Balleca JL, Vanrell JA, Bassas L & Oliva R. (1993) Complete selective absence of protamine P2 in humans. *J Biol Chem* 268, 10553–10557.
- de Yebra L, Balleca JL, Vanrell JA, Corzett M, Balhorn R & Oliva R. (1998) Detection of P2 precursors in the sperm cells of infertile patients who have reduced protamine P2 levels. *Fertil Steril* 69, 755–759.
- Yeung CH, Tüttelmann F, Bergmann M, Nordhoff V, Vorona E & Cooper TG. (2009) Coiled sperm from infertile patients: characteristics, associated factors and biological implication. *Hum Reprod* 24, 1288–1295.
- Zhao M, Shirley CR, Yu YE, Mohapatra B, Zhang Y, Unni E et al. (2001) Targeted disruption of the transition protein 2 gene affects sperm chromatin structure and reduces fertility in mice. *Mol Cell Biol* 21, 7243–7255.
- Zhao M, Shirley CR, Hayashi S, Marcon L, Mohapatra B, Suganuma R et al. (2004) Transition nuclear proteins are required for normal chromatin condensation and functional sperm development. *Genesis* 38, 200–213.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Figure S1. Meta-analysis of the protamine 1 R34S mutation. (A) Construction of 2 × 2 tables for the selected studies included in the meta-analysis to study the association between presence of the R34S polymorphism in the protamine 1 gene and the risk of infertility in man. (B) Forest plot depicting the odds ratio (OR) and the 95% confidence interval (CI) of the eight studies and the combined OR from the meta-analysis.

Figure S2. Meta-analysis of the protamine 1 rare promoter variants. (A) Construction of 2 × 2 tables for the selected studies included in the meta-analysis to study the association between presence of rare variants in protamine 1 promoter and the risk of infertility in man. (B) Forest plot depicting the odds ratio (OR) and the 95% confidence interval (CI) of the five studies and the combined OR from the meta-analysis.

Figure S3. Meta-analysis of the protamine 1 rare promoter variants excluding azoospermic patients. (A) Construction of 2 × 2 tables for the selected studies included in the meta-analysis to study the association between presence of rare variants in protamine 1 promoter and the risk of infertility in man. (B) Forest plot depicting the odds ratio (OR) and the 95% confidence interval (CI) of the four studies and the combined OR from the meta-analysis.

Table S1. Summary of the reports of the rare promoter variants in protamine 1 gene, excluding the polymorphism c.-191C > A.

Please note: Wiley-Blackwell is not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

Annex II

Differential RNAs in the sperm cells of asthenozoospermic patients

Differential RNAs in the sperm cells of asthenozoospermic patients

Meritxell Jodar¹, Susana Kalko², Judit Castillo¹,
Josep Lluís Ballescà³, and Rafael Oliva^{1,*}

¹Human Genetics Research Group, IDIBAPS, Faculty of Medicine, University of Barcelona, Hospital Clínic, C/Casanova 143, Barcelona 08036, Spain ²Bioinformatics Unit, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain ³Institut Clínic de Ginecologia, Obstetricia i Neonatologia, Hospital Clínic i Provincial, C/ Villarreal 170, Barcelona 08036, Spain

*Correspondence address. E-mail: roliva@ub.edu

Submitted on October 14, 2011; resubmitted on December 27, 2011; accepted on January 17, 2012

BACKGROUND: Alterations in RNAs present in sperm have been identified using microarrays in teratozoospermic patients and in other types of infertile patients. However, so far, there have been no reports on using microarrays to determine the RNA content of sperm from asthenozoospermic patients.

METHODS: We started the present project with the goal of characterizing the RNA abundance in the sperm cells of asthenozoospermic patients when compared with controls. To reach this objective, we initially selected four normal fertile donors and four asthenozoospermic infertile patients. Equal amounts of RNA were extracted from the sperm samples, subjected to different quality controls and hybridized to the Affymetrix U133 Plus version 2 arrays.

RESULTS: Several transcripts were identified that were present in different abundance in patients compared with controls. Subsequently, we validated the differential expression of three of the detected transcripts (ANXA2, BRD2 and OAZ3), using real-time PCR in a larger set of samples. A positive correlation between the expression of these transcripts and progressive motility was observed.

CONCLUSIONS: The sperm cells of asthenozoospermic patients contain an altered amount of some RNAs as detected using microarray analysis and subsequently validated using real-time PCR. These results open up the possibility to investigate the implication of these genes in the pathogenic mechanisms in asthenozoospermia and to consider their potential utility as infertility biomarkers.

Key words: sperm motility / RNA / asthenozoospermia / infertility / spermatozoa

Introduction

It is well known that the human sperm cell contains RNA although its functional significance remains to be established (Miller *et al.*, 2005; Lalancette *et al.*, 2009; Johnson *et al.*, 2011; Krawetz *et al.*, 2011). Some RNAs in the mature sperm cell may be remnants from spermatogenesis with no function but its presence may still be potentially useful to evaluate the past events occurring during spermatogenesis and therefore to be used as markers to assess the fertility status (Miller *et al.*, 2005; Lalancette *et al.*, 2009). Sperm RNAs could also have a role in the oocyte upon fertilization (Ostermeier *et al.*, 2004; Krawetz, 2005; Carrell, 2008; Lalancette *et al.*, 2008; Krawetz *et al.*, 2011). Using a microarray-based strategy, the mRNA fingerprint present in the human sperm cell was initially obtained from normal fertile men (Ostermeier *et al.*, 2002). Subsequently, also using microarrays, it has been demonstrated that a subset of sperm RNAs is present in an altered amount in infertile teratozoospermic patients (abnormal sperm morphology) (Platts *et al.*, 2007), and more recently

in infertile patients (Garcia-Herrero *et al.*, 2011). Apart from these microarray-based studies, some spermatozoa RNAs have also been explored as potential clinical markers of infertility in abnormal sperm samples using real-time PCR (Lambard *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004; Cedenho *et al.*, 2006; Depa-Martynow *et al.*, 2007; Guo *et al.*, 2007; Jedrzejczak *et al.*, 2007; Kempisty *et al.*, 2007; Steger *et al.*, 2008; Avendano *et al.*, 2009).

Impaired motility of the sperm cells is one of the major anomalies associated with male infertility. Different studies have reported a reduction of specific sperm motility-related transcripts in asthenozoospermic patients (low motility sperm). Specifically, a significant reduction in the abundance of TPX-1, testis-specific protein 1; LDHC, lactate dehydrogenase C transcript variant 1; PRM1, protamine 1; PRM2, protamine 2; HILS1, histone H1-like protein; TNPI, transition protein 1 and TNP2 transition protein 2 have been reported (Wang *et al.*, 2004; Jedrzejczak *et al.*, 2007; Kempisty *et al.*, 2007). However, to our knowledge, the presence of RNAs in asthenozoospermic patients has not yet been studied using a microarray-based

strategy. Therefore, we started the present project with the goal of characterizing the RNA abundance in asthenozoospermic patients when compared with controls and evaluating the relative quantity of protamine transcripts in our samples.

Materials and Methods

Study population and sample collection

Sperm samples were obtained after informed consent from 29 infertile patients (17 asthenozoospermic and 12 normozoospermic) and from 7 fertile controls from the Assisted Reproduction Unit of the Hospital Clinic of Barcelona (Supplementary data, Table S1). The infertile patients corresponded to couples unsuccessfully trying to achieve a pregnancy for at least one full year. The fertile controls corresponded to normozoospermic semen samples provided by semen donors of proven fertility (resulting in a pregnancy) within the last year. Semen samples were collected in specific sterile containers after at least 3 days of sexual abstinence and were allowed to liquefy. After liquefaction of the semen, sperm parameters were evaluated according to published recommendations (World Health Organization, 2010) using a computer-assisted semen analyser (Proiser, Valencia, Spain). Sperm morphology was evaluated using Kruger strict criteria (Kruger et al., 1987) and at least 100 cells were examined per slide. Infertile patients were divided into subgroups according to alterations of sperm motility. All 17 asthenozoospermic patients satisfied the World Health Organization (2010) criteria for asthenozoospermia defined as <32% progressive motility (grades a + b). All seven fertile controls were classified as normozoospermic according to the World Health Organization (2010) criteria. Significant differences in the sperm motility were present between the asthenozoospermic patients and the normozoospermic fertile controls (Table III). Protamine ratios were determined as previously described (Jodar et al., 2011).

Isolation of RNA from sperm samples

To rule out the possibility of any somatic cells contamination, we performed a 50% Percoll Gradient sperm selection (800 g, 20 min) followed by two phosphate-buffered saline washes. After this initial purification, the samples were treated with somatic cell lysis buffer (0.1% SDS, 0.5% Triton X-100). Optical phase contrast microscopic examination (20 \times) was then used to verify the elimination of the somatic cells (Goodrich et al., 2007). The RNA was then extracted from 15–30 \times 10⁶ sperm cells and purified using the Qiagen miRNeasy Kit according to the manufacturer's recommendations. The RNA samples were subjected to different quality controls. In the first one, in order to determine the purity and concentration of the RNA, the samples were checked spectrophotometrically at 260 and 280 nm. In the second one, in order to determine the RNA integrity, the samples were analyzed using a Bioanalyzer. The majority of the RNAs ranged between 0.2 and 2 kb, which is correct for sperm RNA. In addition spermatozoa are rRNA depleted. Thus, rRNA cannot be used as a marker of RNA quality (Fig. 1A and B). A third control was performed to verify the absence of RNA from leukocytes in RNA samples by performing a RT-PCR for the leukocyte-specific marker CD45 (Fig. 1C; Table II) (Lambard et al., 2004). Finally, in order to assess that the RNA samples were not degraded and did not have any genomic or mitochondrial DNA contamination, we performed a RT-PCR for the PRM2 gene with exon spanning primers (Fig. 1D; Table II) (Goodrich et al., 2007) and for the mitochondrial region DLOOP, which is not transcribed (Fig. 1E; Table II).

Microarray hybridization and quantification

We selected four asthenozoospermic patients and four normozoospermic fertile controls to be analysed by microarray hybridization (Supplementary data, Table S1). The total RNA (50 ng) was converted to cDNA using one-cycle cDNA Synthesis Kit of Affymetrix Santa Clara, CA, USA. After transcription to cRNA, the transcripts underwent biotin labelling using the IVT Labelling Kit protocol of Affymetrix. Biotin-labelled cRNA was fragmented and hybridized to oligonucleotide Affymetrix Human Genome 133 Plus 2 arrays, representing about 38 500 well-characterized genes. Washes and scanning of the arrays were performed according to the manufacturer's instructions. Expression measures were normalized and summarized using the Robust Multi-array Average methodology (Iriazary et al., 2003). The results corresponding to the microarray data set were submitted to the GEO (NCBI) repository (accession number GSE34514). Subsequent statistical differential gene expression analysis was performed by the non-parametric approach Rank Prod (Breitling et al., 2004) in the TM4 Software Suite (Saeed et al., 2006). Rank Prod detects features that are consistently highly ranked in a number of replicate experiments, and is a method that has shown robustness to outliers, being suitable for noisy data. Those probe-sets that present changes between the two groups with *q*-value lower than 0.05 were considered significant.

Real-time PCR

Some of the detected transcripts were selected to further validate their differential abundance using real-time PCR. We also decided to include in the present work the study of the protamine PRM1 and PRM2 transcripts because an abnormal PRM1/PRM2 protein ratio contributes to abnormal chromatin condensation (Oliva, 2006; Jodar et al., 2011) and increased DNA strand breaks (Castillo et al., 2011) phenomena which are correlated with impaired motility of the sperm cell (Miyagawa et al., 2005).

Using 50 or 100 ng total RNA template, cDNA was prepared using a High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Real-time RT-PCR was performed using Lightcycler FastStart DNA Master Plus SYBR green I and a Lightcycler 2.0 instrument (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA) in a 20 μ l total reaction volume, containing 2 μ l cDNA and 0.5 μ M of each sense and antisense primer. The primers were designed using Primer 3 software. The primer sequences, annealing temperature and the expected lengths of the resulting PCR products are summarized in Table II. Melting curve analysis was performed after each run to verify specific amplifications. All PCR products exhibited a single peak in melting curves and were identified as single bands of the appropriate size on gel red stained-agarose gel electrophoresis. In addition, the specificity of the amplifications was confirmed by sequencing of PCR products purified using Exosap. The samples were quantified using the $\Delta\Delta C_t$ method (Livak and Schmittgen, 2001). The expression values obtained were normalized against the housekeeping gene β -actin (ACTB) to account for differing amounts of starting material. All determinations were performed in duplicate for two different initial quantities of total RNA (50–100 ng).

Statistical analysis

Data are presented as mean \pm SEM (Table III). Statistical analyses were performed using SPSS software, version 16.0 (SPSS Corp., Chicago, IL, USA), and statistical tests were deemed significant at *P* < 0.05. A non-parametric Mann-Whitney test was used to detect differences in the average of relative quantification of the different transcripts chosen between the two different populations studied (Table III). The potential correlations between the seminal parameters and the relative quantification of the different transcripts were evaluated using a non-parametric Spearman test (Fig. 2C and D).

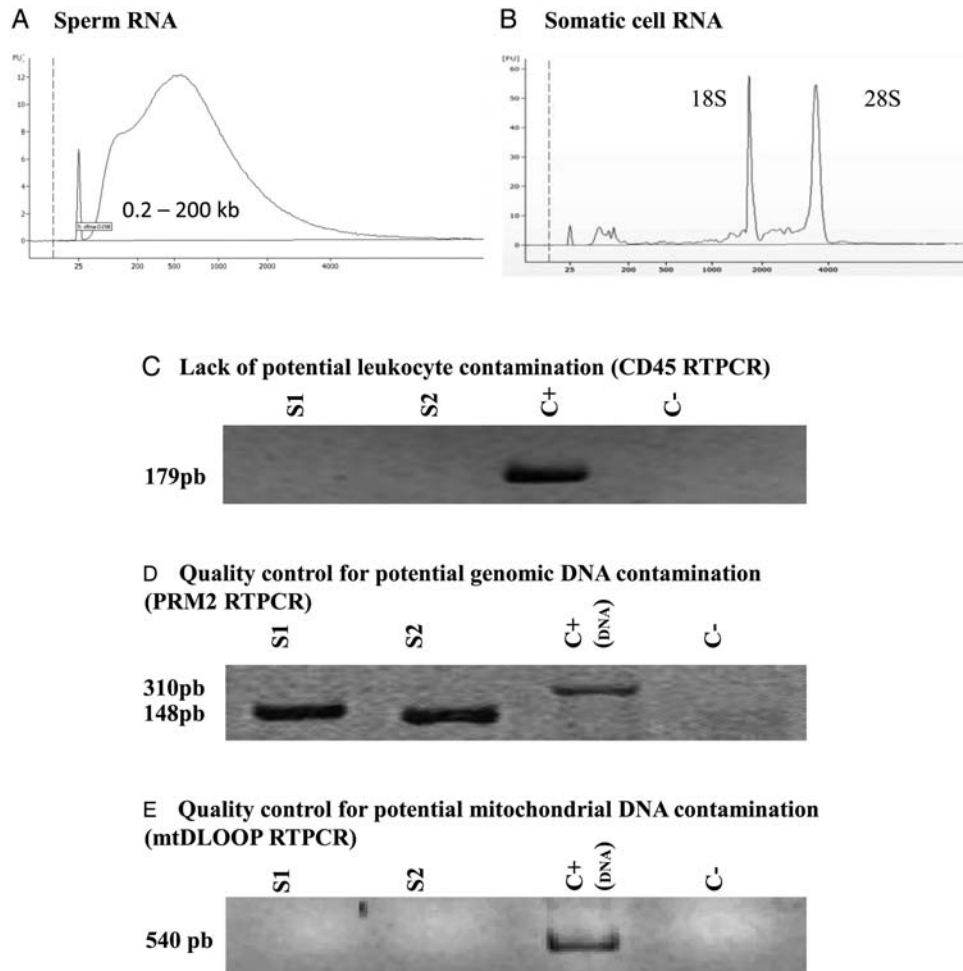


Figure 1 Quality controls performed on the RNA samples. **(A)** Agilent bioanalyzer analysis of the cRNA corresponding to the spermatozoa RNA. The majority of the RNA is distributed between 0.2 and 2 kb and is rRNA depleted. **(B)** Agilent bioanalyzer analysis of cRNA from somatic cells. Note that the majority of the RNA corresponds to rRNA (18S and 28S). **(C)** Electrophoretic analysis of the RT-PCR products corresponding to the leukocyte specific marker CD45 to verify the absence of CD45 RNA in the sperm RNA samples when compared with the leukocytes RNA samples. The lane labelled C+ corresponds to a sperm sample contaminated with 1 million/ml of leukocytes and has been included as a positive control. **(D)** Electrophoretic analysis of the RT-PCR products corresponding to the *PRM2* gene to check the absence of the nuclear DNA band (310 pb) in the RNA samples. The C+ lane is the positive control (genomic DNA) **(E)** Electrophoretic analysis of the RT-PCR products corresponding to the DLOOP mitochondrial region to check the absence of mitochondrial DNA in the RNA samples. The C+ lane corresponds to the positive control (total cellular DNA).

Results

Genes detected at a differential abundance in asthenozoospermic patients using a microarray-based strategy

The genes detected with a different abundance in asthenozoospermic patients compared with fertile donors are shown in Table I. We found 17 transcripts significantly decreased and two increased in asthenozoospermic patients. Sixteen of these differential transcripts are among the 10% most highly expressed sequences reported in human sperm. Also, it is interesting to note that 10 of 19 transcripts with a different abundance correspond to uncharacterized or predicted proteins. Ontological and pathway mapping of the differentially abundant transcripts

detected that the spermatid development and the ubiquinone biosynthesis pathways are altered in sperm from asthenozoospermic patients when compared with fertile donors (not shown). Of the genes detected at an increased or at a decreased abundance, we selected five potentially related to sperm motility or spermatogenesis (based on published data) to validate their differential expression in a higher number of samples using real-time PCR. The chosen transcripts were ANXA2, BRD2, mtND2, mtND3 and OAZ3.

Validation of the cDNA microarray results using real-time PCR

Real-time PCR results confirmed the differential abundance of three of the five transcripts (ANXA2, BRD2 and OAZ3) between infertile

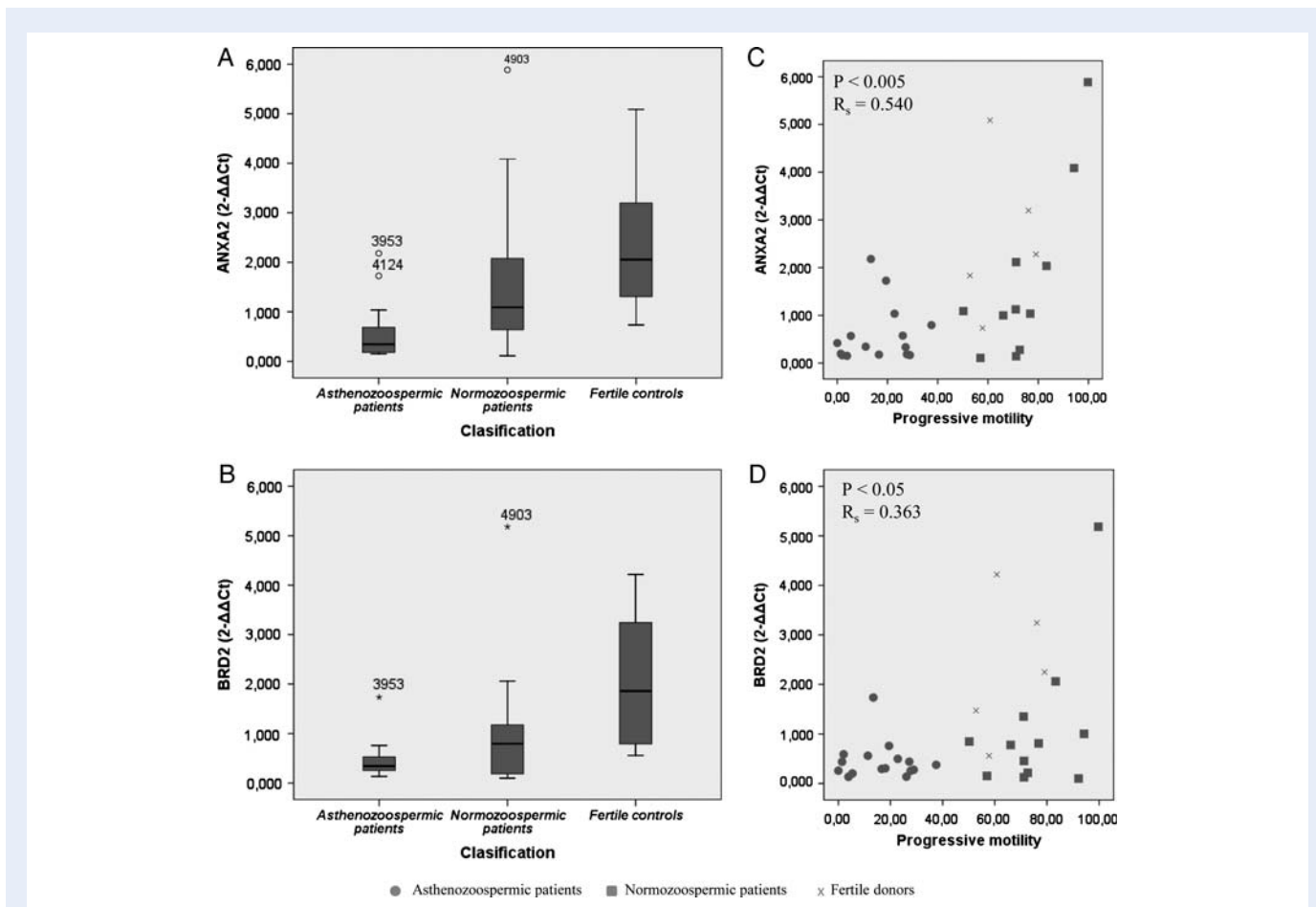


Figure 2 Differential abundance of the ANXA2 and BRD2 transcripts in asthenozoospermic patients. (**A** and **B**) Box plot diagram of the relative abundance of the ANXA2 and BRD2 transcripts in the three populations studied showing the smallest observation, lower quartile, median quartiles, upper quartile, largest observation, and outliers (labelled open circle or asterisk with indication of the sample number). A marked decrease in the abundance of the two transcripts is detected in the asthenozoospermic patients. (**C** and **D**) Correlation between the relative abundance of the ANXA2 or BRD2 transcripts and the progressive motility (a + b motility). A significant positive correlation between the sperm progressive motility (a + b) and the relative mRNA abundance of the ANXA2 and BRD2 transcripts is detected. The significance P-values and the Spearman's rho correlations are indicated. See the bottom of the figure for the meaning of the different symbols.

asthenozoospermic patients ($n = 16$) and fertile normozoospermic controls ($n = 6$) ($P < 0.05$; Table III). No significant differences were found for any of the two selected mitochondrial transcripts (mtND2 and mtND3) (Table III). Subsequently, we selected the two most differential transcripts (ANXA2 and BRD2) to further study their relative abundance in a new group of patients (infertile normozoospermic patients; $n = 12$) with a good motility (progressive motility a + b > 40%; World Health Organization, 2010). We observed a higher content of the two transcripts studied in the normozoospermic patients when compared with asthenozoospermic patients, but the differences were not significant (Fig. 2A and B). However, we found a significant positive correlation between the sperm progressive motility (a + b) and the relative mRNA levels of the ANXA2 and BRD2 transcripts ($P < 0.05$; Fig. 2C and D).

Protamine mRNA expression

The amounts of protamine transcripts as measured in the microarrays were lower in asthenozoospermic patients when compared with

fertile donors, but the differences were not statistically significant (for the PRM1 transcript the ratio was 0.876 and the q -value 0.384 and for the PRM2 transcript the ratio was 0.794 and the q -value 0.222). However, based on the study of Kempisty et al. (2007), where they found a higher content of PRM1 and PRM2 transcripts in spermatozoa of normozoospermic men versus asthenozoospermic men, we also decided to evaluate the relative quantity of the protamines transcripts in a larger group of samples using real-time PCR. Consistently with the previous results, we also found significant differences in the abundance of the PRM1 and PRM2 transcripts between asthenozoospermic patients and fertile controls (Table III). In addition, we also observed differences between normozoospermic patients and fertile controls that narrowly failed to reach statistical significance for PRM2 (PRM1, $P = 0.010$ and PRM2, $P = 0.067$) but no significant differences were found between asthenozoospermic and normozoospermic patients. These results may indicate that the differences in the abundance of the protamines are more correlated with the fertility status than with the motility parameters. We also explored whether

Table I Genes whose RNA was detected at a significantly increased or decreased abundance in sperm from asthenozoospermic patients as compared with fertile controls.

q-Value	Probe set	Gene title	Gene Symbol	Ratio*	rma-signal (patients)	rma-signal (controls)
Underexpressed genes in asthenozoospermic patients compared to fertile controls						
0.000	1555653_at	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	HNRPA3	0.485	2.194	3.219
0.003	1553551_s_at	NADH dehydrogenase subunit 2	MT-ND2	0.581	1.959	2.766
0.003	1568126_at	annexin A2	ANXA2	0.431	3.778	5.049
0.006	242904_x_at	hypothetical protein LOC100289246	LOC100289246	0.500	5.032	5.914
0.010	225899_x_at	similar to FLJ45445 protein	FLJ45445	0.552	3.370	4.105
0.010	230972_at	ankyrin repeat domain 9	ANKRD9	0.661	4.675	5.290
0.024	222075_s_at	ornithine decarboxylase antizyme 3	OAZ3	0.502	3.592	4.620
0.027	238188_at	chromosome 1 open reading frame 148	C1orf148	0.578	3.129	3.907
0.027	227129_x_at	hypothetical LOC402483	FLJ45340	0.579	3.139	3.916
0.027	226385_s_at	chromosome 7 open reading frame 30	C7orf30	0.578	5.006	5.822
0.028	1553588_at	NADH dehydrogenase subunit 3	MT-ND3	0.580	2.926	3.683
0.033	228919_at	NA	NA	0.703	6.398	6.939
0.033	241835_at	hypothetical LOC100132147	LOC100132147	0.663	4.593	5.021
0.035	207010_at	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, beta 1	GABRB1	0.709	2.940	3.560
0.036	209403_at	TBC1 domain family, member 3	TBC1D3	0.623	4.052	4.862
0.041	237425_at	hypothetical BC042079 locus	LOC474358	0.654	5.914	6.463
0.043	214911_s_at	bromodomain containing 2	BRD2	0.639	4.020	4.641
Overexpressed genes in asthenozoospermic patients compared to fertile controls						
0.010	227227_at	CDNA FLJ32605	NA	1.831	4.379	3.586
0.020	233092_s_at	DKFZP434B061 protein	DKFZP434B061	1.655	3.940	3.115

*Quotient between means of normalized expression values (i.e.: mean patients/mean control)

Table II Oligonucleotides used for the quality controls and real-time PCR.

Gene	Sequence (5'–3' direction)	Exons	Genomic size (pb)	cDNA size (pb)	Annealing temperature (°C)	Reference
ACTB	TTCCTTCTGGGCATGGAGT TACAGGTCTTTGCGGATGTC	45	—	90	60	Steger et al. (2008)
ANXA2	GGACGCTCTCAGCTCTCG CTTCTGAGGCCAATGTGTT	1–2	720	112	60	Present work
BRD2	ACCAGGGCCTTTACCAGTCT TATTGGACCCTGGGACAGAG	9–10	370	250	60	Present work
CD45	CCTTGAACCCGAACATGAGT ATCTTTGAGGGGATTCCAG	12–13	3306	179	60	Present work
DLOOP	CACCATTAGCACCCAAAGCT TGATTTACGGAGGATGGTG	mtDNA	443	—	55	Tsutsumi et al. (2006)
mtND2	CTATCTCGACCTGAAACAAGC GGTGGAGTAGATTAGGCGTAGG	mtDNA	213	213	60	Piechota et al. (2006)
mtND3	CCCTCCTTTTACCCTACCA GGCCAGACTTAGGGCTAGGA	mtDNA	101	101	60	Present work
OAZ3	TATTCGGCTGGAACTTGAC CCTTGATCCAAGGCCTGATA	2–3	—	170	62	Present work
PRM1	AGAGCCGGAGCAGATATTACC TACATCGCGTCTGTACTCG	1–2	202	156	60	Present work
PRM2	TATAGGCGCAGACACTGC GCCTTCTGCATGTTCTCT	1–2	310	149	60	Ostermeier et al. (2005)

Table III Seminal parameters in the asthenozoospermic patients and the fertile controls and the abundance of selected RNA transcripts in their sperm measured using real-time PCR.

	Asthenozoospermic patients (n = 16)	Normozoospermic fertile controls (n = 6)	Statistical significance (Mann–Whitney U-test)
Seminal parameters			
Concentration (Million spermatozoa/ml)	65.2 ± 9.7	79.6 ± 23.8	NS
Volume (ml)	3.6 ± 0.5	3.1 ± 0.6	NS
Millions total spermatozoa	192.6 ± 30.6	226.7 ± 53.0	NS
Motility a (%; fast progressive)	3.1 ± 0.8	32.6 ± 6.4	P < 0.001
Motility b (%; slow progressive)	13.2 ± 2.4	32.7 ± 2.1	P < 0.001
Progressive motility a + b (%)	16.3 ± 2.9	65.3 ± 5.2	P < 0.001
Motility c (%; non-progressive)	13.1 ± 3.4	18.4 ± 1.9	P < 0.050
Total motility (%)	29.4 ± 5.7	83.7 ± 4.6	P < 0.001
Morphology normal forms (%)	21.8 ± 2.2	17.4 ± 4.8	NS
Abundance of the transcripts (relative to β-actin)			
ANXA2 (2 ^{-ΔΔC_t})	0.6 ± 0.1	2.4 ± 0.6	P < 0.005
BRD2 (2 ^{-ΔΔC_t})	0.4 ± 0.1	2.1 ± 0.6	P < 0.001
mtND2 (2 ^{-ΔΔC_t})	1.8 ± 0.4	2.6 ± 0.8	NS
mtND3 (2 ^{-ΔΔC_t})	1.9 ± 0.5	1.9 ± 0.4	NS
OAZ3 (2 ^{-ΔΔC_t})	0.4 ± 0.0	1.0 ± 0.3	P < 0.050
PRM1 (2 ^{-ΔΔC_t})	0.7 ± 0.2	2.5 ± 0.6	P < 0.001
PRM2 (2 ^{-ΔΔC_t})	0.9 ± 0.2	3.7 ± 1.3	P < 0.010

there were any correlations between protamine transcripts and the PI/P2 ratios as previously found by other authors (Aoki et al., 2006), but we did not detect any significant difference. This may be because the number of patients having an abnormal PI/P2 ratio (<0.8 and >1.2; Jodar et al., 2011) among the asthenozoospermic patients is very small (Supplementary data, Table S1).

Discussion

In this work, we have used a microarray-based strategy to identify differentially abundant transcripts in asthenozoospermic infertile patients when compared with fertile controls. Subsequently, we have used real-time PCR to validate the detected over or under represented transcripts in a larger number of samples. Ontological and pathway mapping of the differentially abundant transcripts detected in the microarray assay revealed that the spermatid development and the ubiquinone biosynthesis pathways were both altered in asthenozoospermic patients when compared with fertile controls. These results are similar to those obtained in a recent study that compared infertile males and fertile controls using a microarray strategy and where the ontological analysis revealed that infertile patients had a differential abundance of genes implicated in the spermatid development and in energy production (García-Herrero et al., 2010). It is interesting to note that about half of the differential transcripts detected correspond to uncharacterized or predicted proteins (Table I). It will be interesting to characterize these proteins in subsequent studies and to identify their role in spermatogenesis or in sperm motility.

To validate the results from microarray analysis, the relative abundance of five transcripts that were decreased in the asthenozoospermic patients (ANXA2, BRD2, mtND2, mtND3 and OAZ3) was measured in a higher number of subjects using real-time PCR. ANXA2 is a transcript that encodes a calcium-binding protein which may play a key role in the initiation and regulation of sperm motility. BRD2 encodes a transcriptional regulator that belongs to the bromodomains and extra terminal domain family of proteins that probably plays a role in spermatogenesis. The mitochondrial transcripts (mtND2 and mtND3) encode proteins that are part of the mitochondrial respiratory chain and there is some evidence to suggest that the mitochondria may play a key role in the energy maintenance of spermatozoan motility (Amaral et al., 2007). Finally, we also included the OAZ3 transcript, because OAZ3 knock-out homozygous male mice are infertile and their sperm cells have an altered motility (Tokuhiro et al., 2009). The results confirmed a significant lower abundance in asthenozoospermic patients of three of the five transcripts selected (ANXA2, BRD2 and OAZ3) (Table III).

We subsequently selected the transcripts with the largest differences in abundance (ANXA2 and BRD2) to study their abundance in an independent group of infertile men with good sperm motility (normozoospermic). In this group, we also observed differences in the expression of these two genes when compared with asthenozoospermic patients (Fig. 2). The results in the normozoospermic patients indicated an intermediate situation between the asthenozoospermic patients and the fertile controls, indicating some degree of dysfunction of these genes also in this group of patients (Fig. 2). In addition, a positive correlation with the progressive velocity was observed (Fig. 2).

These results suggest that lower abundance of Annexin A2 and the Bromodomain 2 transcripts could be associated with asthenozoospermia and may be useful as a marker to assess the fertility status (Table III). Annexin A2 is a calcium-binding protein that is found in the acrosome and flagellum of the sperm cell and could be implicated in different events that are known to be calcium dependent, such as flagellar motility, acrosome reaction and fertilization (Feinberg *et al.*, 1991). Our results suggest that lower Annexin A2 mRNA levels are associated with poor flagella motility. Different studies shown that the bromodomain 2 protein may be involved in chromatin remodelling during spermatogenesis (Shang *et al.*, 2004; Umehara *et al.*, 2010) and the disruption of *BRD2* expression leads to embryonic lethality (Gyuris *et al.*, 2009). It is interesting to note that this gene is present in a region that may be linked to non-obstructive azoospermia, although so far no mutations have been detected (Matsuzaka *et al.*, 2002). Our results are also consistent with the finding that the *BRD2* transcript has been found at higher abundance in fertile controls when compared with infertile patients (Garcia-Herrero *et al.*, 2010). Epigenetic modifications of the chromatin structure, such as histone acetylation and methylation, are known to have important consequences in the regulation of spermatogenesis, and therefore the lower abundance of *BRD2* transcript could be related with an altered spermatogenesis and infertility. It will be interesting to further study the potential clinical utility of these transcripts.

In this work, we also measured the abundance of the protamine mRNAs because an abnormal P1/P2 ratio is related to an abnormal chromatin condensation and increased DNA strand breaks, which may initiate the apoptotic signalling pathway inducing the inactivation of mitochondria and the immotility of spermatozoa (Miyagawa *et al.*, 2005; Castillo *et al.*, 2011). Our results are consistent with different studies reporting a decreased abundance of the protamine genes in infertile asthenozoospermic patients (Lambard *et al.*, 2004; Kempisty *et al.*, 2007). Consistently with these studies, our results also indicate that there are a higher levels of *PRM1* and *PRM2* transcripts in the fertile controls when compared with asthenozoospermic and normozoospermic infertile patients.

In the present work, we have detected several RNAs present in altered amounts in asthenozoospermic patients through microarray analysis followed by validation of the results using real-time PCR. These results open up the possibility to gain further insight into the pathogenic mechanisms involved in asthenozoospermia and to consider the potential use of the detected RNAs as infertility biomarkers. It will also be interesting to determine if the present findings of altered RNAs may also be related to ultrastructural defects (Courtade *et al.*, 1998) or to alterations in the corresponding proteins as derived from ongoing proteomic studies (Martinez-Heredia *et al.*, 2008; Oliva *et al.*, 2009; Siva *et al.*, 2010; de Mateo *et al.*, 2011).

Supplementary data

Supplementary data are available at <http://humrep.oxfordjournals.org/>.

Authors' roles

M.J. and R.O. designed the study, interpreted the results and wrote the manuscript. M.J. performed all bench work relating RNA isolation,

quality controls and real-time PCR. S.K. was involved in the analysis of the microarray results. J.C. determined the protamine protein ratios. J.L.B. provided and characterized the clinical samples from patients and controls. All authors critically reviewed and approved the final version of the manuscript.

Funding

This study was supported by a grant from the Ministerio de Educación y Ciencia (BFU2009-07118), fondos FEDER, to R.O. J.C. was supported with a fellowship from the University of Barcelona.

Conflict of interest

None declared.

References

- Amaral A, Ramalho-Santos J, St John JC. The expression of polymerase gamma and mitochondrial transcription factor A and the regulation of mitochondrial DNA content in mature human sperm. *Hum Reprod* 2007;**22**:1585–1596.
- Aoki VW, Liu L, Carrell DT. A novel mechanism of protamine expression deregulation highlighted by abnormal protamine transcript retention in infertile human males with sperm protamine deficiency. *Mol Hum Reprod* 2006;**12**:41–50.
- Avendano C, Franchi A, Jones E, Oehninger S. Pregnancy-specific {beta}-1-glycoprotein I and human leukocyte antigen-E mRNA in human sperm: differential expression in fertile and infertile men and evidence of a possible functional role during early development. *Hum Reprod* 2009;**24**:270–277.
- Breitling R, Armengaud P, Amtmann A, Herzyk P. Rank products: a simple, yet powerful, new method to detect differentially regulated genes in replicated microarray experiments. *FEBS Lett* 2004;**573**:83–92.
- Carrell DT. Contributions of spermatozoa to embryogenesis: assays to evaluate their genetic and epigenetic fitness. *Reprod Biomed Online* 2008;**16**:474–484.
- Castillo J, Simon L, de Mateo S, Lewis S, Oliva R. Protamine/DNA ratios and DNA damage in native and density gradient centrifuged sperm from infertile patients. *J Androl* 2011;**32**:324–332.
- Cedenho AP, Lima SB, Cenedeze MA, Spaine DM, Ortiz V, Oehninger S. Oligozoospermia and heat-shock protein expression in ejaculated spermatozoa. *Hum Reprod* 2006;**21**:1791–1794.
- Courtade M, Lagorce C, Bujan L, Caratero C, Mieusset R. Clinical characteristics and light and transmission electron microscopy sperm defects of infertile men with persistent unexplained asthenozoospermia. *Fertil Steril* 1998;**70**:297–304.
- de Mateo S, Castillo J, Estanyol JM, Balleca JL, Oliva R. Proteomic characterization of the human sperm nucleus. *Proteomics* 2011;**11**:2714–2726.
- Depa-Martynow M, Kempisty B, Lianeri M, Jagodzinski PP, Jedrzejczak P. Association between fertilin beta, protamines 1 and 2 and spermatid-specific linker histone H1-like protein mRNA levels, fertilization ability of human spermatozoa, and quality of preimplantation embryos. *Folia Histochem Cytobiol* 2007;**45**(Suppl 1):S79–S85.
- Feinberg JM, Rainteau DP, Kaetzel MA, Dacheux JL, Dedman JR, Weinman SJ. Differential localization of annexins in ram germ cells: a biochemical and immunocytochemical study. *J Histochem Cytochem* 1991;**39**:955–963.

- Garcia-Herrero S, Garrido N, Martinez-Conejero JA, Remohi J, Pellicer A, Meseguer M. Ontological evaluation of transcriptional differences between sperm of infertile males and fertile donors using microarray analysis. *J Assist Reprod Genet* 2010;**27**:111–120.
- Garcia-Herrero S, Garrido N, Martinez-Conejero JA, Remohi J, Pellicer A, Meseguer M. Differential transcriptomic profile in spermatozoa achieving pregnancy or not via ICSI. *Reprod Biomed Online* 2011;**22**:25–36.
- Goodrich R, Johnson G, Krawetz SA. The preparation of human spermatozoal RNA for clinical analysis. *Arch Androl* 2007;**53**:161–167.
- Guo X, Gui YT, Tang AF, Lu LH, Gao X, Cai ZM. Differential expression of VASA gene in ejaculated spermatozoa from normozoospermic men and patients with oligozoospermia. *Asian J Androl* 2007;**9**:339–344.
- Gyuris A, Donovan DJ, Seymour KA, Lovasco LA, Smilowitz NR, Halperin AL, Klysik JE, Freiman RN. The chromatin-targeting protein Brd2 is required for neural tube closure and embryogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2009;**1789**:413–421.
- Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U, Speed TP. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* 2003;**4**:249–264.
- Jedrzejczak P, Kempisty B, Bryja A, Mostowska M, Depa-Martynow M, Pawelczyk L, Jagodzinski PP. Quantitative assessment of transition proteins 1, 2 spermatid-specific linker histone H1-like protein transcripts in spermatozoa from normozoospermic and asthenozoospermic men. *Arch Androl* 2007;**53**:199–205.
- Jodar M, Oriola J, Mestre G, Castillo J, Giwercman A, Vidal-Taboada JM, Balleca JL, Oliva R. Polymorphisms, haplotypes and mutations in the protamine 1 and 2 genes. *Int J Androl* 2011;**34**:470–485.
- Johnson GD, Lalancette C, Linnemann AK, Leduc F, Boissonneault G, Krawetz SA. The sperm nucleus: chromatin, RNA, and the nuclear matrix. *Reproduction* 2011;**141**:21–36.
- Kempisty B, Depa-Martynow M, Lianeri M, Jedrzejczak P, Darul-Wasowicz A, Jagodzinski PP. Evaluation of protamines 1 and 2 transcript contents in spermatozoa from asthenozoospermic men. *Folia Histochem Cytobiol* 2007;**45**(Suppl 1):S109–S113.
- Krawetz SA. Paternal contribution: new insights and future challenges. *Nat Rev Genet* 2005;**6**:633–642.
- Krawetz SA, Kruger A, Lalancette C, Tagett R, Anton E, Draghici S, Diamond MP. A survey of small RNAs in human sperm. *Hum Reprod* 2011; doi:10.1093/humrep/der329.
- Kruger TF, Ackerman SB, Simmons KF, Swanson RJ, Brugo SS, Acosta AA. A quick, reliable staining technique for human sperm morphology. *Arch Androl* 1987;**18**:275–277.
- Lalancette C, Miller D, Li Y, Krawetz SA. Paternal contributions: new functional insights for spermatozoal RNA. *J Cell Biochem* 2008;**104**:1570–1579.
- Lalancette C, Platts AE, Johnson GD, Emery BR, Carrell DT, Krawetz SA. Identification of human sperm transcripts as candidate markers of male fertility. *J Mol Med (Berl)* 2009;**87**:735–748.
- Lambard S, Galeraud-Denis I, Martin G, Levy R, Chocat A, Carreau S. Analysis and significance of mRNA in human ejaculated sperm from normozoospermic donors: relationship to sperm motility and capacitation. *Mol Hum Reprod* 2004;**10**:535–541.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ method. *Methods* 2001;**25**:402–408.
- Martinez-Heredia J, de Mateo S, Vidal-Taboada JM, Balleca JL, Oliva R. Identification of proteomic differences in asthenozoospermic sperm samples. *Hum Reprod* 2008;**23**:783–791.
- Matsuzaka Y, Makino S, Okamoto K, Oka A, Tsujimura A, Matsumiya K, Takahara S, Okuyama A, Sada M, Gotoh R et al. Susceptibility locus for non-obstructive azoospermia is localized within the HLA-DR/DQ subregion: primary role of DQB1*0604. *Tissue Antigens* 2002;**60**:53–63.
- Miller D, Ostermeier GC, Krawetz SA. The controversy, potential and roles of spermatozoal RNA. *Trends Mol Med* 2005;**11**:156–163.
- Miyagawa Y, Nishimura H, Tsujimura A, Matsuoka Y, Matsumiya K, Okuyama A, Nishimune Y, Tanaka H. Single-nucleotide polymorphisms and mutation analyses of the TNPI and TNP2 genes of fertile and infertile human male populations. *J Androl* 2005;**26**:779–786.
- Oliva R. Protamines and male infertility. *Hum Reprod Update* 2006;**12**:417–435.
- Oliva R, de Mateo S, Estanyol JM. Sperm cell proteomics. *Proteomics* 2009;**9**:1004–1017.
- Ostermeier GC, Dix DJ, Miller D, Khatri P, Krawetz SA. Spermatozoal RNA profiles of normal fertile men. *Lancet* 2002;**360**:772–777.
- Ostermeier GC, Miller D, Huntriss JD, Diamond MP, Krawetz SA. Reproductive biology: delivering spermatozoan RNA to the oocyte. *Nature* 2004;**429**:154.
- Ostermeier GC, Goodrich RJ, Diamond MP, Dix DJ, Krawetz SA. Toward using stable spermatozoal RNAs for prognostic assessment of male factor fertility. *Fertil Steril* 2005;**83**:1687–1694.
- Piechota J, Tomecki R, Gewartowski K, Szczesny R, Dmochowska A, Kudla M, Dybczynska L, Stepien PP, Bartnik E. Differential stability of mitochondrial mRNA in HeLa cells. *Acta Biochim Pol* 2006;**53**:157–168.
- Platts AE, Dix DJ, Chemes HE, Thompson KE, Goodrich R, Rockett JC, Rawe VY, Quintana S, Diamond MP, Strader LF et al. Success and failure in human spermatogenesis as revealed by teratozoospermic RNAs. *Hum Mol Genet* 2007;**16**:763–773.
- Saeed AI, Bhagabati NK, Braisted JC, Liang W, Sharov V, Howe EA, Li J, Thiagarajan M, White JA, Quackenbush J. TM4 microarray software suite. *Methods Enzymol* 2006;**411**:134–193.
- Shang E, Salazar G, Crowley TE, Wang X, Lopez RA, Wang X, Wolgemuth DJ. Identification of unique, differentiation stage-specific patterns of expression of the bromodomain-containing genes Brd2, Brd3, Brd4, and Brdt in the mouse testis. *Gene Expr Patterns* 2004;**4**:513–519.
- Siva AB, Kameshwari DB, Singh V, Pavani K, Sundaram CS, Rangaraj N, Deenadayal M, Shivaji S. Proteomics-based study on asthenozoospermia: differential expression of proteasome alpha complex. *Mol Hum Reprod* 2010;**16**:452–462.
- Steger K, Wilhelm J, Konrad L, Stalf T, Greb R, Diemer T, Kliesch S, Bergmann M, Weidner W. Both protamine-1 to protamine-2 mRNA ratio and Bcl2 mRNA content in testicular spermatids and ejaculated spermatozoa discriminate between fertile and infertile men. *Hum Reprod* 2008;**23**:11–16.
- Tokuhiro K, Isotani A, Yokota S, Yano Y, Oshio S, Hirose M, Wada M, Fujita K, Ogawa Y, Okabe M et al. OAZ-t/OAZ3 is essential for rigid connection of sperm tails to heads in mouse. *PLoS Genet* 2009;**5**:e1000712.
- Tsutsumi H, Komuro T, Mukoyama R, Nogami H. Hypervariable region structure and polymorphism of mtDNA from dental pulp and a family analysis. *J Oral Sci* 2006;**48**:145–152.
- Umehara T, Nakamura Y, Jang MK, Nakano K, Tanaka A, Ozato K, Padmanabhan B, Yokoyama S. Structural basis for acetylated histone H4 recognition by the human BRD2 bromodomain. *J Biol Chem* 2010;**285**:7610–7618.
- Wang H, Zhou Z, Xu M, Li J, Xiao J, Xu ZY, Sha J. A spermatogenesis-related gene expression profile in human spermatozoa and its potential clinical applications. *J Mol Med (Berl)* 2004;**82**:317–324.
- World Health Organization. *WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen*, 5th edn. Switzerland: World Health Organization, 2010.

Si no conec una cosa, la investigaré

Louis Pasteur

