



**MEJORA DIAGNÓSTICA
DE LA INFERTILIDAD
MASCULINA MEDIANTE
EL USO DE TÉCNICAS DE
ANÁLISIS MASIVO DE
PROTEÍNAS Y METABOLITOS
EN ESPERMATOZOIDES**



VNIVERSITAT ID VALÈNCIA (U~) Facultat de Ciències Biològiques

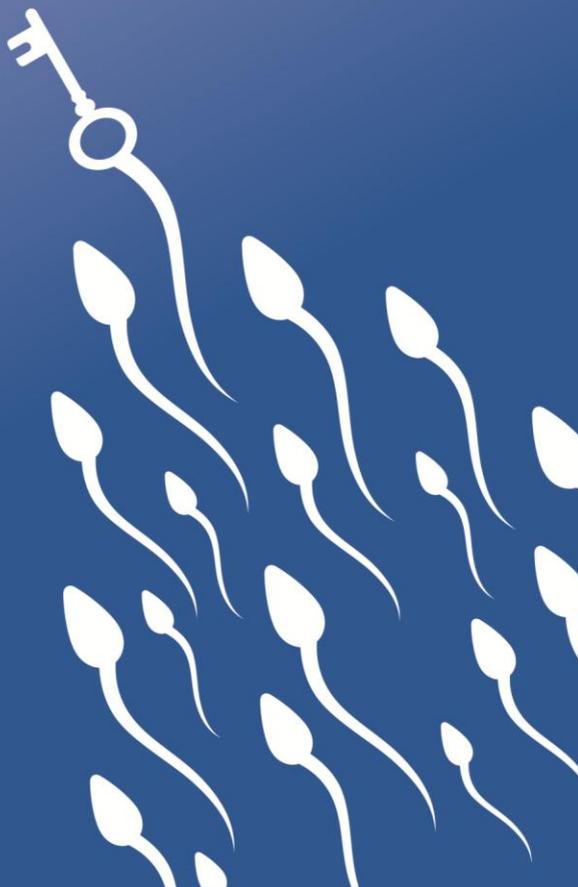
TESIS DOCTORAL

Rocío Rivera Egea
Licenciada en Farmacia

Dirigida por:

Dr. D. Nicolás Garrido Puchalt
Dr. D. Marcos Meseguer Escrivá
Dr. D. Francisco Domínguez Hernández

Valencia, Julio 2017





VNIVERSITAT DE VALÈNCIA  Facultat de Ciències Biològiques

UNIVERSIDAD DE VALENCIA

Facultad de CC. Biológicas

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Programa Oficial de Doctorado en Biotecnología 3004 regulado por el

RD 1393/2007

**MEJORA DIAGNÓSTICA DE LA INFERTILIDAD MASCULINA MEDIANTE EL
USO DE TÉCNICAS DE ANÁLISIS MASIVO DE PROTEÍNAS Y METABOLITOS
EN ESPERMATOZOIDES**

Memoria realizada por D^a Rocío Rivera Egea
para optar al Grado de Doctor por la Universitat de València

Dirigida por:

Dr. D. Nicolás Garrido Puchalt

Dr. D. Marcos Meseguer Escrivá

Dr. D. Francisco Domínguez Hernández

Valencia, Julio 2017

Dr. D. Nicolás Garrido Puchalt, Doctor en Biología por la Universidad de Valencia

INFORMA:

Que D^a Rocío Rivera Egea ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación que ha dado lugar a la memoria titulada: “Mejora diagnóstica de la infertilidad masculina mediante el uso de técnicas de análisis masivo de proteínas y metabolitos en espermatozoides”.

Dicha memoria está concluida y se considera apta para su lectura y defensa públicas.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo la presente certificación.

Valencia, 10 de julio de 2017

FDO. Dr. D. Nicolás Garrido Puchalt

Dr. D. Marcos Meseguer Escrivá, Doctor en Biología por la Universidad de Valencia

INFORMA:

Que D^a Rocío Rivera Egea ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación que ha dado lugar a la memoria titulada: “Mejora diagnóstica de la infertilidad masculina mediante el uso de técnicas de análisis masivo de proteínas y metabolitos en espermatozoides”.

Dicha memoria está concluida y se considera apta para su lectura y defensa públicas.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo la presente certificación.

Valencia, 10 de julio de 2017

FDO. Dr. D. Marcos Meseguer Escrivá

Dr. D. Francisco Domínguez Hernández, Doctor en Biología por la Universidad de Valencia

INFORMA:

Que D^a Rocío Rivera Egea ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación que ha dado lugar a la memoria titulada: “Mejora diagnóstica de la infertilidad masculina mediante el uso de técnicas de análisis masivo de proteínas y metabolitos en espermatozoides”.

Dicha memoria está concluida y se considera apta para su lectura y defensa públicas.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo la presente certificación.

Valencia, 10 de julio de 2017

FDO. Dr. D. Francisco Domínguez Hernández

Cuando inscribí la tesis lo único que tenía claro es que los agradecimientos se escribían al final, y ahora entiendo el por qué, ya que probablemente sea la parte que más me ha costado. Tengo tanta gente a la que agradecerle, que necesitaría la extensión de otra tesis para darles las gracias a todos. Aun así, intentaré ser breve sin dejarme a nadie de los que me han apoyado, ayudado, aguantado, soportado, y un largo número de etcéteras, en esta nueva etapa que hoy se cierra.

Antes de nada quería darles las gracias a mis directores de tesis, Nico, Marcos y Paco. Gracias por toda vuestra ayuda y por haberme aguantado, porque sabéis que cuando me pongo con algo me pongo, y lo quiero ya, y eso a veces no es nada fácil. Gracias por todo lo que habéis hecho por mí y por hacerme una mujer de provecho, porque hoy soy lo que soy gracias a vosotros y porque sin vosotros esta tesis no tendría sentido, GRACIAS. Y en especial quería darle las gracias a Paco, porque a pesar de haberlo incluido como director a 3 meses de depositar la tesis, el sprint final, la ayuda constante, la rapidez en corregir, los consejos y el estar ahí en todo momento, no tiene precio, así que GRACIAS. GRACIAS a los tres.

A las chicas del departamento de proteómica de la UV (Oreto, Laura, Luz y Raquel) y de OWLmetabolomics (Cristina y Miriam), sois la pieza clave para poder hacer entenderme todo este lío que se está montando y al que llaman la era de la ÓMICAS. Gracias a todas.

A mis chicas del laboratorio, de la primera a la última, porque trabajar con vosotras es como no ir a trabajar ningún día de mi vida (Carol, Isa, Mencis, Yol, Palo y Zuri). Porque sois las mejores y punto, porque a pesar de estar insoportable,

Agradecimientos

cansada, agobiada, etc, me habéis ayudado en todo momento y me habéis dado ánimos hasta el final. Qué viva las terapias de grupo! OS QUIERO CHICAS.

A la Nere, mi compi de mesa, de tesis, de investigación, de sofocos, de desahogos, de impotencia, de rabia, de alegrías..., mi amiga, porque esto ha sido mucho más fácil teniéndote al lado.

A mis mejores amigas Julia y Maca.

A mi Juli, porque empezamos esto juntas y aunque me hayas adelantado en la defensa de la tesis, está claro que todo lo que nos proponemos LO CONSEGUIMOS!

A Maca, por estar ahí siempre, ayudarme y ser mi mejor amiga hasta que la muerte nos separe. Simplemente GRACIAS.

A mis amigos (Lauri, Majo, Juan, Ana, Nacho, Juanma, Sonia, Andrea, Vivi, Stefy y mis loquillas), porque a pesar de rechazar todas vuestras ofertas de salir a tomar algo, al pádel, a cenar, habéis estado ahí al pié del cañón y me habéis apoyado, entendido y respetado. Y en especial a mi amigo Mariano por ser un artista y haberme editado una imagen espectacular para mi tesis a pesar de no tener tiempo, y a mi amigo Alex, por tu apoyo incondicional, por tus ánimos, por preocuparte por mí, por mi tesis, por mi salud, por mi locura...GRACIAS A TODOS.

Ya para ir terminando voy a agradecerle a la parte más importante de mi vida, MI FAMILIA (mis padres y mi hermano), porque sois lo mejor que una persona puede desear. Porque no podemos dar un paso los unos sin los otros, porque juntos somos insuperables y porque sin vosotros no soy nadie. Gracias por estar ahí siempre, ayudarme, animarme, apoyarme y por la lucha diaria y continúa para que escribiera la tesis, pues bien AQUÍ ESTA. Os quiero!

Agradecimientos

Y por último, a mi chico, mi amigo, mi compañero, mi todo; porque soportar a una persona sin dormir, sin despegar la vista del ordenador, sin salir de casa, sin sacar a la Kira a las 12 de la noche, no es tarea fácil, pero tú estando a mi lado, con tus ánimos, tus risas, tus abrazos y dándome fuerza en cada momento has conseguido que esto sea coser y cantar, y has hecho que esta aventura que emprendí hace ya 5 años, haya llegado a su fin victoriosamente. Te quiero!

Ah! Y se me olvidaba, a mi Kira, porque a pesar de todos los contratiempos, ha pasado horas y horas a mi lado tumbada mientras escribía esta tesis. No se puede tener mejor compañía.

A todos y cada uno de los mencionados en estos agradecimientos, incluso a aquellos que se me hayan podido olvidar o que no he puesto por no hacerlo más largo, SIMPLEMENTE GRACIAS DE TODO CORAZÓN!!

Rocío

Mi deseo de este año nuevo eras tú

I.INTRODUCCIÓN	3
1. Técnicas de Reproducción Asistida (TRA).....	5
1.1 La Inseminación Artificial o IA.....	5
1.2 La Fecundación <i>in vitro</i> o FIV	8
1.3. Inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI).....	8
1.4. Donación de gametos.....	10
2. Resultados de las TRA	11
3. Infertilidad masculina.....	13
3.1 Análisis básico del semen o espermiograma	16
4. Biomarcadores moleculares de fertilidad en espermatozoides	19
5. Nuevos métodos de diagnóstico y selección en el semen	21
5.1. Técnicas de diagnóstico espermático.....	22
5.1.1. Fragmentación del ADN espermático (SDF).....	22
5.1.2. Estrés oxidativo	24
5.1.3. Hibridación In Situ Fluorescente (FISH)	25
5.1.4. Perfil ARN espermático: Transcriptómica	26
5.1.5. Perfil metabólico espermático: Lipidómica.	28

5.1.5.1: Clasificación.....	29
5.1.5.2. Funciones	32
5.1.5.3. La Lipidómica aplicada a la andrología.	33
5.1.6. Proteómica.....	37
5.1.6.1. Proteómica aplicada a la andrología.....	37
5.1.6.1.1. Estudio descriptivo de la proteómica en espermatozoides humanos	41
5.1.6.1.2. Estudio comparativo de proteómica en los espermatozoides humanos	44
5.2. Técnicas de selección espermáticas.....	47
5.2.1. Características ultramorfológicas.....	47
5.2.1.1. Inyección intracitoplasmática de espermatozoides seleccionados morfológicamente (IMSI).....	47
5.2.1.2. Selección de espermatozoides birrefringentes	48
5.2.2. Madurez espermática y características de la membrana plasmática ..	49
5.2.2.1. Test de unión al ácido hialurónico: PICSI	49
5.2.2.2. Separación inmunomagnética de espermatozoides (MACS)	50

II.HIPÓTESIS:	55
III.OBJETIVO	59
IV.MATERIAL Y MÉTODOS	63
1. Lugar de ejecución	63
2. Población de estudio	63
3. Criterios de inclusión y exclusión	64
3.1. Inclusión:.....	65
3.2. Exclusión:	66
4. Recogida de muestras y análisis básico del semen	67
4.1. Determinación de las características seminales. Elaboración del espermiograma.....	68
4.2. Determinación de los parámetros básicos del semen	69
5. Preparación de las muestras de semen	70
6. Estudios.	73
6.1 Metabolómica: Lipidómica	73
6.1.1. UHPLC-MS.....	73

6.1.2. Aplicación de la técnica UHPLC-MS en muestras de pacientes destinadas propiamente a tratamientos.....	73
6.1.2.1. Tratamientos de reproducción asistida (IAH).....	74
6.1.2.2. Obtención y preparación de las muestras	74
6.1.2.3. Análisis de las muestras	75
6.1.2.4. Análisis estadístico.....	76
6.1.3. Comparación del perfil lipídico entre muestras de semen que consiguieron embarazo mediante ICSI y las que no.....	76
6.1.3.1. Población de estudio: Cálculo del tamaño muestral	77
6.1.3.2. Diseño del estudio	77
6.1.3.3. Tratamiento de reproducción asistida (ICSI).....	78
6.1.3.4. Obtención y preparación de las muestras de semen	83
6.1.3.5. Análisis de las muestras	84
6.1.3.6. Pretratamiento de los datos.....	91
6.1.3.6.1. Normalización de los datos y control de calidad.	92
6.1.3.6.2. Análisis estadístico	94
6.2. Proteómica	101

6.2.1. Caracterización del proteoma de los espermatozoides: Elaboración de una librería de proteínas presentes en los espermatozoides	101
6.2.1.1. LC-MS/MS.....	102
6.2.1.2. Obtención y preparación de las muestras de semen	102
6.2.1.3. Preparación de las muestras de semen para su caracterización mediante una librería.....	103
6.2.1.4. Análisis de la librería de proteínas mediante la técnica LC-MS/MS	105
6.2.1.5. Identificación, validación y cuantificación de proteínas.	106
6.2.2. Comparación del perfil proteico entre muestras de semen que consiguieron embarazo mediante ICSI.....	107
6.2.2.1. Población de estudio: Cálculo del tamaño muestral	107
6.2.2.2. Diseño del estudio	107
6.2.2.3. Tratamiento de reproducción asistida (ICSI) con ovocitos donados	107
6.2.2.4. Obtención y preparación de las muestras de semen.....	108
6.2.2.5. Preparación de las muestras de semen para el análisis proteómico de expresión diferencial	109

6.2.2.6. Análisis de las muestra mediante la metodología SWATH LC-MS/MS.....	110
6.2.2.7. Identificación, validación y cuantificación de proteínas.....	111
6.2.2.8. Análisis estadístico.....	112
6.2.2.9. Análisis funcional. GO, DAVID y String.....	115
V.RESULTADOS	119
1. Metabolómica: Lipidómica	119
1.1. UHPLC-MS.....	119
1.2. Aplicación de la técnica UHPLC-MS en muestras de pacientes destinadas propiamente a tratamientos	119
1.3. Comparación del perfil lipídico entre muestras de semen que consiguieron embarazo mediante ICSI y las que no.....	121
1.3.1. Demográficos	121
1.3.2. Análisis de datos multivariante	123
1.3.3. Análisis de datos univariante	125
1.3.4. Análisis de curvas ROC.....	143
2. Proteómica.....	148

2.1. Caracterización del proteoma de los espermatozoides: Elaboración de una librería de proteínas presentes en los espermatozoides	148
2.1.1. Caracterización de las muestras.....	148
2.1.2. Análisis de la librería de proteínas mediante la técnica LC-MS/MS ...	148
2.2. Comparación del perfil proteico entre muestras de semen que consiguieron embarazo mediante ICSI y las que no	149
2.2.1. Demográficos	149
2.2.2. Análisis de las muestra mediante la metodología SWATH LC-MS/MS150	
2.2.3. Análisis estadístico	151
2.2.3.1. Métodos de regresión múltiple con penalización	156
2.2.4. Análisis funcional. GO, DAVID y String.....	165
VI.DISCUSIÓN.....	181
VII.CONCLUSIONES	205
VIII.BIBLIOGRAFÍA.....	209
IX.ANEXOS.....	229

I. INTRODUCCIÓN

Lo que bien se aprende, nunca se olvida

I.INTRODUCCIÓN

Hoy en día se asume que la infertilidad afecta alrededor de un 8% de las parejas en edad reproductiva, siendo este porcentaje variable según diferentes autores y zonas geográficas, y situándose en un 14% en Europa (Benagiano et al. 2006, ESHRE 2014:2016, Sharlip et al. 2002, Thonneau et al. 1991). Entre sus consecuencias, además de problemas psicológicos (estrés y depresión), físicos y sociales, también representa una gran carga económica (Mascarenhas et al. 2012).

La infertilidad es definida como la incapacidad de lograr un embarazo clínico después de doce meses de relaciones sexuales no protegidas. Esta definición es la que consideran la Sociedad Española de Fertilidad (SEF), la Sociedad Europea de Reproducción y Embriología Humana (ESHRE) (ESHRE Capri Workshop 1996) y la Asociación Americana de Medicina de la Reproducción (ASRM); a diferencia de la Organización Mundial de la Salud (OMS) que prolonga este tiempo a 24 meses (Matorras and Critol 2011).

No obstante, en la práctica clínica, después de un año, se suele empezar a actuar a no ser que hubiese factores que reduzcan todavía más este plazo, como por ejemplo la edad materna avanzada, alteraciones que afectan a la fertilidad femenina o masculina, etc., (tabla 1) (Alamá and Remohí 2011, Brugo-Olmedo et al. 2003).

Factores para el estudio precoz de la pareja infértil	
Mujer	Hombre
Edad > 35 años	Patología genital previa
Amenorrea u oligomenorrea > 6 meses	Cirugía urogenital previa
Enfermedad pélvica inflamatoria	Enfermedades de transmisión sexual
Cirugía abdominal pélvica	Exploración genital anormal
Patología tubárica, uterina u ovárica	Enfermedades genéticas
Endometriosis	
Enfermedades genéticas	

Tabla 1: Factores que aconsejan el estudio precoz de la pareja (Alamá and Remohí 2011).

Dentro de este concepto podemos diferenciar entre infertilidad primaria, refiriéndose a cuando la pareja a pesar de lograr fecundación o gestación de forma natural, no llega a tener un recién nacido vivo (RNV); y secundaria, cuando la pareja sí que tiene hijos pero por alguna razón no consigue quedarse embarazada en intentos posteriores (Mascarenhas et al. 2012).

Por otro lado, la fertilidad, podría definirse como la consecución exitosa de un embarazo que acaba con un RNV y ser entendida como una enfermedad de pareja, y su evaluación o determinación viene condicionada por la influencia de las características de dos individuos, complicando la búsqueda de factores o tratamiento que determinen y nos permitan mejorar este éxito (Alamá and Remohí 2011).

Aunque históricamente la infertilidad ha estado relacionada casi exclusivamente con la mujer, hoy en día se sabe que el factor masculino es responsable aproximadamente del 50% de los casos (Nallella et al. 2006) y del 30% de ellos de forma exclusiva (Thonneau et al. 1991). En este sentido, el estudio del factor masculino ha ido cobrando un creciente interés desde hace ya varias décadas.

1. Técnicas de Reproducción Asistida (TRA)

Durante los últimos años, el número de TRA ha ido aumentando anualmente, estimándose que desde que tuviese lugar el nacimiento del primer niño concebido mediante una TRA, han nacido más de 5 millones de niños gracias a estos procedimientos (ESHRE 2014:2016). Por ello, la aparición y el gran desarrollo de las TRA ha resultado ser un gran avance para el tratamiento de la infertilidad incrementando el éxito de estas parejas con problemas para concebir (Chemes and Alvarez Sedo 2012), aplicando cada vez tecnologías más punteras para hacer que los tratamientos sean más eficaces.

De entre la variedad de tratamientos de reproducción asistida que existen hoy en día, los principales son: la inseminación artificial o IA, la fecundación *in vitro* o FIV (dentro de la cual podemos encontrar la inyección espermática intracitoplasmática o ICSI) y la donación de gametos (Alamá and Remohí 2011).

1.1 La Inseminación Artificial o IA

La IA es el método más sencillo dentro de las TRA y es la primera técnica a utilizar a la hora de enfrentarse a un caso de infertilidad, después del coito programado (CP), aunque a este último no se le considera una TRA como tal.

Consiste en el depósito, mediante una fina cánula, del semen capacitado en el tracto reproductor femenino, generalmente en el interior del útero, acortando de este modo el recorrido que deben completar los espermatozoides hasta encontrarse con el ovocito (figura 1). Esta técnica se puede realizar tanto con semen de la pareja (IAH, IA homóloga o IAC, IA conyugal) o con semen de un donante (IAD, IA donante). Para que esta técnica pueda ser realizada, la mujer

debe presentar permeabilidad de las trompas y ovarios funcionales, y la recuperación de espermatozoides tras la capacitación debe ser óptima.



Figura 1: Esquema de IA

Este proceso de selección espermática, denominado capacitación, consiste en eliminar el plasma seminal, de modo que se evitan las contracciones uterinas provocadas por las prostaglandinas presentes en éste, y se seleccionan aquellos espermatozoides con mejor movilidad. Los métodos de selección espermática más empleados en las TRAs son los gradientes de Percoll o de densidad discontinua y el Swim-Up (SU) (figura 2) (Boomsma et al. 2007, ESHRE Capri Workshop Group 2009).

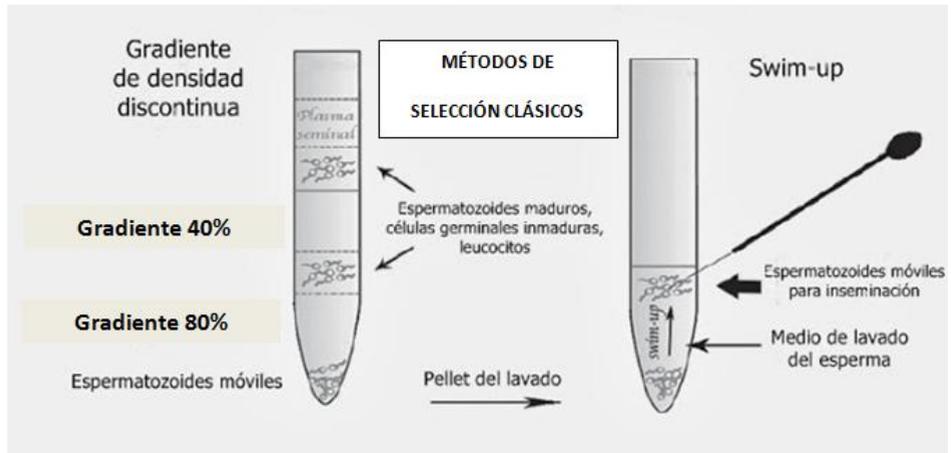


Figura 2: Métodos de selección espermática clásicos.

La IA puede realizarse en ciclo natural o ciclo estimulado, siendo este último el más efectivo (ESHRE Capri Workshop Group 2009).

Los gradientes de Percoll o gradientes de densidad discontinua, se basan en la selección de espermatozoides capaces de vencer la dificultad de diferentes capas de gradientes de densidad alcanzando el fondo del tubo, y descartando: el plasma seminal, células redondas, células inmaduras, detritos y espermatozoides no progresivos. Es decir, en esta técnica los espermatozoides se separan en función de su densidad, ya que los espermatozoides maduros presentan una ligera mayor densidad que aquellos inmaduros.

El SU, se basa en el principio de que solo los espermatozoides con mejor movilidad son capaces de subir/nadar hasta el sobrenadante.

1.2 La Fecundación *in vitro* o FIV

Técnica en la cual se somete a la paciente a una estimulación ovárica suficiente para conseguir que se desarrollen varios folículos que posteriormente le son extraídos mediante una punción folicular. Una vez fuera del cuerpo se depositan en una placa *petri* junto con unas gotas en las que hay espermatozoides procedentes de una muestra de semen capacitada y se espera a que sean fecundados, aproximando aún más que en una IA la distancia entre el ovocito y el espermatozoide. Se basa en la unión de los dos gametos en el laboratorio. Una vez se ha producido la fecundación, el embrión es transferido al útero de la madre para conseguir gestación (figura 3).



Figura 3: Esquema de FIV.

1.3. Inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI)

La ICSI consiste en microinyectar con un micromanipulador (figura 4), un espermatozoide móvil y morfológicamente normal en un ovocito que previamente ha sido extraído del ovario de la mujer (como en el caso de la FIV)

(Palermo et al. 1992). Tras la microinyección y después de haberse comprobado que ha habido fecundación y que las primeras divisiones embrionarias han sido correctas, se transfiere al útero de la paciente dentro de los siguientes 3-6 días (figura 5) (García-Herrero et al. 2011, Meseguer et al. 2003).

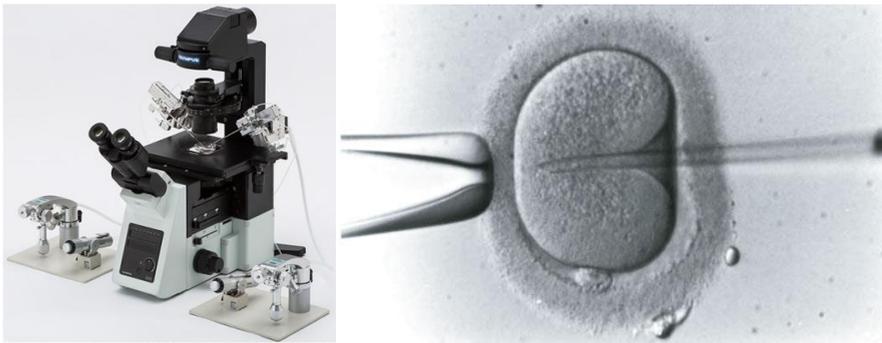


Figura 4 y 5: Micromanipulador e ICSI.

Esta TRA se prescribe en casos, entre otros, de oligoastenoteratozoospermia, fallo repetido de fecundación tras la *in vitro* convencional, en pacientes de cáncer que criopreservan sus muestras de semen previamente a un tratamiento oncológico, pacientes con daños en la médula ósea, aquellos hombres con problemas de eyaculación o eyaculación retrógrada o pacientes que conservaron muestras de semen antes de realizarse una vasectomía (Benadiva et al. 1999, Gil-Salom et al. 2000, Lahteenmaki et al. 1995, Nagy et al. 1995). También puede ser usado en casos de diagnóstico genético preimplantacional para enfermedades monogénicas (Liebaers et al. 1998) o en hombres con azoospermia por ausencia bilateral congénita de vasos deferentes o por obstrucción inguinal de los conductos eyaculadores (Tournaye et al. 1994).

Aunque la ICSI se emplea en casos con factor masculino severo, también existen indicaciones femeninas como anomalías en la zona pelúcida (Mandelbaum et al. 1997).

En el caso de la ICSI, tanto el recorrido del espermatozoide como el proceso de penetración por parte de este de la zona pelúcida del ovocito son inexistentes.

Podemos resumir que cada técnica de las aquí descritas contempla unos requerimientos distintos por parte del espermatozoide ya que cada técnica “puentea” diferentes obstáculos que el espermatozoide debería superar en una fecundación conseguida de manera natural, haciendo cada vez más fácil la fecundación conforme más invasiva es la técnica.

1.4. Donación de gametos

Hay casos en los que los pacientes no pueden hacer uso de sus propios gametos (azoospermia, enfermedad genética, etc). En estos casos se pueden realizar cualquiera de las TRA explicadas anteriormente pero con espermatozoides u ovocitos donados. Estos gametos procederán de jóvenes sanos, que tras pasar test psicológico, análisis de sangre, semen y orina, análisis genéticos y realizarse una anamnesis completa, donan sus gametos para las personas que los necesitan (Alamá and Remohí 2011).

2. Resultados de las TRA

Los resultados obtenidos por las TRA todavía están lejos de la perfección o 100% de éxito. Desde la perspectiva del gameto y si tenemos en cuenta las tasas de RNV (figura 6), aun utilizando semen donado (el mejor gameto disponible) en ciclos de IA o FIV, podemos ver que no todos los pacientes tienen éxito y además para alcanzarlo se necesitan varios intentos, y dentro de cada intento varios embriones en el caso de la FIV y la ICSI (figura 7) (Garrido et al. 2011).

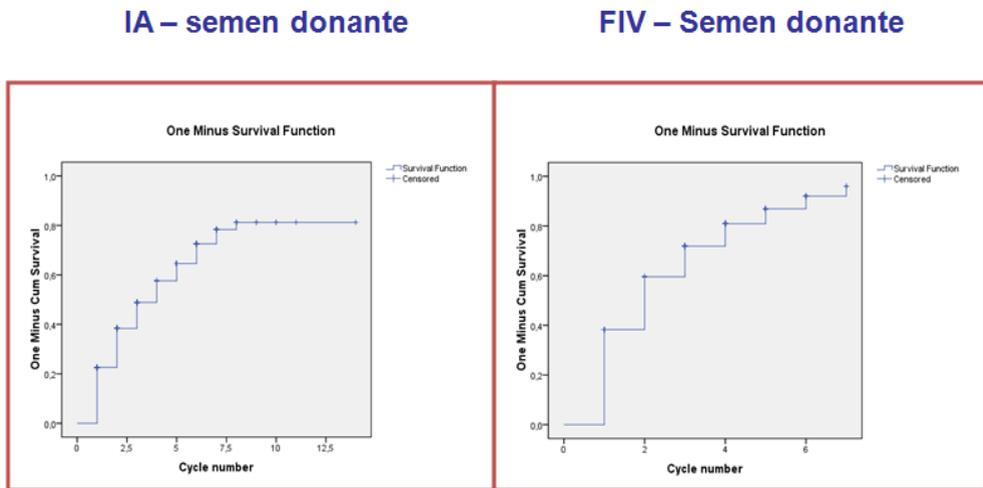


Figura 6: Tasas de RNV acumuladas usando semen donado. En esta figura se representan datos de más de 10.000 ciclos de IA y FIV realizados en IVI Valencia, donde las tasas acumuladas de RNV están representadas en el eje de las Y, y el número de ciclos en el eje de las X. Se observa la probabilidad acumulada de conseguir un RNV por ciclo, en ciclos en los que se usa semen donado para IA o FIV, describiendo la necesidad de repetir tratamientos y de cómo las probabilidades cambian conforme se suceden los intentos fallidos.

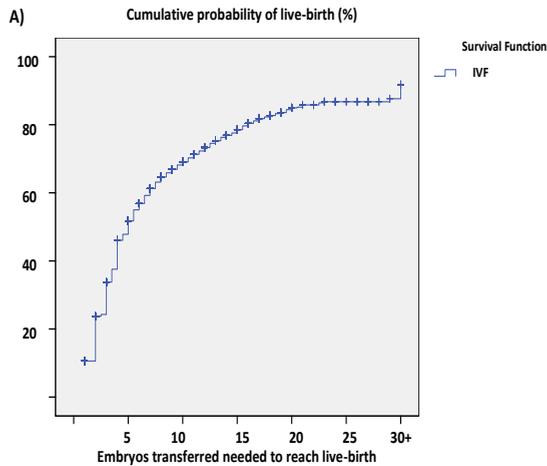


Figura 7: Probabilidad acumulada de conseguir un RNV en ciclos de FIV en función del número de embriones transferidos necesarios para conseguirlo.

El objetivo final de las TRA consiste en unir un ovocito y un espermatozoide de forma que originen un embrión que dé lugar a un RNV sano.

Pero, ¿cómo puede la evaluación de los gametos (ovocitos o espermatozoides) o la calidad de los embriones ser de utilidad para los pacientes? Es sabido que identificar el embrión óptimo, aumenta las probabilidades de conseguir una gestación y por ende un RNV y además que la gestación se consiga pronto. Sin embargo, desde la aparición de la vitrificación de ovocitos, el interés por la elección del embrión óptimo ha disminuido (metafóricamente hablando) ya que tarde o temprano se conseguirá la gestación, porque la paciente se transferirá todos y cada uno de los embriones que ha generado hasta que consiga un RNV. De la misma manera, si identificamos los mejores ovocitos podemos mejorar las probabilidades de éxito reproductivo, pero en España no se permite la selección de ovocitos, sino que se fecundarán todos aquellos ovocitos maduros disponibles después de la punción de la paciente/donante. Sin embargo, la selección del

mejor espermatozoide o el eyaculado óptimo, que sí está admitida, nos permitiría influenciar la calidad del embrión y a su vez mejorar los resultados de las TRA.

El espermatozoide es una célula ideal para que a partir de él se diseñen estrategias que nos permitan mejorar los resultados de las TRA, ya que presentan la ventaja de que casi siempre están en exceso a diferencia de los ovocitos, es decir, no son el factor limitante y por tanto, elegir bien puede mejorar los resultados por cada paciente/tratamiento realizado, no como con ovocitos y embriones sucede. Además, cada uno de ellos presenta una genética única, dando lugar a una gran variedad de fenotipos diferentes (Wang et al. 2012). Por tanto en el eyaculado podemos encontrar gran cantidad de espermatozoides diferentes, unos buenos y otros malos, pero puesto que solo se necesitan unos pocos la clave está en elegir con criterio.

3. Infertilidad masculina

Puesto que el factor masculino es responsable de aproximadamente la mitad de los casos de infertilidad, el estudio del varón supone una parte esencial en el análisis de la pareja infértil. El desarrollo de la ICSI, hizo que el factor masculino quedara relegado a segundo plano (Lewis 2007), ya que bastaba con disponer de un solo espermatozoide por ovocito obtenido tras la punción para poder realizar dicha técnica y obtener fecundación, gestación y RNV. Pero, con el paso del tiempo, tras las ventajas que ofrece estudiar el espermatozoide (anteriormente comentadas) y la no consecución hasta la fecha del 100% de éxito en las TRA, ha hecho que el estudio del factor masculino recupere protagonismo.

La infertilidad masculina puede deberse a diferentes factores tanto congénitos como adquiridos presentados en distintas localizaciones: fallos durante la espermiogénesis (Toshimori et al. 2004), cambios congénitos o adquiridos a nivel de hipotálamo e hipófisis (pre-gonadales), en el tracto urogenital (gonadales) y post-gonadales, infecciones y distintos factores endocrinos, genéticos e inmunológicos (tabla 2) (Khorram et al. 2001). Se calcula que alrededor del 30% son patologías de origen genético, 50% no genético y un 20% de la infertilidad masculina es de origen idiopático.

Causas de infertilidad masculina

Alteraciones a nivel Hipotálamo-hipofisarias o pre-gonadales	Alteraciones gonadales primarias o desórdenes gonadales	Alteraciones en el transporte de los espermatozoides o desórdenes post-gonadales	Infertilidad de origen desconocido o idiopática
<ul style="list-style-type: none"> • Congénitas Deficiencias congénitas de GnRH Hemocromatosis Desórdenes genéticos multiorgánicos • Adquiridas Tumores de la glándula pituitaria y el hipotálamo Desórdenes infiltrativos Problemas vasculares Alteraciones hormonales Drogas • Sistémicas Enfermedades crónicas Deficiencias nutricionales Obesidad 	<ul style="list-style-type: none"> • Congénitas Criptorquidia Distrofia miotónica Anorquia congénita Varicocele Síndromes de insensibilidad androgénica Deficiencias de la 5-α-reductasa (tipo 2) Síndrome de Klinefelter (XXY) y sus variaciones (XXY/XY, XXXY) Microdeleciones del cromosoma Y • Adquiridas Orquitis Orquitis granulomatosas Orquitis epididimarias Drogas Radiaciones ionizantes Toxinas ambientales Hipertermia Inmunológicas, incluida la enfermedad autoinmune poli-glandular Traumatismos Torsiones Castración Enfermedades sistémicas 	<ul style="list-style-type: none"> • Disfunciones del epidídimo Drogas Infecciones • Anormalidades de los vasos deferentes Ausencia congénita de los conductos deferentes Síndrome de Young Infecciones Vasectomías • Disfunción eyaculatoria Enfermedades de la médula espinal Disfunción de la autonomía Eyaculación precoz 	<ul style="list-style-type: none"> • Sistémicos

Tabla 2: Causas de infertilidad masculina.

El estudio de la infertilidad masculina debe incluir, de acuerdo con la OMS, una historia médica completa, un examen físico y dos análisis seminales o espermiogramas (OMS 2010).

3.1 Análisis básico del semen o espermiograma

Hasta la fecha, la única herramienta aceptada por la OMS para evaluar el potencial fértil del varón es el análisis básico del semen o espermiograma. Sin embargo, su valor predictivo para pronosticar las posibilidades de un hombre o una muestra de conseguir un RNV son relativamente bajas.

El espermiograma debe realizarse conforme al manual de la OMS en su última versión del 2010 (OMS 2010). El análisis incluye la valoración macroscópica y microscópica de la muestra. Dentro de la evaluación macroscópica se determina: el volumen, la viscosidad, el pH, el aspecto y el olor; y la evaluación microscópica consiste en la valoración de la concentración, movilidad, morfología, vitalidad, así como de la determinación de células redondas, leucocitos y anticuerpos anti-espermatozoides. Las características de estos parámetros han ido variando con el tiempo. Actualmente se siguen las directrices establecidas en el “Quinto manual de laboratorio para el examen y procesado del semen de la OMS 2010”. En la tabla 3 se muestran los valores de referencia establecidos en este manual.

Parámetros seminales	Límite de referencia más bajo
Volumen seminal (mL)	1,5 (1,4 – 1,7)
Número total de espermatozoides (10⁶ por eyaculado)	39 (33 – 46)
Concentración espermática (10⁶ por mL)	15 (12- 16)
Movilidad total (PR + NP, %)	40 (38 - 42)
Movilidad progresiva (PR, %)	32 (31 – 34)
Vitalidad (espermatozoides vivos, %)	58 (55 – 63)
Morfología espermática (formas normales, %)	4 (3,0 – 4,0)

Tabla 3: Valores límite de referencia inferior de los principales parámetros de calidad espermática. PR: Espermatozoides con movilidad progresiva; NP: Espermatozoides con movilidad no progresiva. (OMS 2010).

El espermiograma es una técnica relativamente sencilla, rápida, informativa y económica que puede venir acompañada por un examen físico, un análisis hormonal y un análisis genético, si su resultado o la anamnesis del paciente así lo requieren. Sin embargo, esta técnica presenta ciertas limitaciones, ya que se basa en aspectos evidentes o visuales (células), dejando a un lado aspectos moleculares (anomalías ocultas para el ojo humano) (Altmae and Salumets 2011, Lewis 2007).

Una de sus limitaciones es la interpretación de los resultados, ya que existe una zona de incertidumbre en la cual un paciente con resultado de análisis del semen que esté dentro de los parámetros normales, no indica necesariamente que sea fértil y que su muestra conlleve a la consecución de un embarazo; igual que un paciente con fertilidad probada puede presentar un resultado anormal del espermiograma (figura 8). Varios estudios sostienen este hecho (Nallella et al. 2006, Schulte et al. 2010). Además, los resultados del espermiograma son muy variables en cortos periodos de tiempo e incluso con diferentes parejas (Rivera et al. 2012).

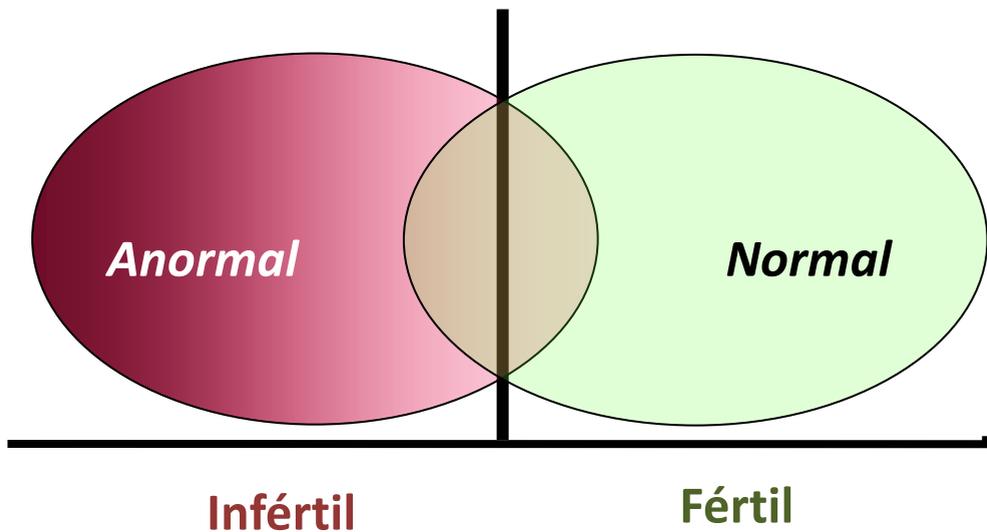


Figura 8: Resultados del espermiograma.

Otra limitación se hace patente cuando echamos un vistazo a la bibliografía, donde el valor mínimo de espermatozoides (expresado en millones de espermatozoides con movilidad progresiva) necesarios para realizar cada TRA varía para cada técnica y entre diferentes clínicas. Todo esto se refleja también en las sucesivas modificaciones que ha sufrido el manual de la OMS en cuanto a los rangos de referencia de los parámetros que establece desde 1980 hasta hoy (2010 última actualización).

Por tanto la utilidad del espermiograma se limita a: 1) estimar el potencial reproductivo a grandes rasgos, 2) identificar riesgos genéticos (como aneuploidías en el cariotipo, Fibrosis Quística (FQ), etc.), 3) identificar posibles infecciones o anticuerpos antiespermatozoides, 4) identificar obstrucciones en el tracto reproductor masculino, y 5) elegir la TRA más conveniente desde la perspectiva

coste/beneficio. Sin embargo no está indicado para: 1) predecir el éxito reproductivo y 2) permitirnos elegir el mejor espermatozoide o eyaculado con el fin de incrementar las oportunidades reproductivas. Por tanto, estos hechos apuntan claramente hacia la necesidad de descubrir y definir, de forma precisa y consistente, marcadores de fertilidad en espermatozoides para predecir el éxito reproductivo (Sanchez et al. 2013).

4. Biomarcadores moleculares de fertilidad en espermatozoides

En los últimos años, las líneas de investigación en el área de la andrología están centradas mayoritariamente en la búsqueda de nuevas herramientas o test complementarios al espermiograma, que mejoren su poder diagnóstico junto con nuevos métodos de selección espermática que aumenten las tasas de embarazo en las TRA. En concreto se ha centrado en la búsqueda de nuevos marcadores de infertilidad (Garrido et al. 2008, Rivera et al. 2012) permitiendo un gran progreso en el conocimiento acerca de los mecanismos bioquímicos y moleculares que regulan la producción de espermatozoides.

La fertilidad espermática puede ser representada como un continuo donde la parte superior representa el 100% de fertilidad y la parte inferior el 100% de infertilidad (figura 9). Para conseguir el 100% de fertilidad o de éxito reproductivo, necesitamos de muchos factores diferentes que contribuyen a ello en mayor o menor medida, pero exactamente no sabemos cuánto. Esto es lo que estaría representado en la figura 9, con las diferentes bandas y las diferentes anchuras de banda de tamaño desconocido (en función del % de contribución en el éxito reproductivo). Todas estas bandas (o factores) se corresponderían con las

anomalías evidentes (nivel visual o celular, aquellas que pueden ser evaluadas mediante el espermograma: recuento, movilidad, morfología) u ocultas (nivel molecular, aquellas que el espermograma no alcanza a valorar) cuyo ancho de banda podría ser estudiado.

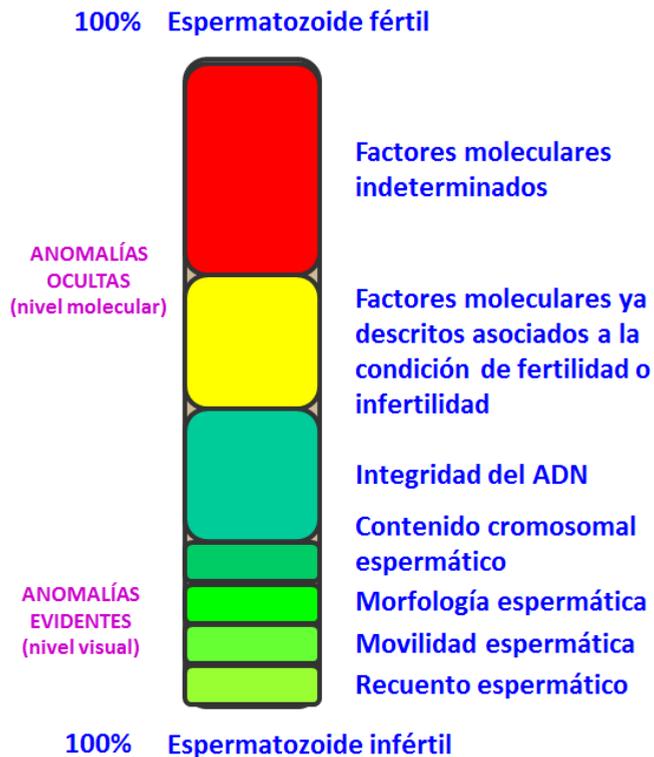


Figura 9: Fertilidad espermática.

Con todo ello sabemos que, el mejor espermatozoide debe tener la habilidad de nadar y penetrar en el moco cervical para encontrar y reconocer el ovocito, principalmente por reconocimiento de las glicoproteínas de la zona pelúcida, e iniciar los eventos que resultan en un embrión (Anton and Krawetz

2012, Garrido et al. 2008). En todos estos procesos participan varias moléculas las cuales pueden ser usadas como biomarcadores de la función espermática.

Hasta la fecha, varios factores espermáticos parecen estar relacionados con la fertilidad masculina (Esbert et al. 2011, Meseguer et al. 2011), pero ninguno de ellos se ha podido definir como responsable único de dicha situación, confirmando que la infertilidad masculina puede ser provocada por la combinación de diferentes factores. Por tanto, es necesario realizar estudios para determinar los factores moleculares clave en la función espermática, estandarizando el factor femenino para determinar la relación entre el factor estudiado y la habilidad del espermatozoide para conseguir o no embarazo.

5. Nuevos métodos de diagnóstico y selección en el semen

En los últimos años, se han llevado a cabo diversos estudios para identificar y comprender los mecanismos moleculares que intervienen en la infertilidad masculina. Fruto de ello, un gran número de biomarcadores espermáticos y test han sido descritos como útiles para la valoración de la función espermática (Anton and Krawetz 2012, Said and Land 2011). Entre ellos, los relacionados con la integridad del ADN (ácido desoxirribonucleico), estrés oxidativo y expresión de perfiles de ARN (ácido ribonucleico), son los más estudiados.

Actualmente, las técnicas de selección de espermatozoides utilizadas como el SU o los gradientes de densidad, dependen de la movilidad y morfología de los espermatozoides, no siendo suficientemente eficientes para conseguir

poblaciones de espermatozoides libres de daño u oxidación de ADN, con morfología normal y fisiológicamente competentes. Además, empleando las TRA, la selección natural del tracto reproductor femenino se obvia, especialmente en los tratamientos en los que se realiza la ICSI, donde el éxito reproductivo es prácticamente independiente de la función espermática.

Todos estos hechos, permiten concluir que es necesario el desarrollo de nuevas herramientas de diagnóstico basadas en la batería de biomarcadores definidos. Dichos biomarcadores nos permitirán valorar el potencial de fertilidad masculina, mejorar el diagnóstico, definir las deficiencias moleculares y si es posible, usarlos para separar espermatozoides normales y anormales capaces de fecundar el ovocito y resultar en un embrión y un embarazo a término (Said and Land 2011).

Las ciencias “ÓMICAS”, desarrolladas basándose en los hallazgos conseguidos por el Proyecto Genoma Humano, han revolucionado el método clásico de análisis, permitiendo la evaluación masiva de cientos y miles de genes, proteínas o metabolitos en un mismo experimento, proporcionando una nueva dimensión de estudio en cualquier disciplina y permitiendo investigaciones para obtener una visión global de procesos biológicos y moleculares (Egea et al. 2014).

5.1. Técnicas de diagnóstico espermático

5.1.1. Fragmentación del ADN espermático (SDF)

Cualquier tipo de anomalía de la cromatina o daño en el ADN, puede afectar disminuyendo el potencial fértil del varón (Meseguer et al. 2011). Por

tanto, la evaluación de la integridad del ADN espermático se ha convertido en los últimos años en un nuevo e importante biomarcador de la calidad del semen que puede tener el potencial para discriminar entre varones fértiles e infértiles y puede por tanto ser usado como técnica complementaria al espermiograma (Meseguer et al. 2011).

La SDF es originada por diferentes causas incluyendo apoptosis abortiva (Singh et al. 2003), estrés oxidativo, exposición a sustancias químicas (Irvine et al. 2000, Smith et al. 2006) que da lugar a reacciones redox y defectos en la espermiogénesis (Carrell et al. 2007), entre otros. Todas estas causas han abierto debate sobre la utilidad de esta técnica de diagnóstico.

Los test actualmente disponibles para medir el daño del ADN, entre otros, incluyen el ensayo Cometa (Comet assay), el análisis de la estructura de la cromatina del espermatozoide (Sperm Chromatin Structure assay, SCSA), el test de dispersión de la cromatina espermática (Sperm Chromatin Dispersion test, SCD), la técnica TUNEL (Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling assay) y la detección de daños de ADN mediante la técnica de hibridación in situ fluorescente (DBD-FISH) (Lewis January 2012).

Desafortunadamente, muchas de las técnicas empleadas para detectar daño en el ADN nos proporcionan información incompleta sobre el origen y las características del daño detectado, y ninguna nos provee del conocimiento de su etiología y patogénesis, por tanto su uso de manera complementaria al espermiograma permanece sujeto a controversia (Simon et al. 2010). De hecho, la ASRM (Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine 2008)

concluyó que el valor clínico de esta técnica no estaba definido, y no contenía evidencia lo suficientemente fuerte para proporcionar una indicación clínica para su uso rutinario en el tratamiento de la infertilidad masculina.

5.1.2. Estrés oxidativo

El metabolismo normal de los espermatozoides genera especies reactivas de oxígeno (EROs), y éstas, cuando se encuentran en un rango adecuado, juegan un papel importante durante la capacitación espermática y otras funciones celulares clave (Tartibian and Maleki 2012). Sin embargo, cuando sus niveles son altos, pueden superar la actividad antioxidante (Santiso et al. 2010) e inducir fragmentación de ADN espermático, desregular la reacción acrosómica e impedir el reconocimiento y fusión entre el espermatozoide y el ovocito (especialmente O^2 , H_2O_2 y NO) e incluso inducir la apoptosis. Esto está causado por una extrema sensibilidad de los espermatozoides humanos al daño inducido por EROs debido a la especial composición de su membrana plasmática, la cual contiene elevado número de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) (Thomson et al. 2011).

Sin embargo, las células espermáticas tienen defensas contra los niveles excesivos de EROs que incluyen a la superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPxs) y glutatión reductasa (GR), entre otros, confirmando que tanto los marcadores de estrés oxidativo como los antioxidantes pueden jugar un papel importante en la etiología del potencial fértil del varón (Tartibian and Maleki 2012).

Existe un interés específico en el efecto de las EROs sobre el ADN, incluyendo la formación de 8-hydroxydeoxyguanosina (8-OHdG), uno de los mayores productos oxidativos del ADN y por tanto un biomarcador útil del daño de ADN espermático susceptible de ser analizado simultáneamente junto a la fragmentación de ADN mediante el kit OxyDNA Assay Kit (Cambiochem, Barcelona, Spain) (Thomson et al. 2011).

En resumen, las medidas relacionadas con el estrés oxidativo no han sido todavía introducidas en el análisis rutinario del semen. Esto se debe principalmente a la falta de datos clínicos y consenso respecto al empleo de la información recopilada (Garrido et al. 2008).

5.1.3. Hibridación In Situ Fluorescente (FISH)

El uso de espermatozoides de hombres con infertilidad severa en la técnica ICSI, preocupa por el posible aumento de incidencias de las aneuploidías cromosomales en los espermatozoides de estos pacientes en comparación con los pacientes fértiles (Bonduelle et al. 2002, Harton and Tempest 2012), ya que estos desórdenes cromosomales son la principal causa de pérdida gestacional y desarrollo de discapacidades en humanos (Hassold and Hunt 2001).

El análisis del contenido cromosomal espermático usando FISH antes de las TRA, nos permite evaluar la presencia de anomalías cromosómicas en muestras de semen en fresco, epidídimo o testículos, y así determinar el riesgo de transmisión de las anomalías cromosómicas de origen paterno a la descendencia o incluso recomendar llevar a cabo biopsia embrionaria y análisis

cromosómico como parte del proceso de selección embrionaria (Bonduelle et al. 2002, Egozcue et al. 1997, Harton and Tempest 2012, Rodrigo et al. 2010).

Hasta la fecha, varios estudios (Harton and Tempest 2012, Nicopoullos et al. 2008, Rodrigo et al. 2010) han mostrado similares tasas de fecundación en pacientes con resultados de FISH normales o anormales, menor tasa de embarazo e implantación con resultados de FISH anormales, y mayores tasas de aborto con pacientes con FISH anormal. Por tanto, los resultados del FISH nos permiten ofrecer un consejo genético más personalizado basado en el tipo de anormalidad observada y aconsejar acerca la oportunidad de la realización de diagnóstico prenatal, amniocentesis, diagnóstico genético preimplantacional o incluso recomendar el uso de espermatozoides donados (Rodrigo et al. 2010).

5.1.4. Perfil ARN espermático: Transcriptómica

Como se ha comentado antes, las ciencias “-ómicas” nos permiten mejorar el conocimiento en un campo consiguiendo una amplia visión de un sistema biológico complejo y obteniendo gran cantidad de información con relativamente poco coste y esfuerzo (Egea et al. 2014).

La transcriptómica es la ciencia que estudia el conjunto de ARNs mensajeros (ARNm) expresados en la célula sometida a determinadas condiciones durante un tiempo concreto. Sus técnicas han sido aplicadas a la evaluación de la expresión genética de las células espermáticas con el fin de un entendimiento más detallado de las bases moleculares de la fertilidad masculina estudiando los

perfiles de expresión génica relacionados con la espermatogénesis entre hombres fértiles e infértiles (Egea et al. 2014, Garrido et al. 2009).

Es sabido que el ARNm es necesario desde la primera división embrionaria hasta la activación del genoma embrionario, y en consecuencia puede afectar los rasgos fenotípicos de los embriones y la descendencia (Garcia-Herrero et al. 2010a). Varias técnicas pueden ser usadas para examinar el perfil de ARN de espermatozoides (RNAseq y qPCR (reacción en cadena de la polimerasa)), pero hasta la fecha, los únicos estudios realizados en espermatozoides, utilizan la tecnología de microarrays que permite establecer todas las secuencias expresadas en este tipo de células (figura 10) (Garcia-Herrero et al. 2010b, Garcia-Herrero et al. 2011, Garrido et al. 2009).

Mediante el uso de esta tecnología (figura 10), se ha demostrado que existen diferencias entre los perfiles de expresión génica o perfiles transcriptómicos, de donantes fértiles y pacientes infértiles (Garcia-Herrero et al. 2010a), así como entre los pacientes que consiguen embarazo y aquellos que no lo consiguen tras la aplicación de diferentes TRA (Garcia-Herrero et al. 2010a, Garcia-Herrero et al. 2010b, Schena et al. 1995). Además se ha visto que el requerimiento molecular del espermatozoide es menor, cuanto más invasiva es la técnica (Garcia-Herrero et al. 2010b, Garcia-Herrero et al. 2011).

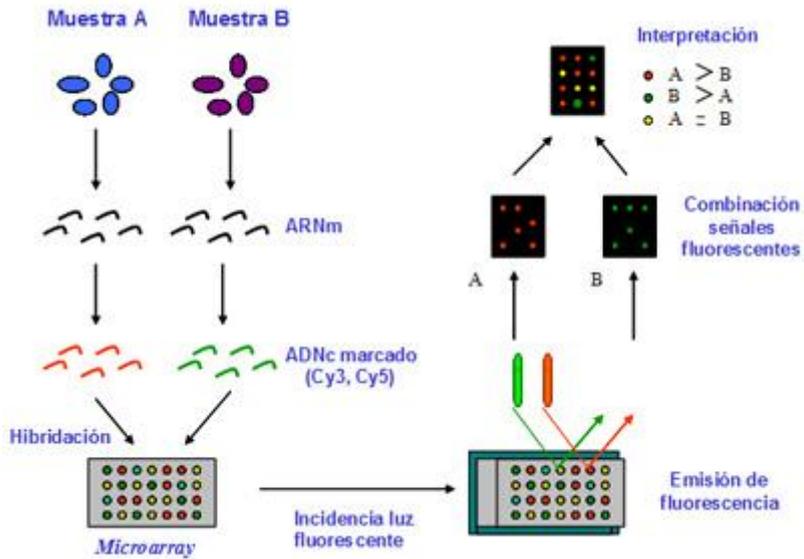


Figura 10: Microarrays.

La transcriptómica podría ser aplicada en la clínica complementando al análisis básico del semen (Rivera et al. 2012) como herramienta diagnóstica en la evaluación de la infertilidad masculina mediante el análisis de expresión de ARNm espermático, ayudando además a la elección del tratamiento reproductivo más adecuado. Aun así son necesarios más estudios.

5.1.5. Perfil metabólico espermático: Lipidómica

La metabolómica es el estudio del conjunto de metabolitos en células y fluidos, usando varias formas de aproximaciones espectrales y analíticas con el fin de determinar metabolitos asociados a estados fisiológicos o patológicos (Rivera et al. 2012).

En el caso de los espermatozoides, la información disponible hasta la fecha es bastante limitada. Solo unos pocos artículos han estudiado el metaboloma, ya que la metabolómica es un campo de análisis muy reciente y novedoso.

Los estudios que existen hasta la fecha están más centrados en metabolitos resultado del estrés oxidativo (Deepinder et al. 2007) o del fluido seminal (Gupta et al. 2011), pero no en los lípidos, ya que aunque tuvieron su auge hace un par de décadas donde se estudiaba su implicación en la fisiología reproductiva (Nissen and Kreysel 1983a), la bibliografía disponible hace patente que estas investigaciones se fueron abandonando por desconocimientos de sus rutas metabólicas y sus funciones. En la actualidad y gracias a las técnicas “ómicas”, se les ha podido devolver el protagonismo a estas moléculas que participan en múltiples procesos bioquímicos y estructurales.

5.1.5.1: Clasificación

La clasificación clásica de los lípidos diferencia dos grandes grupos en base a su polaridad. Por un lado los lípidos polares, principalmente fosfolípidos, como importantes componentes de las membranas celulares y cuya función es eminentemente estructural; y por otro, los lípidos neutros o apolares, con función fundamentalmente energética, entre los que destacan los triacilglicéridos.

Dentro de estos dos grandes grupos se definen 5 categorías: ácidos grasos, glicerolípidos, esfingolípidos, glicerofosfolípidos y lípidos esteroides (tabla 4) (Fahy et al. 2009).

CATEGORY	MAIN CLASS	SUB-CLASS	GENERAL NAME	OWL CODE	GENERIC STRUCTURE	
Fatty Acids	Non-esterified Fatty Acids	n/a	Saturated fatty acids (SFA)	FFA		
		n/a	Monounsaturated fatty acids (MUFA)	FFA		
		n/a	Polyunsaturated fatty acids (PUFA)	FFA		
	Oxidized fatty acids	Eicosanoids	Hydroxy-eicosatetraenoic acids (HETE) Epoxy eicosatetraenoic acids (EET)	FFAox		
				FFAox		
			Octadecanoids	Dihydroxyeicosatrienoic acids (DHETE)	FFAox	
				Hydroxy-octadecadienoic acids (HODE) Oxo-octadecadienoic acids (Oxo-ODE)	FFAox FFAox	
	Fatty esters	n/a	Acyl carnitines	AC		
	Glycerolipids	n/a	n/a	Diacylglycerides	DAG	
n/a		n/a	Triacylglycerides	TAG		
Sphingolipids	Phosphosphingolipids	n/a	Sphingomyelins	SM		
	Ceramides	n/a	N-acylsphingosines (Ceramides)	Cer		
Glycosphingolipids	n/a	Monohexosylceramides	CMH			
Sphingoid bases	n/a	n/a	Free Sphingoid bases	FSB		

CATEGORY	MAIN CLASS	SUB-CLASS	GENERAL NAME	OWL CODE	GENERIC STRUCTURE
Glycerophospholipids	Glycerophosphocholines	Phosphatidylcholines (PC)	Diacylglycerophosphocholines	DAPC	
			1-ether, 2-acylglycerophosphocholines	MEMAPC	
		Lysophosphatidylcholines (LPC)	1-Monoacylglycerophosphocholines	MAPC	
			2-Monoacylglycerophosphocholines	MAPC	
			1-Monoetherylglycerophosphocholines	MEPC	
	Glycerophosphoethanolamines	Phosphatidylethanolamines (PE)	Diacylglycerophosphoethanolamines	DAPE	
			1-ether, 2-acylglycerophosphoethanolamines	MEMAPE	
		Lysophosphatidylethanolamines (LPE)	1-Monoacylglycerophosphoethanolamines	MAPE	
			2-Monoacylglycerophosphoethanolamines	MAPE	
			1-Monoetherylglycerophosphoethanolamines	MEPE	
Glycerophosphoinositols	Phosphatidylinositols (PI)	Diacylglycerophosphoinositols	DAPI		
Sterol Lipids	Sterols	n/a	Cholesteryl Esters	ChoE	
		n/a	Free bile acids (FBA)	BA	
	Bile acids	n/a	Taurine conjugated bile acids (TCBA)	BA	
		n/a	Glycine conjugated bile acids (GCBA)	BA	

Tabla 4: Clasificación de los lípidos.

5.1.5.2. Funciones

La formación de membranas celulares, el almacenamiento y producción de energía, y la síntesis de eicosanoides y hormonas esteroideas, son algunas de las funciones tradicionalmente atribuidas a los lípidos. No obstante en los últimos años, se ha descubierto el papel fundamental que estas moléculas desempeñan en otros muchos procesos fisiológicos como reguladores de la expresión génica y mediadores en los procesos de inflamación, reproducción y neuroprotección (Dunbar et al. 2014, Funk 2001, Wathes et al. 2007).

Además de su papel básico como componentes estructurales, los fosfolípidos de la membrana celular forman parte del conjunto de PUFAs de la célula. A partir de ellos, mediante la acción de enzimas específicas, estos ácidos grasos serán liberados para entrar a formar parte de diversos procesos fisiológicos, ya sea de manera directa o a través de la formación de derivados. Concretamente las prostaglandinas desempeñan un papel relevante en varios procesos reproductivos femeninos y están implicados en el desarrollo testicular, tanto durante la embriogénesis como en el adulto, la espermatogénesis y la maduración espermática (Rossitto et al. 2015). Los PUFA de cadena larga (LCPUFAs) afectan a la producción de prostaglandinas actuando como sustratos de las ciclooxigenasas una vez que éstos han sido liberados de la membrana celular por la acción de la fosfolipasa A2, enzima encargada de liberar los ácidos grasos en posición sn-2 de los glicerofosfolípidos.

Se muestra aquí un resumen de la bibliografía que existe en relación a la importancia de los lípidos, especialmente de los PUFAs, en la fisiología del sistema reproductivo. Dicha influencia queda demostrada en prácticamente todos los

niveles del proceso de reproducción, desde el desarrollo embrionario del tejido testicular, pasando por la espermatogénesis y la fecundación, hasta la formación de la placenta. Y más allá aún, la relevancia de los PUFAs en la reproducción, queda también patente a lo largo de la formación del sistema nervioso fetal.

Un estudio realizado en ratas gestantes en el que se analizó la composición lipídica del tejido cerebral, músculo, hígado y tejido adiposo, demostró como el estradiol induce una movilización del DHA (ácido docosahexaenoico) desde los tejidos maternos, favoreciendo una mayor biodisponibilidad de este ácido graso, justo en los momentos en los que la demanda fetal es más importante y supera la capacidad materna para la síntesis *de novo* (Fabelo et al. 2012).

5.1.5.3. La Lipidómica aplicada a la andrología

Podemos decir que, entre los factores moleculares implicados en la función espermática, los lípidos de la membrana del espermatozoide son de especial interés, dado que su participación en diferentes eventos conduce al éxito en la fecundación (Flesch and Gadella 2000), en la capacitación y en la interacción espermatozoide-ovocito (Flesch and Gadella 2000, Kawano et al. 2011), y mejoran su habilidad para sobrevivir tras el proceso de congelación/descongelación. De hecho, cambios en la composición lipídica de la membrana plasmática han sido relacionados con la disminución de la calidad del espermatozoide durante la criopreservación (Beirao et al. 2012, Kaeoket et al. 2010, Maldjian et al. 2005). Además, su particular composición lipídica, contiene niveles muy elevados de fosfolípidos, esteroides, glicolípidos y ácidos grasos saturados y poliinsaturados que

aumentan su sensibilidad al ataque oxidativo y han sido correlacionados positivamente con la calidad espermática. Probablemente sea porque estos ácidos grasos proveen a la membrana plasmática de una alta fluidez (Niu and Wang 2009). Esto es aparentemente contradictorio, ya que recientes investigaciones soportan la hipótesis de que los PUFAs, inicialmente muy susceptibles a la peroxidación lipídica, también presentan propiedades antioxidantes (principalmente los de la serie n-3) y por lo tanto son menos propensos a la peroxidación lipídica (Garcia et al. 2011).

Como se ha mencionado anteriormente, en las décadas de los 80 y los 90 varios estudios pretendían encontrar la conexión entre la composición lipídica de la membrana espermática y la viabilidad y funcionalidad de los espermatozoides.

Nissen y cols. (Nissen and Kreysel 1983b), dieron a conocer la relación significativa entre el contenido del DHA y el recuento y número de espermatozoides con movilidad normal. A pesar de que los lípidos están involucrados en los procesos de síntesis y maduración de los espermatozoides, la movilidad, es el parámetro relacionado con los lípidos más estudiado hasta la fecha.

Varios trabajos (Force et al. 2001, Lenzi et al. 1996, Zhou et al. 2010), han puesto de manifiesto el importante papel de los lípidos de la membrana plasmática del espermatozoide en la calidad seminal. Dado la susceptibilidad de los PUFAs al ataque oxidativo, alteraciones funcionales no visibles en los espermatozoides, podrían estar relacionadas directa o indirectamente con daños oxidativos, disminuyendo de esta forma el potencial fértil del varón. Por tanto, la

peroxidación lipídica, podría ser uno de los factores bioquímicos responsables del bajo contenido de DHA en los espermatozoides con movilidad reducida (Nissen and Kreysel 1983b).

Cómo ya sabemos, la fisiología y las características moleculares de los espermatozoides van variando a lo largo de su maduración en el epidídimo y su paso por todo el tracto reproductor masculino hasta llegar al eyaculado (Cooper 1986). Estos cambios moleculares que tienen lugar en el epidídimo, en concreto los que se dan en la composición lipídica aumentando la fluidez de la membrana tales como el aumento del contenido en fosfatidilcolina y disminución de la relación colesterol/fosfolípidos, están relacionados con la inducción de la movilidad progresiva espermática (Haidl and Opper 1997, Rejraji et al. 2006). Un aumento de los niveles de colesterol en espermatozoides humanos con baja movilidad, se relaciona con un aumento de la rigidez de la membrana, provocando alteraciones bioquímicas y funcionales durante el proceso de capacitación (Buffone et al. 2009).

Por el contrario, los PUFAs, que son los ácidos grasos más abundantes en la membrana espermática, favorecen la movilidad del espermatozoide ya que dotan de fluidez a la membrana del mismo. Pero a su vez, convierten al espermatozoide en una diana fácil para las EROs comprometiendo la integridad y viabilidad celular del espermatozoide (Wathes et al. 2007).

Como hemos visto anteriormente, en los últimos años, el estrés oxidativo como causa de daño espermático ha despertado interés por poder ser una de las causas más comunes de infertilidad masculina. Muchos de los estudios se centran

en conocer los mecanismos desencadenantes de la producción de EROs (Santiso et al. 2010, Tartibian and Maleki 2012, Thomson et al. 2011), pero parece que son los propios espermatozoides defectuosos la principal fuente de lipoperoxidación, provocando el inicio de la cascada de daño oxidativo que afecta a la calidad del semen (Wathes et al. 2007). Por lo tanto, el análisis de la composición lipídica de los espermatozoides y su grado de peroxidación lipídica se podrían utilizar como herramienta diagnóstica para complementar al espermiograma.

Pocos estudios han identificado hasta la fecha el perfil lipídico espermático, limitándose a describir compuestos metabólicos en general con solo unos pocos lípidos incluidos (Bernabo et al. 2015, Gupta et al. 2011, Khoshvaght et al. 2016, Oresti et al. 2015, Paiva et al. 2015, Schroter et al. 2016, van Gestel et al. 2016). Por ejemplo, Gupta y cols. (Gupta et al. 2011) detectaron 10 metabolitos relacionados con la fertilidad masculina donde se incluía la glicerofosocolina, mientras que Deepinder y cols. (Deepinder et al. 2007) identificó diferencias en los niveles de glicerilfosforilcolina y glicerilfosforiletanolamina entre donantes y pacientes infértiles. Más recientemente, Paiva y cols. (Paiva et al. 2015) identificaron algunos lípidos en muestras de semen (2-metilglutarato, 2-hidroxi-3-metilvalerato, butirato, caprato, O-acetilcarnitina, L-acetilcarnitina, y sn-glicero-3-fosfocolina), entre miles de metabolitos.

Además de poder diagnosticar una muestra de semen mediante el análisis de los lípidos y clasificarla según los parámetros de la OMS, podemos darle otro enfoque creando perfiles lipídicos que se relacionen con el éxito reproductivo. Estos perfiles lipídicos consistirían en la descripción de todos los lípidos que se

encuentran en los espermatozoides de una muestra que consigue embarazo y aquellos que se encuentran en espermatozoides de una muestra que no consigue embarazo. De esta forma podremos seleccionar la muestra en función de si dará lugar a embarazo o no, en vez de clasificarla en función de su movilidad, concentración, morfología o estado de oxidación. Este razonamiento es el que dio lugar a la elaboración de esta tesis.

5.1.6. Proteómica

La proteómica nos permite conocer el conjunto de proteínas que una célula, tejido u organismo está expresando en un momento determinado o bajo unas condiciones particulares. Dado que las interacciones entre proteínas son las responsables de la función celular, el enfoque proteómico es más adecuado en este caso que el genómico. La identificación y cuantificación de las proteínas que constituyen una célula o tejido nos ayudan a entender los procesos que se llevan a cabo en ellos.

5.1.6.1. Proteómica aplicada a la andrología

Como se ha comentado anteriormente, la proteómica permite la comparación de perfiles proteicos entre dos condiciones biológicas diferentes. La ventaja de usar células espermáticas en proteómica está unida a la accesibilidad y facilidad de purificación de estas células, además de que el número necesario para realizar el análisis no es un factor limitante, por ello son células particularmente adecuadas para el análisis proteómico (Oliva et al. 2009).

El gran progreso y desarrollo de las técnicas proteómicas durante los últimos años, principalmente en espectrometría de masas, ha supuesto un aumento en esfuerzos dedicados al estudio de proteínas espermáticas y, más específicamente, al perfil proteico de espermatozoides fértiles (du Plessis et al. 2011). Los espermatozoides, siendo células traduccional y transcripcionalmente silenciosas (Brewis and Gadella 2010), necesitan de la aproximación proteómica para estudiar su función. Un gran número de proteínas han sido identificadas, las cuales pueden jugar un papel importante en fertilidad masculina. Con esta información se podía generar un catálogo de proteínas espermáticas para clarificar la importancia de su función, así como ayudar en la detección de espermatozoides no competentes fisiológicamente (du Plessis et al. 2011). En proteínas espermáticas nucleares (de Mateo et al. 2011), la función de la cromatina paterna en el ovocito es importante, así como es importante para el marcado epigenético, la correcta fecundación y el desarrollo embrionario.

La comparación entre perfiles proteicos de varones fértiles e infértiles ha sido el primer paso para identificar proteínas seminales exclusivas que están relacionadas con la infertilidad masculina usando herramientas proteicas como técnicas de separación de proteínas en una o dos dimensiones (1D-SDS-PAGE O 2D-SDS-PAGE), electroforesis diferenciales de dos dimensiones (2D-DIGE), así como la cromatografía líquida de alta presión (HPLC), espectrometría de masas (MS), cromatografía de fase líquida reversa acoplada a tándem MS (RS-LC-MS/MS), arrays de proteínas, técnicas de ionización asistida por láser acoplada a MS (MALDI-TOF) (Egea et al. 2014) (figura 11) y el SWATH-MS espectrometría de masas de adquisición independiente de datos, que es una técnica muy reciente (figura 12) (Perez-Patino et al. 2016, Vaswani et al. 2015).

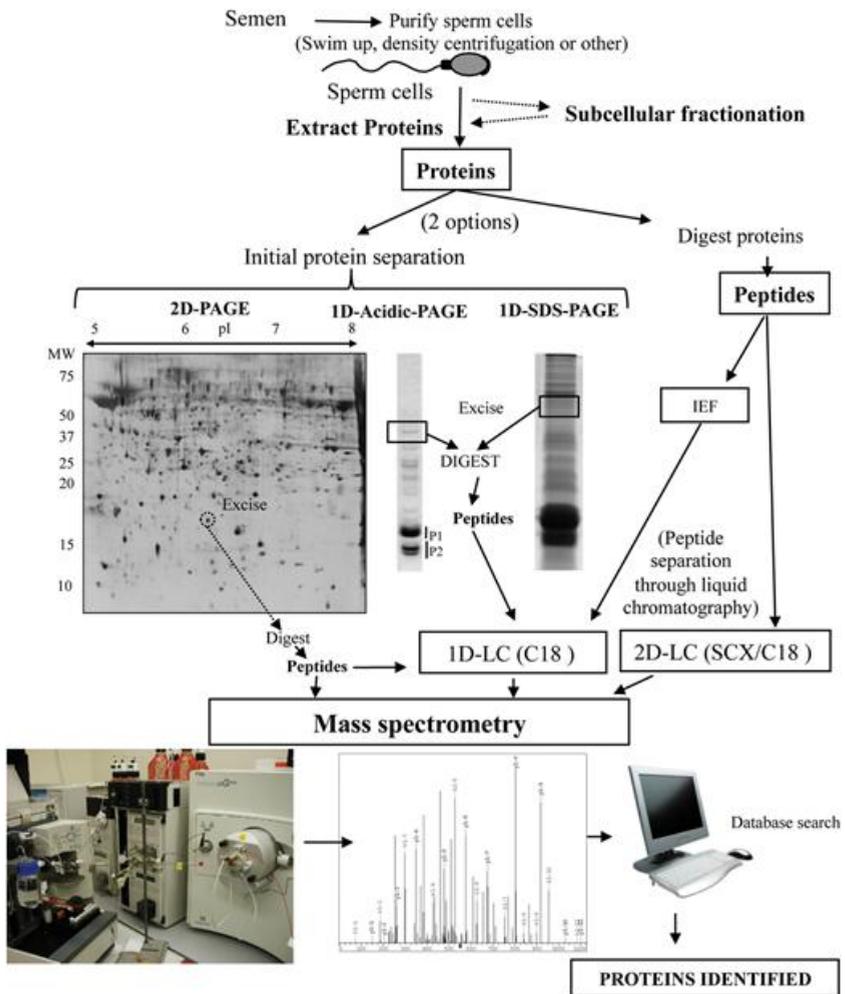


Figura 11: Diferentes estrategias para el estudio del proteoma espermático (Amaral et al. 2014).

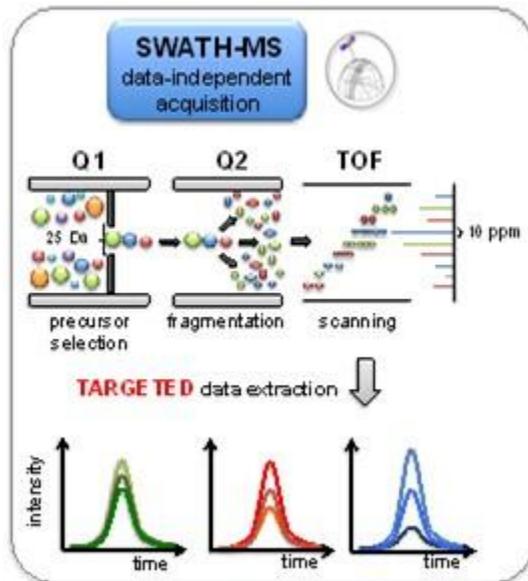


Figura 12: SWATH-MS.

Estas técnicas son capaces de dividir proteínas complejas o *pools* de péptidos extraídos de células, medios celulares o fluidos humanos en base a características únicas, principalmente: carga, tamaño, hidrofobicidad y presencia de dianas específicas o aminoácidos (du Plessis et al. 2011, Stendardi et al. 2011, Thacker et al. 2011).

Con estas técnicas, algunas funciones desarrolladas por las proteínas espermáticas en diferentes procesos pueden también ser elucidadas, y así identificar modificaciones post-traduccionales capaces de afectar a proteínas y consecuentemente a la función espermática. Por tanto, avances en proteómica pueden ayudar a determinar todas las moléculas potencialmente involucradas en

la función espermática, así como identificar causas de infertilidad desconocidas (de Mateo et al. 2007).

En 2009, Baker y cols. (Baker and Aitken 2009) utilizaron los datos obtenidos del proteoma de la levadura para predecir que el número de proteínas presentes en el espermatozoide humano rondaría las 2000-2500. Hoy en día, los estudios proteómicos elevan el número a 6198 proteínas diferentes (Amaral et al. 2014). Entre las funciones de estas proteínas encontramos: metabolismo energético, apoptosis, ciclo celular, meiosis y tráfico de membranas, entre otras. De la misma manera, se ha visto que el espermatozoide humano también contiene proteínas implicadas en el metabolismo de los ARNs y la regulación de la traducción, procesos que se creían inexistentes en estas células (Amaral et al. 2014).

5.1.6.1.1. Estudio descriptivo de la proteómica en espermatozoides humanos

El conocimiento del proteoma espermático es importante en la identificación de las muchas causas todavía desconocidas de infertilidad masculina.

Estudio de proteómica en espermatozoides

Hasta la fecha, los estudios se han centrado en identificar las proteínas presentes en los espermatozoides de pacientes infértiles con alteraciones en el resultado del espermograma. Varios estudios (du Plessis et al. 2011, Oliva et al. 2009) han elucidado diferencias proteómicas en muestras de semen de pacientes astenozoospermicos (Li et al. 2017, Martinez-Heredia et al. 2008, Saraswat et al.

2017) y oligozoospermicos (Botta et al. 2009). Martínez-Heredia y cols. (Martínez-Heredia et al. 2008) encontraron variaciones de 17 proteínas en muestras astenozoospermicas, pero ninguna de ellas por sí sola era única responsable del estado espermático. Sin embargo, recientemente un grupo ha descubierto que la ruta de transducción de las proteínas JAK-STAT/PSM β 3, puede estar involucrada en mecanismos patogénicos de astenozoospermia (Li et al. 2017). En pacientes oligozoospermicos (Botta et al. 2009) variaciones de 14 proteínas fueron detectadas en comparación con los grupos control. Estas proteínas fueron clasificadas en 3 grupos según su función: proteínas productoras de estrógenos, proteínas estructurales y proteínas de señalización y reguladoras. Estas proteínas podrían participar en mecanismos oligozoospermicos fisiopatogénicos y sus alteraciones podría ser el resultado de una alteración general de estas proteínas en estos pacientes. Además, un caso con globozoospermia fue también estudiado (Liao et al. 2009) mostrando que la membrana acrosomal del espermatozoide asociada a proteínas, esta desregulada en esta condición y que las 35 proteínas cuyos niveles se encuentran alterados en estos pacientes están implicadas en el citoesqueleto, metabolismo y movilidad.

Por último, un estudio reciente (Garin-Muga et al. 2016), con el fin de completar el actual catálogo del proteoma humano con las proteínas todavía no identificadas (missing proteins), analizó espermatozoides (entre otras células) como fuente prometedora de este tipo de proteínas, identificando 97 “missing proteins” entre las que se encontraban DNAH3 (dineína 3 de cadena pesada) involucrada en la motilidad del espermatozoide e implicada en el montaje flagelar del espermatozoide y TEPP (proteína de testículo, próstata y placenta) no descritas hasta la fecha.

Estudios de proteómica en el plasma seminal

El plasma seminal humano contiene muchas proteínas que son importantes en la capacitación espermática, modulación de la respuesta inmune del útero, e interacción con la zona pelúcida y posterior fusión ovocitaria.

Existen varios estudios que describen las proteínas que se encuentran en dicho fluido procedentes de los órganos accesorios. Un estudio (Zylbersztejn et al. 2013) describió el perfil proteico de varones adolescentes con varicocele, concluyendo que había proteínas que podían servir como marcadores del diagnóstico temprano de esta patología. Un año antes (Fu-Jun and Xiao-Fang 2012) ya se habían descrito 270 proteínas relacionadas con la maduración espermática, donde 34 eran proteínas epididimales y 274 prostáticas (algunas de ellas eran originadas en ambos órganos accesorios).

Todo el contenido de proteínas presente en fluido epididimal y tejido testicular ha intentado ser caracterizado (Guyonnet et al. 2011, Oliva et al. 2009), dado su posible efecto en la calidad espermática y su uso potencial como marcadores en patologías reproductivas. De esta forma, se encontraron: 4 potenciales marcadores de azoospermia no obstructiva (estabilina 2, proteína centrosómica 135-kDa (CP135), factor de liberación de nucleótidos de guanina y proteína inducible por prolactina (PIP)) (Upadhyay et al. 2013), 83 potenciales marcadores en testículos, 42 en epidídimo, 7 en vesícula seminal y 17 en próstata; estos últimos en otro estudio (Camprubi et al. 2012). Un estudio reciente (Soda et al. 2017) ha analizado en humanos las proteínas de capping de la actina β 3 (hCP β 3) y α 3 (hCP α 3) como posibles marcadores de fertilidad masculina, y concluye que parece que estas proteínas juegan un papel importante en la

espermiogénesis, por lo que la alteración de la cantidad de estas proteínas puede ser causa de infertilidad masculina y un factor pronóstico de los resultados de las TRA.

5.1.6.1.2. Estudio comparativo de proteómica en los espermatozoides humanos

Los extensos catálogos proteómicos nos proporcionan una idea de las proteínas presentes en estas células en un momento determinado, pero algunas de estas proteínas son modificadas durante el tránsito por el epidídimo, o posteriormente para permitir el movimiento característico de la hiperactivación o la unión al ovocito. Los análisis proteómicos comparativos permiten conocer cuáles de esas proteínas constituyen dianas a modificar para llevar a cabo estos procesos y, por extensión, qué defectos o ausencias proteicas pueden producir infertilidad.

Unos de los primeros estudios a este respecto (Pixton et al. 2004) comparó el perfil proteico de un paciente normozoospermico que había sufrido un fallo de fecundación tras FIV convencional con el de tres donantes fértiles, obteniendo 20 proteínas cuya cuantía difería entre ambos grupos. Sin embargo, sólo fueron capaces de identificar con seguridad dos de las 20 proteínas: SABP (proteína de secreción activa de actina) y ODF2 (proteína 2 de fibras densas externas), que se hallaban en mayor cantidad en el paciente. La mayor cantidad de SABP podría inhibir la hiperactivación y la reacción acrosómica. Por su parte la ODF2 forma parte de la estructura que rodea el axonema a lo largo de las piezas media y principal de la cola. Más tarde, Mateo y colaboradores (de Mateo et al. 2007), intentaron correlacionar la expresión proteómica, el contenido de

protaminas y la integridad del ADN. Analizaron 47 muestras de semen de pacientes infértiles y 10 de donantes, e identificaron 101 spots que correspondían a 58 proteínas diferencialmente expresadas en muestras de semen de pacientes infértiles, 8 proteínas relacionadas con la integridad del ADN y 7 relacionadas con el contenido de protaminas. En la misma línea, se identificaron las modificaciones post-traduccionales de proteínas de cromatina endógenas (Gupta et al. 2017), concluyendo que eran la clave para entender el epigenoma del espermatozoide.

Sin embargo, Thacker y cols. (Thacker et al. 2011), identificaron solo 4 proteínas predominantes, en muestras de varones de fertilidad probada: precursor de SG II (prosecretoneurina), isoforma de la clusterina I, proteína inducida por prolactina (PIP), y preproteína específica de antígeno prostático isoforma I (PSA). De hecho, dos de estas proteínas se hallaban ausentes en la muestra infértil (pSG II y clusterina I). De estos resultados se ha postulado que la función de la SG podría ser la de regular la capacitación espermática. Por el contrario, la función de la PSA (antígeno prostático espermático) es la de degradar la SG, promoviendo la motilidad espermática en el momento adecuado. La clusterina protege de reacciones que pueden producir daño oxidativo, a la vez que aglutina espermatozoides anormales. Por su parte, una disminución en la concentración de PIP podría causar que el líquido seminal fuera más viscoso e incluso impedir la completa licuefacción del eyaculado.

Recientemente, Azpiazu y cols. (Azpiazu et al. 2014) han realizado un estudio proteómico comparativo de muestras de semen normozoospermicas que consiguieron embarazo (16) y que no lo consiguieron (15), usando FIV convencional en todos los casos. Encontraron 66 proteínas diferencialmente

expresadas, 31 en menor abundancia en el grupo de 'No embarazo' y 35 más abundantes. La búsqueda en las bases de datos reveló que dichas proteínas estaban implicadas en la organización de la cromatina y el metabolismo de lipoproteínas.

Como podemos ver, a diferencia de la lipidómica que es un campo de investigación que ha vuelto a retomar su interés en los últimos años pero del que no hay disponible mucha información, la identificación de las proteínas espermáticas es un tema muy estudiado, pero hasta hace poco nadie había relacionado ni los lípidos ni las proteínas con el éxito reproductivo, limitándose únicamente, a describir o caracterizar las muestras de semen.

Además, la capacidad de conocer y catalogar las proteínas que componen el proteoma espermático nos ayudará a comprender la fisiología del gameto masculino, y asimismo a identificar proteínas cuya alteración o modificación conlleven una disminución en la fertilidad.

Este razonamiento junto con el gran avance en el desarrollo de las técnicas ómicas, fue el que nos animó a empezar este proyecto y por ende esta tesis. Además, aunque inicialmente el equipamiento y los reactivos que se necesitan para este tipo de análisis son caros, las técnicas ómicas proveerán a los investigadores de la correcta combinación de moléculas asociadas a una adecuada función espermática. Dicha combinación puede ser optimizada, una vez se haya decidido que ARNm, proteínas o lípidos son importantes, usando aproximaciones más baratas como las técnicas de PCR, y proteínas personalizadas o microarrays

de RNAm. Esto disminuye el coste por análisis único, el cual desplaza el balance coste/beneficio hacia el empleo de tales tecnologías en el análisis espermático.

5.2. Técnicas de selección espermáticas

A la vista de la preocupación derivada de la calidad de los espermatozoides que se utilizan para la técnica de ICSI, donde el proceso natural de selección del espermatozoide se obvia y no existe una técnica de diagnóstico espermático precisa y fiable, es importante mejorar las técnicas de selección espermáticas para seleccionar el espermatozoide más competente (Rivera et al. 2012).

Actualmente en las clínicas de reproducción asistida podemos encontrar distintas técnicas de selección objetiva de los espermatozoides. Estas técnicas que explicaremos a continuación, se basan en las características ultramorfológicas, maduración espermática y características de la membrana plasmática (Rivera et al. 2012).

5.2.1. Características ultramorfológicas

5.2.1.1. Inyección intracitoplasmática de espermatozoides seleccionados morfológicamente (IMSI)

El estudio de la morfología espermática y el diagnóstico de la viabilidad espermática, juega un papel crucial en la determinación del potencial fértil del varón, tanto *in vivo* como *in vitro* (Kruger and Coetzee 1999). Basándose en esta afirmación y debido a las limitaciones del ICSI y los aumentos a los que se

observan los espermatozoides que no son suficientes para ver defectos nucleares sutiles que puedan dar lugar a la transmisión de enfermedades genéticas y cromosomales, se describió el IMSI (Berkovitz et al. 2006). Esta técnica se basa en el examen, a tiempo real y sin tinciones, de la morfología de los orgánulos de los espermatozoides móviles (MSOME) y fue introducida por Bartoov en 2002 (Bartoov et al. 2003). Con ella se permite analizar la morfología de los espermatozoides con una óptica de 6300 aumentos, prestando atención a orgánulos como acrosoma, lámina postacrosómica, cuello, mitocondrias, cola y núcleo.

A pesar de que los resultados obtenidos en los estudios realizados hasta la fecha parecen observar mejoras en las tasas de implantación, gestación, RNV y disminución en las tasas de aborto, el tiempo que consume esta selección espermática, la formación de los embriólogos, los equipos especiales que se necesitan (Said and Land 2011), así como los resultados, poco sólidos, que se han obtenido en los estudios realizados, hacen que más investigaciones sean necesarias para introducir esta técnica en la rutina del laboratorio.

5.2.1.2. Selección de espermatozoides birrefringentes

El efecto de birrefringencia se genera cuando al cruzar una estructura anisotrópica el rayo de luz incidente se refracta en dos rayos polarizados que viajan a distinta velocidad. La retardancia del rayo lento respecto al rayo rápido, produce tal efecto.

Los espermatozoides maduros presentan birrefringencia (Baccetti 2004) debido a la organización longitudinal y fuerte compactación de los filamentos de las nucleoproteínas y a la organización longitudinal de los filamentos proteicos subacrosomales presentes en la cabeza del espermatozoide (Gianaroli et al. 2008, Magli et al. 2012, Vermey et al. 2015), reflejando por tanto la birrefringencia, un buen estado de salud y calidad espermática.

Por tanto este método proporciona una técnica de selección espermática rápida y no invasiva especialmente en casos de factor masculino severo con el fin de desarrollar embriones más viables, aunque se necesitan evidencias más sólidas que justifiquen su implementación en la rutina en los laboratorios de andrología.

5.2.2. Madurez espermática y características de la membrana plasmática

5.2.2.1. Test de unión al ácido hialurónico: PCSI

El ácido hialurónico (AH) es un polisacárido presente en la zona pelúcida de los ovocitos que se hidroliza mediante la hialuronidasa espermática para facilitar su entrada en el ovocito, con lo que el AH parece jugar un papel importante en la selección espermática fisiológica (Parmegiani et al. 2010a).

Los espermatozoides capaces de unirse fuertemente al AH *in vitro*, presentan; 1) ausencia de retención anómala de citoplasma, 2) ausencia de histonas persistentes, 3) presencia de ADN sin fragmentación, 3) ausencia de marcadores de apoptosis como la caspasa 3, y 4) la expresión de la chaperona HspA2, que forma parte del complejo sinaptonémico y dirige y apoya la meiosis pudiéndose relacionarse con aneuploidías (Rivera et al. 2012).

Actualmente hay dos sistemas diseñados para seleccionar espermatozoides basándose en este hecho, el PICSI que consiste en una placa *petri* cuya base está impregnada de AH que seleccionará espermatozoides con receptores del AH; y el SpermSlow, que consiste en un medio de AH viscoso usado en las placas de ICSI en vez de polivinilpropileno (Parmegiani et al. 2010a, Parmegiani et al. 2010b). Estos sistemas seleccionan los mejores espermatozoides con habilidad para unirse al AH y por tanto maduros, no apoptóticos, con ADN no fragmentado y menor frecuencia de aneuploidías.

Hasta el momento pocos datos clínicos apoyan esta técnica, esto unido a que únicamente se puede aplicar a ICSI, hace que no sea una técnica ampliamente utilizada en las clínicas (Romany et al. 2014).

5.2.2.2. Separación inmunomagnética de espermatozoides (MACS)

La técnica MACS (Miltenyi et al. 1990), ya utilizada clínicamente con éxito en distintos ámbitos, permite separar distintos fenotipos moleculares candidatos a ser utilizados como base de la separación molecular en espermatozoides en caso de que sean marcadores de membrana y hayan estado relacionados con la infertilidad masculina.

Esta técnica se basa en el uso de micropartículas magnéticas de aproximadamente 50 nanómetros de diámetro, los MicroBeads (MB), conjugadas con proteínas o anticuerpos específicos para su unión a las células o marcadores de interés. Requieren unas columnas para separar físicamente las células en función de si están o no marcadas, y tras ser sometidas a un intenso campo

magnético creado en la matriz de la columna, son retenidas las células unidas con una mínima cantidad de MB, mientras que las células no unidas pasan a través de la columna y pueden ser recogidas. Las células unidas pueden posteriormente ser liberadas de la columna mediante lavados.

Ambas fracciones son separadas con elevada pureza, manteniendo su estructura, función óptima y viabilidad (figura 13).

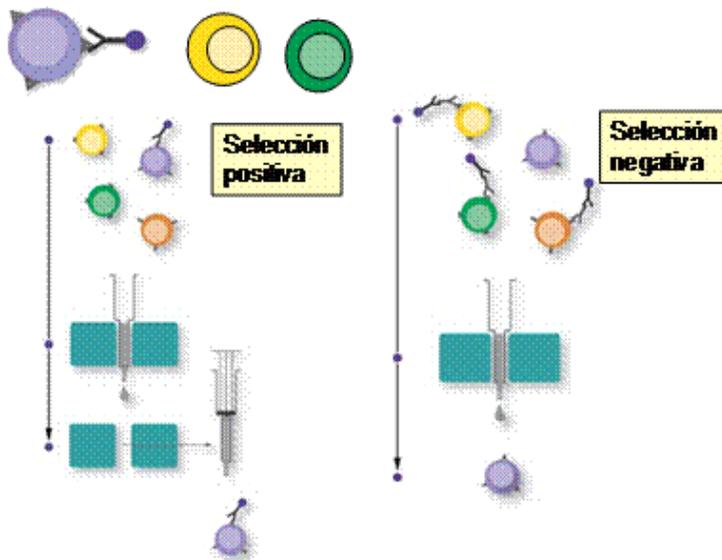


Figura 13: Técnica de MACS.

El MACS marca magnéticamente aquellos espermatozoides que expresen el marcador de membrana que estemos estudiando, como la fosfatidilserina (PS), ubiquitina, receptores factor activación plaquetario (PAF), AH, fosfolipasa A2

(PLA2G2A), entre otros. El más estudiado hasta el momento es el marcador de la apoptosis o PS (Grunewald et al. 2001, Romany et al. 2014).

En un principio el uso de esta técnica mejora la calidad embrionaria y los resultados reproductivos, pero los estudios hasta la fecha son muy controvertidos (Nadalini et al. 2014, Romany et al. 2014), por lo que más estudios son necesarios para poder implementar esta técnica en los laboratorios de andrología.

III. HIPÓTESIS

Hoy pueden pasar cosas espectaculares

II.HIPÓTESIS:

Hipotetizamos que existen diferencias entre el perfil lipídico y proteico de los espermatozoides obtenidos de pacientes infértiles categorizados a partir de los resultados obtenidos con el uso de sus muestras (si logran obtener una gestación evolutiva o no) en tratamientos de ICSI de ovocitos propios o donados. Estas diferencias sentarán la base para conocer y obtener el perfil lipídico y proteico de mejor pronóstico en las TRA.

III. OBJETIVO

Hagamos algo increíble

III.OBJETIVO

El objetivo de esta tesis es obtener el perfil lipídico y proteico compatible con el éxito reproductivo en diferentes TRA, mediante la comparación de los resultados del análisis del conjunto de metabolitos (en concreto lípidos) y proteínas presentes en las muestras de semen de pacientes infértiles que logran obtener una gestación frente aquellas que no lo logran.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

Tú puedes con todo

IV.MATERIAL Y MÉTODOS

1. Lugar de ejecución

- Laboratorio de andrología y laboratorio de FIV del Instituto Universitario IVI Valencia.
- OWL metabolomics.
- Departamento de proteómica Universidad de Valencia (SCSIE).
- El proyecto está financiado por CDTI (Centro para el Desarrollo Tecnológico Industrial) con identificación IDI-20111144.

2. Población de estudio

La población de referencia objeto de estudio la constituyen todos los varones infértiles entre 30 y 45 años que acuden al Instituto Universitario IVI Valencia y cuyas parejas de edad comprendida entre 30 y 45 años con indicación de IAH (hasta 37 años) o ICSI con ovocitos propios (hasta 38 años) o donados (hasta 45 años) con un ciclo hormonal sustituido y por consiguiente pacientes en las que se genere una cohorte embrionaria.

El proyecto fue aprobado por el comité ético de investigación clínica (CEIC) del Instituto Universitario IVI Valencia con el código de proyecto 1209-C-108-RR. Los individuos que formaron parte del estudio expresaron su voluntad de participar mediante la firma del correspondiente consentimiento informado.

En el caso de someterse a un ciclo de donación de ovocitos, los gametos donados fueron reclutados a partir de jóvenes menores de 35 años de edad. Estas

jóvenes voluntarias incentivadas por razones altruistas donan sus ovocitos en el marco de lo dictado en la Ley Española de Reproducción Asistida, manteniendo el secreto profesional con respecto a las identidades de las donantes y receptoras. Antes de convertirse en donantes, todas estas mujeres estaban plenamente informadas y dieron por escrito el correspondiente consentimiento firmado para la utilización de sus gametos, como se indica en la ley. Se les aplicaron los análisis de sangre de manera periódica los cuales incluyen la detección de: antígeno de superficie de para la hepatitis B (VHB), virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) 1 y 2, Anti-virus de la hepatitis C (VHC), anti-herpes simple virus (VHS) 1 y 2, Sífilis, Chlamydia y anticuerpos contra Citomegalovirus (CMV). Además, a las mujeres incluidas en este programa, se les estudia la presencia de antígeno-anticuerpos contra el VIH (DUO) y anticuerpos contra la Rubéola y Toxoplasma. Cultivos microbiológicos se realizaron para descartar la presencia de *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma* y *Mycoplasma hominis*. Todos los resultados positivos obtenidos en los mencionados análisis condujeron directamente a la terminación de las donaciones conjuntamente con la asesoría médica apropiada para cada caso.

3. Criterios de inclusión y exclusión

Debemos tener en cuenta que el estudio de la infertilidad es complicado, desde el punto de vista que estamos estudiando un resultado (gestación sí o no) a partir del estudio de dos entes individuales, un gameto femenino y otro masculino. De modo, que en nuestro caso, debemos estandarizar al máximo el factor femenino para que interfiera lo mínimo en nuestro estudio. Sabemos que hay muchos factores que pueden causar esterilidad y que es prácticamente

imposible controlarlos todos para ver cómo afecta de manera exclusiva el factor masculino, aunque intentamos minimizar este hecho ciñéndonos a unos criterios de inclusión que nos permitan reducir el resto de factores que no sean el masculino, sobre todo en el caso de ciclos de ovodonación donde el factor femenino se obvia.

3.1. Inclusión:

Mujeres IAH

* ≤ 37 años

Hombres IAH

*Muestras en fresco con una recuperación espermática superior a 3 millones de TMP (total de espermatozoides móviles progresivos) después del SU (con la intención de no comprometer los resultados de la inseminación por realizarla con menor cantidad de espermatozoides de lo establecido).

Mujeres ICSI-OVODÓN

* ≤ 45 años

*Ser primer o segundo ciclo de ovodón

*Sometidas a un ciclo/tratamiento de reproducción asistida en el Instituto Universitario IVI Valencia con ovocitos donados por mujeres de fertilidad probada incluidas en nuestro programa de donación de ovocitos.

*Número de ovocitos donados para cada receptora ≥ 8

*Útero sin anomalías congénitas o adquiridas tras evaluación ecográfica

*Las transferencias embrionarias serán de uno o dos embriones en D3

*Índice de masa corporal (IMC) $\leq 30 \text{ kg/m}^2$

Hombres ICSI-OVODÓN

*Muestras en fresco con una recuperación espermática superior a 1mill después del SU.

Mujeres ICSI-PROPIOS

*≤38 años

*Ser primer o segundo ciclo de ICSI

*IMC ≤ 30 kg/m²

*Útero sin anomalías congénitas o adquiridas tras evaluación ecográfica

*Las transferencias embrionarias serán de uno o dos embriones en D3

Hombres ICSI- PROPIOS

*Muestras en fresco con una recuperación espermática superior a 1mill después del SU.

3.2. Exclusión:

IAH

- * PCO
- * Endometriosis
- * Miomas, pólipos extirpados por histeroscopia o laparoscopia
- * Hidrosalpinx
- * Falta de permeabilidad tubárica
- * Malformaciones uterinas y en trompas de Falopio, obstrucción tubárica
- * Obesidad IMC >30 kg/m²

ICSI-OVODÓN

- * Malformaciones uterinas
- * Abortos de repetición (≥ 2 abortos)
- * Obesidad IMC >30 kg/m²

ICSI propios

- * Baja respuesta (<6 MII por ciclo)
- * Endometriosis
- * Malformaciones uterinas (miomas, adenomiosis, malformaciones uterinas adquiridas o congénitas)
- * Abortos de repetición (≥ 2 abortos)
- * Obesidad IMC >30 kg/m²

4. Recogida de muestras y análisis básico del semen

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

Todas las muestras de semen se obtuvieron exclusivamente por masturbación después de un periodo de abstinencia sexual comprendido entre 3 y 5 días y depositadas en un contenedor estéril. A continuación se trasladaron al

laboratorio, acompañadas de una hoja de petición y de propiedad de la muestra donde estaban anotados una serie de detalles clínicos importantes, para su procesamiento lo antes posible ya que no deben transcurrir más de 45-60 minutos desde su recolección hasta su procesamiento.

4.1. Determinación de las características seminales. Elaboración del espermiograma

Las muestras recogidas se dejaron durante un periodo de 10-15 minutos en el incubador a 37°C y 5% de CO₂ hasta su total licuefacción. Una vez alcanzada la licuefacción de la muestra, se valoraron las características macroscópicas y microscópicas de la misma.

El análisis macroscópico que se debe realizar en el eyaculado consiste en la valoración de: el aspecto, la licuefacción, el color, la viscosidad, el pH y el volumen.

En cuanto al análisis microscópico, se evalúa la concentración espermática, la movilidad, la morfología así como la presencia de otros elementos celulares (como leucocitos, o células germinales inmaduras) y detritos, anticuerpos antiespermatozoides (aglutinación) y vitalidad.

Los parámetros más importantes y que más ayudan a la determinación del potencial fértil del varón son el volumen, la concentración y la movilidad. Estos tres parámetros se determinaron de visu y en distintos momentos del análisis del semen: 1) en las muestras de semen en fresco y 2) tras el procesado de la muestra

o recuperación de espermatozoides que posteriormente fueron usados en las TRA, siempre mediante la técnica de SU.

4.2. Determinación de los parámetros básicos del semen

Volumen: el volumen del eyaculado es un parámetro esencial en cualquier evaluación seminal, ya que permite conocer el número total de espermatozoides en el eyaculado. Es aportado por las vesículas seminales, la glándula prostática, y en menor medida las glándulas bulbo uretrales y se mide tras su licuefacción. Este parámetro se determinó midiendo el total del volumen eyaculado en un tubo graduado atóxico y estéril.

Concentración: la concentración da una idea del número de espermatozoides por mililitro de eyaculado. La determinación de la concentración espermática se realizó por contaje en una cámara de recuento Makler (Sefi Medical Instruments, Haifa, Israel) donde se coloca una gota de 10 μL de la muestra y se evalúa, a un aumento de 20X en microscopio de contraste de fases. La cámara Makler (figura 14) que sirve para realizar espermigramas, está subdividida en 100 microcuadrados de 0,1 x 0,1 mm de lado. El número de espermatozoides contenidos en cualquier línea de 10 microcuadrados, indica la concentración en millones por mililitro. Para determinar este parámetro se contó el número de espermatozoides presentes en 30 microcuadrados y se realizó la media obteniendo el número de millones de espermatozoides por mililitro.

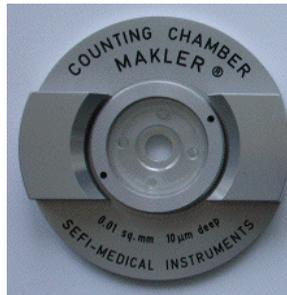


Figura 14: Cámara Makler.

Movilidad: el ensayo de la movilidad se lleva a cabo lo antes posible mediante el conteo y evaluación del tipo de movilidad de 200 espermatozoides móviles e inmóviles observados al azar. Según la última clasificación de la OMS (OMS 2010) las muestras de semen se dividen en función de su movilidad en: espermatozoides progresivos, aquellos con un movimiento activo de forma rectilínea o curvilínea amplia sin tener en cuenta la velocidad; los espermatozoides no progresivos, espermatozoides con patrones de movimiento que no tienen progresión; y los espermatozoides inmóviles, aquellos que no presentan ningún tipo de movimiento.

5. Preparación de las muestras de semen

Todas las muestras fueron preparadas a través de la capacitación espermática mediante SU (figura 15). Esta técnica se basa en la capacidad que tienen los espermatozoides con movilidad progresiva de avanzar en un medio adecuado y permite obtener espermatozoides con capacidad fecundante y eliminar los espermatozoides muertos, inmóviles o lentos, y cualquier otro tipo celular o detrito.

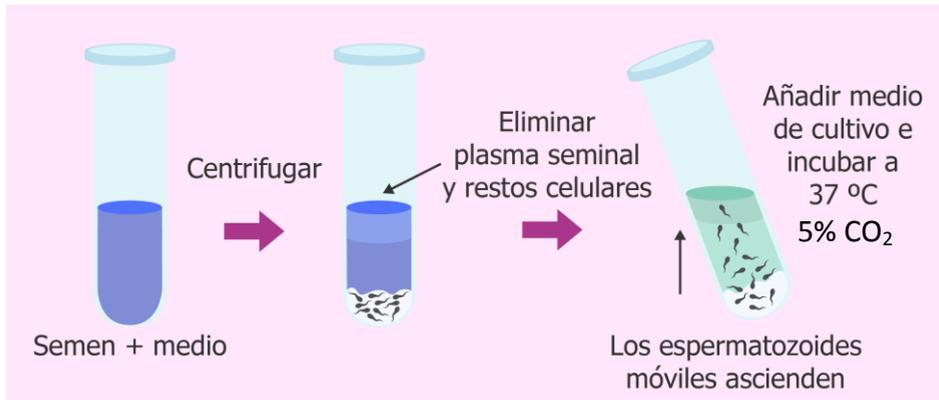


Figura 15: Técnica de SU.

El SU es una técnica muy sencilla que se llevó a cabo mediante el siguiente protocolo:

- Se colocó el eyaculado en un tubo Falcon® (Becton Dickinson, USA) de 14 ml y se añadió Gamete Medium (COOK, Bloomington, IN, USA) en proporción 1:2 ó 1:3 para un lavado previo.
- A continuación, se centrifugó 10 minutos a 400g y se decantó con cuidado con el fin de eliminar el sobrenadante.
- Se añadió, sobre el sedimento espermático o pellet formado, un volumen entre 0,5 y 1mL de Fertilization Medium (COOK, Bloomington, IN, USA) o HTF ((Human Tubaric Fluid) (Irvine Scientific, Santa Ana, USA) (según el estudio), dejándolo resbalar cuidadosamente por las paredes y evitando que se mezclara con el pellet.
- Seguidamente, se colocó el tubo en el incubador con una inclinación de 45° durante 45 minutos a 37°C y 5% CO₂. Durante este tiempo los

espermatozoides móviles migraron desde el pellet hacia el nuevo medio de cultivo.

- Se recogió un volumen entre 0,1-0,5 mL de la capa superior del sobrenadante donde se encontrarían los espermatozoides móviles, siendo esta fracción la utilizada en las TRA.

6. Estudios

6.1 Metabolómica: Lipidómica

Con el fin de identificar y describir el perfil metabólico de los espermatozoides en varones infértiles como un primer paso para evaluar su implicación en la fertilidad, se utilizó la técnica de UHPLC-MS (cromatografía líquida de alto rendimiento acoplada a espectrómetro de masas) para analizar muestras de semen y en concreto para el análisis de los espermatozoides.

6.1.1. UHPLC-MS

El sistema de extracción aplicado en esta técnica permitía una selección amplia de múltiples clases de metabolitos del total de metabolitos identificados en una ejecución única. Visto que la mayoría de metabolitos identificados eran lípidos, nos centramos en ellos porque eran los metabolitos que nos iban a dar mayor rendimiento en nuestro estudio.

Con el UHPLC-MS conseguimos una excelente sensibilidad cubriendo los lípidos principales: monoacilgliceroles y fosfolípidos, diacilgliceroles y glicerolípidos, esfingolípidos, triacilgliceroles y colesterol ésteres.

6.1.2. Aplicación de la técnica UHPLC-MS en muestras de pacientes destinadas propiamente a tratamientos

Una vez decidido que los metabolitos en los que nos íbamos a centrar eran los lípidos: por ser el metabolito que se encontraba en mayor cantidad en los espermatozoides y poder dar más rendimiento en las muestras a analizar, por estar menos estudiados, y por estar relacionados e implicados con funciones del

espermatozoide; pusimos a punto la técnica UHPLC-MS para muestras de semen destinadas a TRA propiamente dichas. En este caso, se hizo un ensayo con muestras de pacientes que iban a ser sometidos a tratamientos de IAH o IAC. Para ello se obtuvieron 10 alícuotas de las muestras capacitadas de pacientes que acudieron a la clínica IVI Valencia a realizarse dicho tratamiento. En ningún caso se comprometió el éxito del tratamiento.

6.1.2.1. Tratamientos de reproducción asistida (IAH)

Estimulación ovárica

En los ciclos de IAH se estimuló tanto con la hormona estimulante de folículos, FSH (Gonal-F; Serono S.A., SpainorPuregon; Schering-Plough española, Spain) como con hMG (Lepori; FarmaLaboratories, Spain; o Menopur; Ferring, Spain). La estimulación se inicia en el día 3 del ciclo con dosis de FSH recombinante de entre 75 y 150 UI. La foliculometría se monitoriza vía ecografía vaginal y siguiendo los niveles de estradiol. Cuando el tamaño del folículo dominante era de alrededor de 18 milímetros la paciente recibía 10.000 UI de hCG (gonadotropina coriónica humana) (Profasi 10 000 UI; Serono S.A., Spain). Las pacientes se inseminaron entre las 12 y 36 horas siguientes tras la inyección de hCG (Garrido et al. 2007).

6.1.2.2. Obtención y preparación de las muestras

Tal y como hemos indicado anteriormente, las muestras fueron obtenidas mediante masturbación después de un periodo de 3-5 días de abstinencia y se prepararon mediante la técnica de SU. Una vez realizada la técnica de capacitación espermática y teniendo en cuenta que no podíamos comprometer el

tratamiento, se recuperó el volumen de muestra capacitada sobrante de la capa contigua a la recuperada para el tratamiento, sin mezclarla con el pellet. Cada muestra, con su correspondiente alícuota de medio de capacitación HTF, para controlar los lípidos inherentes al medio de cultivo y por tanto el límite de detección (LOD). El volumen que recuperábamos en cada caso, era congelado por inmersión directa en nitrógeno líquido sin crioprotector, a la espera de ser analizado.

6.1.2.3. Análisis de las muestras

Para obtener los perfiles metabólicos (en concreto lipídicos) en muestras de espermatozoides, dichas muestras se analizaron mediante UHPLC-MS que permite analizar un gran número de muestras en un tiempo muy corto, comparándolas con un control positivo que correspondía al medio que se utilizó para preparar/capacitar las muestras mediante SU.

En este caso se utilizaron dos procedimientos o sistemas de extracción: el sistema de extracción de $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ con el fin de extraer lípidos apolares, y el sistema de extracción de MeOH con el fin de extraer lípidos polares.

Los dos sistemas de extracción utilizados ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ y MeOH), permitieron identificar una amplia selección de clases de lípidos a partir de extractos totales de los mismos dentro de una serie perteneciente a una muestra única.

Una vez analizadas las muestras mediante el UHPLC, estas son inyectadas en el espectrometro de masas para la determinación de su masa molecular característica.

6.1.2.4. Análisis estadístico

La complejidad de los perfiles metabólicos, con gran cantidad de datos por cada perfil lipídico, precisa de complicados tratamientos estadísticos para identificar los posibles lípidos marcadores. El análisis estadístico de los datos generados se llevó a cabo mediante programas específicos para procesar los datos adquiridos, obteniéndose un listado de la relación masa/carga (m/z), tiempos de retención (R_t) e intensidades para todos los picos encontrados cromatográficamente importantes. Los métodos estadísticos multidimensionales son necesarios para la interpretación de los datos generados en este tipo de estudios. Estos tratamientos facilitan enormemente el descubrimiento de compuestos marcadores escondidos en la complejidad de datos, al posibilitar la identificación de picos que pueden discriminar entre los diferentes grupos analizados.

6.1.3. Comparación del perfil lipídico entre muestras de semen que consiguieron embarazo mediante ICSI y las que no

Finalmente, y tras varios ensayos con el fin de poner a punto la técnica y estar seguros de la forma que íbamos a enviar las muestras, su comparación con el control (medio de cultivo) y la cantidad de espermatozoides que en cada una de ellas es óptima para realizar el estudio, procedimos a realizar el análisis en que se

basa esta tesis, la obtención del perfil lipídico de los espermatozoides y su relación con la consecución o no del embarazo.

6.1.3.1. Población de estudio: Cálculo del tamaño muestral

El tamaño muestral fue establecido de forma arbitraria basándonos en estudio previos disponibles con un diseño similar al nuestro (Garcia-Herrero et al. 2010a, Garcia-Herrero et al. 2010b, Garrido et al. 2013), y dependía de la disponibilidad de recursos económicos para realizar los experimentos, dado que no existen datos previos para predefinir las diferencias entre grupos. Además, no se definió un resultado de medida único, ya que se tenía que evaluar el perfil lipídico total. Por tanto se incluyeron 38 muestras de pacientes cuyas parejas se sometieron a ciclos de ICSI con ovocitos propios (4 casos) y ovocitos donados (34 casos) con más o igual a 1 millón de espermatozoides/mL tras el proceso de capacitación por SU. Se utilizaron alícuotas de 300µL de muestras con concentraciones desde 1 millón de espermatozoides/mL hasta 58,3 millones de espermatozoides/mL, para realizar el estudio.

6.1.3.2. Diseño del estudio

El estudio fue prospectivo, analítico y utilizamos el diseño de casos y controles anidados con los 38 pacientes, incluyendo 22 muestras en el grupo de pacientes que conseguían gestación (E) y 16 muestras en el grupo de pacientes que no lo conseguían (NE).

6.1.3.3. Tratamiento de reproducción asistida (ICSI)

Control de la estimulación ovárica

Todas las donantes recibieron tratamiento oral con anticonceptivos 1-2 meses para la sincronización del ciclo previo a la estimulación.

Utilizamos el protocolo con antagonistas de la GnRH en el cual se administra los días 2 y 3 del ciclo dosis de 150-300 UI/día subcutánea de FSH recombinante (Gonal-F®, Madrid, Spain; Puregon®; MSD, Madrid, Spain). Cuando el folículo dominante alcanza los 14 mm se administra una dosis de 0,25 mg de antagonista de la GnRH una vez al día subcutánea (Gonal-F®, Madrid, Spain; Puregon®; MSD, Madrid, Spain). Una única dosis de triptorelina 0,2 ml se administra vía intramuscular (Decapeptyl R); IpsenPharma, Barcelona, España) para la maduración ovocitaria final cuando al menos 3 o más folículos han alcanzado un tamaño medio de ≥ 18 mm (Munoz M et al. 2013).

Las cuatro pacientes que se realizaron el tratamiento con sus propios ovocitos, fueron estimuladas de la misma forma.

Preparación endometrial en receptoras

El protocolo usado para la preparación endometrial de las receptoras ha sido anteriormente publicado (Meseguer et al. 2006, Remohi et al. 1995, Soares et al. 2005), y se realizó siguiendo las rutinas clínicas establecidas en nuestros centros.

Las pacientes con función ovárica activa se desensibilizaron con una única administración intramuscular de triptorelina 3,75 mg depot (Decapeptyl 3,75 mg;

Ipsen-Pharma, Barcelona, Spain) administrada entre 18-21 días del ciclo previo. La sustitución de estrógenos se inicia en el día 3-5 del nuevo ciclo de menstruación, después de confirmar la quiescencia ovárica y un determinado grosor endometrial mediante ecografía transvaginal.

Se administra (vía oral) valeraniato de estradiol (E_2), la cantidad administrada es de 2 mg/día (Progynova; Schering, Madrid, Spain) durante los 8 primeros días, incrementándose a 4 mg/día durante los 3 días posteriores, finalmente se aumenta la dosis a 6 mg/día hasta el momento del test de embarazo. El grosor del endometrio ha sido considerado como un importante factor pronóstico para el resultado del tratamiento. En ciclos de donación de ovocitos se ha observado y publicado una correlación entre el grosor endometrial y el resultado del ciclo (Noyes et al. 2001, Shapiro et al. 1993). En algunos laboratorios, la suplementación con progesterona no se empieza si la línea endometrial es más fina de 9 mm o más gruesa de 12 mm (Borini et al. 1996). En nuestra experiencia el grosor endometrial no es un factor determinante en el pronóstico del ciclo. Incluso endometrios finos (<7 mm) tuvieron buenas tasas de gestación e implantación, sin ningún incremento en la tasa de aborto. Únicamente el ciclo se cancela en casos de sangrado vaginal de la receptora durante la administración del valeraniato de E_2 .

Una vez comprobada la fecundación, las pacientes inician la administración de progesterona (P) intravaginal micronizada (Progeffik, Laboratories Effik S.A., Madrid, Spain), con una dosis diaria de 800 mg/día, continuando con esta dosis al menos hasta el resultado del embarazo (Escriba et

al. 2006). Cuando el test de embarazo es positivo, la administración de valerianato de E₂ y de P micronizada continua hasta 80 días después del test de embarazo.

Obtención de ovocitos, ciclos de ICSI y cultivo embrionario

La punción folicular se lleva a cabo 36 horas después de administra la hCG para completar la maduración ovocitaria. Se realiza bajo sedación, mediante ecografía guiada, y en un quirófano contiguo al laboratorio de FIV, con el fin de que el traslado de los tubos al laboratorio sea lo más rápido posible. Los folículos se aspiraron y su contenido se vertió a los tubos atemperados. Los tubos con el líquido folicular se mantuvieron a 37°C mediante bloques térmicos calefactados.

Una vez en el laboratorio, se vertió el líquido folicular incluido en los tubos, en placas *petri* precalentadas, se buscaron los ovocitos mediante visualización directa del líquido folicular con una lupa y un objetivo de 8-10x. Una vez localizado el ovocito, se deposita en una placa de lavado con Gamete Medium (COOK™, Bloomington, IN, USA). Una vez lavados los ovocitos, se cultivaron en medio Fertilization (COOK™, Bloomington, IN, USA) a 5,5% CO₂ y 37°C durante 4 horas antes de decumularlos.

La decumulación de las células de la granulosa, consiste en la eliminación de las células de alrededor del ovocito mediante acción mecánica ayudados por una enzima, mediante pipeteado en Medio Fertilization (COOK, Bloomington, IN, USA) al 50% con la enzima hialuronidasa 40IU/mL (Sage IVF, Biocare Europe). La decumulación de los ovocitos es necesaria por 2 cosas: primero para comprobar el grado de madurez de éstos, y segundo, para llevar a cabo la microinyección, es decir, para poder sujetar al ovocito e inyectar el espermatozoide.

Posteriormente la ICSI se realizó en un medio que contenía HEPES (Gamete Medium, COOK™, Bloomington, IN, USA) con un aumento de 400X usando microscopio Olympus IX7. Inmediatamente después de la ICSI, los ovocitos inyectados se colocaron en placas de *petri* (Falcon, Madrid, España) (cultivo en gotas) de medio de cultivo (Cleavage Medium, COOK™, Bloomington, IN, USA) bajo aceite a 37°C y 5,5% CO₂ (Heraeus, Heracell, Madrid, España).

Los embriones se incubaron a 37°C y 5,5% CO₂ y O₂ atmosférico y se cultivaron individualmente hasta el embrión de día 3 (72 horas después del ICSI) en medio Cleavage (COOK™, Bloomington, IN, USA). Desde el día 3 hasta el día 5 se usó CCM medio (Vitrolife, Goteborg, Sweden). Las placas de cultivo incluían 3 gotas de lavado de 100 µL y seis gotas de 50 µL, cubiertas con 7 mL de aceite mineral.

Valoración embrionaria y transferencia

De forma rutinaria, en los laboratorios de embriología humana se trabaja con una serie de variables que proporcionan información sobre el estado y la evolución de los embriones y nos permiten definir el desarrollo del embrión y seleccionar los mejores embriones para la transferencia, es decir, los que tienen el mayor potencial de implantación. Así los métodos actuales de selección embrionaria incluyen el análisis de los gametos y embriones en distintas etapas del desarrollo, desde la observación de los pronúcleos en los cigotos, pasando por las sucesivas divisiones embrionarias hasta que se alcanza el estadio de blastocisto (ASEBIR 2008, ASEBIR 2015, Rienzi et al. 2005).

El sistema de gradación embrionaria propuesto por la Asociación Española para el Estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR), establece un sistema de 4 categorías (A,B, C o D) divididas en función del potencial implantatorio esperado (tabla 5) (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology 2011, ASEBIR 2008, ASEBIR 2015). Esta clasificación supone que la calidad embrionaria es un indicador predictivo del éxito del tratamiento, pero para ello es necesario evaluar todas las observaciones realizadas a los largo del desarrollo del embrión (ASEBIR 2008).

SISTEMA DE GRADACIÓN EMBRIONARIA	
Categoría	Descripción
A	Embrión de óptima calidad con máxima capacidad de implantación
B	Embrión de buena calidad con elevada capacidad de implantación
C	Embrión regular con una probabilidad de implantación media
D	Embrión de mala calidad con una probabilidad de implantación baja

Tabla 5: sistema de gradación embrionaria según los criterios de ASEBIR (ASEBIR 2008).

La fecundación se evaluó a las 16-19 horas post-ICSI y se confirmó por la presencia de dos pronúcleos y dos corpúsculos polares. La morfología del embrión se analizó el día 2 (48 horas post-ICSI) y el día 3 (72 horas post-ICSI) teniendo en cuenta el número simetría y granularidad de las blastómeras, el tipo y porcentaje de fragmentación, la presencia de blastómeras multinucleadas y el grado de compactación (Alikani et al. 2000). La morfología también se evaluó el día 5 (120 horas después del ICSI) de acuerdo con la expansión de la cavidad blastocítica y el número y la integridad de la masa celular interna (MCI) y el trofoectodermo (TE). En base a este sistema de clasificación, seleccionamos embriones para transferir

el día 3 debido a que era la rutina clínica establecida en nuestros centros en el momento en que se analizaron las muestras incluidas en esta tesis.

El número de embriones transferidos se decidió en base a la calidad de los mismos. Los embriones supernumerarios fueron congelados para futura transferencia usando la técnica de la vitrificación estándar de la clínica. El objetivo principal de este estudio fue el embarazo evolutivo confirmado por la presencia de sacos gestacionales con el latido del corazón fetal por ecografía transvaginal durante la semana 12.

6.1.3.4. Obtención y preparación de las muestras de semen

De la misma forma, las muestras fueron obtenidas mediante masturbación tras 3-5 días de abstinencia y tras su licuefacción fueron evaluadas por dos observadores independientes, de acuerdo a los parámetros del análisis básico del semen definidos por la OMS (OMS 2010). Los resultados fueron aceptados cuando las diferencias entre los dos observadores eran menores del 5%. Luego, todas las muestras fueron preparadas de acuerdo al protocolo de rutina para el tratamiento de ICSI. Todas las muestras se capacitaron mediante la técnica de SU (explicada en el 5 de material y métodos). Una vez realizada la técnica de capacitación espermática, se recuperaron 300 μ L del sobrante de la muestra que se utilizaba para la realización del ciclo de ICSI, sin comprometer el éxito del tratamiento. Además, 4 alícuotas de medio de capacitación (Sydney IVF Fertilization Medium, COOK Bloomington, IN, USA) fueron también analizadas con el fin de establecer el LOD. Tanto las muestras como las alícuotas de medio se congelaron en nitrógeno líquido por inmersión directa sin crioprotector y se

mantuvieron en el congelador a -20°C a la espera de conocer su resultado de gestación para asignarlas al grupo de estudio correspondiente y poder proceder a la realización de su análisis. Una vez recopiladas las 38 muestras de pacientes y clasificadas en dos grupos de acuerdo a su habilidad para conseguir o no embarazo (en paralelo a previos estudios realizados por nuestro grupo (Garcia-Herrero et al. 2010a, Garcia-Herrero et al. 2010b, Garrido et al. 2013), estas fueron separadas y analizadas usando la técnica de UHPLC-MS (tabla 6).

Tipo de muestra	Gestación	Número de muestras
Espermatozoides	SÍ	22
	NO	16
Medio de cultivo (Medio Fertilization, COOK, Bloomington, IN, USA)	-	4

Tabla 6: Clasificación de las muestras analizadas en el estudio.

6.1.3.5. Análisis de las muestras

Procedimientos de extracción lipídica (UHPLC-MS)

Un buen experimento de perfiles metabólicos se basa en la capacidad de determinar cambios en el biofluido o el complemento tisular de los metabolitos de un organismo. La técnica UHPLC-MS es muy adecuada para estos análisis debido a su alta sensibilidad, gran cobertura sobre diferentes clases de metabolitos, capacidad de alto rendimiento y amplio rango dinámico. En este estudio se utilizaron múltiples sistemas para analizar analitos endógenos para su inclusión en procedimientos de análisis estadísticos posteriores utilizados para estudiar las diferencias metabólicas entre dos grupos de muestras (Barr et al.

2012, Bedair and Sumner 2008, Burton et al. 2008, Griffiths et al. 2007, Theodoridis et al. 2008).

Un esquema del diagrama de trabajo seguido en el presente estudio se muestra en la figura 16, y se describe brevemente como sigue.

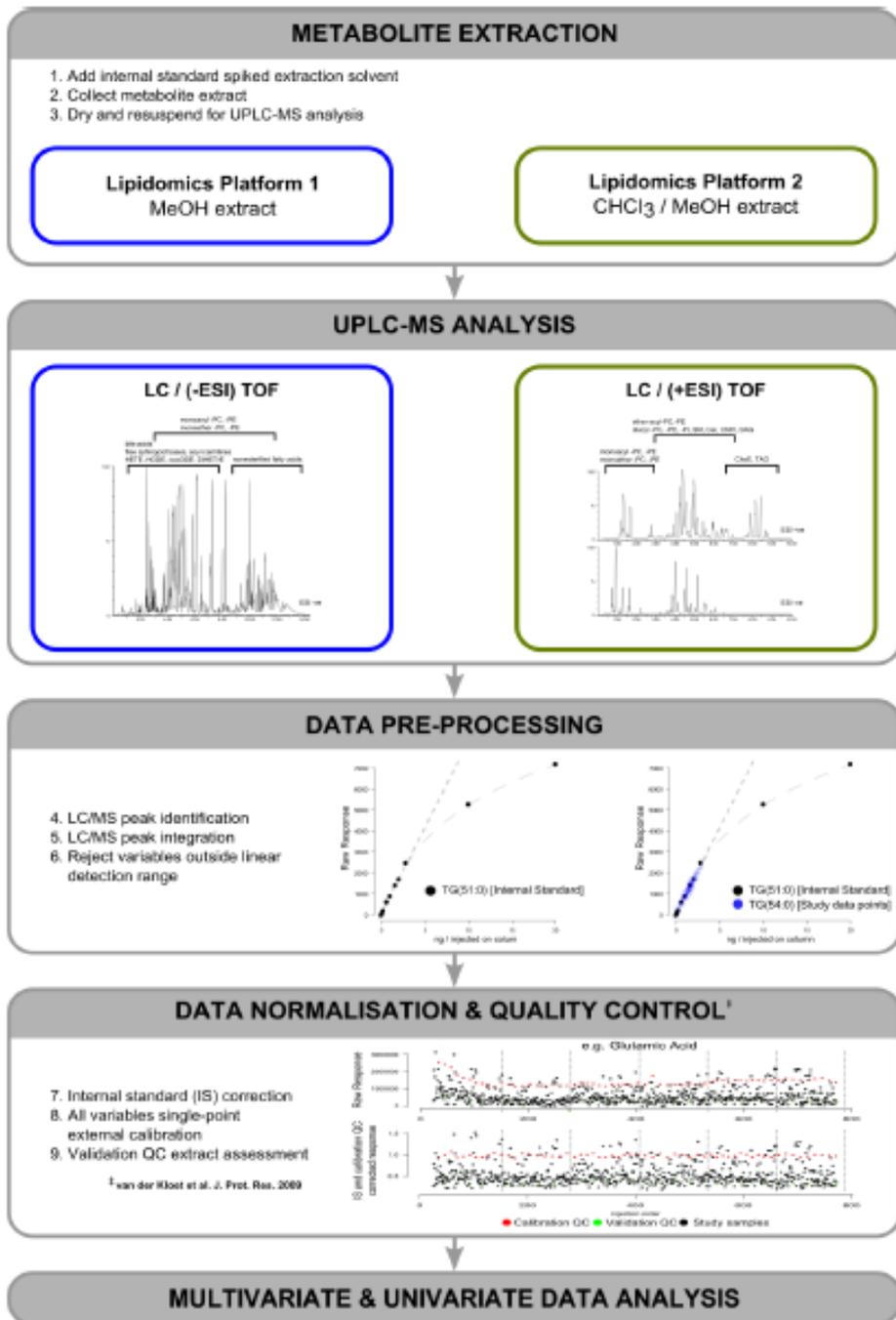


Figura 16: Diagrama de trabajo del análisis del perfil metabólico.

En el perfil metabólico, no existe un solo método o sistema para analizar todo el metaboloma de una muestra biológica, principalmente debido a la amplia gama de concentraciones de los metabolitos acoplado a su extensa diversidad química (Baker 2011, Duportet 2012). El presente estudio utilizó dos sistemas de UHPLC-MS para optimizar la cobertura extensa del lipidoma celular (Barr et al. 2012).

La extracción de lípidos se realizó fraccionando las muestras en pools de especies con propiedades fisicoquímicas similares, usando combinaciones apropiadas de disolventes orgánicos. Se utilizaron dos sistemas de extracción separados para la obtención de perfiles por UHPLC-MS:

- (Sistema de extracción 1): Acilos grasos, ácidos biliares, esteroides y lisoglicerofosfolípidos.
- (Sistema de extracción 2): Glicerolípidos, glicerofosfolípidos, lípidos esteroides y esfingolípidos.

Las proteínas fueron precipitadas y descartadas del lisado celular de las muestras añadiendo metanol. Después, de mezclarlas con el vortex de forma breve, se les añadió a las muestras cloroformo. Como los métodos analíticos aplicados, cubren diferentes clases de lípidos, se incluyeron estándares internos múltiples de la mayoría de estas clases. Triptófano-d5(indole-d5), PC(13:0/0:0), ácido graso no esterificado (NEFA) (19:0) y ácido dehidroalcohólico se añadieron en el metanol y se usaron como estándar interno en el primer análisis de UHPLC-MS (Sistema de extracción 1); SM(d18:1/6:0), PE(17:0/17:0), PC(19:0/19:0),

TAG(13:0/13:0/13:0), Cer(d18:1/17:0) y ChoE(12:0) fueron añadidos en cloroformo y usados como estándar interno en el segundo análisis UHPLC-MS (Sistema de extracción 2). Las muestras fueron incubadas a -20°C durante 30 minutos y después de pasarlas por el agitador vortex, se recogieron dos fases diferentes.

- *Para el análisis del sistema de extracción 1*, el cual incluye acilos grasos, ácidos biliares, esteroides, y lisoglicerofosfolípidos, se recogieron los sobrenadantes después de centrifugarlos a 16000 x g durante 15 minutos, secarlos, reconstituirlos en metanol, resuspenderlos de nuevo durante 20 minutos y centrifugarlos a 16000 x g durante 5 minutos antes de transferirlos a los viales para el análisis de UHPLC-MS.
- *Para el sistema de extracción 2*, el cual incluye glicerolípidos, colesterol esteres, esfingolípidos y glicerofosfolípidos, las células extraídas fueron mezcladas con agua (pH=9) y después mezcladas en agitador vortex brevemente, las muestras fueron incubadas durante 1 hora a -20°C. Tras centrifugarlas a 16000 x g durante 15 minutos, la fase orgánica fue recogida y el disolvente fue eliminado. El extracto seco, fue luego reconstituido en acetonitrilo/isopropanol (50:50), resuspendido durante 10 minutos, centrifugado a 16000 x g durante 5 minutos y transferido a los viales para su análisis en el UHPLC-MS.

De forma adicional, dos tipos diferentes de muestras de control de calidad (QC), fueron utilizadas para evaluar la calidad de los datos (van der Kloet et al. 2009). Las muestras QC son muestras de medio de cultivo de referencia, que se

distribuyeron uniformemente sobre los lotes y se extrajeron y analizaron al mismo tiempo que las muestras individuales.

- *La calibración de las muestra QC* se utilizó para corregir los diferentes factores de respuesta entre y dentro de los lotes.
- *La validación de las muestras QC* se utilizó para evaluar cómo de bien el procedimiento de pretratamiento de datos mejora la calidad de los datos.

Por cada uno de los dos sistemas de extracción o procedimientos analíticos, se realizaron inyecciones de muestras duplicadas de forma aleatoria, con cada uno de los extractos de calibración y validación de QC intercalados uniformemente a lo largo de toda la ejecución del lote.

Análisis LC-MS

Dos instrumentos UHPLC-time-of-flight (TOF)-MS (Barr et al. 2012) se utilizaron para obtener perfiles óptimos de lipidómica. El sistema de extracción 1 fue analizado en Acquity-LCT Premier XE system (Waters Corp., Milford, MA) y el sistema de extracción 2 en Acquity-Xevo G2QTOF (Waters Corp., Milford, MA). Se utilizaron diferentes métodos de UHPLC-MS para cada sistema de extracción o procedimiento y diferentes espectrómetros de masas, aunque los dos espectrómetros de masa se usaron como TOF aunque uno de ellos fuera QTOF. Las condiciones de la separación cromatográfica y la espectrometría de masas se resumen en la tabla 7.

MÉTODOS DE ANÁLISIS UHPLC-MS		
	Sistema de extracción 1	Sistema de extracción 2
Tipo de columna	UPLC BEH C18, 1,0 x 100 mm, 1,7 µm	UPLC BEH C18, 2,1 x 100 mm, 1,7 µm
Tasa de Flujo	0,14 ml/min	0,40 ml/min
Disolvente A	H ₂ O + 0,05% Formic Acid	H ₂ O + ACN + 10mM Ammonium Formate
Disolvente B	ACN + 0,05% Formic Acid	ACN+ Isopropanol + 10mM Ammonium Formate
(%B), tiempo	0%, 0 min	40%, 0 min
(%B), tiempo	50%, 2 min	100%, 10 min
(%B), tiempo	100%, 13 min	40%, 15 min
(%B), tiempo	0%, 18 min	40%, 17 min
Temperatura de la Columna	40 °C	60 °C
Volumen de inyección	2 µl	3µl
Temperatura de la fuente	120 °C	120 °C
Flujo de nebulización de N₂	600 l / hora	1000 l / hora
Tª de nebulización N₂	350 °C	500 °C
Flujo de cono de N₂	30 l / hora	30 l / hora
Potencia de capilaridad	2,8 kV	3,2 kV
Potencia de cono	50 V	30 V
Modo electrospray de iones	Negativo	Positivo

Tabla 7: Condiciones de la separación cromatográfica y la espectrometría de masas.

Con el fin de examinar la estabilidad del tiempo de retención y la sensibilidad del sistema a lo largo de su ejecución, se analizó un pool de compuestos estándar, antes y después del conjunto completo de inyecciones de las muestras, duplicadas y aleatorizadas. La calidad media de proceso de análisis fue monitorizada usando cinco extractos repetidos de muestras validadas de QC. Generalmente, la estabilidad del tiempo de retención fue < 6 segundos inyección a inyección y la precisión de masa < 3 ppm para m/z 400-1200, y $< 1,2$ mDa para m/z 50-400. Los datos de MS fueron adquiridos en un rango de m/z de 50-1000 para el Sistema de extracción 1 y de m/z 50-1200 para el Sistema de extracción 2. La media intralote en valores de %CV, fue 11,12 para ambos sistemas 1 y 2.

6.1.3.6. Pretratamiento de los datos

El pretratamiento de los datos generó una lista de áreas de los picos cromatográficos para los lípidos detectados en cada inyección de muestra. La normalización de los datos se realizó siguiendo el procedimiento descrito por van der Kloet y cols. (van der Kloet et al. 2009). Se estableció un LOD como tres veces el nivel de ruido de fondo (muestra de medio de cultivo). Los lípidos con al menos un valor de muestra bajo el LOD fueron excluidos del análisis. El ruido de fondo se restó entonces de los datos y se aplicó un procedimiento de normalización adicional dividiendo cada muestra por su número de espermatozoides. Una vez normalizados, la dimensionalidad del conjunto de datos complejos se redujo para permitir la fácil visualización de cualquier agrupación metabólica de los diferentes grupos de muestras. Esto se logró mediante análisis de datos multivariantes, incluyendo el análisis de componentes principales no supervisados (PCA) (Jolliffe

2002) y / o enfoques supervisados ortogonales de mínimos cuadrados parciales a estructuras latentes (OPLS) (Bylesjö 2006, Wiklund et al. 2008).

También se realizaron análisis estadísticos univariantes calculando los cambios en el porcentaje del grupo y el p valor del test de Wilcoxon para la comparación entre los espermatozoides infértiles (que no conseguían gestación (NE)) y fértiles (que sí conseguían gestación (E)).

Todos los datos se procesaron usando el administrador de aplicaciones TargetLynx para el software MassLynx 4.1 (Waters Corp., Milford, MA, USA). Se introdujo en el programa un conjunto predefinido de pares de R_t y relación m/z , correspondientes a los lípidos incluidos en el análisis. Los cromatogramas de iones asociados extraídos (ventana de tolerancia de masa = 0,05 Da) detectaron los picos correspondientes y se redujo el ruido en los dominios de LC y MS de tal manera que sólo el software procesaba las características relacionadas con los lípidos verdaderos.

6.1.3.6.1. Normalización de los datos y control de calidad

Se calcularon los factores de normalización para cada lípido dividiendo sus intensidades en cada muestra por la intensidad registrada de un patrón interno apropiado en esa misma muestra, siguiendo el procedimiento descrito por van der Kloet y cols. (van der Kloet et al. 2009):

- *El estándar interno* más apropiado para cada variable se definió como el resultante en una desviación estándar relativa mínima después de la

corrección calculada a partir de las muestras de calibración QC en todos los lotes de análisis. En general, como cabría esperar, las mejores tendencias de los estándares internos siguieron similitudes estructurales químicas entre los compuestos “spike” y las variables endógenas.

- Se utilizó *la regresión lineal* (respuesta corregida estándar interna en función de la orden de inyección de la muestra) para estimar, en las muestras de calibración QC, cualquier desviación intralote no corregida por corrección estándar interna (Martinez-Arranz et al. 2015). Para todas las variables, la respuesta corregida estándar interna en cada lote se dividió por su tendencia de derivación intralote correspondiente, de manera que los valores de abundancia normalizados de las muestras de estudio se expresaron con respecto a las muestras de suero de calibración de QC calibradas por lotes (fijadas arbitrariamente en 1).

Después de la normalización, se evaluó la concordancia entre los valores de la respuesta de la inyección de muestra duplicada. Cuando se encontraron coeficientes de variación > 30%, se devolvieron los datos correspondientes de inyección de muestra para la inspección manual de la integración automatizada realizada por el software TargetLynx y se realizaron modificaciones cuando fue apropiado. Los valores cero de respuesta variable de inyección de muestras restantes en el conjunto de datos corregido, se sustituyeron por los valores “missing” o ausentes antes de promediar para formar el conjunto de datos final que se utilizó para el estudio de los análisis estadísticos de la muestra.

Se aplicó un método suavizado en función de la media móvil para la reducción del ruido. Las características de LC-MS se identificaron antes del análisis, ya sea por comparación de sus espectros de masas precisos y R_t cromatográficos con los de los estándares de referencia disponibles o, cuando no estuvieran disponibles, mediante análisis de masa de fragmentos de MS/MS por Barr y cols en 2012 (Barr et al. 2012). Brevemente, las características identificadas de los iones en el Sistema 1 incluía ácidos grasos, acil carnitina, lisofosfolípidos y ácidos grasos, lisofosfolípidos y ácidos grasos oxidados. Las características iónicas consideradas para el siguiente análisis de datos fueron los aductos $[M-CO_2H]^-$, $[M-CO_2H]^-$, $[M-H]^-$, $[M-CO_2H]^-$ and $[M-H]^-$ para NEFA, AC, ácidos grasos oxidados, monoacil- y monoeter-fosfatidilcolinas y monoacil- y monoeter-fosfatidiletanolaminas o fosfatidilinositoles, respectivamente. El Sistema 2 proporcionó cobertura sobre glicerolípidos, ésteres de colesterol, esfingolípidos y glicerofosfolípidos. Las características iónicas consideradas para el siguiente análisis de datos de estas clases de lípidos fueron los aductos $[M+H]^+$ para diacil- o monoeter, monoacil-fosfatidilcolinas, fosfatidiletanolaminas o fosfatidilinositoles, monohexosilceramidas y esfingomielinas; $[M+H-H_2O]^+$ para ceramidas; $[M+Na]^+$ para diacilgliceroles; $[M+NH_4]^+$ para ésteres de colesterol y triacilgliceroles.

6.1.3.6.2. Análisis estadístico

a) Análisis de datos multivariante

El primer objetivo en el proceso de análisis de datos es reducir la dimensionalidad del conjunto de datos complejos para permitir la fácil visualización de cualquier agrupación metabólica de los diferentes grupos de

muestras. Esto se ha conseguido mediante el análisis PCA (Jolliffe 2002), y/o OPLS supervisados (Bylesjö 2006, Wiklund et al. 2008).

En el PCA, la matriz de datos se reduce a una serie de componentes principales (PC), donde cada uno de ellos es una combinación lineal de las áreas de los picos de los lípidos. Cada PC sucesivo explica la cantidad máxima de varianza posible, no explicada por los PC anteriores.

En este análisis se incluyen dos tipos de gráficos (figura 17); *Scores plot*: presenta las muestras como situadas en los planos de proyección descritos por los PC; *Loading plot*: muestra la influencia de los lípidos en el agrupamiento que aparece en el gráfico de puntuaciones. La interpretación de la gráfica *Score plot*, es facilitada por el gráfico de cargas que indica qué variables espectrales son responsables de los patrones y tendencias encontradas: como los lípidos con diferentes niveles entre dos grupos aparecen en la misma región de los gráficos *Score plot* y *Loading plot*, para comprender cómo se relacionan los lípidos con las muestras.

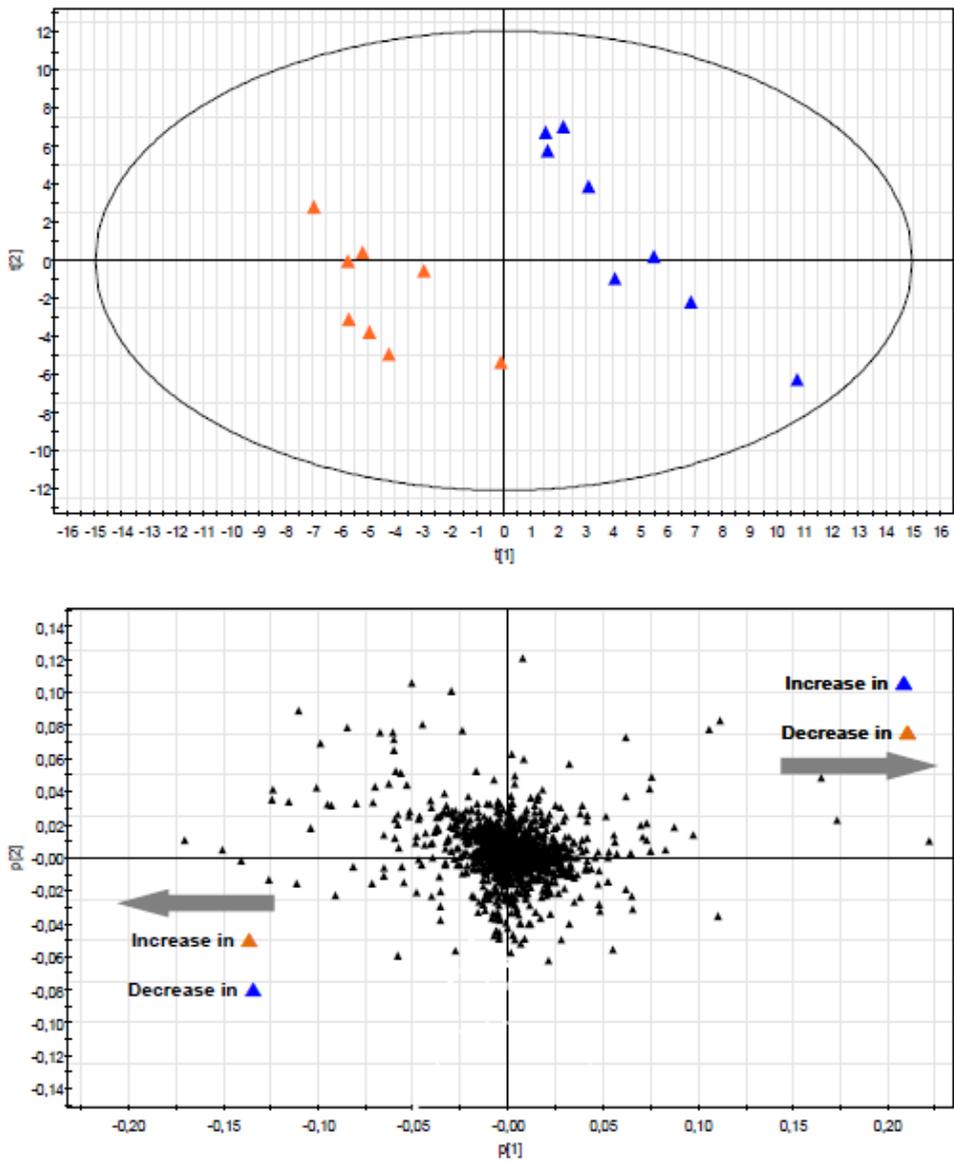


Figura 17: Gráficas PCA. *Score plot* (arriba) y *Loading plot* (abajo).

El número de componentes o dimensiones del modelo (A) incluidos en el modelo está vinculado a la diferencia entre el grado de ajuste y la capacidad

predictiva (parámetro R2 y Q2, respectivamente). R2 proporciona una indicación de cuánto de la variación dentro del conjunto de datos puede ser explicado por el modelo (bondad de ajuste). El parámetro Q2 describe la capacidad predictiva del modelo (bondad de la predicción).

Los parámetros R2 y Q2 muestran un comportamiento completamente diferente a medida que aumenta la complejidad del modelo (aumenta A). La bondad de ajuste, R2, varía entre 0 y 1, donde 1 significa un modelo perfectamente ajustado y 0 no encaja en absoluto. Sin embargo, R2 es incremental y se aproxima a la unidad a medida que A aumenta. Por lo tanto, no es suficiente tener un R2 alto. Por otra parte, la bondad de la predicción, Q2, es menos incremental y no se acercará automáticamente a 1 con el aumento de A. Además, dependiendo del tipo de muestras incluidas en el análisis, los valores de corte podrían cambiar, pero usualmente si el valor de Q2 es más del 20% de R2 que puede considerarse como un buen modelo de PCA.

La segunda etapa del proceso de análisis de datos se refiere a la identificación de los metabolitos que contribuyen al agrupamiento observado en las gráficas PCA. Para este propósito se utilizó el método OPLS (Bylesjö 2006, Wiklund et al. 2008). Se trata de un enfoque supervisado, enfocando el análisis hacia el objetivo del estudio: posibles biomarcadores discriminando entre grupos. Se crea una variable extra Y para cada muestra, tomando valores discretos 0 para el primer grupo y 1 para el segundo. La regresión de estos datos permite calcular nuevos componentes principales; ahora explicando sucesivamente la varianza X-Y correlacionada máxima. La rotación de este modelo OPLS permite que la correlación interclase (Grupo E - Grupo NE) sea capturada en un solo componente

predictivo. En este caso, el número de dimensiones del modelo (A) es la suma del componente que explica la variación interclase más los componentes que explica la variación intraclase.

El rendimiento del modelo OPLS se evaluó utilizando el parámetro predictivo R2X, R2Y y Q2Y. R2X y R2Y resumen cuánto de X está relacionado con Y, y el porcentaje de Y que explica, proporciona una indicación de cuánto de X e Y se explican por todos los componentes ortogonales. El parámetro Q2Y describe la capacidad predictiva del modelo para estimar los datos Y; los valores negativos de Q2Y indican que el modelo no es válido para separar entre ambas clases.

b) Análisis de datos univariante

Los datos se expresaron como medias o proporciones con sus correspondientes intervalos de confianza del 95% (IC del 95%) o desviaciones estándar (DE).

Las variables cuantitativas se compararon entre los grupos utilizando el *test de la t de Student* para muestras independientes cuando los datos se distribuían normalmente (*test de Shapiro-Wilk*). Se realizaron análisis estadísticos univariantes de las variables lipídicas, calculando los valores de p del *test de Wilcoxon* para la comparación entre las muestras de las que se obtuvo un embarazo y aquellas que no lo consiguieron, cuando los datos no siguieron una distribución normal.

- *Test de Shapiro-Wilk*: se utilizó para probar la normalidad de los datos. Se aplicó a cada metabolito para detectar si una muestra proviene de una población normalmente distribuida.
- *Test de la t de Student y test de Wilcoxon*: después de la prueba de normalidad, los metabolitos se evaluaron mediante el cálculo de los cambios en el porcentaje del grupo y el p valor del test de la t de Student (distribución normal) o Wilcoxon (distribución no normal) para las comparaciones incluidas en el estudio.

Para los datos categóricos, el test de Chi-cuadrado se utilizó para comparar proporciones entre los grupos.

El *Volcano Plot* se usó para resumir los criterios de tasa de cambio y test de la t. La tasa de cambio es un número que describe cuánto cambia una cantidad que va de un grupo inicial (grupo afectado) a un valor final (grupo de control), en este caso grupo E y NE, por tanto es la proporción entre la media de las porciones. El volcano plot (figura 18), es un diagrama de dispersión eficaz y fácil de interpretar de los valores p negativos transformados en \log_{10} del test de la t frente a la tasa de cambio en \log_2 . Los lípidos con niveles diferenciales estadísticamente significativos según el test de la t se encuentran por encima de la línea umbral horizontal. Los lípidos con valores de tasa de cambio grandes se encuentran lejos de la línea de umbral vertical en \log_2 tasa de cambio = 0, indicando si el lípido está regulado hacia arriba o hacia abajo.

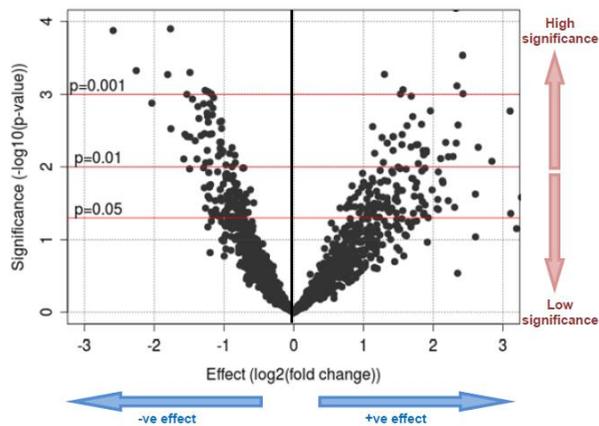


Figura 18: Volcano Plot. Interpretación

Se calculó la sensibilidad y especificidad diagnóstica y se construyó el análisis de la característica de funcionamiento del receptor (ROC) trazando la sensibilidad frente a la tasa de falsos positivos (especificidad-1) de varios valores de corte para predecir el embarazo. El área bajo la curva ROC (AUC) se calculó para los parámetros lipidómicos entre los grupos. El valor con la combinación óptima de sensibilidad y especificidad se eligió como el valor de corte. La prueba de cribado ideal es aquella que se aproxima o alcanza la esquina superior izquierda del gráfico (100% de sensibilidad y 100% de especificidad). También se calcularon valores predictivos positivos y negativos.

Para todos los test, se consideró estadísticamente significativo un valor de p inferior a 0,05. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando SPSSv22 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE.UU.) y utilizando el paquete de software estadístico R v.3.1.1 (R Development Core Team, 2011; <http://cran.r-project.org>) con el paquete MASS, este último para el análisis lipidómico.

6.2. Proteómica

Con el fin de caracterizar el perfil proteico de los espermatozoides de varones infértiles como un primer paso para evaluar su implicación en la fertilidad, se llevó a cabo una identificación masiva de proteínas mediante análisis de cromatografía líquida acoplada en tándem a espectrometría de masas (LC-MS/MS).

La técnica de SWATH (del inglés Sequential Windowed Acquisition of All Theoretical Fragment Ion Mass Spectra), se emplea para el estudio de expresión diferencial como técnica de análisis label-free de alta resolución. Hasta la fecha, solo se conoce un único estudio similar a esta tesis pero de caracterización de plasma seminal de cerdo en el que se emplee esta técnica (Perez-Patino et al. 2016).

6.2.1. Caracterización del proteoma de los espermatozoides: Elaboración de una librería de proteínas presentes en los espermatozoides

Con el fin de obtener el máximo número de proteínas identificadas, se preparó una mezcla de muestras de espermatozoides (pacientes y donantes), que constituirían una librería a partir de la cual llevar a cabo la caracterización de dicho proteoma. Esta librería sirvió de base para el posterior análisis de cuantificación label-free de las muestras objeto de estudio mediante la tecnología de SWATH.

Las muestras utilizadas para la elaboración de la librería fueron 4 muestras con un recuento > 20 millones de espermatozoides totales en la muestra, que con el fin de realizar una buena librería, procedían de dos donantes

y dos pacientes, presentando todos ellos parámetros de calidad del semen dentro de la normalidad.

6.2.1.1. LC-MS/MS

La identificación de proteínas presentes en los espermatozoides se llevó a cabo mediante un análisis LC-MS/MS con adquisición dependiente de datos.

6.2.1.2. Obtención y preparación de las muestras de semen

Las muestras fueron obtenidas mediante masturbación tras 3-5 días de abstinencia y tras su licuefacción fueron evaluadas siguiendo la metodología explicada en el apartado 6.1.3.4 de material y métodos. Luego, todas las muestras fueron preparadas de acuerdo al protocolo de rutina para el tratamiento de ICSI y se capacitaron mediante la técnica de SU (explicada en el apartado 5 de material y métodos).

Los donantes son jóvenes entre 18 y 35 años con buen estado de salud psicofísica y que disponen de plena capacidad de obrar, que tras pasar una entrevista psicológica, declaran que no presentan ningún antecedente personal ni familiar de ninguna enfermedad genética, hereditaria o que implique un riesgo añadido para el proceso de donación y presentan valores de las analíticas negativos y/o normales (marcadores serológicos negativos para VIH 1 y 2, VHB, VHC y de sífilis, hemograma, cariotipo, marcadores negativos para Chlamydia en una muestra de orina mediante PCR y un cultivo negativo para Gonorrea en una muestra de semen, grupo sanguíneo y Rh y análisis de portadores), vienen a la

clínica con el fin de ayudar a parejas donde el varón no posee espermatozoides. En el caso que nos ocupa, ambos donantes tenían 29 años y fertilidad probada.

En cuanto a los pacientes elegimos dos con características totalmente diferentes, para ampliar lo máximo posible la librería. Uno de ellos tenía 46 años, esterilidad secundaria y semen normozoospermico; y el otro, 28 años y esterilidad primaria, también con semen normozoospermico.

6.2.1.3. Preparación de las muestras de semen para su caracterización mediante una librería

Preparación de las muestras previa a la separación del gel

Las muestras analizadas para elaborar la librería se extrajeron en 100µL de tampón de lisis (Urea 7M/tiourea 2M /CHAPS al 4%) por agitación en vortex durante 30 minutos. El extracto total de proteína se centrifugó durante 10 minutos a 13000 rpm. Después se cogieron 25µg de cada una de las muestras (n=4) para un total de 100 µg de muestra y se le añadió el volumen correspondiente de Laemmli Sample Buffer 1X. De esta forma, las muestras fueron desnaturalizadas a 95°C durante 5 minutos para ser resueltas por completo en un gel de electroforesis 1D-SDS-PAGE (Bio-Rad 12% [™] Mini-PROTEAN® TGX [™]) (figura 19).

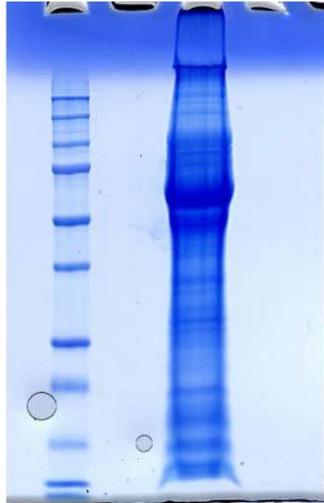


Figura 19: Gel librería. Mezcla de 4 muestras: dos pacientes y dos donantes.

Preparación del gel y tinción

La electroforesis se realizó usando un gel Bio-Rad 12%™ Mini-PROTEAN® TGX™. El gel 1D-SDS-PAGE fue teñido con Comassie coloidal, para visualizar las proteínas.

Digestión en gel de la librería

La carrera del gel correspondiente al pool de muestras analizadas (figura 19), se cortó en 6 fragmentos para aumentar la identificación de proteínas y realizar una caracterización completa de la librería de los espermatozoides. Cada fracción de gel se cortó en piezas de 1 mm y las muestras se digirieron con tripsina (Sequencing Grade Trypsin (Promega)) como se describe en el artículo de Shevchenko (Shevchenko et al. 1996). Se utilizaron 750ng de tripsina en 150 µL de solución bicarbonato amónico 50mM (ABC). La digestión se paró con ácido trifluoroacético (TFA) (concentración final del 1%), se realizó una doble extracción

con acetonitrilo (ACN) y todas las soluciones de péptidos se secaron en un evaporador rotatorio. Finalmente las muestras se resuspendieron con 20 μL de ACN al 2%; TFA al 0,1% dejándolas preparadas para ser analizadas por LC-MS/MS.

6.2.1.4. Análisis de la librería de proteínas mediante la técnica LC-MS/MS

Se cargaron 5 μL de cada muestra de la librería en una columna trampa (NanoLC Column 3 μ C18-CL, 75 μm x 15cm; Eksigen) y se limpiaron y concentraron con 0,1% de TFA a 3 $\mu\text{L}/\text{min}$ durante 5 minutos. Los péptidos que fueron eluyendo, se cargaron en una columna analítica (LC Column, 3 μ C18-CL, 75 μm x 12cm, Nikkyo) equilibrada en 5% de ACN y 0,1% de ácido fórmico (FA). La elución de los péptidos se llevó a cabo con un gradiente lineal de 5 a 35% de B en 180 minutos (A: 0,1% FA; B: ACN, 0,1% FA) para una tasa de flujo de 300nL/minuto, es decir, el gradiente de B va aumentando del 5% al 35% y va eluyendo los péptidos en función de su hidrofobicidad (lo menos hidrófobos primero). Los péptidos se analizaron en un espectrómetro de masas nanoESI qTOF (5600 TripleTOF, ABSCIEX).

El análisis mediante MS/MS tripleTOF se realizó en modo de adquisición dependiente de información, en el que se realizó una exploración MS de 250 ms de TOF de 350-1250 m/z, seguido de escaneos de iones de 150 ms de 350-1500 m/z en los 25 iones más intensos con carga 2-5. Esta técnica es dependiente de información, ya que depende de los péptidos más intensos y estos son los que fragmenta y analiza por MS/MS. Las ecuaciones de energía de colisión se fijaron para todos los parámetros como carga 2+ iones (porque es como lo

encontraremos cuando se realice la técnica SWATH con las muestras de los pacientes objeto de estudio).

6.2.1.5. Identificación, validación y cuantificación de proteínas

Después del LC-MS/MS los archivos de datos obtenidos, se procesaron utilizando el motor de búsqueda ProteinPilot v5.0. (ABSciex). Los parámetros por defecto del ProteinPilot se utilizaron para generar la lista de picos. Todos los archivos de muestras de la librería se combinaron en una sola búsqueda. Se utilizó el algoritmo Paragon (4.0.0.0, 4767) de ProteinPilot para buscar en la base de datos de proteínas Expsy teniendo en cuenta los siguientes parámetros: especificidad de tripsina, cis-alquilación, restricciones de taxonomía Homo sapiens, aplicando un test de corrección múltiple (FDR, False Discovery Rate) para la validación de los datos.

Para evitar el uso de la misma evidencia espectral en más de una proteína, las proteínas identificadas se agruparon basándose en espectros de MS/MS por el Algoritmo Pro-proteína Pro-Group™. Por tanto, las proteínas que compartían espectro MS/MS se agruparon, independientemente de la secuencia del péptido asignada. Así, la proteína dentro de cada grupo que podría explicar más datos espectrales con confianza, fue representada como la proteína primaria del grupo. Sólo se enumeraron las proteínas del grupo para las que existía una evidencia individual (péptidos únicos con suficiente confianza), generalmente hacia el final de la lista de proteínas.

6.2.2. Comparación del perfil proteico entre muestras de semen que consiguieron embarazo mediante ICSI

Finalmente y una vez elaborada la librería de proteínas presentes en los espermatozoides, procedimos a realizar el estudio en que se basa esta tesis, la obtención del perfil proteico de los espermatozoides y su relación con la consecución o no del embarazo.

6.2.2.1. Población de estudio: Cálculo del tamaño muestral

El tamaño muestral fue establecido tal y como se explica en el 6.1.3.1. de material y métodos. Además, no se definió un resultado de medida único, ya que se tenía que evaluar el perfil proteico total. Por tanto se incluyeron 8 muestras de pacientes cuyas parejas se sometieron a ciclos de ICSI con ovocitos donados con más de 1 millón de espermatozoides/mL tras el proceso de capacitación por SU. Estas muestras presentaban concentraciones que iban desde 8 hasta 24 millones de espermatozoides/mL con una cantidad de espermatozoides por muestra que iba desde 4 hasta 12,32 millones de espermatozoides totales.

6.2.2.2. Diseño del estudio

El estudio fue prospectivo, analítico y utilizamos el diseño de casos y controles anidados con los 8 pacientes, incluyendo 4 muestras en el grupo de pacientes que conseguían gestación (E) y 4 muestras en el grupo de pacientes que no lo conseguían (NE).

6.2.2.3. Tratamiento de reproducción asistida (ICSI) con ovocitos donados

Explicado detalladamente en el apartado 6.1.3.3 de material y métodos.

6.2.2.4. Obtención y preparación de las muestras de semen

Las muestras fueron obtenidas mediante masturbación tras 3-5 días de abstinencia y tras su licuefacción evaluadas como se detalla en el apartado 6.1.3.4 de material y métodos. Todas las muestras fueron preparadas de acuerdo al protocolo de rutina para el tratamiento de ICSI. Todas las muestras se capacitaron mediante la técnica de SU (explicada en el apartado 5 de material y métodos).

Una vez realizado el SU, se recuperaron alícuotas de diferente volumen del sobrante de la muestra que se utilizaba para la realización del ciclo de ICSI, sin comprometer el éxito del tratamiento. Las muestras se congelaron en nitrógeno líquido por inmersión directa sin crioprotector y se mantuvieron en el congelador a -20°C a la espera de conocer su resultado de gestación para asignarlas al grupo de estudio correspondiente y poder proceder a la realización de su análisis. Una vez recopiladas las 8 muestras de pacientes y clasificadas en dos grupos de acuerdo a su habilidad para conseguir o no embarazo en paralelo a previos estudios realizados por nuestro grupo (Garcia-Herrero et al. 2010a, Garcia-Herrero et al. 2010b, Garcia-Herrero et al. 2011, Garrido et al. 2013), estas fueron separadas y analizadas usando la técnica de SWATH (tabla 8).

Tipo de muestra	Gestación	Número de muestras
Espermatozoides	SÍ	4
	NO	4

Tabla 8: Clasificación de las muestras analizadas en el estudio.

6.2.2.5. Preparación de las muestras de semen para el análisis proteómico de expresión diferencial

Preparación de las muestras previa a la separación del gel

Una vez conocido el resultado de gestación de los pacientes incluidos en el estudio, se descongelaron las muestras a temperatura ambiente y se prepararon para su separación en gel.

En este caso, las muestras fueron preparadas de manera muy similar a las muestras utilizadas para elaborar la librería. Las proteínas de los espermatozoides fueron extraídas en 50 μ L de tampón de lisis (Urea 7M, tiourea 2M y CHAPS al 4%) y se agitaron con vortex durante 30 minutos. El extracto total de las proteínas se centrifugó 10 minutos a 13000 rpm. Todas las muestras fueron mezcladas con Laemmli Sample Buffer 1X y desnaturalizadas durante 5 minutos a 95°C. Estas muestras se cargaron en un gel de electroforesis 1D-SDS-PAGE (Bio-Rad Any kD™Mini-PROTEAN® TGX™).

Preparación del gel y tinción

La electroforesis se realizó usando un gel Bio-Rad Any kD™Mini-PROTEAN® TGX™. La electroforesis se detuvo una vez que la muestra entró en el gel resolutivo. El gel 1D-SDS-PAGE fue teñido con Comassie coloidal, para visualizar las proteínas (figura 20).

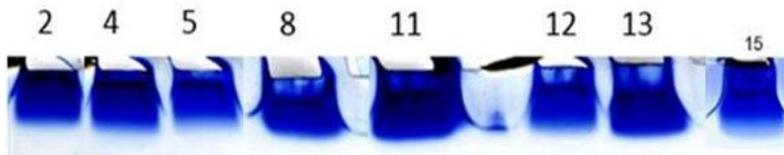


Figura 20: Gel de muestras de pacientes que se sometieron a ciclos de ICSI dentro del programa de ovodonación. Las del grupo E (logran embarazo) son las muestras 8, 11, 13 y 15; mientras que las del grupo NE (no logran embarazo) son las muestras 2, 4, 5 y 12.

Cada carrera del gel correspondiente se cortó, y las muestras fueron digeridas con tripsina (Sequencing Grade Trypsin (Promega)) (Shevchenko et al. 1996). Para ello se utilizaron 750ng de tripsina en 150 μ L de solución ABC. La digestión se paró con TFA (concentración final 1%), se realizó una doble extracción con ACN y todas las soluciones de péptidos se secaron en un evaporador rotatorio. Finalmente las muestras se resuspendieron con 7 μ L de ACN al 2%; TFA al 0,1%, dejándolas preparadas para ser analizadas mediante LC-MS/MS-SWATH.

6.2.2.6. Análisis de las muestra mediante la metodología SWATH LC-MS/MS

El SWATH™-MS o espectrometría de masas de adquisición independiente de datos es un método de análisis basado en LC-MS/MS en el que todos los iones dentro de un rango de m/z seleccionado se fragmentan y analizan en una segunda etapa de espectrometría de masas en tándem. (Gillet et al. 2012, Hopfgartner et al. 2012, Perez-Patino et al. 2016).

Para los experimentos basados en la metodología SWATH-MS, el instrumento (SCIEX TripleTOF 5600) se configuró como se describe por Gillet y cols. (Gillet et al. 2012). Brevemente, el espectrómetro de masas fue manejado en

un modo de fragmentación independiente de datos. Se utilizó una ventana de aislamiento de 16 Da (15 Da de eficiencia óptima de transmisión de iones y 1 Da de solapamiento de ventanas), se construyó un conjunto de 37 ventanas solapadas que cubrían el intervalo de masa 350-1250 Da.

Se cargaron 5 μ L de cada muestra en una columna trampa (columna NanoLC, 3 μ m C18-CL, 75 μ m x 15 cm, Eksigent) y se limpiaron y concentraron con TFA al 0,1% a 3 μ L / min durante 5 minutos. Los péptidos que iban eluyendo, se cargaron en una columna analítica (columna LC, 3 μ m C18-CL, 75 μ m x 12 cm, Nikkyo) equilibrada en ACN al 5% 0,1% FA. La elución del péptido se llevó a cabo con un gradiente lineal de 5 a 35% de B en 180 minutos (A: 0,1% de FA, B: ACN, 0,1% de FA) a un caudal de 300 nL/min. Los péptidos eluidos se infundieron en el espectrómetro de masas nanoESI qTOF (ABSCIEX TripleTOF 5600).

6.2.2.7. Identificación, validación y cuantificación de proteínas

Los datos obtenidos del experimento con la técnica SWATH, se analizaron utilizando el software PeakView® (v2.2, AB SCIEX) de acuerdo con el siguiente esquema (figura 21).

Los picos de la ejecución de SWATH se extrajeron con un umbral de confianza del péptido del 95% y una tasa de FDR del 1%.

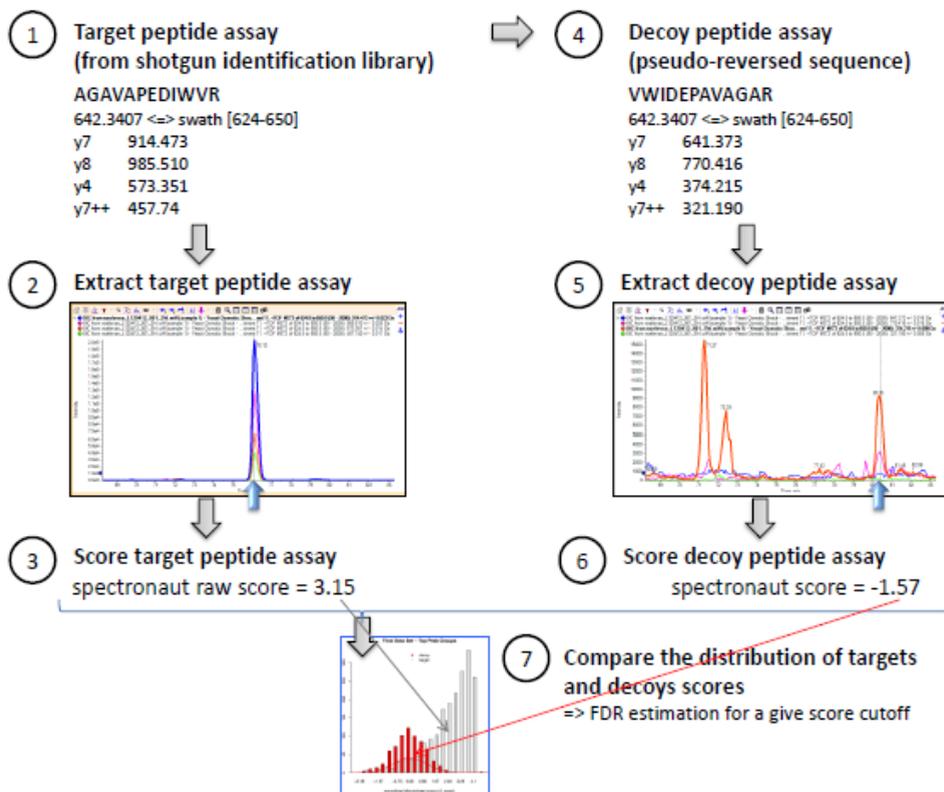


Figura 21: esquema de análisis del PeakView® (v2.2, AB SCIEX). 1) Análisis del péptido elegido a través de la digestión de la proteína en todos sus péptidos; 2) Cromatograma del péptido elegido, encontramos el pico del péptido elegido a determinado Rt y los picos incluidos dentro de él corresponden a los picos de las diferentes transiciones de ese péptido; 3) Valor del péptido elegido; a su vez, por otro lado tenemos 4), 5) y 6) que corresponde a la validación del proceso con una confianza del 95%.

6.2.2.8. Análisis estadístico

El objetivo de nuestro estudio, aparte de la obtención del perfil proteico de muestras de pacientes infértiles que se someten a ciclos de TRA (en concreto OVODÓN/ICSI), es comparar el perfil proteico entre muestras de semen que consiguieron embarazo y las que no, y describir sus diferencias.

Para ello determinamos la significancia estadística (p valor) y la tasa de cambio. Con esta información seleccionamos de todas las proteínas identificadas, aquellas que se encontraban en cantidades diferentes en un grupo frente al otro de manera significativa, y con la tasa de cambio determinamos en que grupo se encontraban las proteínas en mayor cantidad, analizando el grupo E frente al NE.

La comparación de los grupos E y NE se realizó a partir de los datos cuantitativos de SWATH obtenidos con PeakView®.

El problema más habitual al que nos enfrentamos en cualquier tipo de estudio bioestadístico son las bases de datos en las que el número de variables de interés son mucho mayor que el número de observaciones que se disponen. Además, tenemos el problema de si las observaciones son independientes o no.

Bajo este tipo de condiciones, realizar inferencia utilizando los modelos clásicos más conocidos como el test t , el ANOVA o el χ^2 cuadrado, nos llevan a otros tipos de problemas como: 1) el aumento del error de tipo I o aumento del error tipo II al intentar reducir el error de tipo I y 2) el no disponer de los suficientes grados de libertad para poder estimar todos los parámetros del modelo.

Entre los métodos más adecuados que nos permiten construir modelos para resolver este tipo de situaciones en las que tenemos más variables que muestras, tenemos los métodos de regresión con penalización (Ridge, Lasso y Elastic Net) y los métodos de proyección o de reducción de dimensión (PLS).

a) Método de regresión múltiple con penalización: Elastic-Net

Entre todas las técnicas utilizadas para el encogimiento de los coeficientes de regresión a cero utilizamos la técnica Elastic-Net. Esta restricción es una combinación de dos técnicas (Ridge y Lasso), luego permite más variables en el modelo.

b) Métodos de reducción de dimensión

Estos métodos transforman las variables predictivas originales (proteínas) y las ajustan a un modelo de mínimos cuadrados usando las variables transformadas. Para ello se siguen dos pasos: 1) la obtención de la transformación de las variables predictivas y 2) la estimación del nuevo modelo de regresión usando esos nuevos predictores. La elección de estos nuevos predictores se puede realizar a través del PCA o mínimos cuadrados parciales (PLS, siglas en inglés).

Aplicación De PLS-DA

El PLS es un método de reducción de dimensión donde primero se identifica un nuevo conjunto de variables de una forma supervisada, es decir, utiliza la variable respuesta con el fin de identificar nuevas variables que no sólo se aproximan a las variables originales, sino que también están relacionadas con la variable respuesta. En resumen, el método PLS intenta encontrar direcciones que ayuden a explicar la variable respuesta (embaraza-no embarazo) y las variables predictivas (diferentes proteínas). Su principal ventaja con respecto al PCA es que se necesitan menos componentes para explicar la variable respuesta.

En este caso vamos a aplicar el PLS-DA, método PLS pero combinado con análisis discriminante, debido a que la variable respuesta es cualitativa.

6.2.2.9. Análisis funcional. GO, DAVID y String

La interpretación de los largos listados de proteínas que se obtienen de los experimentos realizados en esta tesis, fueron un auténtico reto y fue gracias a la ontología génica como se pudieron interpretar. La ontología se define como una manera formal de estructurar el conocimiento biológico, refiriéndose a los genes y a sus productos génicos.

En un primer paso, la GO, divide en tres dominios diferentes: funciones moleculares, procesos biológicos y componentes celulares, que a su vez se subdividen en otros.

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

El análisis bioinformático de las proteínas identificadas y validadas se realizó manualmente utilizando la base de datos UniProt KB (www.uniprot.org).

Este análisis permitió elucidar las diferentes funciones y procesos en los que las proteínas identificadas y validadas estarían presuntamente implicadas. Las proteínas sin similitud con las entradas de la base de datos no se consideraron.

Además se utilizó la base de datos DAVID (<https://david.ncifcrf.gov>), que provee de una interpretación funcional de amplias listas de genes derivados de estudios genómicos y basados en el GO. Esta base de datos integra y aglomera millones de identificadores de genes y proteínas de gran variedad de fuentes de información genéticas públicas proporcionando una anotación heterogénea.

Los listados de proteínas diferenciales identificadas mediante el análisis de PLS-DA se analizaron mediante la herramienta bioinformática de DAVID utilizando dos backgrounds distintos, el proteoma humano y el total de proteínas cuantificadas con SWATH, lo que nos proporcionó una serie de términos ontológicos estadísticamente afectados, así como una serie de rutas metabólicas.

Por último se llevó a cabo el análisis String (análisis de redes de asociación de proteínas funcionales, <https://string-db.org>) con el fin de averiguar si las proteínas encontradas estaban relacionadas entre sí.

V. RESULTADOS

*Incluso las cosas que parecen difíciles
son fáciles cuando las haces con pasión*

V.RESULTADOS

1. Metabolómica: Lipidómica

1.1. UHPLC-MS

Se puso a punto la técnica de UHPLC-MS para la identificación de lípidos en muestras de semen.

1.2. Aplicación de la técnica UHPLC-MS en muestras de pacientes destinadas propiamente a tratamientos

Para la aplicación de esta técnica en nuestro estudio se obtuvieron 10 alícuotas de las muestras capacitadas de pacientes que acudieron a la clínica IVI Valencia a realizarse un ciclo de IAH. Estas muestras se analizaron comparándolas con un control positivo que correspondía al medio que se utilizó para preparar/capacitar las muestras mediante SU. Tras la aplicación de los dos sistemas de extracción ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ y MeOH) se obtuvieron un total de 212 lípidos que se encontraban en las muestras de espermatozoides. Se considera que **se encontraba en mayor cantidad** (sistema de extracción $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, tabla 9; y sistema de extracción MeOH , tabla 10), si el lípido se encontraba en una cantidad de 3 o más veces de lo que se encontraba en el medio de capacitación; que **se encontraba en menor cantidad**, si no se detectaba el lípido en las muestras; y **equivalente al blanco**, si el valor del lípido no superaba el límite establecido de 3 veces el valor de sí mismo en el medio.

Familias de metabolitos (lípidos)	Número de lípidos
SE ENCONTRABA MAYOR CANTIDAD	184
Glicerolípidos	20
Diacilgliceridos	3
Triacilgliceridos	17
Glicerofosfolípidos	113
1-eter, 2-acilglicerofosfocolina	36
1-eter, 2-acilglicerofosfoetanolamina	13
Diacilglicerofosfocolina	47
Diacilglicerofosfoetfanolamina	9
Diacilglicerofosfoinositol	8
Esfingolípidos	49
Ceramidas	14
Monohexosilceramidas	4
Esfingomielina	31
Esteroles	2
Colesterol Ester	2

Tabla 9: Metabolitos que SE ENCONTRABAN EN MAYOR CANTIDAD utilizando el sistema de extracción CHCl₃/MeOH.

Familias de metabolitos	Número de lípidos
SE ENCONTRABA EN MAYOR CANTIDAD	28
Acilcarnitinas	2
(en blanco)	2
Ácidos biliares	3
Taurina-conjugada ácidos biliares	3
Glicerofosfolípidos	23
1-Monoacilglicerofosfocolina	5
1-Monoacilglicerofosfoetanolamina	4
1-Monoetherglicerofosfoetanolamina	5
2-Monoacilglicerofosfocolina	5
2-Monoacilglicerofosfoetanolamina	4

Tabla 10: Metabolitos que SE ENCONTRABAN EN MAYOR CANTIDAD utilizando el sistema de extracción MeOH.

En líneas generales, detectamos 212 metabolitos entre los dos sistemas de extracción que se encontraban en mayor cantidad en las muestras de espermatozoides. La mayor parte de ellos son glicerolípidos (fosfatidilcolinas, etanolaminas e inositoles) y esfingolípidos (esfingomielinas y ceramidas).

1.3. Comparación del perfil lipídico entre muestras de semen que consiguieron embarazo mediante ICSI y las que no

1.3.1. Demográficos

Como se muestra en la tabla 11, ambos grupos de estudio (E y NE), son comparables, ya que entre los parámetros y características estudiadas no se encuentran diferencias estadísticamente significativas.

CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES			
	GESTACIÓN SI (E)	GESTACIÓN NO (NE)	p valor
N	21	15	
EDAD MUJER	38,6±4,81	39±4,42	0,795
IMC	22,5±2,67	22,4±4,1	0,916
FOLICULOS ANTRALES	13,3±3,64	11,4±3,05	0,0916
OVOCITOS MADUROS (MII)	9,68±5,01	8,86±3,9	0,584
TASA FECUNDACIÓN	79,5±16,9	80,8±16,4	0,818
TRANSFER EMBRIONES	1,86±0,351	1,79±0,426	0,573
CALIDAD EMBRIONARIA-FRECUENCIAS			Pr(z)*
A	2	3	0,911876525
A+A	8	4	0,695076349
A+B	2	0	
A+C	0	2	
B	1	0	0,69362701
B+B	4	2	0,196397706
B+C	2	0	
CARACTERÍSTICAS DEL SEMEN			p valor
EDAD VARÓN	42,7±5,04	43,5±6,26	0,684
VOLUMEN	2,93±1,02	2,39±0,738	0,0747
ESPERMATOZOIDES PROGRESIVOS	41,5±13,7	42,7±15,3	0,811
ESPERMATOZOIDES NO PROGRESIVOS	8,32±5,18	5,92±3,82	0,127
ESPERMATOZOIDES INMÓVILES	50,2±14,8	51,8±15,5	0,761
TOTAL ESPERMATOZOIDES	148±103	147±102	0,972
TOTAL DE ESPERMATOZOIDES PROGRESIVOS	60,3±41,7	57,2±40,1	0,826
MORFOLOGÍA NORMAL	4,38±2,2	4,07±2,59	0,716
ALTERACIONES DE CABEZA	90,9±20,5	95,5±3,57	0,326
ALTERACIONES PIEZA MEDIA	35,6±12,2	30,6±9,42	0,181
ALTERACIONES DE COLA	13,8±7,66	13,2±7,56	0,836
<p>Test Chi cuadrado con p valor simulado (basado en 2000 réplicas)</p> <p>p valor = 0,393</p> <p>*Pr(z) correlación significativa con respuesta variable</p>			

Tabla 11: Características de los pacientes participantes en el estudio.

1.3.2. Análisis de datos multivariante

Comenzamos a agrupar las muestras usando una *gráfica de Score* de PCA, comparando los espermatozoides que lograron embarazo (E) versus espermatozoides que no lograron embarazo (NE). Nuestro modelo de análisis de PCA se generó utilizando 22 muestras E y 16 muestras NE y las muestras QC (figura 22). La reproducibilidad del análisis se evaluó mediante un análisis multivariante no supervisado de todas las muestras y las muestras QC incluidas en el estudio. Dado que el análisis PCA, muestra la variabilidad entre las muestras, la superposición de las inyecciones de QC proporciona una buena indicación de la de la reproducibilidad y calidad de las mediciones.

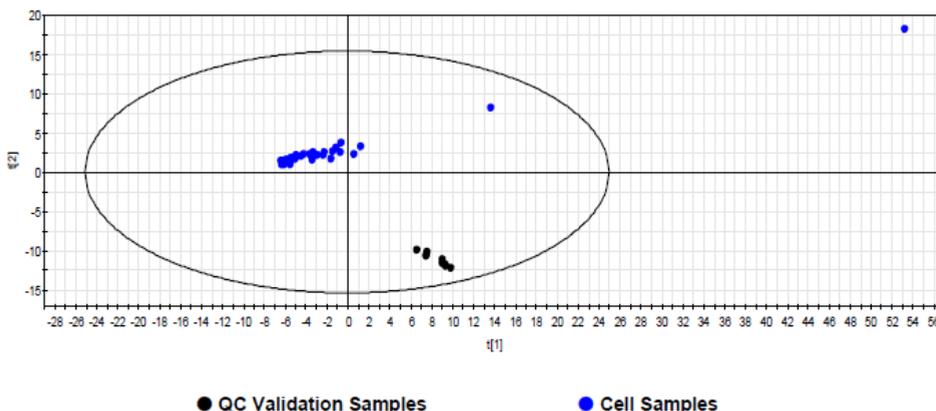


Figura 22: Modelo PCA de muestras y controles de calidad. Puntos en negro, muestras de validación (QC) correspondientes al medio de cultivo, y puntos en azul, muestras de semen.

Una vez validada la calidad del experimento, se retiraron las inyecciones de QC del análisis y se generó un modelo de PCA con todas las muestras. La figura 23 muestra que las muestras número 35 del grupo E y número 24 del grupo NE, se encontraban fuera del rango establecido (delimitado por la elipse). Sin embargo,

una inspección adicional de los datos relativos a esas muestras, mostró que la muestra 35 tenía niveles elevados de unos pocos glicerofosfolípidos, mientras que la muestra 24 mostraba niveles elevados de la mayoría de las especies lipídicas. La inspección de los datos también mostró que la muestra número 11 del grupo E, aunque estaba dentro del rango establecido, tenía niveles más altos de la mayoría de las especies lipídicas. Teniendo esto en cuenta, las muestras 11 y 24 (cada una de un grupo, E y NE respectivamente) se clasificaron como outliers y se retiraron del análisis, mientras que la muestra 35 se mantuvo en el estudio.

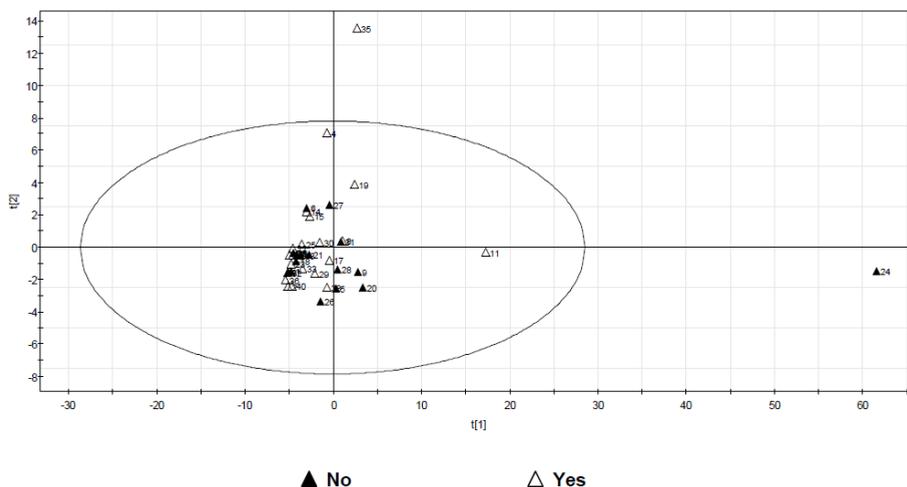


Figura 23: Modelo de PCA de todas las muestras de semen analizadas, las que consiguen embarazo (E, triángulos blancos) y las que no lo consiguen (NE, triángulos negros).

Después de eliminar estos valores atípicos u outliers, el PCA (figura 24) mostró una distribución aleatoria de muestras sobre los dos primeros componentes principales $t[1]$ y $t[2]$, indicando que el contenido global de lípidos en los espermatozoides no se separa según su capacidad fecundante. El modelo OPLS supervisado, no se muestra, ya que mostró una capacidad predictiva

negativa, lo que indica que no era válido separar los dos grupos usando todos los lípidos encontrados en nuestro estudio. También se aplicaron análisis estadísticos multivariantes después de la transformación logarítmica o de la raíz cuadrada, pero no se encontró ningún modelo.

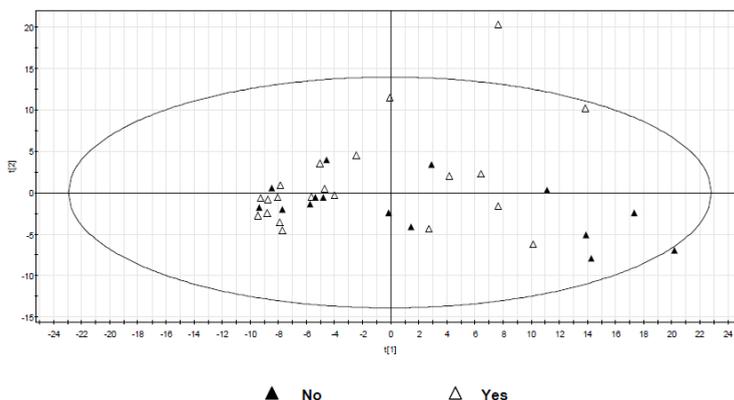


Figura 24: Modelo de PCA de muestras de semen analizadas que consiguen embarazo (E, triángulos blancos) y que no lo consiguen (NE, triángulos negros), excluyendo las dos muestras que presentaban valores atípicos.

1.3.3. Análisis de datos univariante

El volcano plot mostrado en la figura 25 refleja los lípidos más significativos, considerados individualmente para la comparación de los espermatozoides NE frente al E. Este tipo de representación de los datos (volcano plot) destaca los lípidos individuales más detectados diferencialmente, considerando los diferentes valores de p para cada lípido (0,05; 0,01; o 0,001) y la tasa de cambio positiva o negativa en los espermatozoides del grupo NE frente al E. La mayoría de los lípidos aparecieron en niveles más altos en espermatozoides que no mostraron capacidad de gestación.

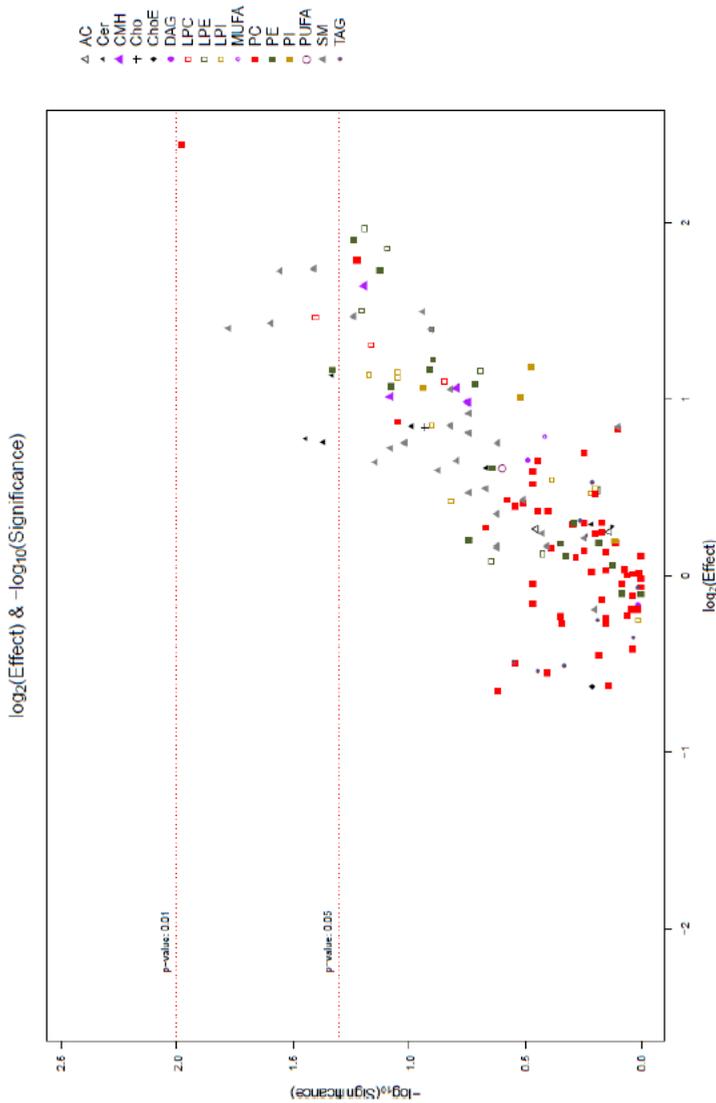


Figura 25: Volcano plot: representación de [$\log_2(\text{tasa de cambio, efecto})$ vs $-\log_{10}(\text{p-valor, significancia})$] para la comparación entre muestras del grupo NE frente a las del grupo E. AC: acil carnitina , Cer: ceramida, CMH: monohexosilceramidas , Cho: colesterol, ChoE: colesterol ester, DAG: diacilglicérido, LPC: lisofosfatidilcoina , LPE: lisofosfatidiletanolamina , LPI: lisofosfatidilinositol , MUFA: ácidos grasos monoinsaturados , PC: fosfatidil colina , PE: fosfatidiletanolamina , PI: fosfatidilinositol, PUFA: ácidos grasos poliinsaturados , SM: esfingomielinas , TAG: triacilglicéridos.

En la tabla 12 se muestran los 10 lípidos alterados de las 151 especies lipídicas diferentes detectadas en las muestras de semen destinadas a los tratamientos de ICSI que se encontraban en mayor abundancia de forma estadísticamente significativa en las muestras del grupo NE, oscilando su tasa de cambio desde 1,10 a 1,30, el p valor < 0,05 y aplicando una tasa de FDR del 1%. Las 151 especies lipídicas se encuentran en la tabla 13.

Todas las ceramidas con significancia estadística eran diferentes y consistían en un resto de esfingosina de 18 carbonos (sphing-4-enina) que está amida-unido a un grupo acilo graso de cadena larga. Varias esfingomielinas también se encontraron en niveles más altos en espermatozoides a partir de los cuales no se consiguió embarazo, la mayoría de los cuales también contenían el resto sphing-4-enina. Además, tres glicerofosfolípidos: la lisofosfatidilcolina PC (0:0/20:0) y dos especies plasmalógeno PC (O-22:0/20:4) y PE (P-16:0/18:2), fueron significativamente mayores en los espermatozoides sin capacidad fecundante.

Fórmula lipídica	Grupo NE (media ± DE)	Grupo E (media ± DE)	Log ₂ (tasa de cambio)	p valor (<0,05)
Ceramida, Cer(d18:1/22:0)	6,04 ± 5,44	2,83 ± 3,38	1,10	3,58E-02
Ceramida, Cer(d18:1/23:0)	0,39 ± 0,37	0,17 ± 0,16	1,23	4,27E-02
Ceramida, Cer(d18:1/24:0)	2,02 ± 1,99	0,89 ± 0,96	1,18	4,63E-02
Esfingomielinas, SM(38:1)	1,74 ± 1,63	0,77 ± 0,99	1,18	3,89E-02
Esfingomielinas, SM(d18:1/22:0)	0,95 ± 0,90	0,39 ± 0,51	1,28	2,78E-02
Esfingomielinas, SM(42:1)	1,45 ± 1,34	0,59 ± 0,76	1,29	2,55E-02
Esfingomielinas, SM(d18:1/25:0)	0,28 ± 0,23	0,12 ± 0,13	1,20	1,67E-02
1 or 2-Monoacilglicerofosfocolinas, PC(0:0/20:0)	0,07 ± 0,06	0,03 ± 0,04	1,20	3,95E-02
1-ether, 2-acilglicerofosfocolinas, PC(O-22:0/20:4)	0,31 ± 0,26	0,13 ± 0,16	1,22	1,05E-02
1-ether, 2-acilglicerofosfoetanolaminas, PE(P-16:0/18:2)	1,15 ± 1,08	0,53 ± 0,54	1,12	4,07E-02

Tabla 12: Metabolitos afectados, estadísticamente significativos, dependiendo de la capacidad de fecundación (consecución o no del embarazo).

Entre los lípidos encontrados en los grupos E y NE se incluyeron ceramidas: (Cer)(d18:1/22:0), Cer(d18:1/23:0), Cer(d18:1/24:0), y esfingomielinas: (SM)(38:1), SM(d18:1/22:0), SM(42:1), y SM(d18:1/25:0). De forma adicional, 1 o 2-monoacilglicerofosfocolinas PC(0:0/20:0), 1-eter, 2-acilglicerofosfocolinas PC(O-22:0/20:4) y acilglicerofosfoetanolaminas, 1-eter, 2-acilglicerofosfoetanolaminas PE(P-16:0/18:2); mostraron diferentes niveles entre grupos (tabla 12).

Considerando la clasificación de metabolitos en función de las clases de lípidos, no de lípidos únicos, los análisis estadísticos univariantes mostraron mayores niveles de monoacilglicerofosfocolina con un ácido graso esterificado en

la posición sn-2 en espermatozoides infértiles en comparación con los fértiles. La 2-monoacilglicerofosocolina (glicerofosfolípido) fue la única suma de metabolitos (familia química) que salió estadísticamente significativa (p -valor = 0,0394) en el grupo NE (se puede encontrar información detallada en la tabla 14).

Resultados

		Grupo NE		Grupo E		Análisis ROC								
IDENTIFICACIÓN LIPÍDICA	FÓRMULA QUÍMICA	Media	DE	Media	DE	p valor	Tasa de cambio	Área bajo la curva	Sens	Spec	PPV	NPV	Índice Youden	Punto de corte
Cer(d18:1/20:0)	C38H75NO3	22,40	20.50	11.76	15.02	0.10	1.91	0.66	0.40	0.90	0.75	0.68	0.30	32.95
Cer(d18:1/22:0)	C40H79NO3	6,04	5.44	2.83	3.38	0.04	2.14	0.71	0.87	0.52	0.57	0.85	0.39	1.67
Cer(d18:1/23:0)	C41H81NO3	0,39	0.37	0.17	0.16	0.04	2.35	0.70	0.87	0.55	0.59	0.85	0.42	0.12
Cer(d18:1/24:0)	C42H83NO3	2,02	1.99	0.89	0.96	0.05	2.27	0.70	0.40	0.95	0.86	0.68	0.35	2.82
Cer(d18:1/24:1) + Cer(d18:2/24:0)		1,75	1.22	1.24	0.95	0.21	1.41	0.63	0.93	0.33	0.50	0.88	0.27	0.59
Cer(42:3)		1,83	0.79	1.87	1.23	0.91	0.98	0.55	0.80	0.48	0.52	0.77	0.28	1.24
CMH(d18:1/16:0)	C40H77NO8	12,74	14.60	7.36	9.57	0.16	1.73	0.64	0.87	0.48	0.54	0.83	0.34	2.69
CMH(d18:1/22:0)	C46H89NO8	6,21	6.52	3.78	5.90	0.18	1.64	0.64	0.80	0.53	0.57	0.77	0.33	1.38
CMH(d18:1/24:0)	C48H93NO8	2,70	2.95	1.21	1.89	0.06	2.24	0.69	0.80	0.60	0.60	0.80	0.40	0.46
CMH(d18:1/24:1)	C48H91NO8	0,92	0.81	0.57	0.83	0.08	1.61	0.67	0.93	0.38	0.52	0.89	0.31	0.14

Resultados

Cholesterol	C27H46O	0,42	0.51	0.19	0.17	0.12	2.27	0.66	0.33	0.95	0.83	0.67	0.29	0.46
ChoE(20:4)	C47H76O2	0,00	0.00	0.00	0.00	0.75	0.65	0.54	1.00	0.21	0.62	1.00	0.21	0.00
ChoE(22:6)	C49H76O2	0,02	0.03	0.02	0.03	0.62	1.18	0.56	0.88	0.42	0.68	0.71	0.30	0.01
PC(16:0/16:0)	C40H80NO8 P	0,84	0.59	0.68	0.42	0.57	1.22	0.56	0.80	0.43	0.50	0.75	0.23	0.41
PC(32:1)		0,18	0.11	0.17	0.11	0.86	1.04	0.52	0.80	0.43	0.50	0.75	0.23	0.10
PC(14:0/18:2)	C40H76NO8 P	0,08	0.04	0.07	0.05	0.61	1.05	0.55	1.00	0.29	0.50	1.00	0.29	0.03
PC(16:0/18:0)	C42H84NO8 P	0,51	0.38	0.42	0.34	0.34	1.22	0.60	0.87	0.43	0.52	0.82	0.30	0.20
PC(16:0/18:1)	C42H82NO8 P	0,15	0.12	0.10	0.07	0.34	1.47	0.60	0.33	0.95	0.83	0.67	0.29	0.23
PC(16:0/18:2)	C42H80NO8 P	0,02	0.01	0.02	0.01	1.00	1.02	0.50	0.67	0.47	0.64	0.50	0.13	0.02
PC(14:0/20:4)	C42H76NO8 P	0,04	0.02	0.05	0.04	0.40	0.97	0.59	0.86	0.43	0.50	0.82	0.29	0.03
PC(18:0/18:1)	C44H86NO8 P	0,11	0.08	0.08	0.06	0.21	1.42	0.63	0.87	0.43	0.52	0.82	0.30	0.04
PC(18:0/18:2)	C44H84NO8 P	0,02	0.01	0.02	0.01	0.97	0.97	0.50	0.93	0.24	0.47	0.83	0.17	0.01
PC(16:0/20:4)	C44H80NO8 P	0,01	0.01	0.01	0.01	0.79	0.95	0.59	0.80	0.52	0.55	0.79	0.32	0.01
PC(18:3/18:3)	C44H76NO8 P	2,29	1.51	2.55	2.61	0.92	0.90	0.51	1.00	0.24	0.48	1.00	0.24	0.90
PC(20:0/18:2)	C46H88NO8 P	0,31	0.14	0.28	0.19	0.69	1.08	0.60	0.80	0.43	0.50	0.75	0.23	0.20
PC(18:0/20:3)	C46H86NO8 P	0,11	0.05	0.13	0.13	0.46	0.83	0.55	0.87	0.38	0.50	0.80	0.25	0.06
PC(38:5)		0,06	0.04	0.06	0.04	0.70	0.94	0.54	0.90	0.27	0.63	0.67	0.17	0.03
PC(38:5)		0,13	0.09	0.14	0.10	0.73	0.97	0.54	0.38	0.87	0.80	0.50	0.25	0.16

Resultados

PC(16:0/22:6)	C46H80NO8 P	0,99	0.52	1.01	0.66	0.92	0.98	0.53	0.73	0.48	0.50	0.71	0.21	0.84
PC(18:0/22:4)	C48H88NO8 P	0,05	0.02	0.06	0.04	0.85	0.90	0.52	0.33	0.93	0.88	0.50	0.27	0.08
PC(40:5)		0,08	0.05	0.10	0.10	0.87	0.82	0.52	1.00	0.24	0.48	1.00	0.24	0.03
PC(18:0/22:6)	C48H84NO8 P	0,53	0.34	0.71	0.73	1.00	0.74	0.50	0.87	0.38	0.50	0.80	0.25	0.29
PC(20:3/20:4)	C48H82NO8 P	0,06	0.05	0.08	0.07	0.45	0.76	0.59	0.63	0.64	0.71	0.54	0.26	0.05
PC(18:1/22:6)	C48H82NO8 P	0,17	0.11	0.22	0.17	0.39	0.76	0.59	0.62	0.67	0.72	0.56	0.29	0.18
PC(40:8)		0,12	0.09	0.13	0.12	0.92	0.91	0.51	0.67	0.53	0.67	0.53	0.20	0.08
PC(34:3)		0,03	0.02	0.03	0.02	0.71	1.07	0.56	0.80	0.43	0.50	0.75	0.23	0.02
PC(36:3)		0,07	0.04	0.09	0.06	0.45	0.85	0.58	0.38	0.87	0.80	0.50	0.25	0.10
PC(31:0)		0,73	0.47	0.64	0.36	0.70	1.15	0.54	0.33	0.95	0.83	0.67	0.29	1.24
PE(16:0/18:1)	C39H76NO8 P	10,58	12.20	4.18	5.20	0.06	2.53	0.69	0.80	0.57	0.57	0.80	0.37	1.82
PE(16:0/18:2)	C39H74NO8 P	0,69	0.52	0.42	0.25	0.18	1.64	0.63	0.40	0.90	0.75	0.68	0.30	0.71
PC(16:0/17:0)		1,28	0.92	0.95	0.60	0.20	1.35	0.58	0.40	0.90	0.75	0.68	0.30	1.71
PC(33:1)		0,11	0.07	0.10	0.06	0.68	1.11	0.54	0.33	0.90	0.71	0.66	0.24	0.17
PC(15:0/18:2)	C41H78NO8 P	0,03	0.02	0.02	0.01	0.28	1.31	0.61	0.27	1.00	1.00	0.65	0.27	0.04
PE(18:1/18:2)	C41H76NO8 P	0,26	0.26	0.14	0.12	0.13	1.86	0.66	0.69	0.68	0.60	0.76	0.38	0.16
PE(16:0/20:4)	C41H74NO8 P	0,97	0.52	0.86	0.66	0.59	1.13	0.58	0.47	0.76	0.58	0.67	0.23	1.07
PE(20:5/16:0)	C41H72NO8 P	0,20	0.11	0.19	0.15	0.77	1.09	0.59	0.78	0.54	0.54	0.78	0.32	0.16
PC(17:0/18:1)		0,07	0.06	0.06	0.04	0.42	1.23	0.55	0.60	0.57	0.50	0.67	0.17	0.05

Resultados

PC(17:0/18:2)		0,03	0.02	0.03	0.02	0.82	0.97	0.52	0.67	0.48	0.48	0.67	0.14	0.02
PC(15:0/20:3)	C43H80NO8 P	0,20	0.17	0.19	0.15	0.91	1.05	0.51	0.71	0.50	0.68	0.54	0.21	0.11
PC(15:0/20:4)	C43H78NO8 P	0,03	0.01	0.02	0.02	0.66	1.13	0.63	0.83	0.53	0.56	0.82	0.36	0.02
PE(18:0/20:4)	C43H78NO8 P	1,01	0.43	1.07	1.01	0.80	0.94	0.55	0.40	0.76	0.55	0.64	0.16	1.22
PE(38:5)		0,93	0.61	0.75	0.49	0.47	1.25	0.57	0.29	0.90	0.67	0.66	0.19	1.44
PE(20:4/18:2)	C43H74NO8 P	0,33	0.25	0.22	0.16	0.23	1.50	0.63	0.85	0.44	0.52	0.80	0.29	0.13
PE(16:0/22:6)	C43H74NO8 P	12,06	8.67	13.06	11.43	1.00	0.92	0.50	0.38	0.73	0.67	0.46	0.11	11.67
PC(19:1/18:2)		0,18	0.09	0.18	0.17	0.31	0.96	0.61	0.83	0.52	0.50	0.85	0.36	0.11
PC(17:0/20:3)		0,15	0.10	0.16	0.15	0.68	0.96	0.54	0.60	0.57	0.50	0.67	0.17	0.11
PC(17:0/20:4)		0,12	0.05	0.13	0.11	0.72	0.92	0.54	0.79	0.48	0.50	0.77	0.26	0.09
PC(17:0/20:4)		0,03	0.01	0.04	0.03	0.97	0.81	0.51	0.21	1.00	1.00	0.46	0.21	0.08
PE(18:0/22:6)	C45H78NO8 P	7,64	5.49	8.02	7.53	0.75	0.95	0.53	0.93	0.24	0.47	0.83	0.17	3.36
PC(15:0/22:6)	C45H78NO8 P	0,87	0.45	0.96	0.77	0.66	0.91	0.51	0.52	0.67	0.69	0.50	0.19	0.92
PI(18:0/20:3)	C47H85O13 P	0,13	0.16	0.08	0.08	0.77	1.57	0.56	0.40	0.80	0.50	0.73	0.20	0.12
PI(18:0/20:4)	C47H83O13 P	0,06	0.07	0.03	0.04	0.30	1.72	0.62	0.75	0.56	0.56	0.75	0.31	0.02
PI(16:0/20:4)	C45H79O13 P	0,61	0.54	0.31	0.25	0.11	2.00	0.67	0.46	0.89	0.75	0.70	0.35	0.57
PI(18:0/22:6)	C49H83O13 P	0,69	0.61	0.74	1.06	0.33	0.94	0.60	0.92	0.50	0.55	0.91	0.42	0.19
DG(34:2)		0,11	0.10	0.08	0.05	0.97	1.33	0.50	0.33	0.90	0.71	0.66	0.24	0.14
DG(36:4)		0,56	0.41	0.47	0.42	0.53	1.19	0.60	0.87	0.43	0.52	0.82	0.30	0.23

Resultados

PC(O-16:0/14:0)		0,21	0.15	0.22	0.19	0.70	0.95	0.54	0.77	0.45	0.48	0.75	0.22	0.12
PC(16:1e/14:0)		0,32	0.34	0.22	0.15	0.52	1.48	0.58	0.82	0.39	0.45	0.78	0.21	0.13
PC(O-16:0/16:0)		0,11	0.07	0.13	0.10	1.00	0.89	0.50	0.93	0.24	0.47	0.83	0.17	0.05
PC(16:1e/16:0)		0,21	0.18	0.16	0.13	0.36	1.34	0.59	0.80	0.52	0.55	0.79	0.32	0.09
PC(34:0e)		0,20	0.13	0.18	0.13	0.51	1.12	0.57	0.36	0.89	0.71	0.65	0.25	0.33
PC(34:1e)		0,23	0.12	0.24	0.21	0.81	0.94	0.56	0.80	0.48	0.52	0.77	0.28	0.11
PC(O-16:0/18:2)	C42H82NO7 P	0,04	0.02	0.07	0.07	0.70	0.57	0.54	0.38	0.93	0.89	0.52	0.31	0.07
PC(16:1e/18:1)		0,13	0.09	0.12	0.09	0.78	1.07	0.53	0.67	0.52	0.50	0.69	0.19	0.07
PC(18:1e/18:1)		0,03	0.03	0.06	0.07	0.24	0.55	0.62	0.40	0.87	0.80	0.52	0.27	0.06
PC(16:1e/20:3)		0,24	0.17	0.16	0.15	0.15	1.50	0.67	0.71	0.62	0.56	0.76	0.33	0.14
PC(O-16:0/22:4)		0,12	0.05	0.17	0.12	0.14	0.72	0.60	0.40	0.86	0.80	0.50	0.26	0.18
PC(16:1e/22:6)		8,35	2.90	12.39	11.46	0.14	0.67	0.55	0.33	1.00	1.00	0.52	0.33	13.65
PC(18:1e/22:4)		0,33	0.08	0.47	0.39	0.14	0.70	0.51	0.35	1.00	1.00	0.48	0.35	0.54
PC(40:5e)		0,01	0.00	0.01	0.01	0.04	0.52	0.64	0.63	0.88	0.92	0.50	0.51	0.01
PC(22:1e/20:4)		0,08	0.07	0.04	0.05	0.06	1.84	0.70	0.86	0.61	0.63	0.85	0.47	0.02
PC(O-22:0/20:4)	C50H94NO7 P	0,31	0.26	0.13	0.16	0.01	2.33	0.77	1.00	0.53	0.62	1.00	0.53	0.03
PE(O-16:0/18:1)		14,07	13.07	8.96	10.97	0.19	1.57	0.63	0.73	0.55	0.55	0.73	0.28	3.72
PE(P-16:0/18:2)		1,15	1.08	0.53	0.54	0.05	2.18	0.70	0.79	0.55	0.55	0.79	0.34	0.31
PE(18:1e/18:1)		12,42	12.95	5.49	6.05	0.07	2.26	0.68	0.40	0.95	0.86	0.68	0.35	16.18
PE(16:1e/20:4)		2,62	2.76	1.16	1.13	0.08	2.27	0.67	0.87	0.48	0.54	0.83	0.34	0.61
PE(18:1e/20:4)		0,96	0.99	0.42	0.40	0.12	2.30	0.66	0.80	0.55	0.57	0.79	0.35	0.25
PE(16:1e/22:6)		23,00	11.65	26.29	21.81	0.43	0.88	0.52	0.93	0.29	0.48	0.86	0.22	11.07
SM(d18:0/14:0)	C37H77N2O	0,49	0.37	0.36	0.34	0.18	1.35	0.63	0.67	0.67	0.59	0.74	0.33	0.30

Resultados

	6P													
SM(d18:0/15:0)		1,14	1.17	0.71	0.71	0.37	1.60	0.59	0.33	0.89	0.71	0.63	0.23	1.22
SM(d18:0/16:0)	C39H82N2O 6P	0,71	0.63	0.49	0.51	0.18	1.45	0.63	0.67	0.67	0.59	0.74	0.33	0.40
SM(d18:0/18:0)	C41H85N2O 6P	0,64	0.64	0.37	0.37	0.21	1.73	0.63	0.33	1.00	1.00	0.68	0.33	1.17
SM(d18:0/22:0)	C45H93N2O 6P	1,20	1.40	0.69	0.96	0.11	1.74	0.66	0.73	0.60	0.58	0.75	0.33	0.33
SM(d18:1/12:0)	C35H71N2O 6P	0,56	0.42	0.40	0.31	0.24	1.41	0.62	0.47	0.81	0.64	0.68	0.28	0.51
SM(32:1)		0,34	0.30	0.22	0.20	0.10	1.56	0.67	0.80	0.62	0.60	0.81	0.42	0.15
SM(33:1)		0,22	0.16	0.17	0.13	0.39	1.30	0.59	0.33	0.90	0.71	0.66	0.24	0.36
SM(d18:1/16:0)	C39H80N2O 6P	1,04	0.91	0.58	0.54	0.08	1.80	0.67	0.33	1.00	1.00	0.68	0.33	1.73
SM(d18:2/16:0)		0,22	0.18	0.15	0.11	0.63	1.42	0.55	0.47	0.90	0.78	0.70	0.37	0.26
SM(d18:1/17:0)		0,34	0.26	0.24	0.21	0.24	1.41	0.62	0.80	0.48	0.52	0.77	0.28	0.17
SM(d18:1/18:0)	C41H84N2O 6P	0,69	0.63	0.39	0.36	0.18	1.79	0.63	0.33	0.95	0.83	0.67	0.29	1.32
SM(36:2)		0,17	0.14	0.12	0.07	0.57	1.45	0.56	0.40	0.90	0.75	0.68	0.30	0.24
SM(38:1)		1,74	1.63	0.77	0.99	0.04	2.27	0.70	0.73	0.67	0.61	0.78	0.40	0.70
SM(d18:2/20:0)		0,27	0.24	0.20	0.20	0.80	1.37	0.53	0.47	0.86	0.70	0.69	0.32	0.37
SM(39:1)		0,14	0.13	0.07	0.08	0.12	2.07	0.65	0.87	0.52	0.57	0.85	0.39	0.03
SM(d18:1/22:0)	C45H91N2O 6P	0,95	0.90	0.39	0.51	0.03	2.42	0.72	0.73	0.67	0.61	0.78	0.40	0.40
SM(d16:1/24:1)	C45H90N2O 6P	0,10	0.08	0.06	0.05	0.15	1.69	0.64	0.40	0.90	0.75	0.68	0.30	0.12
SM(d18:1/23:0)	C46H93N2O 6P	0,17	0.16	0.08	0.09	0.06	2.17	0.69	0.87	0.52	0.57	0.85	0.39	0.04
SM(d18:1/23:1)		0,09	0.06	0.06	0.05	0.11	1.50	0.64	0.53	0.76	0.62	0.70	0.30	0.07

Resultados

SM(d18:1/24:1) + SM(d18:2/24:0)		0,37	0.25	0.24	0.21	0.13	1.50	0.65	0.60	0.71	0.60	0.71	0.31	0.28
SM(42:3)		0,11	0.06	0.09	0.06	0.24	1.29	0.62	0.47	0.81	0.64	0.68	0.28	0.11
SM(d18:2/14:0)		0,14	0.11	0.09	0.07	0.31	1.61	0.60	0.40	0.95	0.86	0.69	0.35	0.21
SM(42:1)		1,45	1.34	0.59	0.76	0.04	2.45	0.72	0.73	0.76	0.69	0.80	0.50	0.63
SM(d18:1/25:0)		0,28	0.23	0.12	0.13	0.04	2.30	0.74	0.86	0.60	0.60	0.86	0.46	0.08
SM(43:2)		0,20	0.10	0.15	0.11	0.25	1.29	0.64	0.53	0.81	0.67	0.71	0.34	0.22
SM(38:0)		1,85	1.98	1.16	1.60	0.24	1.59	0.62	0.67	0.60	0.56	0.71	0.27	0.81
SM(31:1)		0,34	0.28	0.19	0.15	0.07	1.82	0.68	0.50	0.81	0.64	0.71	0.31	0.28
TG(50:4)		0,01	0.00	0.02	0.04	0.46	0.30	0.59	0.44	0.80	0.80	0.44	0.24	0.01
TG(52:5)		0,01	0.01	0.02	0.02	0.55	0.63	0.56	0.79	0.45	0.50	0.75	0.24	0.01
TG(56:5)		0,04	0.03	0.12	0.19	0.65	0.32	0.55	0.42	0.86	0.80	0.52	0.28	0.05
TG(56:7)		0,79	0.77	2.50	4.10	0.36	0.32	0.59	0.48	0.80	0.77	0.52	0.28	0.93
TG(56:8)		1,50	1.06	3.59	6.79	0.97	0.42	0.50	0.93	0.29	0.48	0.86	0.22	0.69
TG(58:6)		0,14	0.10	0.46	0.70	0.06	0.29	0.56	0.32	1.00	1.00	0.48	0.32	0.43
TG(58:8)		0,43	0.47	1.37	2.26	0.28	0.31	0.61	0.25	1.00	1.00	0.50	0.25	1.83
TG(58:9)		0,48	0.53	1.06	1.83	0.92	0.45	0.51	0.33	0.87	0.78	0.48	0.20	0.68
TG(58:10)		0,20	0.20	0.71	1.44	0.58	0.29	0.57	0.33	0.91	0.86	0.45	0.24	0.42
AC(8:0)	C15H29NO4	0,26	0.30	0.14	0.16	0.35	1.88	0.61	0.31	0.94	0.80	0.63	0.25	0.49
AC(12:0)	C19H37NO4	0,16	0.15	0.14	0.16	0.65	1.11	0.55	0.85	0.39	0.50	0.78	0.24	0.06
AC(14:1)		0,37	0.42	0.33	0.34	0.73	1.11	0.54	0.53	0.65	0.53	0.65	0.18	0.26
24:1n-9	C24H46O2	0,35	0.48	0.15	0.11	0.38	2.28	0.59	0.60	0.65	0.56	0.68	0.25	0.14
14:2		1,02	1.26	0.49	0.61	0.25	2.08	0.62	0.73	0.52	0.52	0.73	0.26	0.27
11-HETE	C20H32O3	0,01	0.02	0.01	0.01	0.17	2.08	0.64	0.53	0.76	0.62	0.70	0.30	0.01
9-HETE	C20H32O3	0,01	0.01	0.00	0.01	0.21	1.85	0.63	0.93	0.32	0.52	0.86	0.25	0.00
PC(0:0/20:0)	C28H58NO7	0,07	0.06	0.03	0.04	0.04	2.29	0.71	0.93	0.45	0.54	0.90	0.38	0.01

Resultados

	P													
LPC(19:1)		0,05	0.04	0.02	0.02	0.14	1.90	0.66	0.50	0.81	0.60	0.74	0.31	0.04
LPC(22:1)		0,12	0.12	0.06	0.06	0.07	2.10	0.71	0.64	0.83	0.70	0.79	0.47	0.08
PE(0:0/22:4)	C27H48NO7 P	0,35	0.38	0.21	0.20	0.23	1.71	0.62	0.47	0.81	0.64	0.68	0.28	0.26
LPI(16:0)		0,66	0.57	0.44	0.52	0.15	1.50	0.64	0.87	0.43	0.52	0.82	0.30	0.20
LPI(16:0)		0,30	0.29	0.18	0.17	0.12	1.67	0.65	0.87	0.48	0.54	0.83	0.34	0.10
LPI(18:0)		0,21	0.21	0.09	0.08	0.07	2.25	0.68	0.47	0.86	0.70	0.69	0.32	0.17
LPI(18:0)		0,15	0.16	0.07	0.07	0.09	2.14	0.67	0.47	0.90	0.78	0.70	0.37	0.14
LPI(18:1)		0,23	0.23	0.12	0.13	0.09	1.84	0.67	0.73	0.57	0.55	0.75	0.30	0.08
LPI(18:2)		0,07	0.08	0.06	0.08	0.61	1.20	0.55	0.67	0.62	0.56	0.72	0.29	0.03
LPI(20:4)		0,07	0.08	0.06	0.08	0.63	1.18	0.55	0.73	0.52	0.52	0.73	0.26	0.02
LPI(20:4)		0,06	0.06	0.05	0.06	0.41	1.19	0.58	0.93	0.24	0.47	0.83	0.17	0.01
LPI(22:6)		0,41	0.41	0.48	0.47	0.97	0.85	0.50	1.00	0.24	0.48	1.00	0.24	0.10
PE(O-16:0/0:0)		3,68	2.74	2.74	1.97	0.37	1.34	0.59	1.00	0.24	0.48	1.00	0.24	0.88
PE(16:2e/0:0)		2,02	2.18	0.91	0.86	0.06	2.22	0.69	0.47	0.90	0.78	0.70	0.37	1.85
PE(P-18:2/0:0)		0,32	0.35	0.16	0.12	0.12	2.09	0.65	0.53	0.81	0.67	0.71	0.34	0.28
PE(20:1e/0:0)		0,26	0.24	0.11	0.12	0.06	2.25	0.69	0.80	0.60	0.60	0.80	0.40	0.06
PE(20:2e/0:0)		0,81	0.91	0.36	0.43	0.08	2.28	0.68	0.53	0.85	0.73	0.71	0.38	0.72
PE(20:3e/0:0)		0,57	0.58	0.31	0.27	0.20	1.82	0.63	0.60	0.76	0.64	0.73	0.36	0.42

Tabla 13: Comparación lipídica entre muestras del grupo E y NE. Los valores de p reflejan los valores obtenidos en los test de la t para muestras de distribución normal o pruebas de Wilcoxon para muestras no distribuidas normalmente. Las diferencias estadísticamente significativas están marcadas en negrita. Sens = sensibilidad; Espec = especificidad; PPV: valores predictivos para los positivos; NPV: valores predictivos para negativos. Cer Ceramidas; CMH Monohexosilceramidas; ChoE ésteres de colesterol, PC fosfatidilcolinas, PE fosfatidiletanolaminas; PI fosfatidilinositales; SM Esfingomielinas; TG Triacilglicerol; LPC lisofosfatidilcolinas; LPE lisofosfatidiletanolaminas; AC Acil carnitinas; LPI lisofosfatidilinositales

Resultados

			Grupo NE		Grupo E				Análisis de curvas ROC						
CLASE LÍPIDO	SUBCLASE	FORMA ABREV	Media	DE	Media	DE	p valor	Tasa de cambio	Área bajo la curva	Sens.	Spec	PPV	NPV	IY	Punto de corte
Acylcarnitines	Acylcarnitines	AC	0.73	0.68	0.57	0.54	0.36	1.28	0.59	0.60	0.70	0.60	0.70	0.30	0.50
Non-esterified fatty acids	Monounsaturated fatty acids	MUFA	0.35	0.48	0.15	0.11	0.38	2.28	0.59	0.60	0.65	0.56	0.68	0.25	0.14
Non-esterified fatty acids	Polyunsaturated fatty acids	PUFA	1.02	1.26	0.49	0.61	0.25	2.08	0.62	0.73	0.52	0.52	0.73	0.26	0.27
Non-esterified fatty acids	Unsaturated fatty acids..	UFA	1.36	1.54	0.63	0.68	0.24	2.15	0.62	0.33	0.95	0.83	0.67	0.29	1.27
Non-esterified fatty acids	Non-esterified fatty acids	NEFA_total	1.36	1.54	0.63	0.68	0.24	2.15	0.62	0.33	0.95	0.83	0.67	0.29	1.27
Non-esterified fatty acids	NEFA omega 9	NEFA_omega_9	0.35	0.48	0.15	0.11	0.38	2.28	0.59	0.60	0.65	0.56	0.68	0.25	0.14
Oxidized fatty acids	Arachidonic acid-derived oxidized fatty acids	AAoxFA	0.02	0.02	0.01	0.01	0.15	2.07	0.64	0.53	0.76	0.62	0.70	0.30	0.01

Resultados

Glycerolipids	Diacylglycerols	DAG	0.67	0.46	0.55	0.44	0.36	1.21	0.59	0.67	0.57	0.53	0.71	0.24	0.43	
Glycerolipids	Triacylglycerols	TAG	3.50	2.93	9.64	16.6 6	0.68	0.36	0.54	0.19	1.00	1.00	0.47	0.19	14.84	
Glycerophospholipids	2-Monoacylglycerophosphocholine	2-MAPC	0.07	0.06	0.03	0.04	0.04	0.04	2.29	0.71	0.93	0.45	0.54	0.90	0.38	0.01
Glycerophospholipids	Lysophosphatidylcholines	LPC	0.15	0.16	0.07	0.08	0.12	2.13	0.67	0.50	0.86	0.67	0.75	0.36	0.13	
Glycerophospholipids	Diacylglycerophosphocholine	DAPC	10.73	4.99	10.70	7.23	0.66	1.00	0.55	0.40	0.81	0.60	0.65	0.21	14.65	
Glycerophospholipids	1-ether, 2-acylglycerophosphocholine	MEMAPC	10.64	3.32	14.64	12.5 4	0.82	0.73	0.52	0.29	1.00	1.00	0.50	0.29	16.75	
Glycerophospholipids	Phosphatidylcholines	PC	21.38	7.77	25.33	19.6 1	0.90	0.84	0.51	1.00	0.24	0.48	1.00	0.24	10.13	
Glycerophospholipids	2-Monoacylglycerophosphoethanolamine	2-MAPE	0.35	0.38	0.21	0.20	0.23	1.71	0.62	0.47	0.81	0.64	0.68	0.28	0.26	
Glycerophospholipids	1-Monoetherglycerophosphoethanolamine	1-EPE	7.66	6.22	4.57	3.27	0.08	1.68	0.67	0.93	0.38	0.52	0.89	0.31	2.32	

Resultados

Glycerophospholipids	Lysophosphatidyl ethanolamines	LPE	0.35	0.38	0.21	0.20	0.23	1.71	0.62	0.47	0.81	0.64	0.68	0.28	0.26
Glycerophospholipids	Diacylglycerophospho ethanolamine	DAPE	34.45	20.67	28.78	21.61	0.39	1.20	0.59	0.47	0.81	0.64	0.68	0.28	39.20
Glycerophospholipids	1-ether, 2-acylglycerophospho ethanolamine	MEMAPE	54.14	34.14	42.11	29.80	0.28	1.29	0.61	0.40	0.90	0.75	0.68	0.30	68.32
Glycerophospholipids	Phosphatidyl ethanolamines	PE	88.59	53.32	70.89	48.04	0.31	1.25	0.60	0.47	0.86	0.70	0.69	0.32	102.87
Glycerophospholipids	Diacylglycerophosphoinositol	DAPI	1.22	1.27	1.08	1.21	0.73	1.13	0.54	0.27	0.90	0.67	0.62	0.17	2.03
Glycerophospholipids	Lysophosphatidyl inositols	LPI	2.15	1.97	1.55	1.42	0.37	1.38	0.59	0.40	0.86	0.67	0.67	0.26	2.26
Sphingolipids	Ceramides	Cer	34.43	29.73	18.70	20.55	0.12	1.84	0.65	0.40	0.95	0.86	0.69	0.35	50.32
Sphingolipids	Monohexosylceramides	CMH_total	22.58	24.29	12.51	17.29	0.11	1.81	0.66	0.87	0.48	0.54	0.83	0.34	4.21
Sphingolipids	Sphingomyelins	SM	15.56	13.46	8.74	8.53	0.14	1.78	0.65	0.87	0.43	0.52	0.82	0.30	3.74

Resultados

Sterols	Cholesteryl Esters	ChoE	0.02	0.03	0.02	0.03	0.46	1.03	0.58	0.83	0.43	0.65	0.67	0.26	0.01
Sphingolipids	Cer+SM+CHM+FSB	SL	72.57	63.82	39.94	45.62	0.10	1.82	0.66	0.40	0.95	0.86	0.69	0.35	103.46
Glycerophospholipids + Diacylglycerols	PC+PE+LPC+LPE+PI+LPI+PS+PG+LPG(+DAG)	Membrane.Lipids	187.47	119.7	139.8	95.08	0.29	1.34	0.61	0.47	0.76	0.58	0.67	0.23	209.40
Triacylglycerols + Cholesteryl Esters	TAG+ChoE	Storage.Lipids	3.52	2.95	9.65	16.66	0.68	0.36	0.54	0.19	1.00	1.00	0.47	0.19	14.87
All the lipids	PC+PE+LPC+LPE+PI+LPI+PS+PG+LPG+DAG+TAG+NEFA+SL	Lipids	0.73	0.68	0.57	0.54	0.36	1.28	0.59	0.60	0.70	0.60	0.70	0.30	0.50
Mitochondrial glycerolipids	PG+CL+PS+PE	Mitochondrial.glycerolipids	88.59	53.32	70.89	48.04	0.31	1.25	0.60	0.47	0.86	0.70	0.69	0.32	102.87
Glycerophospholipids	PE PEMT	PC_PEMT	10.36	3.62	14.76	13.17	0.73	0.70	0.54	0.29	1.00	1.00	0.50	0.29	17.39
Glycerophospholipids	PC PEMT	PE_PEMT	73.25	42.14	61.31	43.78	0.34	1.19	0.60	0.47	0.81	0.64	0.68	0.28	82.83
Glycerophospholipids	PC including docohexanoic acid (DHA)	PC.DHA	11.03	3.96	15.43	13.70	0.80	0.71	0.53	0.24	1.00	1.00	0.48	0.24	19.01

Resultados

Non-esterified fatty acids		SM_DAG	16.23	13.82	9.29	8.78	0.14	1.75	0.65	0.33	0.95	0.83	0.67	0.29	28.48
Ceramides and PC		Cer_PC	55.80	34.00	44.03	29.78	0.27	1.27	0.61	0.40	0.86	0.67	0.67	0.26	75.41
Glycerophospholipids	PC including anaquidonic acid	PC_20.4	0.79	0.38	0.65	0.44	0.20	1.21	0.63	0.87	0.43	0.52	0.82	0.30	0.44
Glycerophospholipids	PE including anaquidonic acid	PE_20.4	6.72	5.17	4.41	3.13	0.31	1.52	0.60	0.33	0.95	0.83	0.67	0.29	11.14
ChoE and LPC		ChoE_LPC	0.22	0.21	0.12	0.13	0.08	1.88	0.68	0.50	0.86	0.70	0.72	0.36	0.18
Cho01 and PC		ChoI_PC	21.80	7.95	25.52	19.60	0.82	0.85	0.52	0.67	0.57	0.53	0.71	0.24	20.53

Tabla 14: Clasificación de lípidos entre las muestras de E y NE. Los valores de p reflejan los valores obtenidos en los ensayos t para muestras de distribución normal o pruebas de Wilcoxon para muestras no distribuidas normalmente. Las comparaciones estadísticamente significativas están marcadas en negrita. IY = Índice de Youden, Sens. = Sensibilidad; Especificidad = especificidad; PPV: valores predictivos para los positivos; NPV: valores predictivos para negativos.

1.3.4. Análisis de curvas ROC

Cuando se evaluó el poder predictivo de los lípidos individuales y de las clases de lípidos, varias moléculas mostraron prometedoras habilidades predictivas (tablas 13 y 14). Particularmente, la capacidad predictiva de pronosticar el embarazo fue mejor para las ceramidas, con un AUC de aproximadamente 0,70, con una sensibilidad de casi 90% para Cer (d18: 1/22: 0) y Cer (d18: 1/23: 0) y especificidad de 0,95 para Cer (d18: 1/24: 0) (figura 26). El valor predictivo positivo para esta última es elevado, 0.86, por lo tanto es una forma de resumir el rendimiento de una prueba diagnóstica. Un patrón similar se encontró para los lípidos individuales PC(O-22:0/20:4) y PE(P-16:0/18:2), SM(38:1), SM(d18:1/22:0), SM(42:1) y SM(d18:1/25:0); y la clase lipídica monoacilglicerofosfolina (figura 27).

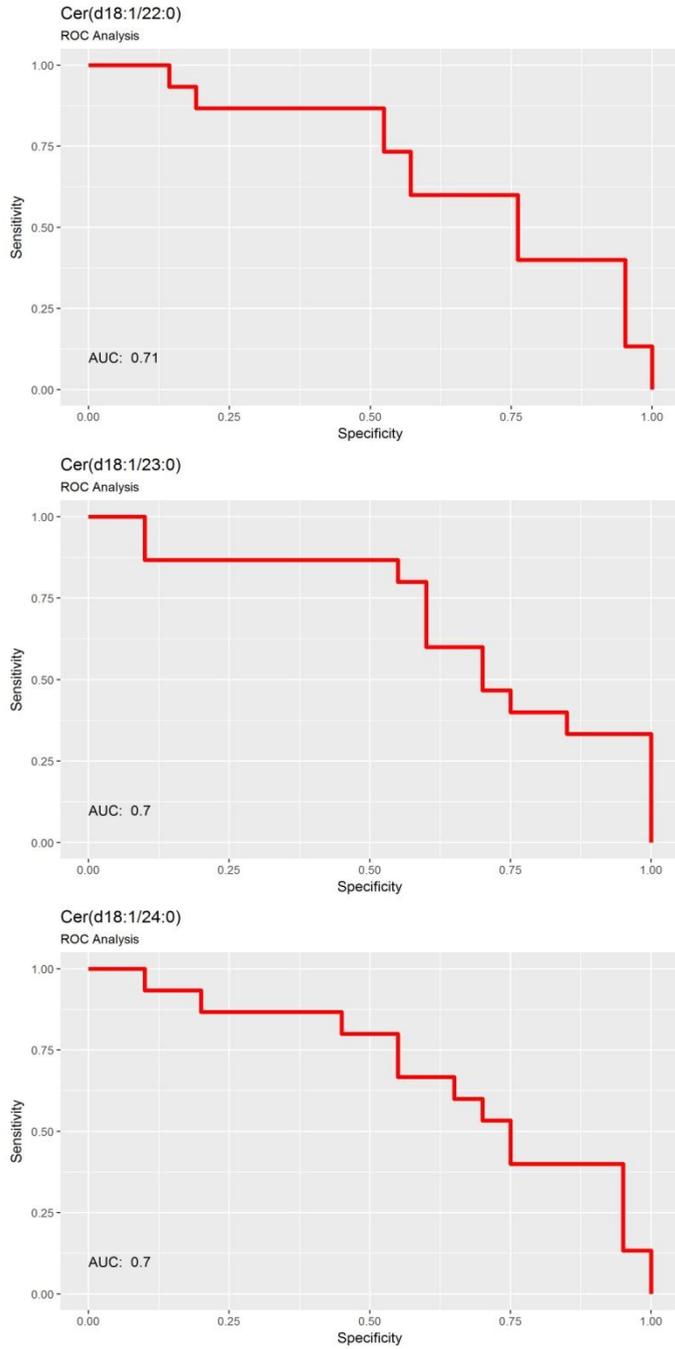
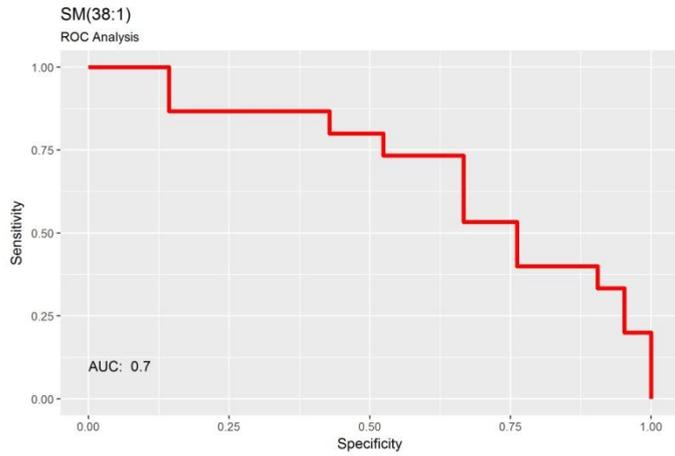
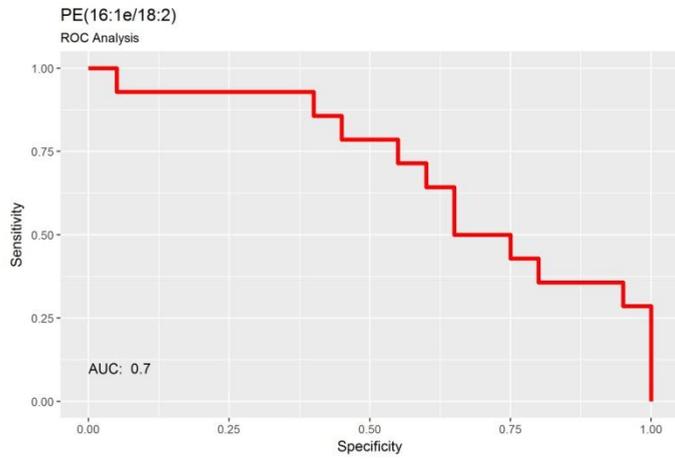
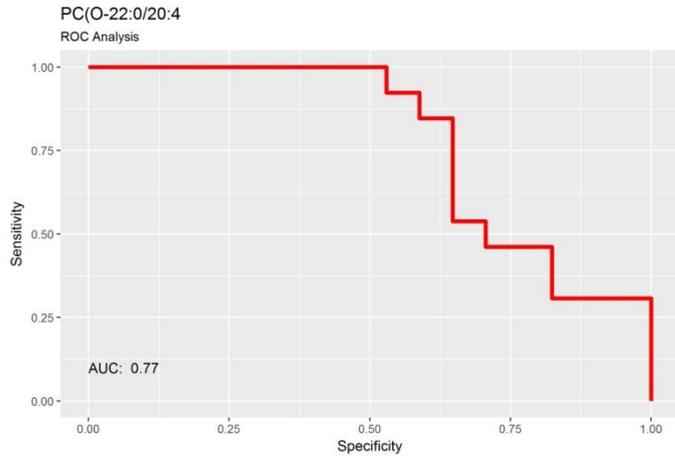
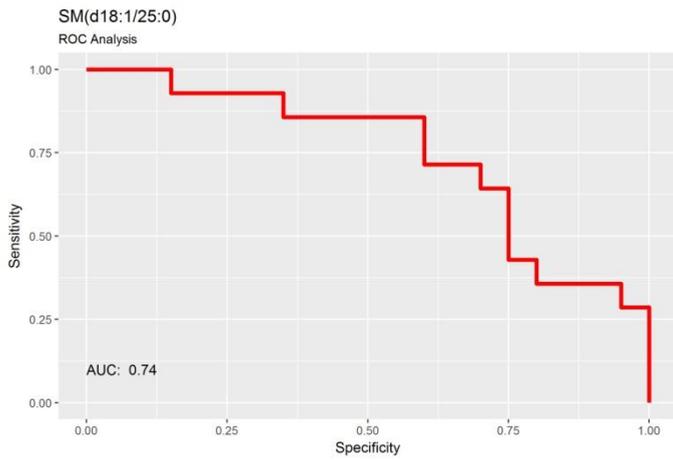
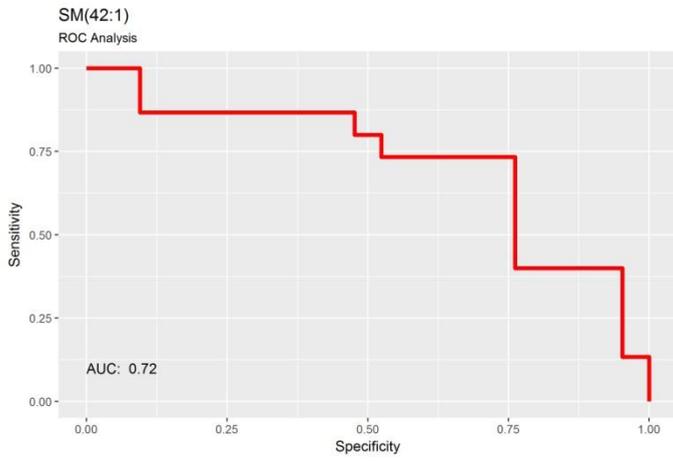
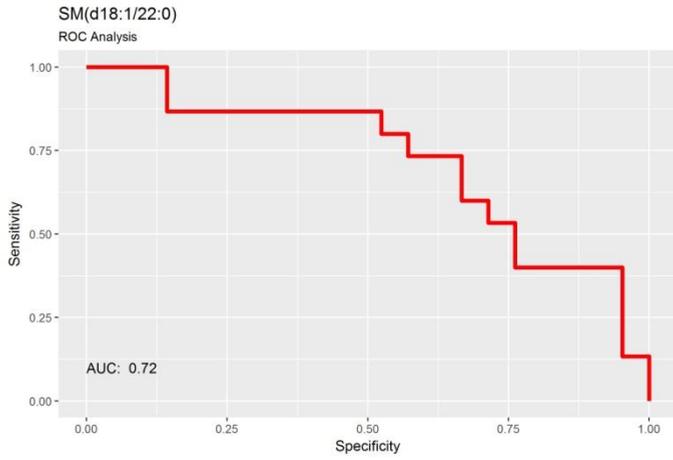


Figura 26: Curvas ROC ceramidas (Cer).





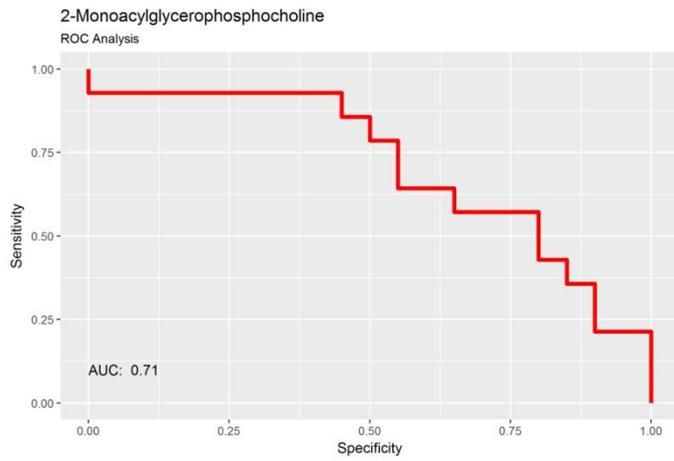


Figura 27: Curvas ROC: PC (fosfatidilcolina), PE (fosfatidiletanolamina) y SM (esfingomielina).

2. Proteómica

2.1. Caracterización del proteoma de los espermatozoides: Elaboración de una librería de proteínas presentes en los espermatozoides

2.1.1. Caracterización de las muestras

Tal y como se ha comentado en el apartado 6.2.1. de material y métodos, para este estudio se reclutaron 4 muestras con un TMP en fresco > 20 millones. Con el fin de realizar una buena librería, las 4 muestras elegidas procedían de dos donantes y dos pacientes. Las características de las muestras se presentan en la tabla 15.

	Edad (años)	Concentración (millones/mL)	TOT spz	PROG (%)	TMP (millones)
Donante 1	29	38	19	83	83
Donante 2	29	67	33,5	74	74
Paciente 1	46	38	19	58	58
Paciente 2	28	102	51	48	48

Tabla 15: Características de las muestras utilizadas para generar la librería. TOT spz: millones de espermatozoides en la muestra analizada tras capacitar mediante SU; PROG: porcentaje de espermatozoides que presentan movilidad progresiva; TMP: total de espermatozoides móviles progresivos en la muestra capacitada.

2.1.2. Análisis de la librería de proteínas mediante la técnica LC-MS/MS

Un total de 2946 proteínas se identificaron con un FDR del 1% con restricción de taxonomía (*Homo sapiens*). La lista completa de las 2946 proteínas con su código de acceso, nombre de la proteína, especie, péptidos de cada

proteína (95%), nombre del gen, fiabilidad de la identificación y el % de la cobertura de secuencia (% Cov) se encuentra en el anexo 1.

La librería (datos proteómicos obtenidos con LC-MS/MS) se depositó en el Consorcio ProteomeXchange a través del repositorio de socios PRIDE (Vizcaino et al. 2016) con el identificador del conjunto de datos PXZD006309.

2.2. Comparación del perfil proteico entre muestras de semen que consiguieron embarazo mediante ICSI y las que no

2.2.1. Demográficos

Como se muestra en la tabla 16, ambos grupos de estudio (E y NE) son comparables, ya que el único parámetro en el que se encuentran diferencias estadísticamente significativas, es en la edad de la mujer. Esta diferencia tiene sentido si tenemos en cuenta que al ser la n muy pequeña, hay pocos datos sobre la edad de las pacientes y todas presentan más o menos la misma edad (entorno a los 40-42 años) por lo que los datos están muy cerca unos de otros, con lo cual la mínima diferencia entre los grupos va a salir significativa y más si tenemos en cuenta que la desviación típica es muy pequeña. La diferencia de estos datos con una n mayor sería comparable y no significativa.

CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES			
	GESTACIÓN SI (E)	GESTACIÓN NO (NE)	p valor
N	4	4	
EDAD MUJER	40,2±0,5	43,5±1	0,0228*
IMC	22,7±3,17	23,9±1,86	0,6857
OVOCITOS MADUROS (MII)	11 ± 3,16	11,5 ± 0,577	0,8817
TASA DE FECUNDACIÓN	82,9±20,7	70±19,5	0,3094
Nº EMBRIONES TRANSFERIDOS	1,75±0,5	1,5±0,577	0,6084
CARACTERÍSTICAS DEL SEMEN			p valor
EDAD VARÓN	37,2±3,77	40,2±1,5	0,2425
VOLUMEN	3,38±1,25	2,25±0,957	0,2338
CONCENTRACIÓN	59,8±28,1	60±25,6	1
ESPERMATOZOIDES PROGRESIVOS	48±5,23	36±9,27	0,1441
ESPERMATOZOIDES NO PROGRESIVOS	8,25±4,11	11,5±9,68	0,8857
ESPERMATOZOIDES INMÓVILES	43,8±7,59	52,5±11,7	0,3429
TOTAL ESPERMATOZOIDES	195±104	146±83,2	0,8857
TOTAL DE ESPERMATOZOIDES PROGRESIVOS	96,8±60	54,3±32	0,4857
MORFOLOGÍA NORMAL	4,5±2,08	4,25±1,26	0,8824
ALTERACIONES DE CABEZA	94±2,71	95±2,16	0,5516
ALTERACIONES PIEZA MEDIA	32,5±18,3	31±11,7	0,7715
ALTERACIONES DE COLA	21,5±15,7	31±11,7	0,4678
Prueba estadística Mann-Whitney no paramétrica para muestras independientes			
*p valor < 0,05. Significancia estadística			

Tabla 16: Características de los pacientes participantes en el estudio.

2.2.2. Análisis de las muestra mediante la metodología SWATH LC-MS/MS

En las 8 muestras analizadas (4 muestras por grupo (E y NE)), se cuantificaron 2228 proteínas (anexo 2). Todas las proteínas se encuentran incluidas dentro de la librería previa (anexo 1).

2.2.3. Análisis estadístico

Como se ha comentado anteriormente, se determinó la significancia estadística (p valor) y la tasa de cambio de las proteínas identificadas con el fin de seleccionar aquellas que se encontraban en cantidades diferentes en un grupo frente al otro de manera significativa, y ver en qué grupo se encontraban las proteínas en mayor cantidad, analizando el grupo E frente al NE. En este caso se consideró que presentaba significancia estadística cuando el valor de p era $<0,05$.

Como podemos ver en la tabla 17, de las 2228 proteínas identificadas, 53 de ellas presentaban un p valor $<0,05$. Aquellas sombreadas en azul, presentaban una función conocida y relacionada con la reproducción y espermatogénesis.

UniprotKB / Código acceso	Nombre corto de la proteína	Nombre proteína	p-valor	Tasa cambio (E/NE)
Q5VU69	CA189	Proteína no caracterizada C1orf189	0,01288	6,17
P11279	LAMP1	Glicoproteína 1 de membrana asociada a los lisosomas	0,02179	5,40
P55209	NP1L1	Proteína de ensamblaje de nucleosomas 1-like-1	0,00519	4,82
P48723	HSP13	Proteína de 70 kDa de choque térmico 13	0,00824	4,60
A8MZ97	CB074	Proteína no caracterizada C2orf74	0,02588	4,54
P62269	RS18	40S Proteína ribosomal S18	0,02583	3,72
P15735	PHKG2	Cadena catalítica gamma fosforilasa b quinasa, isoforma hepática/testículo	0,00286	3,38
Q6UWQ5	LYZL1	Proteína similar a lisozima 1	0,02068	3,06
P13637	P13637	Subunidad alfa-3 ATPasa transportadora de sodio / potasio	0,01091	3,02

Resultados

UniprotKB /Código acceso	Nombre corto de la proteína	Nombre proteína	p-valor	Tasa cambio (E/NE)
Q9BZW7	TSG10	Proteína del gen 10 específico del testículo	0,04356	2,93
Q9BVG9	PTSS2	Fosfatidilserina sintasa 2	0,00379	2,83
Q9UI46	DNAI1	Dineína cadena intermedia 1, axonema	0,01434	2,46
Q6DD88	ATLA3	Atlastina-3	0,02109	2,33
Q8TB22	SPT20	Proteína asociada a la espermatogénesis 20	0,02282	2,20
Q86UT6	NLRX1	NLR miembro de la familia X1	0,03517	2,18
Q495T6	MMEL1	Metallo-endopeptidasa de tipo membrana 1	0,03617	2,18
P15259	PGAM2	Fosfoglicerato mutasa 2	0,04511	2,16
Q8IUAO	WFDC8	WAP proteína del dominio central de cuatro disulfuros 8	0,04663	2,12
A1L0T0	ILVBL	Proteína del tipo acetato sintasa	0,01206	2,11
Q16222	UAP1	UDP - N - acetilhexosamina pirofosforilasa	0,02165	2,10
Q96FJ2	DYL2	Cadena ligera de dineína 2, citoplasmática	0,04869	2,10
Q9NQE9	HINT3	La proteína 3 de unión a nucleótidos de la tríada de histidina	0,02596	2,08
P26436	ASPX	Proteína acrosomal SP-10	0,02453	2,03
Q5T2S8	ARMC4	Proteína 4 que contiene repetición armadillo	0,03073	1,97
P08236	BGLR	Beta-glucuronidasa	0,04587	1,92
O95573	ACSL3	Ácido graso de cadena larga - CoA ligasa 3	0,01421	1,80
Q8NE09	RGS22	Regulador de la señalización de la proteína G 22	0,00511	1,78
Q9H1E5	TMX4	Proteína transmembrana relacionada con la tiorredoxina 4	0,02438	1,77
Q8IZ96	CKLF1	La proteína que contiene el dominio transmembrana MARVEL de tipo CKLF 8	0,03324	1,74

Resultados

UniprotKB /Código acceso	Nombre corto de la proteína	Nombre proteína	p-valor	Tasa cambio (E/NE)
Q96M32	KAD7	Adenilato quinasa 7	0,04894	1,71
Q9BXA6	TSSK6	Serina/treonina-proteín quinasa 6 específica para el testículo	0,01107	1,66
P40939	ECHA	Subunidad de la enzima trifuncional alfa, mitocondrial	0,0404	1,65
Q9BQE3	TBA1C	Tubulina cadena alfa-1C	0,02977	1,63
Q8IWG1	WDR63	Proteína que contiene repetición de WD 63	0,03982	1,63
P56597	NDK5	Nucleósido difosfato quinasa homólogo 5	0,01669	1,63
O75190	DNJB6	Miembro de la subfamilia B del homólogo DnaJ 6	0,04904	1,58
Q9NZC3	GDE1	Glicerofosfodiester fosfodiesterasa 1	0,04441	1,44
P63244	RACK1	Receptor de la proteína quinasa C1 activada	0,01283	-1,63
P13667	PDIA4	Proteína disulfuro-isomerasa A4	0,04045	-1,79
P63104	1433Z	14-3-3 proteína zeta / delta	0,03665	-1,84
Q53QW1	CB057	Proteína no caracterizada C2orf57	0,01544	-1,84
Q7Z745	MRO2B	Maestro, miembro de la familia de proteínas de repetición 2B de choque térmico	0,04886	-1,89
Q9NRY5	F1142	Proteína FAM114A2	0,01804	-2,02
O43759	SNG1	Sinaptogirina-1	0,0229	-2,02
P33316	DUT	Desoxiuridina 5'-trifosfato nucleotidohidrolasa, mitocondrial	0,02932	-2,21
P49356	FNTB	Subunidad de la proteína farnesiltransferasa beta	0,01994	-2,28
P27105	STOM	Proteína de membrana integral de la banda 7 de eritrocitos	0,02789	-2,48

UniprotKB /Código acceso	Nombre corto de la proteína	Nombre proteína	p-valor	Tasa cambio (E/NE)
Q6P2H8	TMM53	Proteína transmembrana 53	0,02696	-2,53
P13796	PLSL	Plastina 2	0,00731	-2,55
Q9Y2X7	GIT1	ARF proteína activadora de GTPasa GIT1	0,00783	-3,01
O43181	NDUS4	NADH deshidrogenasa [ubiquinona] proteína de hierro y azufre 4, mitocondrial	0,0101	-3,42
P46976	GLYG	Glicogenina-1	0,01817	-5,51
Q96JB2	COG3	Subunidad 3 del complejo de Golgi oligomérico conservado	0,03838	-7,50

Tabla 17: Resumen de las 53 proteínas con p valor<0,05 y su tasa de cambio.

Como vemos en la tabla, el valor positivo de la tasa de cambio nos indica cuantas veces esa proteína se encuentra en mayor cantidad en el grupo E frente al NE, en este caso hay 37 proteínas que se encuentran en mayor cantidad en el grupo E; y el valor negativo nos indica que está en menor cantidad en el grupo E frente al NE o que están en mayor cantidad en el grupo NE, 16 proteínas se detectan en menor cantidad en el grupo E.

Curiosamente, de las 8 proteínas que tienen una función ya descrita implicada en la reproducción y en el espermatozoide, 7 de ellas se encuentran en mayor cantidad en el grupo E que en el NE. La única que se encuentra en mayor cantidad en el grupo NE está vinculada con el proceso de capacitación del espermatozoide. En la siguiente tabla (tabla 18) se muestran estas 8 proteínas y sus funciones.

Nombre proteína	Función
Cadena catalítica gamma fosforilasa b quinasa, isoforma hepática / testículo	Subunidad catalítica de la fosforilasa b quinasa (PHK), que media la regulación neuronal y hormonal de la degradación del glucógeno (glicogenólisis) por fosforilación y activando así la glicógeno fosforilasa. Puede regular la glucogeneólisis en los testículos.
Proteína del gen 10 específico del testículo	Puede jugar un papel importante en la envoltura fibrosa de la cola del espermatozoide, una estructura importante de la cola del espermatozoide (espermatogénesis)
Proteína asociada a la espermatogénesis 20	Puede desempeñar un papel en la regulación de la fertilidad.
Metallo-endopeptidasa de tipo membrana 1	Metaloproteasa involucrada en la función espermática, posiblemente modulando los procesos de fecundación y desarrollo embrionario temprano. Degrada una amplia variedad de péptidos pequeños con una preferencia por péptidos más cortos de 3 kDa que contienen residuos voluminosos neutros alifáticos o aminoácidos aromáticos.
Proteína acrosomal SP-10	Vesícula acrosomal nascente de espermátides de fase de Golgi.
Serina/treonina-proteín quinasa 6 específica para el testículo	Requerido para la producción y la función del espermatozoide. Juega un papel en la condensación de ADN durante la remodelación de la cromatina postmeiótica

Nombre proteína	Función
Nucleósido difosfato quinasa homólogo 5	No parece tener actividad de quinasa NDK. Confiere protección contra la muerte celular por Bax y altera los niveles celulares de varias enzimas antioxidantes incluyendo Gpx5. Puede desempeñar un papel en la espermiogénesis al aumentar la capacidad de las espermátidas tardías para eliminar las especies reactivas del oxígeno
Maestro, miembro de la familia de proteínas de repetición 2B de choque térmico	Puede desempeñar un papel en el proceso de capacitación espermática

Tabla 18: Funciones de 8 de las proteínas con significancia estadística que están relacionadas con la reproducción/fertilidad.

2.2.3.1. Métodos de regresión múltiple con penalización

Con el fin de determinar las proteínas que mejor diferenciaban un grupo del otro a partir de su expresión diferencial, utilizamos regresiones múltiples. Para ello, elaboramos un *heatmap* de todas las proteínas (2228) identificadas en el análisis de las 8 muestras de estudio una vez normalizadas (figura 28).

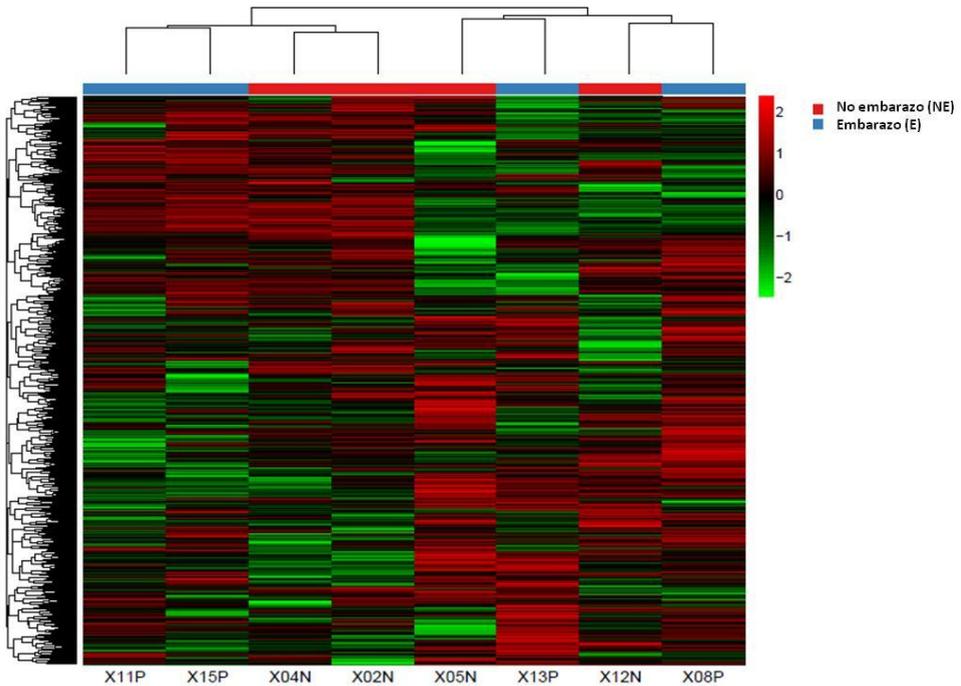


Figura 28. Heatmap de todas las muestras. En la parte inferior se representan las muestras elegidas y en la parte superior en azul las muestras del grupo E y en rojo NE.

En el gráfico (heatmap) observamos que no existe una clara clasificación entre los grupos (E y NE) aunque entre las proteínas parece observarse dos grupos con un comportamiento contrario. Para profundizar en esto aplicamos el modelo Elastic-Net.

a) Métodos de regresión múltiple con penalización: Elastic-Net

La técnica Elastic-Net, combina los métodos de regresión Lasso y Ridge y es menos restrictiva que el primero. Aplicamos esta técnica a nuestra base de datos y obtuvimos 27 proteínas identificadas de manera diferencial: 17 de ellas se encontraban en mayor cantidad en el grupo E que en el NE y 10 se encontraban

en menor cantidad (tabla 19). Estas proteínas explican de una forma más adecuada la diferencia entre los grupos E y NE:

UniprotBK/ Código acceso	Nombre corto	Nombre proteína	p-valor	Tasa de cambio (E/NE)
P52943	CRIP2	Proteína rica en cisteína 2	0,05414	8,34
O15382	BCAT2	Aminotransferasa de cadena ramificada aminoácida, mitocondrial	0,06	6,50
Q5VU69	CA189	Proteína no caracterizada C1orf189	0,01288	6,17
P11279	LAMP1	Glicoproteína 1 de membrana asociada a los lisosomas	0,02179	5,40
P55209	NP1L1	Proteína de ensamblaje de nucleosomas 1- like1	0,00519	4,82
P48723	HSP13	Proteína de 70 kDa de choque térmico 13	0,00824	4,60
A8MZ97	CB074	Proteína no caracterizada C2orf74	0,02588	4,54
Q96DY2	IQCD	Proteína D que contiene dominio IQ	0,09452	3,89
P62269	RS18	40S Proteína ribosomal S18	0,02583	3,72
P15735	PHKG2	Cadena catalítica gamma fosforilasa b quinasa, isoforma hepática/testículo	0,00286	3,38
Q9BVG9	PTSS2	Fosfatidilserina sintasa-2	0,00379	2,83
A1L0T0	ILVBL	Proteína del tipo acetolactato sintasa	0,01206	2,11
P08236	BGLR	Beta-glucuronidasa	0,04587	1,92
Q8NE09	RGS22	Regulador de la señalización de la prot G22	0,00511	1,78
Q9BXA6	TSSK6	Serina/treonina-proteín quinasa 6 específica para el testículo	0,01107	1,66
Q9BQE3	TBA1C	Tubulina cadena alfa-1C	0,02977	1,63
Q8IWG1	WDR63	Proteína que contiene repetición de WD 63	0,03982	1,63

UniprotBK/ Código acceso	Nombre corto	Nombre proteína	p-valor	Tasa de cambio (E/NE)
P63244	RACK1	Receptor de la proteína quinasa C1 activada	0,01283	-1,63
Q53QW1	CB057	Proteína no caracterizada C2orf57	0,01544	-1,84
P49356	FNTB	Subunidad de la proteína farnesiltransferasa beta	0,01994	-2,28
P27105	STOM	Proteína de membrana integral de la banda 7 de eritrocitos	0,02789	-2,48
P13796	PLSL	Plastina-2	0,00731	-2,55
Q9Y2X7	GIT1	ARF proteína activadora de GTPasa GIT1	0,00783	-3,01
O43181	NDUS4	NADH deshidrogenasa [ubiquinona] proteína de hierro y azufre 4, mitocondrial	0,0101	-3,41
P46976	GLYG	Glicogenina-1	0,01817	-5,51
Q9UK85	DKKL1	Proteína relacionada con Dickkopf 1	0,1223	-6,52
Q96JB2	COG3	Subunidad 3 del complejo de Golgi oligomérico conservado	0,03838	-7,49

Tabla 19: proteínas diferencialmente expresadas en el grupo E y NE. En blanco podemos ver las 17 proteínas incrementadas en cantidad en el grupo E y en azul las 10 que se encuentran en menor cantidad en el grupo E respecto al NE.

De entre estas 27 proteínas y dentro del grupo de las 17 proteínas que se encuentran incrementadas en el grupo E, 3 de ellas estaban directamente relacionadas con los testículos: WDR63, TSSK6 y PHKG2, con funciones de desarrollo testicular, producción y función de los espermatozoides, jugando un papel en la condensación de ADN durante la remodelación de la cromatina postmeiótica y de regulación de la glucogeneólisis en los testículos, respectivamente.

De igual forma que en el apartado anterior, realizamos un heatmap en el que se representaban las 27 proteínas contenidas en la tabla 19 (figura 29).

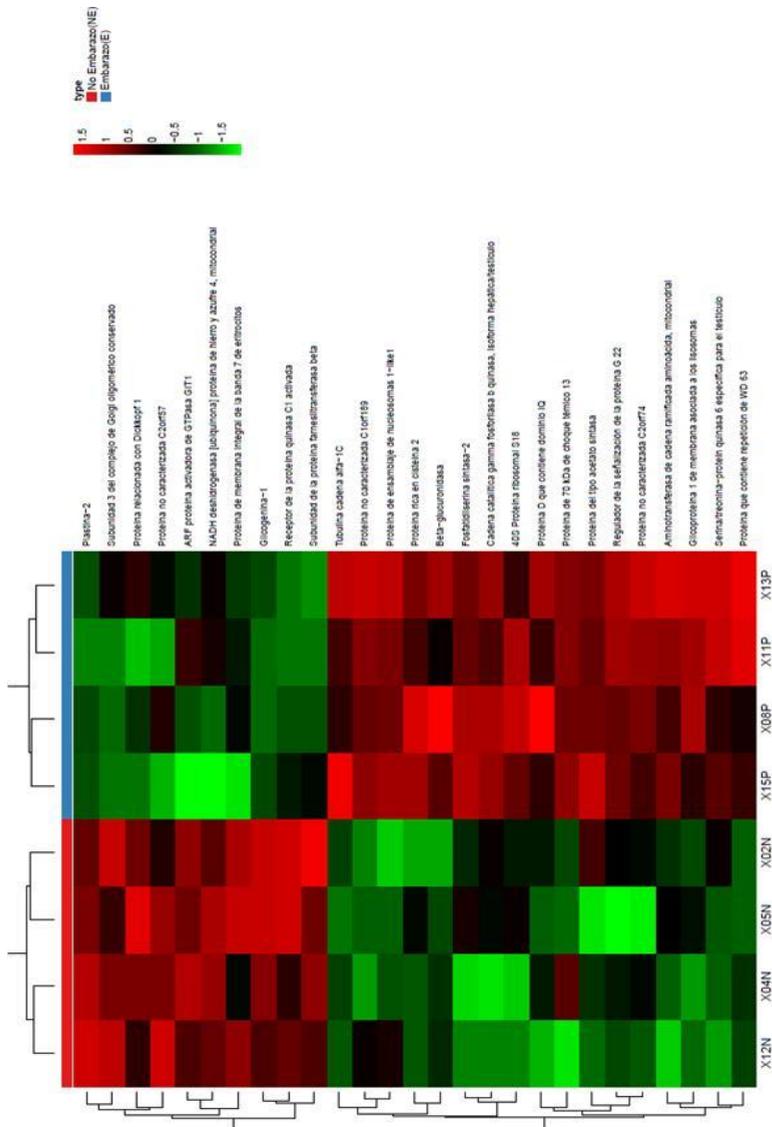


Figura 29: *Heatmap* de las proteínas identificadas por Elastic-Net expresadas diferencialmente entre los dos grupos: E y NE. En la parte inferior se representan las muestras elegidas y en la parte superior en azul las muestras del grupo E y en rojo NE.

Cómo podemos ver en el heatmap, las muestras aparecen clasificadas correctamente según el grupo al que pertenecen. Además, tenemos las proteínas diferenciadas en dos clústeres. Uno formado por las proteínas que tienen una estimación del coeficiente negativo (grupo NE) y otro grupo formado por las proteínas con estimaciones positivas de sus correspondientes coeficientes de regresión (grupo E).

b) Métodos De Reducción De Dimensión. Aplicación De PLS-DA

También aplicamos la clasificación por PLS-DA a las proteínas identificadas. Para ello, utilizamos el paquete mixOmics de R con la clasificación PLS-DA, observando que las muestras aparecen correctamente agrupadas en función del grupo al que pertenecen (muestras que conseguían embarazo (n=4) o no (n=4)) (figura 30).

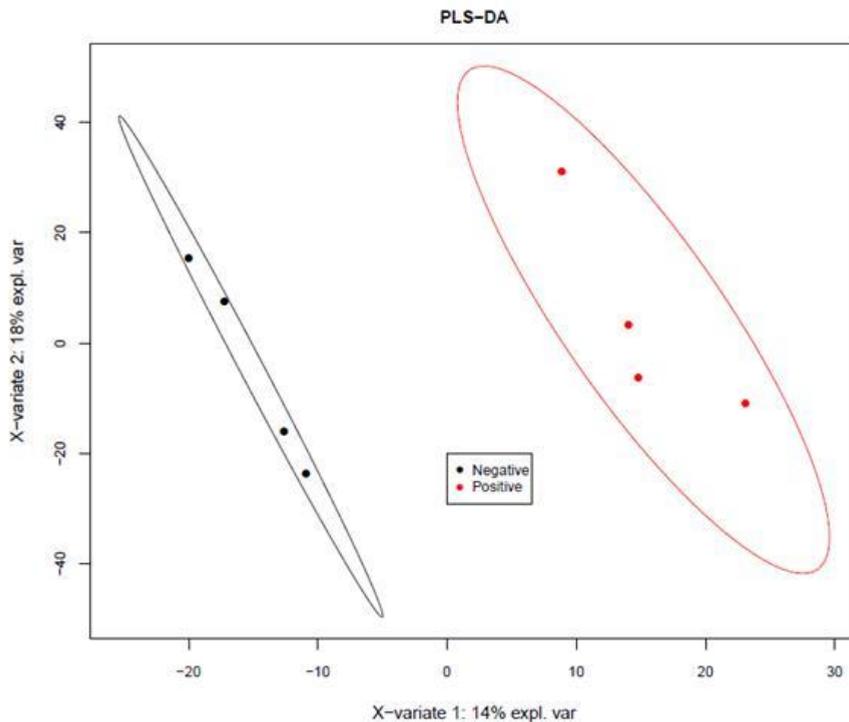


Figura 30: Clasificación por PLS-DA de las muestras por grupo. En rojo las muestras del grupo E y en negro las del grupo NE.

Finalmente aplicamos la función *vip score* tanto a las proteínas diferenciales como al método Elastic-Net y al análisis PLS-DA, lo que nos va a permitir determinar cuál de las variables explicativas es más importante para predecir la variable respuesta, es decir, que proteína tiene más importancia a la hora de que la paciente se embarace o no.

Cuanto más alto es el *vip score*, más importancia tendrá dicha proteína. Si dicha proteína presenta una puntuación mayor de 1 indica que tiene influencia,

pero si su valor es mayor que 1,5 se dice que dicha proteína (variable explicativa) tiene una alta influencia en el embarazo (variable respuesta).

Aplicando dicha función a nuestros datos, obtuvimos un gran número de proteínas con un *vip score* >1,5. Dentro del análisis de Elastic-Net, las 27 proteínas presentaban un *vip score* >1,5, sin embargo en el análisis PLS-DA encontramos 300 proteínas (anexo 3).

Con las proteínas que presentaban un *vip score* >1,5 identificadas mediante PLS-DA, realizamos un gráfico (*heatmap*) (figura 31).

En este gráfico podemos ver que las proteínas con *vip score* >1,5 tienen una tendencia a clasificarse según el grupo al que pertenecen.

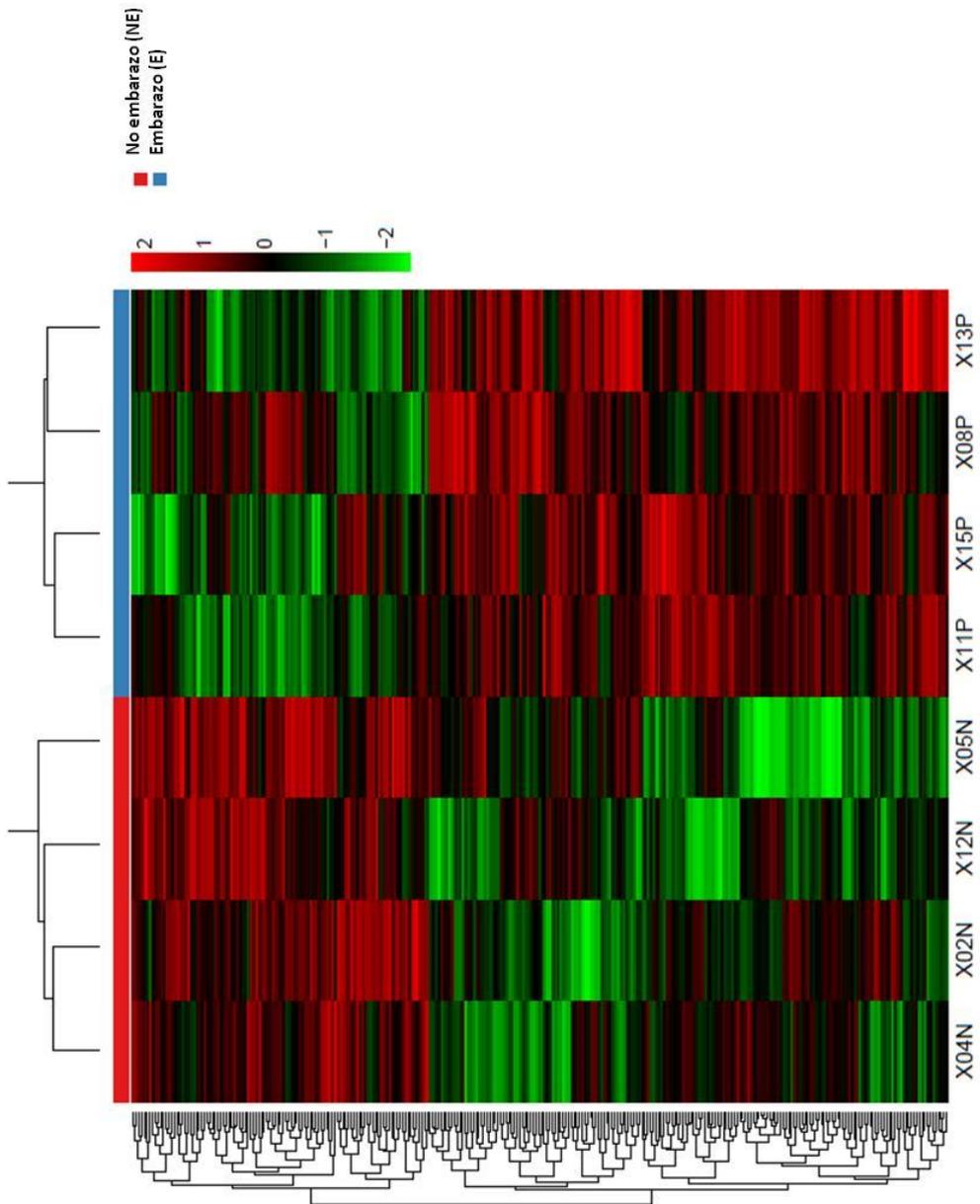


Figura 31: *Heatmap* de las proteínas identificadas por PLS-DA expresadas diferencialmente entre los distintos grupos. En la parte inferior se representan las muestras elegidas y en la parte superior en azul las muestras del grupo E y en rojo NE.

2.2.4. Análisis funcional. GO, DAVID y String

Como se ha comentado en el apartado 6.2.2.8. de material y métodos, aplicamos métodos de análisis funcional a las proteínas identificadas. En principio aplicamos estos análisis a todas y cada una de las proteínas obtenidas de los diferentes sistemas de análisis estadísticos (proteínas diferenciales con significancia estadística, proteínas obtenidas mediante el análisis de penalización Elastic-Net y proteínas obtenidas aplicando el método PLS-DA), pero finalmente nos centramos en las proteínas obtenidas tras la aplicación del método PLS-DA + *vip score* por varias razones: 1) los resultados obtenidos al aplicar el análisis funcional sobre las 300 proteínas obtenidas con este método estadístico son más óptimos (el resto de análisis no nos proporciona un número de proteínas óptimo para realizar estos análisis funcionales); 2) todas las proteínas resultado del análisis Lasso, Elastic-Net y proteínas diferenciales con significancia estadística, se encuentran dentro de las obtenidas por el PLS-DA y 3) el análisis PLS-DA, separa perfectamente los grupos estudiados (E y NE) (figura 30). Si además, a este análisis PLS-DA, le aplicamos la función *vip score*, obtenemos 300 proteínas que explican de forma muy fiable la separación de las muestras, en cuanto a grupos de estudio se refiere, y además tienen una alta influencia en la variable respuesta, es decir, el embarazo.

Para realizar el análisis ontológico se tuvo en cuenta los términos GO, que son: 1) la función molecular, 2) los procesos biológicos y 3) los componentes celulares asociados con las proteínas de los espermatozoides; el análisis STRING y la base de datos DAVID.

Para realizar el análisis de STRING (anexo 4) (figura 32), se tuvieron en cuenta dentro de las proteínas obtenidas por PLS-DA, aquellas que se encontraban en mayor cantidad en el grupo E frente al NE (figura 33) o viceversa (figura 34) y además eran proteínas que presentaban un p valor <0,05, es decir, que la mayoría de proteínas o todas las pertenecientes a un mismo GO se encontraban en E o en NE.

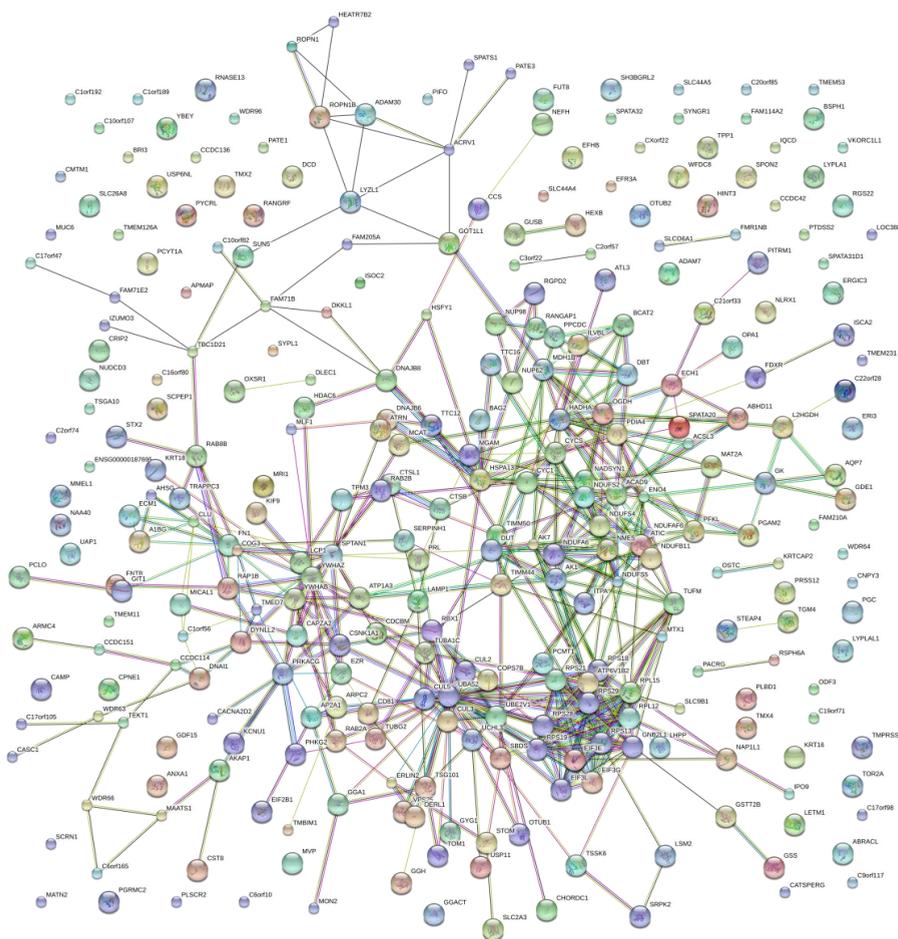


Figura 32: Análisis String con todas las proteínas obtenidas al aplicar PLS-DA.

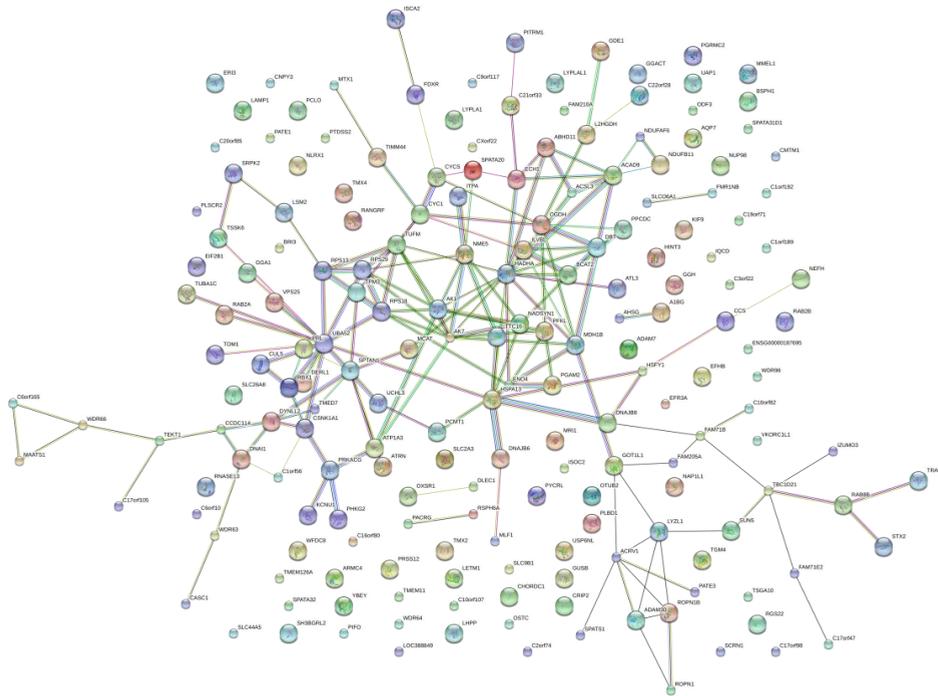


Figura 33: Análisis String con las proteínas que se encuentran en mayor cantidad en el grupo E, de todas las obtenidas tras el PLS-DA.

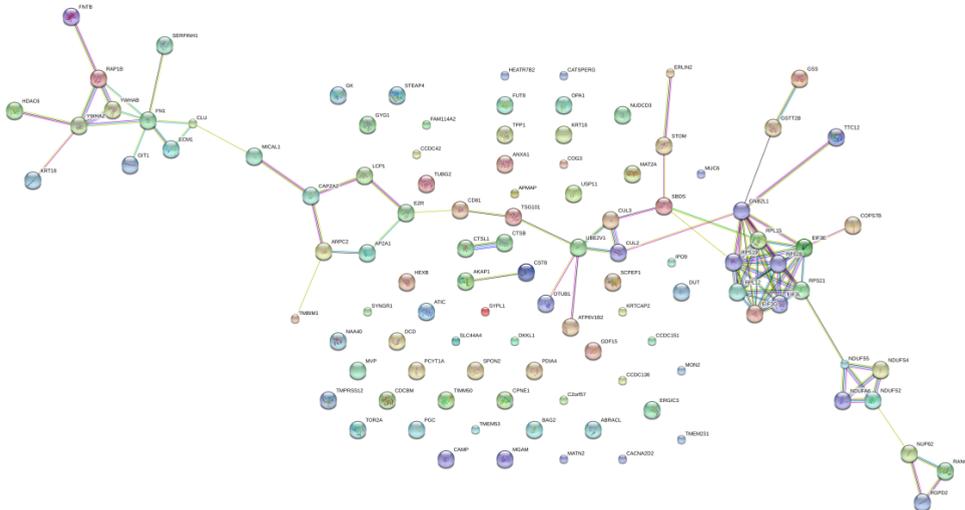


Figura 34: Análisis String con las proteínas que se encuentran en mayor cantidad en el grupo NE.

Se analizaron los cambios globales de abundancia dentro de cada GO. Para ello se determinó el número de proteínas aumentadas en cada grupo. Se tuvieron en cuenta aquellas proteínas que presentaban una diferencia de proteínas entre grupos de 100 ($Dif/Total = 100$, todas las proteínas se encuentran en el grupo E y $Dif/Total = -100$, todas las proteínas se encuentran en el grupo NE) y aquellas que presentaban una diferencia de 66,67 y hasta 60. Estas dos últimas por ser GO relacionados con reproducción, aunque dentro del GO: espermatogénesis no encontramos una diferencia significativa, pero lo incluimos por la importancia de este GO en la tesis que nos ocupa. En la tabla 20, podemos observar los GO seleccionados, sin embargo las proteínas con p valor $<0,05$ seleccionadas se encuentran en el anexo (anexo 5).

Nº genes	GO pathway ID	Descripción del pathway	Grupo E	Grupo NE	Dif/Total	log2 Up/NE
7	GO.0006165	nucleoside diphosphate phosphorylation	7	0	100	3,81
4	GO.0044447	axoneme part	4	0	100	3,00
59	GO.0044446	intracellular organelle part	0	59	-100	-6,88
43	GO.0032991	macromolecular complex	0	43	-100	-6,43
42	GO.0016043	cellular component organization	0	42	-100	-6,39
41	GO.0005515	protein binding	0	41	-100	-6,36
37	GO.0043234	protein complex	0	37	-100	-6,21
32	GO.0006950	response to stress	0	32	-100	-6,00
28	GO.0031090	organelle membrane	0	28	-100	-5,81
24	GO.0033036	macromolecule localization	0	24	-100	-5,58
24	GO.0070887	cellular response to chemical stimulus	0	24	-100	-5,58
23	GO.0051641	cellular localization	0	23	-100	-5,52
21	GO.0071702	organic substance transport	0	21	-100	-5,39
19	GO.0006928	movement of cell or subcellular component	0	19	-100	-5,25
18	GO.0007283	spermatogenesis	15	3	66,67	2,32

Nº genes	GO pathway ID	Descripción del pathway	Grupo E	Grupo NE	Dif/Total	log2 Up/NE
18	GO.0040011	locomotion	0	18	-100	-5,17
15	GO.0005615	extracellular space	0	15	-100	-4,91
14	GO.0000902	cell morphogenesis	0	14	-100	-4,81
14	GO.0061024	membrane organization	0	14	-100	-4,81
13	GO.0098796	membrane protein complex	0	13	-100	-4,70
12	GO.0005198	structural molecule activity	0	12	-100	-4,58
10	GO.0030529	ribonucleoprotein complex	0	10	-100	-4,32
10	GO.0048471	perinuclear region of cytoplasm	0	10	-100	-4,32
9	GO.0005925	focal adhesion	0	9	-100	-4,17
6	GO.0003341	cilium movement	5	1	66,67	2,32
5	GO.0060632	regulation of microtubule-based movement	4	1	60	2,00

Tabla 20: Proteínas PLS-DA analizadas mediante STRING. En azul se observan los GO en los cuales las proteínas que participan están en mayor cantidad en el grupo E que en el NE y en blanco las que están en mayor cantidad en el grupo NE. Dif/Total: es el número de proteínas que se encuentran en el grupo E menos las del grupo NE, dividido entre el número total de proteínas (E+NE) por 100.

De entre todas las proteínas encontradas en esta selección (anexo 5), las agrupamos según si se encontraban mayoritariamente en el grupo de las muestras que embarazaban o las que no.

Del grupo que embaraza (figura 35) y escogimos 5 proteínas. NME5 (NDK5_HUMAN) porque participaba en la mayoría GO seleccionados de este grupo y SPATA20 (SPT20_HUMAN), DNAI1, ARMC4 y AK7 (KAD7_HUMAN) por ser proteínas importantes en los GO con mayor cantidad de proteínas en el grupo que embaraza.

- NME5: Juega un papel importante en la espermiogénesis aumentando las espermátides en estadio tardío para eliminar EROs. Se expresa específicamente en las células germinales del testículo pero forma parte del flagelo.
- SPATA20: Juega un papel importante en la regulación de la fertilidad. Función catalítica y participa en espermatogénesis y diferenciación celular. Es secretada.
- DNAI1: Relacionado con el movimiento del flagelo espermático. Su disminución en el espermatozoide provoca “discinesia ciliar primaria”: enfermedad caracterizada por disfunción de las células ciliadas. Síndrome de Kartagener.
- ARMC4: Involucrada en el movimiento ciliar. Su disminución puede provocar también discinesia ciliar primaria.
- AK7: Involucrado con el mantenimiento de la estructura del cilio y su función. Espermatogénesis.

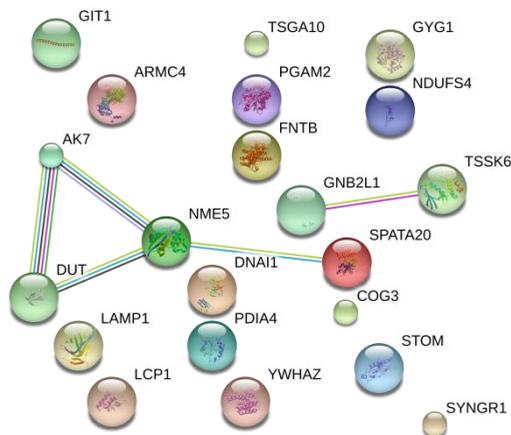


Figura 35: Red String de proteínas que se encuentran en mayor cantidad en el grupo E respecto al NE

De las proteínas que se encontraban en mayor cantidad en el grupo NE (figura 36), encontramos 10 que se repetían en los 20 procesos GO seleccionados para el grupo NE: GNB2L1 (RACK1_HUMAN), PDIA4, YWHAZ (1433Z_HUMAN), SYNGR1 (SNG1_HUMAN), FNTB, LCP1 (PLSL_HUMAN), NDUFS4 (NDUS4_HUMAN), COG3, STOM y GIT1, siendo las que más veces se repetían la YWHAZ, NDUFS4 Y COG3.

- GNB2L1: componente de la subunidad 40S del ribosoma relacionada con la traducción. Ubiquitinación.
- PDIA4: actividad óxido-reductasa y unión ARN.
- YWHAZ: unión cadherina, unión ARN, factor transcripción, involucrado en la regulación positiva del proceso de apoptosis.
- SYNGR1: regulación celular.
- FNTB: regulación proliferación celular, unión ion zinc. Asociado con los microtúbulos.
- LCP1: proteína de unión-actina (filamentos).
- NDUFS4: subunidad de la cadena respiratoria mitocondria.
- COG3: involucrado en el transporte aparato golgi. Función de transporte. Altamente expresado en testículos.
- STOM: regula la actividad de los canales de iones y transporte transmembrana de iones.
- GIT1: involucrado en la regulación de la citocinesis.

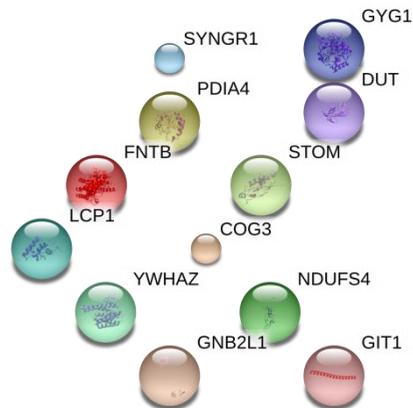


Figura 36: Red String de proteínas que se encuentran en mayor cantidad en el grupo NE.

Debido a que una de las razones de esta tesis, además de describir el perfil proteico de espermatozoides según si embarazan o no, era encontrar proteínas que por el hecho de poder formar parte del grupo de proteínas imprescindibles para embarazar o no, nos permitiesen desarrollar una técnica de selección espermática basada en el fundamento de la técnica de MACS (apartado 5.2.2.2 de la introducción), nos centramos en las proteínas presentes en el PLS-DA con *vip score* >1,5 pero que se encontraban en la membrana o eran proteínas transmembrana, ya que esta característica es un requisito imprescindible para poder separar células mediante esta técnica. De esta forma encontramos 11 proteínas que se encontraban en membrana y que por tanto aquellos espermatozoides que las presenten, podrían ser susceptibles de separarse mediante la técnica de MACS si dichas proteínas tuvieran alguna implicación en la reproducción.

Estas proteínas fueron:

- MGAM: no se ha descrito que participe en ninguna función relacionada con la reproducción o los espermatozoides. Se encuentra en el intestino. Sin embargo se encuentra en el grupo NE en cantidad estadísticamente significativa.

- ATP1A3: participa en el transporte de iones a través de la membrana necesario para en el espermatozoide para hacer frente a los cambios ambientales a lo largo de su paso por el tracto reproductor femenino. Se encuentra en el grupo E en cantidad estadísticamente significativa.

- ATRN: participa en la respuesta al estrés oxidativo. Es una sustancia activadora involucrada en la reproducción masculina, su disminución produce degeneración testicular, disminución de la actividad enzimática testicular y disminución de la densidad y motilidad espermática, todo esto parece ser que relacionado con la edad del paciente. Se encuentra en el grupo E.

- SLC6A1: se expresa mayoritariamente en testículos y está relacionada con el cáncer de testículos por lo que puede ser utilizado como diana para el tratamiento antitumoral. Es un transportador de iones que se expresa en testículos normales. Se encuentra en los espermatozoides del grupo E.

- IZUMO3: proteína de la membrana de los espermatozoides esencial para la unión espermatozoide-ovocito (ratón) y que se expresa de forma específica en los testículos. Se encuentra en los espermatozoides del grupo E.

- GDE1: no se ha descrito que participe en ninguna función relacionada con la reproducción o los espermatozoides, se encuentra en el cerebro. Sin embargo se encuentra en los espermatozoides del grupo E en cantidad estadísticamente significativa.
- KCNU1: canal de potasio específico de testículos. Papel crítico en fertilidad, reconocimiento espermatozoide-ovocito. Se encuentra en los espermatozoides del grupo E.
- LAMP1: se ha visto (en tortugas) que niveles elevados de esta proteína en las células de Sertoli, favorece la entosis de los espermatozoides en vacuolas generadas en estas células. Sin embargo se encuentra en los espermatozoides del grupo E en cantidad significativa y de forma importante.
- STEAP4: Oxirreductasa/metaloreductasa, expresada en testículos entre otros tejidos. Marcador de cáncer de testículos entre otros. Se encuentra en los espermatozoides del grupo NE.
- SLC2A3: transportador de glucosa que se expresa en los testículos y en los espermatozoides, involucrado en los cambios del espermatozoide. Se encuentra en testículos normales con buena espermatogénesis y espermatocitos. Se encuentra en los espermatozoides del grupo E, de forma importante aunque no estadísticamente significativa.

- CD81: regulación de la motilidad celular. Participa en la interacción y fusión del espermatozoide con el ovocito, se encuentra en la membrana que cubre el acrosoma y cuando el espermatozoide está acrosomo-reaccionado (capacitado) en algunas especies desaparece. Se encuentra en los espermatozoides del grupo NE.

Por último, utilizamos la base de datos DAVID para obtener una interpretación funcional de las proteínas diferenciales obtenidas mediante PLS-DA. Para ello se utilizó como background, el proteoma humano y las proteínas resultado del análisis de SWATH.

Teniendo en cuenta las 2228 proteínas identificadas mediante el análisis de SWATH y comparándolas con las 20581 proteínas que forman parte del proteoma humano, obtuvimos algunos procesos enriquecidos (anexo 6):

- Actividad mitocondrial, mitocondria, metabolismo del carbono, proceso de oxidación/reducción.
- Chaperonas
- Unión cadherina
- Ubiquitina
- Ribosomas, actividad ribosomal
- B-oxidación de los ácidos grasos
- ARNtransferencia producción proteínas/biosíntesis de proteínas

Luego nos centramos en los procesos enriquecidos cuando comparábamos las proteínas PLS-DA con el proteoma humano y todas las proteínas identificadas mediante el análisis de SWATH.

Comparamos las proteínas que se encuentran en el grupo E y NE por separado, frente al proteoma humano y obtuvimos varios procesos enriquecidos:

1) En el caso del grupo E/proteoma humano:

- GO.0005739: mitocondria (significativo)
- GO.0003341: movimiento cilio
- GO.0030154: diferenciación celular
- GO.0005874: microtúbulo

2) En el caso del grupo NE/proteoma humano

- GO:0098641: unión a cadherina involucrada en célula-célula adhesión (significativo)
- GO:0005913: célula-célula unión (significativo)
- GO:0006413: iniciación de la traducción (significativo)
- GO:0005747: cadena respiración mitochondrial

También comparamos las proteínas que se encuentra en el grupo E y NE por separado, frente a las proteínas identificadas mediante el análisis de SWATH y obtuvimos varios procesos enriquecidos aunque no de manera significativa:

1) En el caso del grupo E/SWATH:

- GO.0016021: componente integral de membrana
- GO.0003341: movimiento cilio, GO.0005929: cilio, GO.0036158: montaje flagelar del espermatozoide: dineína. Discinesia ciliar primaria.
- GO.0007175: desarrollo multicelular. Espermatogénesis.
- GO.0030154: diferenciación celular. Desarrollo proteínas
- Metabolismo de ácidos grasos

2) En el caso del grupo NE/SWATH

- GO:0098641: unión a cadherina involucrada en célula-célula adhesión
- GO:0000184: transcripción-nuclear ARNm, proceso catabólico

VI. DISCUSIÓN

La mejor manera de predecir el futuro es creándolo

VI.DISCUSIÓN

La infertilidad se ha convertido en un problema médico y social de gran importancia mundial que actualmente afecta a un 14% de parejas en edad reproductiva solo en Europa (ESHRE 2014:2016, Mascarenhas et al. 2012). Por ello el desarrollo de las TRA ha supuesto un hito en el tratamiento de estos problemas al aumentar las posibilidades de éxito reproductivo (Chemes and Alvarez Sedo 2012, Khorram et al. 2001). Hoy en día, el análisis básico del semen constituye la única herramienta diagnóstica y pronóstica para evaluar el estatus fértil del varón, sin embargo, presenta una serie de limitaciones, sobre todo en los casos de infertilidad de origen desconocido (Garrido et al. 2008, Rivera et al. 2012).

Una de las razones que puede explicar el inalcanzable éxito del 100% de las TRA, puede ser la existencia de alteraciones a nivel molecular que son indetectables mediante el uso de las técnicas utilizadas de rutina en el laboratorio (Azpiazu et al. 2014). En estos casos, el uso de biomarcadores moleculares basados en la fisiología espermática podría complementar los análisis actuales mejorando el diagnóstico y tratamiento de la infertilidad masculina, o prediciendo los resultados de las TRAs (Samplaski et al. 2010).

En este sentido, la búsqueda de moléculas presentes en los espermatozoides (nivel molecular u anomalías ocultas) que consigan un embarazo y aquellos que no lo consigan, nos permitirá definir perfiles de gestación sí o no y desarrollar técnicas de diagnóstico y/o selección espermática.

Por todo ello, el objetivo de esta tesis se ha centrado en describir el perfil lipídico y proteico de los espermatozoides y relacionarlo con el éxito reproductivo, con el fin de identificar lípidos y proteínas que por sí solos o en conjunto con otros, actúen como biomarcadores de fertilidad y nos permitan seleccionar en base a él o ellos, aquellos espermatozoides capaces de fecundar un ovocito y dar lugar a un RNV sano.

Por un lado se describieron los lípidos que forman parte de los espermatozoides y su relación con el éxito reproductivo. Varios lípidos y familias o clases de lípidos se vincularon con la función del espermatozoide y la consecución o no del embarazo.

Se eligieron los lípidos porque de entre los componentes celulares con funciones espermáticas relevantes en la reproducción, la membrana plasmática del espermatozoide es una pieza clave debido a su participación en la fusión de los espermatozoides y ovocitos durante la fecundación, los complejos cambios sufridos a lo largo de la vida del espermatozoide incluyendo maduración, capacitación y reacción acrosómica (Muratori et al. 2009), y su papel en los eventos posteriores a la fecundación (los cuales a día de hoy no se pueden descartar)(Flesch and Gadella 2000). Por tanto, las células espermáticas tienen diferente composición de la membrana plasmática en comparación con las células somáticas, ya que su membrana experimenta cambios significativos después de dejar los testículos organizándose en regiones laterales de la superficie de la cabeza del espermatozoide y reorientando sus moléculas adecuadamente por todo el tracto reproductor femenino, por lo que estos cambios son susceptibles

de ser caracterizados y utilizados para conocer si un espermatozoide va a ser competente fisiológicamente o no.

Además, como hemos indicado, la membrana plasmática de los espermatozoides y por extensión los lípidos de esta membrana, tienen un papel crítico en la interacción espermatozoide-ovocito y en la capacitación espermática que conduce al éxito de la fecundación (Khoshvaght et al. 2016), así como su implicación en la capacidad del espermatozoide para sobrevivir después de congelar/descongelar y estabilizar el estrés oxidativo.

La composición de la membrana plasmática es variable en diferentes especies de mamíferos, estando la del espermatozoide constituida aproximadamente de 70% de fosfolípidos, 25% de lípidos neutros y 5% de glicolípidos (Mann and Lutwak-Mann 1981), que es hasta cierto punto comparable a los tipos de células somáticas. Por tanto, el espermatozoide humano puede presentar aproximadamente 50% de glicéridos de fosfocolina, 30% de glicéridos de fosfoetanolamina, 12,5% de esfingomielinas, 3% de fosfatidilserina, 2,5% de cardiolipina y aproximadamente 2% de fosfatidilinositol (Mann and Lutwak-Mann 1981), pero algunos componentes lipídicos pueden variar significativamente entre los varones individuales pero también entre los diferentes eyaculados del mismo individuo, porque pueden variar durante su maduración en el epidídimo adquiriendo movilidad y reconocimientos de señales fisicoquímicas que los harán adecuados para el proceso reproductivo.

Aunque la información disponible hasta la fecha es bastante limitada, algunos estudios han tratado de encontrar la relación entre la composición

lipídica de la membrana espermática, la viabilidad y funcionalidad de los espermatozoides, destacando esta relación Nissen y Kreysel en 1983 (Nissen and Kreysel 1983a). De hecho, estos estudios han demostrado el papel importante de la composición de la membrana espermática y su balance lipídico en la calidad del espermatozoide (Force et al. 2001, Lenzi et al. 1996, Zhou et al. 2010). Además, el grado de susceptibilidad oxidativa de los PUFAs (en gran cantidad en la membrana del espermatozoide), podría estar relacionado con el daño oxidativo, el cual disminuye la capacidad del espermatozoide para fecundar el ovocito. Estos ácidos grasos, además de mejorar la movilidad de los espermatozoides y la fluidez de la membrana, convierten al espermatozoide en un objetivo fácil para las EROs. De esta manera la integridad y la viabilidad de los espermatozoides se ve afectada, produciendo un daño irreversible del ADN y reduciendo la capacidad fecundante del espermatozoide (Wathes et al. 2007). De hecho, un estudio reciente (Aitken et al. 2016) ha demostrado que la pérdida de movilidad gradual estaba altamente correlacionada con la inducción de la peroxidación lipídica. Por lo tanto, esta cuestión en los últimos años es la causa más común de infertilidad masculina, dado que los espermatozoides defectuosos son la principal causa de este tipo de daño oxidativo, pero hasta la fecha no existe ningún sistema fiable que seleccione los espermatozoides en función de si presentan oxidación o no, o de si son fisiológicamente competentes o no.

Por otro lado, las células humanas espermáticas contienen, entre otros, altas cantidades de colesterol, y esto parece estar relacionado con la duración de la capacitación, ya que el colesterol se agota de la membrana plasmática en este proceso. Además del colesterol, en la membrana del espermatozoide se pueden encontrar bajas cantidades de desmosterol, sulfato de colesterol, ésteres de

colesisterilo y DHA (Mann and Lutwak-Mann 1981, Nissen and Kreysel 1983b). Por lo que se ha demostrado que la suplementación de estas moléculas en los medios de cultivo o en la dieta protege a los espermatozoides del daño tras congelar/descongelar (Holt and North 1988, Watson 1981).

Por tanto, debido a que se sabe que los lípidos participan en funciones importantes de los espermatozoides, su descripción y relación con la consecución o no del embarazo nos permitirá elegir lípidos susceptibles de ser biomarcadores espermáticos. Además, el análisis de la composición lipídica (lipidoma) de los espermatozoides y su grado de peroxidación lipídica se podrían utilizar como herramienta diagnóstica para complementar al espermiograma.

Con el fin inicial de describir el perfil lipídico de los espermatozoides, se aplicó la técnica de UHPLC-MS, por primera vez en este tipo de muestras, utilizando diferentes sistemas de extracción que permitieran una amplia selección de lípidos totales extraídos (polares y apolares) en un único análisis. Aplicando esta técnica y sus diferentes sistemas de extracción a distintas muestras de semen (IAHs e ICSIs), obtuvimos gran número de lípidos que podrían definir el perfil lipídico de las muestras que consiguen o no embarazo.

En las muestras destinadas a IAH analizadas (sin tener en cuenta el resultado de la gestación), se identificaron 212 lípidos siendo la mayor parte de ellos glicerolípidos (fosfatidilcolinas, etanolaminas e inositoles) y esfingolípidos (esfingomielinas y ceramidas), es decir, componentes de las membranas lipídicas y que por tanto dotan a la membrana de fluidez (Niu and Wang 2009), tal y como

cabía esperar según los resultados obtenidos en otros estudios descriptivos (Mann and Lutwak-Mann 1981).

Sin embargo al analizar las muestras destinadas a ICSI agrupadas en gestación sí (E) y gestación no (NE), se encontraron de entre las 46 familias de lípidos analizadas, mayores niveles de monoacilglicerofosfolina en los pacientes que no conseguían embarazo respecto a los que sí lo hacían, en concreto de 2-monoacilglicerofosfolina (glicerofosfolípido con un ácido graso esterificado en la posición sn-2).

De igual forma, al analizar los lípidos individuales nos dimos cuenta que la mayoría aparecían en niveles más altos en los espermatozoides de muestras que no conseguían embarazo. De hecho, de las 151 especies lipídicas diferentes que se identificaron, solo 10 lípidos estaban significativamente en mayor cantidad en las muestras del grupo NE. Entre ellos, todas las ceramidas significativamente diferentes y varias esfingomielinas también con niveles altos en espermatozoides que no conseguían embarazo, consistían en un resto de esfingosina de 18 carbonos (sphing-4-enina) que estaba amida-unido a un grupo acilo graso de cadena larga. Además, también fueron significativamente mayores en el grupo sin capacidad fecundante: tres glicerofosfolípidos, la lisofosfatidilcolina PC (0: 0/20: 0) y dos glicerofosfolípidos unidos a éter PC (O-22: 0/20: 4) y la especie de plasmalógeno PE (P-16: 0/18: 2).

Estas diferencias pueden estar relacionadas con la estructura de la membrana; por ejemplo, se sabe que los plasmalógenos de etanolamina poliinsaturados desestabilizan la bicapa lipídica y los fosfolípidos en forma de

como invertido, tales como la lisofosfatidilcolina, tienen sólo una cadena acilo y también tienden a formar bicapas curvas y fases no bicapas (Martínez and Morros 1996). El cambio del equilibrio de los lípidos formadores de bicapa con lípidos inductores no bicapa, puede alterar la curvatura de la membrana e indirectamente afectar las propiedades de las proteínas de la membrana y afectar a los espermatozoides a la hora de fecundar el ovocito.

Además llama la atención que no se encontraran grandes cantidades de colesterol en la membrana de los espermatozoides, como se había descrito en la literatura (Mann and Lutwak-Mann 1981, Nissen and Kreysel 1983b), lo cual se podría deber a que las muestra que se utilizaron para estos análisis estaban capacitadas, y como se indica en estos artículos, el colesterol se pierde en el proceso de capacitación. Por tanto, el colesterol nos serviría para seleccionar aquellos espermatozoides sin capacidad fecundante por no haber capacitado correctamente y separarlos de aquellos que por completar el proceso de capacitación hayan perdido el colesterol de su membrana.

Además, a través del análisis de curvas ROC, se evaluó la capacidad predictiva de pronosticar el embarazo, y en este caso fue mejor para las ceramidas, las cuales presentaban prometedoras habilidades predictivas. De hecho el valor predictivo positivo para la Cer (d18:1/24:0) fue elevado (0.86), por lo que es una buena forma de resumir el rendimiento de una prueba diagnóstica. De la misma forma los lípidos individuales: PC(O-22:0/20:4) y PE(P-16:0/18:2), SM(38:1), SM(d18:1/22:0), SM(42:1) y SM(d18:1/25:0); y la clase lipídica monoacilglicerofosfolinas también mostraron un patrón similar.

En resumen, nuestro estudio lipidómico de muestras de espermatozoides que difieren en el éxito reproductivo, reveló que las que lograron embarazo y las que no, no pudieron ser separadas por los perfiles lipídicos globales. Sin embargo, el análisis univariante mostró una serie de lípidos individuales que se incrementaron en los espermatozoides NE, destacando el hecho de que las muestras con capacidad no fecundante pueden tener niveles más altos de algunos glicerofosfolípidos en concreto monoacilglicerofosfolina, y niveles aumentados de esfingolípidos y ceramidas, estas últimas con prometedoras habilidades predictivas para seleccionar la muestra o espermatozoides que de lugar a embarazo.

Los resultados obtenidos están relacionados con estudios anteriores, ya que Gupta (Gupta et al. 2011) y Deepinder (Deepinder et al. 2007), encontraron lípidos de esta misma familia (glicerolípidos), glicerofosfolina y glicerofosforilcolina, y glicerilfosforiletalona respectivamente, en pacientes con fallo de espermatogénesis, azoospermia obstructiva y oligoastenoteratozoospermia, lo cual podría estar vinculado a que estos lípidos se encuentren de forma más abundante y estadísticamente significativa en los pacientes que no embarazan. En esta tesis además se han encontrado muchos otros lípidos individuales entre los que las ceramidas parecen jugar un papel importante en muestras del grupo NE, por lo que habría que profundizar en la función que estas moléculas desempeñan en los espermatozoides para que su presencia en la membrana del espermatozoide esté relacionada de manera importante en las muestras de varones con muestras que no embarazan, hasta el punto de poder predecir si un espermatozoide o una muestra dará lugar a un embarazo o no.

Por lo tanto, investigaciones futuras centradas en los lípidos específicos identificados en esta tesis relevantes en la reproducción y la determinación de la peroxidación lipídica, mejorará las estrategias utilizadas para modular su presencia en los espermatozoides con el objetivo de mejorar las posibilidades reproductivas. De hecho, en nuestro estudio la mayoría de los lípidos aparecieron en niveles más altos en los espermatozoides que no lograron embarazo. Esta información es útil en el diseño de nuevas herramientas de selección de espermatozoides, como la selección de células activadas magnéticamente (MACS) para seleccionar los espermatozoides con lípidos específicos.

Por otro lado, esta tesis también describió las proteínas presentes en los espermatozoides y su relación con la consecución o no del embarazo. Varias proteínas y sus péptidos se vincularon con la función del espermatozoide y el éxito reproductivo.

Gracias al gran avance de las técnicas proteómicas se han podido identificar proteínas que pueden jugar un papel importante en la fertilidad masculina, lo que sería interesante para generar un catálogo de proteínas espermáticas junto a su función y que fuesen capaces de ser detectadas con el fin de seleccionar el espermatozoide que las exhibiera, o bien por ser de buen pronóstico para conseguir un embarazo, o por no tener capacidad fecundante. Por tanto el estudio de la proteómica podría ayudar a determinar todas las moléculas potencialmente involucradas en la función espermática, así como identificar causas de infertilidad desconocidas.

A diferencia de los lípidos, las proteínas han sido más ampliamente estudiadas, de hecho hay disponibles alrededor de 30 estudios acerca de las proteínas de los espermatozoides. Estos estudios se han centrado básicamente en la identificación o descripción de proteínas espermáticas características tanto de espermatozoides de pacientes normozoospermicos, como de un tipo de alteración del espermiograma, sobre todo oligozoospermia (Botta et al. 2009) y astenozoospermia (Li et al. 2017, Martinez-Heredia et al. 2008, Saraswat et al. 2017, Martinez-Heredia et al. 2008). Solo en un estudio reciente (Azpiazu et al. 2014) se han relacionado las proteínas espermáticas con la consecución o no del embarazo, pero a diferencia de la tesis que nos ocupa en la que se analizaron las muestras de manera individual, en este estudio se utilizaron pools de muestras. Por tanto podemos decir que esta tesis constituye el primer caso de análisis individualizado del proteoma espermático y su relación con el éxito reproductivo.

Aunque los resultados obtenidos por los estudios mencionados anteriormente son relevantes, es sabido que las aproximaciones proteómicas basadas en 2D-DIGE permiten la identificación minoritaria del proteoma espermático cuando se compara con el poder de detección de las técnicas actuales de alto rendimiento basadas en LC-MS/MS. En esta tesis se ha utilizado un análisis de LC-MS/MS muy novedoso como es el SWATH, el cual nos ha permitido realizar un análisis de muestras de semen individualizadas incluso con un número muy reducido de espermatozoides, sin tener que recurrir a los pools o mezclas de muestras.

La principal característica de este tipo de análisis SWATH es que para poder caracterizar el proteoma de los espermatozoides, primero es necesaria la

elaboración de una librería de todas aquellas proteínas presentes en los espermatozoides para después poder cuantificar las proteínas encontradas en las muestras. Con el fin de ampliar al máximo las proteínas identificadas en esta librería, las muestras utilizadas para su elaboración procedían de donantes y pacientes con diferentes características, obteniéndose un total de 2946 proteínas (anexo 1), que han sido depositadas en el repositorio PRIDE.

Hasta la fecha los estudios proteómicos elevan el número de proteínas a 6198 involucradas en diferentes vías celulares, estimándose que ya se han identificado alrededor del 78% de las proteínas espermáticas pero quedan aún un 22% restante por identificar (Amaral et al. 2014). Con todo esto podríamos decir que el proteoma del espermatozoide humano puede estar compuesto al menos por 7500 proteínas diferentes, entre ellas proteínas implicadas en el metabolismo de los ARNs y regulación de la traducción de los mismos, procesos que se creían inexistentes. De hecho, un estudio reciente en el que hemos participado y que tenía como objeto completar el actual catálogo del proteoma humano con proteínas todavía no identificadas, analizó espermatozoides (por creer que serían en estas células donde se encontraban las proteínas que faltaban para completar el proteoma) y encontraron 97 proteínas no identificadas hasta la fecha entre las que destacaban DNAH3 (dineína 3 de cadena pesada) involucrada en la motilidad del espermatozoide e implicada en el montaje flagelar del espermatozoide y TEPP (proteína de testículo, próstata y placenta) (Garin-Muga et al. 2016).

Estas dos proteínas se encuentran en nuestra librería. Sin embargo, solo una de ellas, la DNAH3 se encuentra entre las 2228 (anexo 2) proteínas identificadas en las muestras del estudio, pero su p valor es >0.05 (p valor =

0,68226), por tanto no presenta diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

Dentro de estas 2228 proteínas identificadas a partir de las 8 muestras procedentes de pacientes del grupo E (n=4) y NE (n=4), escogimos aquellas que presentaban un p valor < 0,05, obteniendo un total de 53 proteínas. De estas 53 proteínas, 37 se encontraban en mayor cantidad en el grupo E y correspondían con aquellas con tasa de cambio con valor positivo; y 16 se encontraban en menor cantidad en el grupo E, refiriéndonos a aquellas con tasa de cambio con valor negativo. Dentro de estas proteínas, 8 presentaban funciones implicadas en la fertilidad y en el espermatozoide ya descritas. Siete de ellas se encontraban en mayor cantidad en el grupo E y solo 1 de ellas se encontraba en mayor cantidad en el grupo NE. Las funciones en las que estaban involucradas estas proteínas están relacionadas con la espermatogénesis, la fertilidad (fecundación y desarrollo embrionario) y capacitación espermática. Sin embargo esta última función correspondía a la proteína que se encontraba en mayor cantidad en el grupo NE, lo cual encaja perfectamente con información que se encuentra en la base de datos Uniprot, donde indica que esta proteína se encuentra fosforilada en los residuos de serina y treonina en la región acrosomal de la cabeza del espermatozoide, la pieza media y el flagelo, de espermatozoides no capacitados, los cuales al no haber capacitado y realizado la reacción acrosómica, no tienen actividad fecundante.

Cuando comparamos estos resultados con el artículo de Azpiazu (Azpiazu et al. 2014) en el cual identificaron 1717 proteínas, de las cuales el número de proteínas diferenciales identificadas fueron 66, 31 de ellas disminuidas en el

grupo NE y 35 aumentadas en este mismo grupo según el ratio NE/E, observamos que ninguna de ellas se encontraban identificadas en nuestro análisis a pesar de ser valores similares de proteínas significativas e incluso entre grupos, lo que denota la gran variabilidad y la gran cantidad de proteínas que forman el espermatozoide, y la cantidad de estudios que necesitamos para dilucidar el proteoma completo de un espermatozoide que dé lugar a gestación y de otro que no lo haga.

Intentando buscar una explicación a esta gran diferencia entre los dos grupos y teniendo en cuenta la bibliografía disponible de temas más o menos relacionados y en la misma línea, se podría pensar que, como ya estudiaron García-Herrero y cols. en transcriptómica (García-Herrero et al. 2010b, García-Herrero et al. 2011), las proteínas encontradas sean diferentes en función de la TRA empleada, necesitándose menos requerimiento moleculares cuanto más invasiva es la técnica. Esto justo es lo que ha podido suceder aquí puesto que en el estudio de Azpiazu (Azpiazu et al. 2014) las muestras analizadas provenían de ciclos de FIV y las de esta tesis de ICSI.

Sin embargo, las proteínas identificadas en ambos estudios procedían de diferentes partes subcelulares (núcleo, mitocondria,..) o eran proteínas secretadas que podían participar en la interacción espermatozoide-ovocito (proteína de ensamblaje de nucleosomas 1-like-1, subunidad de la enzima trifuncional alfa mitocondrial y glicoproteína 1 de membrana asociada a los lisosomas respectivamente) y presentaban funciones similares (de unión y actividad catalítica).

Si echamos un vistazo a toda la bibliografía disponible, donde existen estudios que caracterizan el proteoma de espermatozoides con espermiograma anormal o incluso comparan muestras de pacientes normozoospermicos con donantes (de Mateo et al. 2007), vemos que hay proteínas como la glutamina sintetasa (GLNA) que participa en metabolismo; la piruvato deshidrogenasa X (ODPX) que participa en el ciclo de ácido tricarboxílico; la isocitrato deshidrogenasa (IDH3A) que participa en la respiración; la proteína de fibra densa externa (ODF2) que participa en la composición de la cola del espermatozoide y su movimiento; la annexina 5 (ANXA5) que participa en la unión y reconocimiento del espermatozoide y el ovocito, que a pesar de sí encontrarse entre las 2228 proteínas identificadas en nuestras muestras (anexo 2), no lo han hecho de manera significativa.

Comparando nuestros resultados con estudios donde analizaban las proteínas que se encontraban en muestras de pacientes astenozoospermicos, Martínez-Heredia y cols. (Martínez-Heredia et al. 2008) encontraron variaciones de 17 proteínas en muestras astenozoospermicas, pero ninguna de ellas por sí sola, era única responsable del estado espermático. En nuestras 2228 proteínas identificadas en las muestras analizadas, encontramos 12 de estas 17 proteínas: Annexina 5, PIP, precursor de la dihidrolipoamida deshidrogenasa, precursor de la fumarato hidratasa, proteína de choque térmico 70, precursor-3-mercapto-piruvato-sulfurtransferasa, delta-3,5-delta-2,4-dienoil-CoA-isomerasa, proteína A9 de unión al calcio S100, precursor de cluster, inositol-1-monofosfato, proteasoma subunidad 3 beta y precursor de semenogelina. Las dos primeras, se encontraban disminuidas en ambos estudios (es decir, en las muestras astenozoospermicas y en las del grupo E); las cinco siguientes, se encuentran aumentadas en ambos

estudios; y el resto se comportaban de manera contraria en ambos estudios. Esto en principio no debería tener mucho sentido, ya que en teoría una muestra astenozoospermica es una muestra con resultado del espermograma anormal y ninguna de las muestras de esta tesis con las que se ha realizado la comparación presentaba astenozoospermia (tabla 18). Además, las proteínas que coinciden con las de nuestro estudio, son proteínas que pertenecen al grupo E, en vez del al grupo NE, que sería lo más lógico al tratarse de muestras con alteración en la movilidad.

Aún con todos estos resultados decidimos ir un poco más allá en el análisis estadístico de las proteínas identificadas, y además de identificar las proteínas que se encontraban de manera diferencial entre los dos grupos de estudio y que a su vez su diferencia era estadísticamente significativa, realizamos un análisis de regresión múltiple.

Debido a la gran cantidad de datos obtenidos, se empleó el método de regresión múltiple Elastic-Net con el fin de conocer que proteínas explicaban mejor la diferencia entre los dos grupos, es decir, que proteínas tenían más importancia o más peso a la hora de diferenciar los grupos de estudio.

Con este análisis pudimos observar como las muestras se clasificaban perfectamente según al grupo al que pertenecían y además vimos que proteínas estaban en menor o mayor cantidad en el grupo E. De esta forma, identificamos 27 proteínas, 17 incrementadas en el grupo E y 10 disminuidas en este mismo grupo. De las 17 incrementadas en el grupo E, existen proteínas que aún no han sido caracterizadas, por lo que sería una buena línea de investigación posterior,

sobre todo si tenemos en cuenta las proteínas que además presenten una mayor tasa de cambio o diferencia significativa. De hecho, 3 de las proteínas incrementadas en el grupo E, WDR63, TSSK6 y PHKG2 presentaban funciones de desarrollo testicular, producción y función del espermatozoides jugando un papel en la condensación de ADN durante la remodelación de la cromatina postmeiótica y de regulación de la glucólisis en los testículos, respectivamente. También 4 de ellas (proteína rica en cisteína 2, aminotransferasa de cadena ramificada aminoácida mitocondrial, proteína D que contiene dominio IQ y proteína relacionada con Dickkopf 1) no aparecen entre las 53 proteínas diferenciadas de manera significativa, ya que su p valor es $>0,05$. Sin embargo, sí que contribuyen a diferenciar los dos grupos de estudio en gran medida. Como también lo hace la técnica PLS-DA, que demostró que las muestras aparecían correctamente agrupadas, a la vez que nos permitió (mediante el *vip score*) determinar cuáles de las proteínas son más importantes a la hora de predecir si se va a lograr un embarazo o no.

Al comparar las proteínas obtenidas con el método Elastic-Net con aquellas que presentan un *vip score* $>1,5$, vimos que todas estas proteínas del Elastic-Net se encontraban entre las proteínas que mayor influencia tienen sobre la variable respuesta, es decir, sobre el embarazo. Por lo que el estudio minucioso de estas proteínas y su función, que además de ser de las que mejor diferencian los dos grupos (E y NE) son proteínas que tienen gran influencia en el éxito reproductivo, nos puede dar mucha información y podrían ser susceptibles de ser biomarcadores moleculares de la calidad espermática y del éxito reproductivo.

Mediante el análisis funcional de todos nuestros hallazgos, esclarecimos datos importantes en cuanto a las proteínas presentes en los espermatozoides, su función y el éxito reproductivo.

Tras analizar las proteínas obtenidas mediante el análisis de redes STRING, nos dimos cuenta que aquellas que se encontraban en mayor cantidad en el grupo E tenían funciones relacionadas con: espermatogénesis, la fertilidad, diferenciación celular, actividad antioxidante, movimiento flagelar y estructural (flagelo, cilios). Sin embargo, las que se encontraban en mayor cantidad en el grupo NE participaban en: traducción (componente ribosomal), actividad óxido-reductasa, unión ARN, unión cadherina, factor transcripción, apoptosis, regulación celular, cadena respiración mitocondrias, transporte iones (canales) y división celular. Es decir, aquellas proteínas que pertenecían al grupo E estaban más relacionadas con la reproducción, mientras que las que se encontraban en el grupo NE se relacionaban con la función energética, transcripción-traducción y transporte de iones.

Pero puesto que la idea final de esta tesis era, además de identificar el perfil proteico de muestra que embarazan o no, obtener proteínas susceptibles de ser separadas por MACS, se buscaron todas aquellas proteínas que se encontraban en la membrana del espermatozoide, requisito indispensable para seleccionar espermatozoides mediante esta técnica. De esta forma encontramos 11 proteínas cuyas funciones eran diversas. Algunas de ellas se encontraban en el grupo E, otras en el NE, otras presentaban significancia estadística, otras no, y otras con *vip score* >1,5. Por ejemplo ATP1A3 que se encontraba en el grupo E y presentaba significancia estadística podría ser susceptible de ser separada por

MACS por estar en la membrana y ser un transportador de iones necesario para los cambios que experimenta los espermatozoides en su camino al óvulo. IZUMO3, que es esencial en la unión del espermatozoide con el ovocito (en ratón) también se encuentra en membrana y en el grupo E, aunque sin significancia estadística respecto al grupo NE, igual que KCNU1, y con un papel crítico en la fertilidad por ser canal de potasio, y al contrario que CD81 que aunque participa en la fusión espermatozoide ovocito, además de en la movilidad celular, se encuentra en mayor cantidad en el grupo NE. Esta última que parece contradictoria se debe a que los espermatozoides presentan CD81 en la membrana que recubre el acrosoma del espermatozoide, pero cuando ocurre la reacción acrosómica y el espermatozoides está preparado para fecundar o está capacitado, desaparece, por lo que sería una buena molécula para separar cuando queramos separar espermatozoides ya capacitados para las TRAs. Otras proteínas de membrana podrían servir para terapia antitumoral testicular (SLCO6A1 (E) y STEAP4 (NE)). Por último, aquellas más importantes son: LAMP1 que presenta significancia estadística, vip score >1,5 y se encuentra en el grupo E; y SLC2A3 que presenta vip score > 1,5 pero no significancia estadística, también en el grupo E. La primera se ha visto muy recientemente que favorece la eliminación de espermatozoides por parte de las células de Sertoli en los túbulos seminíferos (Ahmed et al. 2017). Y la segunda es un transportador de glucosa que se expresa en los testículos normales con buena espermatogénesis y en espermatozoides.

Estas proteínas son potenciales marcadores o indicadores de fertilidad o infertilidad y de selección positiva (para su uso reproductivo) o negativa (para su descarte) mediante el uso de la técnica de MACS. Con ellas, de forma individualizada o en conjunto, se podría establecer un protocolo de separación de

la técnica MACS que nos permitiera separar espermatozoides fisiológica y reproductivamente competentes.

Finalmente con la base de datos DAVID obtuvimos una interpretación funcional de todas las proteínas, y vimos que las proteínas totales del análisis presentaban procesos enriquecidos de actividad ribosomal, ARN transferencia, producción de proteínas, biosíntesis de proteínas y traducción, a diferencia de lo que se pensaba. Lo cual se confirmó cuando analizamos los procesos en las proteínas obtenidas con PLS-DA y *vip score* > 1,5, además de presentar funciones de movimiento ciliar y generación de energía (mitocondria). De igual forma que pasaba anteriormente en el análisis STRING, es curioso que aquellas proteínas que se encuentran en el grupo E mayoritariamente, tiene funciones de energía, movimiento ciliar y desarrollo celular; mientras que las del grupo NE, presentan funciones de unión, transcripción, traducción, como si los espermatozoides del grupo NE estuvieran en proceso de maduración a diferencia de los del grupo E que ya están diferenciados, y por eso no tuvieran capacidad fecundante.

Toda esta información desvelaba que efectivamente el 22% del proteoma del espermatoide que queda por identificar incluye proteínas implicadas en el metabolismo de los ARNs y regulación de la traducción de las mismas, procesos que se creían inexistentes, encontrando en esta tesis muchas de esas proteínas debido a su implicación en estos procesos.

Gracias a todos los estudios que existen hoy en día sobre proteómica en los espermatozoides, se sabe que cualquier proteína que dé lugar a alguna modificación epigenética que ocurra durante la espermatogénesis podría dar

lugar a ajustes metabólicos; y a la inversa, los cambios metabólicos también pueden inducir alteraciones de la cromatina (Amaral et al. 2014). Incluso se ha visto que existe relación entre el metaboloma de una célula y su epigenoma (Martinez-Pastor et al. 2013), y que algunas proteínas participan en la oxidación de los lípidos que pueden dar lugar a alteraciones en la motilidad, e incluso sus niveles alterados pueden dar lugar a individuos infértiles, como es el caso de las proteínas peroxisomales que oxidan los ácidos grasos de cadena larga (Kaczmarek et al. 2011).

Describir el catálogo de las proteínas que constituyen el espermatozoide humano es crucial para definir "de qué se compone el espermatozoide". Ahora que casi tenemos este conocimiento completo, es el momento de traducir las listas de proteínas espermáticas en interactomas funcionales. Esta tesis ha abierto el camino hacia ese objetivo, ya que aunque se han analizado las funciones de algunas proteínas, la relevancia de las mismas está poco clara de momento. Los futuros experimentos deben tener como objetivo determinar cuáles son los papeles de estas proteínas espermáticas. Además, debemos intentar investigar la hipótesis de que las proteínas paternas específicas pueden ser protagonistas clave en el desarrollo embrionario temprano.

A la vista de todos los resultados, el conjunto de lípidos y proteínas presentes en el espermatozoide es altamente heterogéneo y difícilmente caracterizable.

Además, la principal limitación de nuestro estudio es la cantidad de factores que influyen en la consecución o no del embarazo y que nosotros no

podemos controlar. Sin embargo se ha intentado estandarizar al máximo todos los factores posibles para que fuera el factor masculino el que mayor peso tuviese, sobre todo el factor femenino, escogiendo pacientes incluidas en el programa de ovodonación. Aun así, no se pueden descartar las alteraciones inherentes al espermatozoide y al ovocito. Por lo que el diseño experimental ha supuesto una cuidadosa selección y recolección de las muestras estudiadas en esta tesis. Aunque lo ideal hubiese sido poder analizar el espermatozoide que individualmente conseguía la gestación, al tratarse de técnicas invasivas que destruyen la muestra, ha sido imposible.

Concluyendo, aunque en última instancia sólo un espermatozoide será responsable de la fecundación del ovocito, todavía no existe la técnica que nos permita evaluar y elegir el espermatozoide que será microinyectado y dará lugar a un RNV sano. Por tanto, dilucidar las causas de la infertilidad masculina idiopática, cada vez más presente y creciente en la sociedad, es uno de los mayores desafíos de la andrología. Aunque conseguir esta meta puede ser difícil desde el punto de vista que estamos estudiando un resultado (gestación sí o no) a partir del estudio de dos entes individuales, un gameto femenino y otro masculino, las técnicas ómicas y su creciente desarrollo contribuirán al esclarecimiento de los mecanismos moleculares que dan lugar a este tipo de infertilidad y desvelará los componentes clave de los espermatozoides necesarios para ayudar a seleccionar los espermatozoides más exitosos.

Aun así, la información obtenida contribuye a la elaboración del catálogo de lípidos y proteínas que nos permitirá conocer las funciones del espermatozoide y aumentará la evidencia que sugiere que la infertilidad masculina no depende de

una molécula sino de un conjunto de ellas, y su regulación puede ser necesaria para el desarrollo embrionario normal.

Lo que sí sabemos por los resultados obtenidos, es que existen diferencias entre las muestras que embarazan y las que no en cuanto al perfil lipídico y proteico se refiere, y muchos de los lípidos y sobre todo de las proteínas identificadas solas o en conjunto, nos podrían ayudar a elegir el mejor espermatozoide para conseguir un embarazo.

Esta tesis pretende ayudar a esclarecer o a aumentar el conocimiento sobre los componentes moleculares que forman el espermatozoide y que participan activamente en el proceso de reproducción bien positiva (embarazando) o negativamente (no embarazando), con el fin de encontrar biomarcadores moleculares que permitan el desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico y/o selección espermática que complementen al espermiograma en la práctica diaria del laboratorio.

Aun así, necesitamos de más estudios que profundicen en estos hallazgos y caractericen e identifiquen bien que moléculas SI y cuáles NO, dan lugar a una gestación evolutiva y a un RNV.

VII. CONCLUSIONES

Hoy te sobran motivos para no necesitar razones

VII.CONCLUSIONES

1. El perfil global de lípidos identificados presentes en espermatozoides que dan lugar a un embarazo y aquellos que no, no permite separar las muestras en función de su capacidad fecundante. No obstante, hemos descrito una serie de lípidos en concreto que, tras una futura validación, nos permitirían diferenciar las muestra que embarazan de las que no.

Estos potenciales marcadores de fertilidad espermática no han sido descritos previamente en ninguna función relacionada con la reproducción.
2. Todos los lípidos y familias de lípidos que se han encontrado en mayor cantidad de forma estadísticamente significativa en las muestras analizadas, se encontraban en las muestras del grupo NE.
3. Las ceramidas, presentan una prometedora habilidad predictiva para pronosticar el embarazo.
4. Se ha realizado una de las caracterizaciones más completas del perfil proteico de los espermatozoides.
5. El análisis proteico diferencial de los espermatozoides, ha permitido observar proteínas en los grupos de estudio que presentan funciones

y participan en procesos biológicos relacionados con la reproducción, pudiendo ser utilizadas como biomarcadores espermáticos.

6. Algunas de las proteínas identificadas y ubicadas en la membrana de los espermatozoides, las cuales tienen funciones relacionadas con la reproducción, son susceptibles de ser biomarcadores espermáticos y ser capaces de separar espermatozoides con capacidad fecundante o no, mediante la técnica de MACS.
7. Entre las proteínas diferenciales, se encuentran algunas implicadas en el metabolismo de los ARNs y la regulación de la traducción de los mismos, procesos que se creían inexistentes en el espermatozoide, lo cual podría representar el 22% del proteoma del espermatozoide que queda por conocer.
8. El uso de la técnica UHPLC-MS y el análisis de SWATH-MS podría ser una posibilidad real para predecir los resultados de reproducción asistida, que deberá contrastarse prospectivamente en un estudio clínico para determinar la capacidad de clasificación y selección espermática de estas técnicas.
9. La combinación de marcadores lipídicos y proteicos descritos en este trabajo podría incrementar la capacidad predictiva de la habilidad fecundante del espermatozoide en un análisis tipo MACS.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

Es el momento de hacer más cosas por primera vez

VIII.BIBLIOGRAFÍA

Ahmed N, Yang P, Huang Y, Chen H, Liu T, Wang L, Nabi F, Liu Y and Cheng Q, Entosis Acts as a Novel Way within Sertoli Cells to Eliminate Spermatozoa in Seminiferous Tubule. *Front Physiol* 2017;**8**:368.

Aitken RJ, Muscio L, Whiting S, Connaughton HS, Fraser BA, Nixon B, Smith ND and De Iuliis GN. Analysis of the effects of polyphenols on human spermatozoa reveals unexpected impacts on mitochondrial membrane potential, oxidative stress and DNA integrity; implications for assisted reproductive technology. *Biochem Pharmacol* 2016;**121**:78-96.

Alamá P and Remohí J. Análisis de la Evolución de los Estudios y tratamientos de la infertilidad. In Matorras R, Coroleu B, Romeu A and Pérez F (eds). Libro Blanco Sociosanitario. "La infertilidad en España: Situación actual y perspectivas". *Imago Concept & Image Development, S L* 2011:43-52.

Alikani M, Calderon G, Tomkin G, Garrisi J, Kokot M and Cohen J. Cleavage anomalies in early human embryos and survival after prolonged culture in-vitro. *Hum Reprod* 2000;**15**:2634-2643.

Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Hum Reprod* 2011;**26**:1270-1283.

Altmae S and Salumets A. A novel genomic diagnostic tool for sperm quality?. *Reprod Biomed Online* 2011;**22**:405-407.

Amaral A, Castillo J, Ramalho-Santos J and Oliva R. The combined human sperm proteome: cellular pathways and implications for basic and clinical science. *Hum Reprod Update* 2014;**20**:40-62.

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

ASEBIR. Cuadernos de Embriología Clínica II. Criterios ASEBIR de valoración morfológica de oocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos. 3º edn. 2015:.

ASEBIR. Cuadernos de Embriología Clínica II. Criterios ASEBIR de valoración morfológica de oocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos. 2º edn 2008:.

Azpiazu R, Amaral A, Castillo J, Estanyol JM, Guimera M, Ballesca JL, Balasch J and Oliva R. High-throughput sperm differential proteomics suggests that epigenetic alterations contribute to failed assisted reproduction. *Hum Reprod* 2014;**29**:1225-1237.

Baccetti B. Microscopical advances in assisted reproduction. *J Submicrosc Cytol Pathol* 2004;**36**:333-339.

Baker M. Metabolomics: from small molecules to big ideas. . *Nature Methods* 2011;**8**:117-21.

Baker MA and Aitken RJ. Proteomic insights into spermatozoa: critiques, comments and concerns. *Expert Rev Proteomics* 2009;**6**:691-705.

Barr J, Caballeria J, Martinez-Arranz I, Dominguez-Diez A, Alonso C, Muntane J, Perez-Cormenzana M, Garcia-Monzon C, Mayo R, Martin-Duce A *et al*. Obesity-dependent metabolic signatures associated with nonalcoholic fatty liver disease progression. *J Proteome Res* 2012;**11**:2521-2532.

Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F, Kogosovsky A, Yagoda A, Lederman H, Artzi S, Gross M and Barak Y. Pregnancy rates are higher with intracytoplasmic morphologically selected sperm injection than with conventional intracytoplasmic injection. *Fertil Steril* 2003;**80**:1413-1419.

Bedair M and Sumner L. Current and emerging mass-spectrometry technologies for metabolomics. . *Trends in Analytical Chemistry* 2008;**27(3)**:238-250.

Beirao J, Zilli L, Vilella S, Cabrita E, Schiavone R and Herraes MP. Improving sperm cryopreservation with antifreeze proteins: effect on gilthead seabream (*Sparus aurata*) plasma membrane lipids. *Biol Reprod* 2012;**86**:59.

Benadiva CA, Nulsen J, Siano L, Jennings J, Givargis HB and Maier D. Intracytoplasmic sperm injection overcomes previous fertilization failure with conventional in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1999;**72**:1041-1044.

Benagiano G, Bastianelli C and Farris M. Infertility: a global perspective. *Minerva Ginecol* 2006;**58**:445-457.

Berkovitz A, Eltes F, Lederman H, Peer S, Ellenbogen A, Feldberg B and Bartoov B. How to improve IVF-ICSI outcome by sperm selection. *Reprod Biomed Online* 2006;**12**:634-638.

Bernabo N, Greco L, Ordinelli A, Mattioli M and Barboni B. Capacitation-Related Lipid Remodeling of Mammalian Spermatozoa Membrane Determines the Final Fate of Male Gametes: A Computational Biology Study. *OMICS* 2015;**19**:712-721.

Bonduelle M, Van Assche E, Joris H, Keymolen K, Devroey P, Van Steirteghem A and Liebaers I. Prenatal testing in ICSI pregnancies: incidence of chromosomal anomalies in 1586 karyotypes and relation to sperm parameters. *Hum Reprod* 2002;**17**:2600-2614.

Boomsma CM, Heineman MJ, Cohlen BJ and Farquhar C. Semen preparation techniques for intrauterine insemination. *Cochrane Database Syst Rev* 2007;**(4)**:CD004507.

Borini A, Bianchi L, Violini F, Maccolini A, Cattoli M and Flamigni C. Oocyte donation program: pregnancy and implantation rates in women of different ages sharing oocytes from single donor. *Fertil Steril* 1996;**65**:94-97.

Botta T, Blescia S, Martinez-Heredia J, Lafuente R, Brassesco M, Balleca J and et al. Identification of proteomic differences in oligozoospermic sperm samples. . *Rev Int Androl* 2009;**7**:14-9.

Brewis IA and Gadella BM. Sperm surface proteomics: from protein lists to biological function. *Mol Hum Reprod* 2010;**16**:68-79.

Brugo-Olmedo S, Chillik C and Kopelman S. Definición y causas de la infertilidad. . *RCOG* 2003;**54**:227-248.

Buffone MG, Verstraeten SV, Calamera JC and Doncel GF. High cholesterol content and decreased membrane fluidity in human spermatozoa are associated with protein tyrosine phosphorylation and functional deficiencies. *J Androl* 2009;**30**:552-558.

Burton L, Ivosev G, Tate S, Impey G, Wingate J and Bonner R. Instrumental and experimental effects in LC-MS-based metabolomics. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2008;**871**:227-235.

Bylesjö M. OPLS discriminant analysis: combining the strengths of PLS-DA and SIMCA classification. *J Chemometr* 2006;**20**:341.

Camprubi C, Pladevall M, Grossmann M, Garrido N, Pons MC and Blanco J. Semen samples showing an increased rate of spermatozoa with imprinting errors have a negligible effect in the outcome of assisted reproduction techniques. *Epigenetics* 2012;**7**:1115-1124.

Carrell DT, Emery BR and Hammoud S. Altered protamine expression and diminished spermatogenesis: what is the link?. *Hum Reprod Update* 2007;**13**:313-327.

Chemes HE and Alvarez Sedo C. Tales of the tail and sperm head aches: changing concepts on the prognostic significance of sperm pathologies affecting the head, neck and tail. *Asian J Androl* 2012;**14**:14-23.

Cooper T. The Epididymis, Sperm Maturation and Fertilization. *Springer-Verlag, Heidelberg* 1986:.

de Mateo S, Castillo J, Estanyol JM, Balleca JL and Oliva R. Proteomic characterization of the human sperm nucleus. *Proteomics* 2011;**11**:2714-2726.

de Mateo S, Martinez-Heredia J, Estanyol JM, Dominguez-Fandos D, Vidal-Taboada JM, Balleca JL and Oliva R. Marked correlations in protein expression identified by proteomic analysis of human spermatozoa. *Proteomics* 2007;**7**:4264-4277.

Deepinder F, Chowdary HT and Agarwal A. Role of metabolomic analysis of biomarkers in the management of male infertility. *Expert Rev Mol Diagn* 2007;**7**:351-358.

du Plessis SS, Kashou AH, Benjamin DJ, Yadav SP and Agarwal A. Proteomics: a subcellular look at spermatozoa. *Reprod Biol Endocrinol* 2011;**9**:36-7827-9-36.

Dunbar BS, Bosire RV and Deckelbaum RJ. Omega 3 and omega 6 fatty acids in human and animal health: an African perspective. *Mol Cell Endocrinol* 2014;**398**:69-77.

Duportet Xea. The biological interpretation of metabolomics data can be misled by the extraction method used. . *Metabolomics* 2012;**8**:410-421.

Egea RR, Puchalt NG, Escriva MM and Varghese AC. OMICS: Current and future perspectives in reproductive medicine and technology. *J Hum Reprod Sci* 2014;**7**:73-92.

Egozcue J, Blanco J and Vidal F. Chromosome studies in human sperm nuclei using fluorescence in-situ hybridization (FISH). *Hum Reprod Update* 1997;**3**:441-452.

Esbert M, Pacheco A, Vidal F, Florensa M, Riqueros M, Ballesteros A, Garrido N and Calderon G. Impact of sperm DNA fragmentation on the outcome of IVF with own or donated oocytes. *Reprod Biomed Online* 2011;**23**:704-710.

Escriba MJ, Bellver J, Bosch E, Sanchez M, Pellicer A and Remohi J. Delaying the initiation of progesterone supplementation until the day of fertilization does not compromise cycle outcome in patients receiving donated oocytes: a randomized study. *Fertil Steril* 2006;**86**:92-97.

ESHRE.<https://www.eshre.eu/guidelines-and-legań/ART-fact-sheet.aspx> 2014:2016:

ESHRE Capri Workshop. Guidelines to the prevalence, diagnosis, treatment and management of infertility. *Human Reproduction* 1996:.

ESHRE Capri Workshop Group. Intrauterine insemination. *Hum Reprod Update* 2009;**15**:265-277.

Fabelo N, Martin V, Gonzalez C, Alonso A and Diaz M. Effects of oestradiol on brain lipid class and Fatty Acid composition: comparison between pregnant and ovariectomised oestradiol-treated rats. *J Neuroendocrinol* 2012;**24**:292-309.

Fahy E, Subramaniam S, Murphy RC, Nishijima M, Raetz CR, Shimizu T, Spener F, van Meer G, Wakelam MJ and Dennis EA. Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids. *J Lipid Res* 2009;**50 Suppl**:S9-14.

Fiorentino F, Spizzichino L, Bono S, Biricik A, Kokkali G, Rienzi L, Ubaldi FM, Iammarrone E, Gordon A and Pantos K. PGD for reciprocal and Robertsonian translocations using array comparative genomic hybridization. *Hum Reprod* 2011;**26**:1925-1935.

Flesch FM and Gadella BM. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochim Biophys Acta* 2000;**1469**:197-235.

Force A, Grizard G, Giraud MN, Motta C, Sion B and Boucher D. Membrane fluidity and lipid content of human spermatozoa selected by swim-up method. *Int J Androl* 2001;**24**:327-334.

Fu-Jun L and Xiao-Fang S. Comparative analysis of human reproductive proteomes identifies candidate proteins of sperm maturation. *Mol Biol Rep* 2012;**39**:10257-10263.

Funk CD. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* 2001;**294**:1871-1875.

Garcia BM, Fernandez LG, Ferrusola CO, Salazar-Sandoval C, Rodriguez AM, Martinez HR, Tapia JA, Morcuende D and Pena FJ. Membrane lipids of the stallion spermatozoon in relation to sperm quality and susceptibility to lipid peroxidation. *Reprod Domest Anim* 2011;**46**:141-148.

Garcia-Herrero S, Garrido N, Martinez-Conejero JA, Remohi J, Pellicer A and Meseguer M. Differential transcriptomic profile in spermatozoa achieving pregnancy or not via ICSI. *Reprod Biomed Online* 2011;**22**:25-36.

Garcia-Herrero S, Garrido N, Martinez-Conejero JA, Remohi J, Pellicer A and Meseguer M. Ontological evaluation of transcriptional differences between sperm of infertile males and fertile donors using microarray analysis. *J Assist Reprod Genet* 2010a;**27**:111-120.

Garcia-Herrero S, Meseguer M, Martinez-Conejero JA, Remohi J, Pellicer A and Garrido N. The transcriptome of spermatozoa used in homologous intrauterine insemination varies considerably between samples that achieve pregnancy and those that do not. *Fertil Steril* 2010b;**94**:1360-1373.

Garin-Muga A, Odriozola L, Martinez-Val A, Del Toro N, Martinez R, Molina M, Cantero L, Rivera R, Garrido N, Dominguez F *et al.* Detection of Missing Proteins Using the PRIDE Database as a Source of Mass Spectrometry Evidence. *J Proteome Res* 2016;**15**:4101-4115.

Garrido N, Melo MA, Simón C, Remohí J, Pellicer A, Meseguer M. Ovarian stimulation length, number of follicles higher than 17 mm and estradiol on the day of human chorionic gonadotropin administration are risk factors for multiple pregnancy in intrauterine insemination. *Reproductive Medicine and Biology* 2007;**6**(1):19-26.

Garrido N, Bellver J, Remohi J, Simon C and Pellicer A. Cumulative live-birth rates per total number of embryos needed to reach newborn in consecutive in vitro fertilization (IVF) cycles: a new approach to measuring the likelihood of IVF success. *Fertil Steril* 2011;**96**:40-46.

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

Garrido N, Martinez-Conejero JA, Jauregui J, Horcajadas JA, Simon C, Remohi J and Meseguer M. Microarray analysis in sperm from fertile and infertile men without basic sperm analysis abnormalities reveals a significantly different transcriptome. *Fertil Steril* 2009;**91**:1307-1310.

Garrido N, Remohi J, Martinez-Conejero JA, Garcia-Herrero S, Pellicer A and Meseguer M. Contribution of sperm molecular features to embryo quality and assisted reproduction success. *Reprod Biomed Online* 2008;**17**:855-865.

Gianaroli L, Magli MC, Collodel G, Moretti E, Ferraretti AP and Baccetti B. Sperm head's birefringence: a new criterion for sperm selection. *Fertil Steril* 2008;**90**:104-112.

Gillet LC, Navarro P, Tate S, Rost H, Selevsek N, Reiter L, Bonner R and Aebersold R. Targeted data extraction of the MS/MS spectra generated by data-independent acquisition: a new concept for consistent and accurate proteome analysis. *Mol Cell Proteomics* 2012;**11**:O111.016717.

Gil-Salom M, Romero J, Rubio C, Ruiz A, Remohi J and Pellicer A. Intracytoplasmic sperm injection with cryopreserved testicular spermatozoa. *Mol Cell Endocrinol* 2000;**169**:15-19.

Griffiths WJ, Karu K, Hornshaw M, Woffendin G and Wang Y. Metabolomics and metabolite profiling: past heroes and future developments. *Eur J Mass Spectrom (Chichester)* 2007;**13**:45-50.

Grunewald S, Miska W, Miska G, Rasch M, Reinhardt M, Glander HJ and Paasch U. Molecular glass wool filtration as a new tool for sperm preparation. *Hum Reprod* 2007;**22**:1405-1412.

Grunewald S, Paasch U and Glander HJ. Enrichment of non-apoptotic human spermatozoa after cryopreservation by immunomagnetic cell sorting. *Cell Tissue Bank* 2001;**2**:127-133.

Gupta A, Mahdi AA, Ahmad MK, Shukla KK, Jaiswer SP and Shankhwar SN. ¹H NMR spectroscopic studies on human seminal plasma: a probative discriminant function analysis classification model. *J Pharm Biomed Anal* 2011;**54**:106-113.

Gupta N, Pentakota S, Mishra LN, Jones R and Rao MR. Identification of Posttranslational Modifications of Endogenous Chromatin Proteins From Testicular Cells by Mass Spectrometry. *Methods Enzymol* 2017;**586**:115-142.

Guyonnet B, Dacheux F, Dacheux JL and Gatti JL. The epididymal transcriptome and proteome provide some insights into new epididymal regulations. *J Androl* 2011;**32**:651-664.

Haidl G and Opper C. Changes in lipids and membrane anisotropy in human spermatozoa during epididymal maturation. *Hum Reprod* 1997;**12**:2720-2723.

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

Hassold T and Hunt P. To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nat Rev Genet* 2001;**2**:280-291.

Holt WV and North RD. The role of membrane-active lipids in the protection of ram spermatozoa during cooling and storage. *Gamete Res* 1988;**19**:77-89.

Hopfgartner G, Tonoli D and Varesio E. High-resolution mass spectrometry for integrated qualitative and quantitative analysis of pharmaceuticals in biological matrices. *Anal Bioanal Chem* 2012;**402**:2587-2596.

Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL, Fulton N, Milne PA and Aitken RJ. DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *J Androl* 2000;**21**:33-44.

Jolliffe I. Principal component analysis. *2nd ed New York. Springer* 2002:.

Kaczmarek K, Studencka M, Meinhardt A, Wieczerek K, Thoms S, Engel W and Grzmil P. Overexpression of peroxisomal testis-specific 1 protein induces germ cell apoptosis and leads to infertility in male mice. *Mol Biol Cell* 2011;**22**:1766-1779.

Kaeoket K, Sang-urai P, Thamniyom A, Chanapiwat P and Techakumphu M. Effect of docosahexaenoic acid on quality of cryopreserved boar semen in different breeds. *Reprod Domest Anim* 2010;**45**:458-463.

Kawano N, Yoshida K, Miyado K and Yoshida M. Lipid rafts: keys to sperm maturation, fertilization, and early embryogenesis. *J Lipids* 2011;**2011**:264706.

Khorram O, Patrizio P, Wang C and Swerdloff R. Reproductive technologies for male infertility. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;**86**:2373-2379.

Khoshvaght A, Towhidi A, Zare-shahneh A, Noruozi M, Zhandi M, Davachi ND and Karimi R. Dietary n-3 PUFAs improve fresh and post-thaw semen quality in Holstein bulls via alteration of sperm fatty acid composition. *Theriogenology* 2016;**85**:807-812.

Kruger TF and Coetzee K. The role of sperm morphology in assisted reproduction. *Hum Reprod Update* 1999;**5**:172-178.

Lahteenmaki A, Reima I and Hovatta O. Treatment of severe male immunological infertility by intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1995;**10**:2824-2828.

Lenzi A, Picardo M, Gandini L and Dondero F. Lipids of the sperm plasma membrane: from polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy. *Hum Reprod Update* 1996;**2**:246-256.

Lewis S. The urgent need for new sperm biomarkers. Focus on Reproduction. . *Eshre* January 2012:.

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

Li J, Zhang L and Li B. Correlative study on the JAK-STAT/PSMbeta3 signal transduction pathway in asthenozoospermia. *Exp Ther Med* 2017;**13**:127-130.

Liao TT, Xiang Z, Zhu WB and Fan LQ. Proteome analysis of round-headed and normal spermatozoa by 2-D fluorescence difference gel electrophoresis and mass spectrometry. *Asian J Androl* 2009;**11**:683-693.

Liebaers I, Sermon K, Staessen C, Joris H, Lissens W, Van Assche E, Nagy P, Bonduelle M, Vandervorst M, Devroey P *et al.* Clinical experience with preimplantation genetic diagnosis and intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1998;**13 Suppl 1**:186-195.

Magli MC, Crippa A, Muzii L, Boudjema E, Capoti A, Scaravelli G, Ferraretti AP and Gianaroli L. Head birefringence properties are associated with acrosome reaction, sperm motility and morphology. *Reprod Biomed Online* 2012;**24**:352-359.

Maldjian A, Pizzi F, Gliozzi T, Cerolini S, Penny P and Noble R. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. *Theriogenology* 2005;**63**:411-421.

Mandelbaum J, Antoine JM, Plachot M, Belaisch-Allart J and Salat-Baroux J. Are there indications for intra-cytoplasmic sperm injection in female infertility?. *Contracept Fertil Sex* 1997;**25**:607-610.

Mann T and Lutwak-Mann C. Male reproductive function and semen. *Springer* 1981:.

Martínez P and Morros A. Membrane lipid dynamics during human sperm capacitation. . *Frontiers in Bioscience* 1996 Jul;**1**:103-17.

Martinez-Arranz I, Mayo R, Perez-Cormenzana M, Minchole I, Salazar L, Alonso C and Mato JM. Enhancing metabolomics research through data mining. *J Proteomics* 2015;**127**:275-288.

Martinez-Heredia J, de Mateo S, Vidal-Taboada JM, Balleca JL and Oliva R. Identification of proteomic differences in asthenozoospermic sperm samples. *Hum Reprod* 2008;**23**:783-791.

Martinez P, Morros A. Membrane lipid dynamics during human sperm capacitation. *Frontiers in Bioscience* 1996 1;1:d103-17

Martinez-Pastor B, Cosentino C and Mostoslavsky R. A tale of metabolites: the cross-talk between chromatin and energy metabolism. *Cancer Discov* 2013;**3**:497-501.

Mascarenhas MN, Flaxman SR, Boerma T, Vanderpoel S and Stevens GA. National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys. *PLoS Med* 2012;**9**:e1001356.

Matorras R and Critol L. Fertilidad e Infertilidad Humanas. In Matorras R, Coroleu B, Romeu A and Pérez F (eds). Libro Blanco Sociosanitario. "LA infertilidad en España: Situación actual y perspectivas". *Imago Concept & Image Development, S L*, Madrid 2011:31-42.

Meseguer M, de los Santos MJ, Simon C, Pellicer A, Remohi J and Garrido N. Effect of sperm glutathione peroxidases 1 and 4 on embryo asymmetry and blastocyst quality in oocyte donation cycles. *Fertil Steril* 2006;**86**:1376-1385.

Meseguer M, Garrido N, Remohi J, Pellicer A, Simon C, Martinez-Jabaloyas JM and Gil-Salom M. Testicular sperm extraction (TESE) and ICSI in patients with permanent azoospermia after chemotherapy. *Hum Reprod* 2003;**18**:1281-1285.

Meseguer M, Santiso R, Garrido N, Garcia-Herrero S, Remohi J and Fernandez JL. Effect of sperm DNA fragmentation on pregnancy outcome depends on oocyte quality. *Fertil Steril* 2011;**95**:124-128.

Miltenyi S, Muller W, Weichel W and Radbruch A. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* 1990;**11**:231-238.

Munoz M, Cruz M, Humaidan P, Garrido N, Perez-Cano I and Meseguer M. The type of GnRH analogue used during controlled ovarian stimulation influences early embryo developmental kinetics: a time-lapse study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2013;**168**(2):167-172.

Muratori M, Luconi M, Marchiani S, Forti G and Baldi E. Molecular markers of human sperm functions. *Int J Androl* 2009;**32**:25-45.

Nadalini M, Tarozzi N, Di Santo M and Borini A. Annexin V magnetic-activated cell sorting versus swim-up for the selection of human sperm in ART: is the new approach better than the traditional one?. *J Assist Reprod Genet* 2014;**31**:1045-1051.

Nagy ZP, Verheyen G, Liu J, Joris H, Janssenswillen C, Wisanto A, Devroey P and Van Steirteghem AC. Results of 55 intracytoplasmic sperm injection cycles in the treatment of male-immunological infertility. *Hum Reprod* 1995;**10**:1775-1780.

Nallella KP, Sharma RK, Aziz N and Agarwal A. Significance of sperm characteristics in the evaluation of male infertility. *Fertil Steril* 2006;**85**:629-634.

Nicopoulos JD, Gilling-Smith C, Almeida PA, Homa S, Nice L, Tempest H and Ramsay JW. The role of sperm aneuploidy as a predictor of the success of intracytoplasmic sperm injection?. *Hum Reprod* 2008;**23**:240-250.

Nissen HP and Kreysel HW. Analysis of phospholipids in human semen by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1983a;**276**:29-35.

Nissen HP and Kreysel HW. Polyunsaturated fatty acids in relation to sperm motility. *Andrologia* 1983b;**15**:264-269.

Niu DM and Wang JJ. Lipids in the sperm plasma membrane and their role in fertilization. *Zhonghua Nan Ke Xue* 2009;**15**:651-655.

Noyes N, Hampton BS, Berkeley A, Licciardi F, Grifo J and Krey L. Factors useful in predicting the success of oocyte donation: a 3-year retrospective analysis. *Fertil Steril* 2001;**76**:92-97.

Oliva R, de Mateo S and Estanyol JM. Sperm cell proteomics. *Proteomics* 2009;**9**:1004-1017.

OMS. .WHO laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. 5edn ilustrada. 2010:.

Oresti GM, Penalva DA, Luquez JM, Antollini SS and Avelzano MI. Lipid Biochemical and Biophysical Changes in Rat Spermatozoa During Isolation and Functional Activation In Vitro. *Biol Reprod* 2015;**93**:140.

Paiva C, Amaral A, Rodriguez M, Canyellas N, Correig X, Balleca JL, Ramalho-Santos J and Oliva R. Identification of endogenous metabolites in human sperm cells using proton nuclear magnetic resonance (¹H-NMR) spectroscopy and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). *Andrology* 2015;**3**:496-505.

Palermo G, Joris H, Devroey P and Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992;**340**:17-18.

Parmegiani L, Cognigni GE, Bernardi S, Troilo E, Ciampaglia W and Filicori M. "Physiologic ICSI": hyaluronic acid (HA) favors selection of spermatozoa without DNA fragmentation and with normal nucleus, resulting in improvement of embryo quality. *Fertil Steril* 2010a;**93**:598-604.

Parmegiani L, Cognigni GE, Ciampaglia W, Pocognoli P, Marchi F and Filicori M. Efficiency of hyaluronic acid (HA) sperm selection. *J Assist Reprod Genet* 2010b;**27**:13-16.

Perez-Patino C, Barranco I, Parrilla I, Valero ML, Martinez EA, Rodriguez-Martinez H and Roca J. Characterization of the porcine seminal plasma proteome comparing ejaculate portions. *J Proteomics* 2016;**142**:15-23.

Pixton KL, Deeks ED, Flesch FM, Moseley FL, Bjorndahl L, Ashton PR, Barratt CL and Brewis IA. Sperm proteome mapping of a patient who experienced failed fertilization at IVF reveals altered expression of at least 20 proteins compared with fertile donors: case report. *Hum Reprod* 2004;**19**:1438-1447.

Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine. The clinical utility of sperm DNA integrity testing. *Fertil Steril* 2008;**90**:S178-80.

Print CG and Loveland KL. Germ cell suicide: new insights into apoptosis during spermatogenesis. *Bioessays* 2000;**22**:423-430.

Rejraji H, Sion B, Prensier G, Carreras M, Motta C, Frenoux JM, Vericel E, Grizard G, Vernet P and Drevet JR. Lipid remodeling of murine epididymosomes and spermatozoa during epididymal maturation. *Biol Reprod* 2006;**74**:1104-1113.

Remohi J, Gallardo E, Guanes PP, Simon C and Pellicer A. Donor-recipient synchronization and the use of gonadotrophin-releasing hormone agonists to avoid the premature luteinizing hormone surge in oocyte donation. *Hum Reprod* 1995;**10 Suppl 2**:84-90.

Rienzi L, Ubaldi F, Iacobelli M, Romano S, Minasi MG, Ferrero S, Sapienza F, Baroni E and Greco E. Significance of morphological attributes of the early embryo. *Reprod Biomed Online* 2005;**10**:669-681.

Rivera R, Meseguer M and Garrido N. Increasing the success of assisted reproduction by defining sperm fertility markers and selection sperm with the best molecular profile. *Expert Rev Obstet Gynecol* 2012;**7(4)**.

Rodrigo L, Peinado V, Mateu E, Remohi J, Pellicer A, Simon C, Gil-Salom M and Rubio C. Impact of different patterns of sperm chromosomal abnormalities on the chromosomal constitution of preimplantation embryos. *Fertil Steril* 2010;**94**:1380-1386.

Romany L, Garrido N, Motato Y, Aparicio B, Remohi J and Meseguer M. Removal of annexin V-positive sperm cells for intracytoplasmic sperm injection in ovum donation cycles does not improve reproductive outcome: a controlled and randomized trial in unselected males. *Fertil Steril* 2014;**102**:1567-75.e1.

Rossitto M, Ujjan S, Poulat F and Boizet-Bonhoure B. Multiple roles of the prostaglandin D2 signaling pathway in reproduction. *Reproduction* 2015;**149**:R49-58.

Roudebush WE. Seminal platelet-activating factor. *Semin Thromb Hemost* 2007;**33**:69-74.

Roudebush WE and Purnell ET. Platelet-activating factor content in human spermatozoa and pregnancy outcome. *Fertil Steril* 2000;**74**:257-260.

Said TM and Land JA. Effects of advanced selection methods on sperm quality and ART outcome: a systematic review. *Hum Reprod Update* 2011;**17**:719-733.

Samplaski MK, Agarwal A, Sharma R and Sabanegh E. New generation of diagnostic tests for infertility: review of specialized semen tests. *Int J Urol* 2010;**17**:839-847.

Sanchez V, Wistuba J and Mallidis C. Semen analysis: update on clinical value, current needs and future perspectives. *Reproduction* 2013;**146**:R249-58.

Santiso R, Tamayo M, Gosalvez J, Meseguer M, Garrido N and Fernandez JL. Simultaneous determination in situ of DNA fragmentation and 8-oxoguanine in human sperm. *Fertil Steril* 2010;**93**:314-318.

Saraswat M, Joenvaara S, Jain T, Tomar AK, Sinha A, Singh S, Yadav S and Renkonen R. Human Spermatozoa Quantitative Proteomic Signature Classifies Normo- and Asthenozoospermia. *Mol Cell Proteomics* 2017;**16**:57-72.

Schena M, Shalon D, Davis RW and Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 1995;**270**:467-470.

Schroter F, Jakob U, Teichmann A, Haralampiev I, Tannert A, Wiesner B, Muller P and Muller K. Lipid dynamics in boar sperm studied by advanced fluorescence imaging techniques. *Eur Biophys J* 2016;**45**:149-163.

Schulte RT, Ohl DA, Sigman M and Smith GD. Sperm DNA damage in male infertility: etiologies, assays, and outcomes. *J Assist Reprod Genet* 2010;**27**:3-12.

Shapiro H, Cowell C and Casper RF. The use of vaginal ultrasound for monitoring endometrial preparation in a donor oocyte program. *Fertil Steril* 1993;**59**:1055-1058.

Sharlip ID, Jarow JP, Belker AM, Lipshultz LI, Sigman M, Thomas AJ, Schlegel PN, Howards SS, Nehra A, Damewood MD *et al.* Best practice policies for male infertility. *Fertil Steril* 2002;**77**:873-882.

Shevchenko A, Jensen ON, Podtelejnikov AV, Sagliocco F, Wilm M, Vorm O, Mortensen P, Shevchenko A, Boucherie H and Mann M. Linking genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;**93**:14440-14445.

Simon L, Brunborg G, Stevenson M, Lutton D, McManus J and Lewis SE. Clinical significance of sperm DNA damage in assisted reproduction outcome. *Hum Reprod* 2010;**25**:1594-1608.

Singh NP, Muller CH and Berger RE. Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. *Fertil Steril* 2003;**80**:1420-1430.

Smith R, Kaune H, Parodi D, Madariaga M, Rios R, Morales I and Castro A. Increased sperm DNA damage in patients with varicocele: relationship with seminal oxidative stress. *Hum Reprod* 2006;**21**:986-993.

Soares SR, Troncoso C, Bosch E, Serra V, Simon C, Remohi J and Pellicer A. Age and uterine receptiveness: predicting the outcome of oocyte donation cycles. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;**90**:4399-4404.

Soda T, Miyagawa Y, Ueda N, Takezawa K, Okuda H, Fukuhara S, Fujita K, Kiuchi H, Uemura M, Okamoto Y *et al.* Systematic characterization of human testis-specific actin capping protein beta3 as a possible biomarker for male infertility. *Hum Reprod* 2017:.

Stendardi A, Focarelli R, Piomboni P, Palumberi D, Serafini F, Ferramosca A and Zara V. Evaluation of mitochondrial respiratory efficiency during in vitro capacitation of human spermatozoa. *Int J Androl* 2011;**34**:247-255.

Tartibian B and Maleki BH. Correlation between seminal oxidative stress biomarkers and antioxidants with sperm DNA damage in elite athletes and recreationally active men. *Clin J Sport Med* 2012;**22**:132-139.

Thacker S, Yadav SP, Sharma RK, Kashou A, Willard B, Zhang D and Agarwal A. Evaluation of sperm proteins in infertile men: a proteomic approach. *Fertil Steril* 2011;**95**:2745-2748.

Theodoridis G, Gika H and Wilson I. LC-MS-based methodology for global metabolite profiling in metabolomics/metabolomics. *Trends in Analytical Chemistry* 2008;**27(3)**:251-260.

Thomson LK, Zieschang JA and Clark AM. Oxidative deoxyribonucleic acid damage in sperm has a negative impact on clinical pregnancy rate in intrauterine

insemination but not intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil Steril* 2011;**96**:843-847.

Thonneau P, Marchand S, Tallec A, Ferial ML, Ducot B, Lansac J, Lopes P, Tabaste JM and Spira A. Incidence and main causes of infertility in a resident population (1,850,000) of three French regions (1988-1989). *Hum Reprod* 1991;**6**:811-816.

Toledo AA, Mitchell-Leef D, Elsner CW, Slayden SM and Roudebush WE. Fertilization potential of human sperm is correlated with endogenous platelet-activating factor content. *J Assist Reprod Genet* 2003;**20**:192-195.

Toshimori K, Ito C, Maekawa M, Toyama Y, Suzuki-Toyota F and Saxena DK. Impairment of spermatogenesis leading to infertility. *Anat Sci Int* 2004;**79**:101-111.

Tournaye H, Devroey P, Liu J, Nagy Z, Lissens W and Van Steirteghem A. Microsurgical epididymal sperm aspiration and intracytoplasmic sperm injection: a new effective approach to infertility as a result of congenital bilateral absence of the vas deferens. *Fertil Steril* 1994;**61**:1045-1051.

Upadhyay RD, Balasiner NH, Kumar AV, Sachdeva G, Parte P and Dumasia K. Proteomics in reproductive biology: beacon for unraveling the molecular complexities. *Biochim Biophys Acta* 2013;**1834**:8-15.

van der Kloet FM, Bobeldijk I, Verheij ER and Jellema RH. Analytical error reduction using single point calibration for accurate and precise metabolomic phenotyping. *J Proteome Res* 2009;**8**:5132-5141.

van Gestel RA, Brouwers JF, Ultee A, Helms JB and Gadella BM. Ultrastructure and lipid composition of detergent-resistant membranes derived from mammalian sperm and two types of epithelial cells. *Cell Tissue Res* 2016;**363**:129-145.

Vaswani K, Ashman K, Reed S, Salomon C, Sarker S, Arraztoa JA, Perez-Sepulveda A, Illanes SE, Kvaskoff D, Mitchell MD *et al.* Applying SWATH Mass Spectrometry to Investigate Human Cervicovaginal Fluid During the Menstrual Cycle. *Biol Reprod* 2015;**93**:39.

Vermey BG, Chapman MG, Cooke S and Kilani S. The relationship between sperm head retardance using polarized light microscopy and clinical outcomes. *Reprod Biomed Online* 2015;**30**:67-73.

Vizcaino JA, Csordas A, Del-Toro N, Dianas JA, Griss J, Lavidas I, Mayer G, Perez-Riverol Y, Reisinger F, Ternent T *et al.* 2016 update of the PRIDE database and its related tools. *Nucleic Acids Res* 2016;**44**:11033.

Wang J, Fan HC, Behr B and Quake SR. Genome-wide single-cell analysis of recombination activity and de novo mutation rates in human sperm. *Cell* 2012;**150**:402-412.

Wathes DC, Abayasekara DR and Aitken RJ. Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. *Biol Reprod* 2007;**77**:190-201.

Watson PF. The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5 degrees C by egg-yolk lipoprotein. *J Reprod Fertil* 1981;**62**:483-492.

Wiklund S, Johansson E, Sjoström L, Mellerowicz EJ, Edlund U, Shockcor JP, Gottfries J, Moritz T and Trygg J. Visualization of GC/TOF-MS-based metabolomics data for identification of biochemically interesting compounds using OPLS class models. *Anal Chem* 2008;**80**:115-122.

Zhou X, Xia XY and Huang YF. Updated detection of the function of sperm plasma membrane. *Zhonghua Nan Ke Xue* 2010;**16**:745-748.

Zylbersztejn DS, Andreoni C, Del Giudice PT, Spaine DM, Borsari L, Souza GH, Bertolla RP and Fraietta R. Proteomic analysis of seminal plasma in adolescents with and without varicocele. *Fertil Steril* 2013;**99**:92-98.

IX. ANEXOS

IX. ANEXOS

Lista de ABREVIATURAS:

1D-SDS-PAGE: Técnicas de separación de proteínas en una dimensión

2D-DIGE: Electroforesis diferenciales de dos dimensiones

2D-SDS-PAGE: Técnicas de separación de proteínas en dos dimensiones

8-OHdG: 8-hydroxydeoxyguanosina

ABC: bicarbonato amónico

AC: Acil carnitinas

ACN: acetonitrilo

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AH: Ácido Hialurónico

ARN: Ácido ribonucleico

ASEBIR: Asociación Española para el Estudio de la Biología de la Reproducción

ASRM: Asociación Americana de Medicina de la Reproducción

AUC: Área bajo la curva

BPI: Pico de intensidad Base

Cer: Ceramidas

ChoE: Ésteres de colesterol

CMH: Monohexosilceramidas

CMV: Cytomegalovirus

CP: Coito Programado

CP135: 135kDa proteína centrosomal

DAVID: Base de datos (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery)

DBD-FISH: Detección de daños de ADN mediante la técnica de hibridación in situ fluorescente

DE: Desviación estándar

DHA: Ácido Docosahexaenoico

E: Grupo que consigue gestación

EROs: Especies Reactivas de Óxígeno

ESRHE: Sociedad Europea de Reproducción y Embriología

FA: ácido fórmico

FDR: del inglés test de corrección múltiple

FISH: Hibridación In situ Fluorescente

FIV: Fecundación in vitro

FQ: Fibrosis Quística

FSH: Hormona folículo estimulante

GnRH: Hormona liberadora de gonadotropina

GO: ontología génica

GPxs: Glutation Peroxidasa

GR: Glutation Reductasa

HBA: Test de unión del ácido hialurónico

hCG: Gonadotropina coriónica humana

hCP α 3: α 3 acting capping protein

hMG: Gonadotropina menopáusica humana

H-MNR: resonancia magnética nuclear

HPLC: Cromatografía líquida de alta presión

HTF: Medio de cultivo Human Tubaric Fluid

IA: Inseminación Artificial

IAC: Inseminación Artificial Conyugal

IAD: Inseminación Artificial de Donante

IAH: Inseminación Artificial Homóloga

IC 95%: Intervalo de confianza del 95%

ICSI: Inyección Intracitoplasmática

IMC: Índice de masa corporal

IMSI: Inyección Intracitoplasmática de espermatozoides seleccionados morfológicamente

LC-MS/MS: Cromatografía líquida acoplada en tándem a MS

LCPUFAs: Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga

LOD: Límite de detección

LPC: Lisofosfatidilcolinas

LPE: Lisofosfatidiletanolaminas

LPI: Lisofosfatidilinositoles

m/z: Masa molecular

MACS: Separación Inmunomagnética de Espermatozoides

MALDI-TOF: Técnicas de deionización asistida por láser acoplada a MS

MB: MicroBeads

MCI: Masa Celular Interna

mL: Mililitros

MS: Espectrometría de masas

MSOME: Morfología de los orgánulos de los espermatozoides móviles

NEFA: Ácido grasos no esterificados

NP (tabla de la OMS): Espermatozoides con movilidad no progresiva

NE: Grupo que no consigue gestación

ODF2: Outer dense fibre protein 2/2

OMS: Organización Mundial de la Salud

OPLS: Enfoques supervisados ortogonales de mínimos cuadrados parciales a estructuras latentes

PAF: Receptores factor de activación plaquetario

PC: Componente principal

PC: Fosfatidil colina

PCA: Análisis de componentes principales

PE: Fosfatidiletanolaminas

PI: Fosfatidilinositoles

PIP: Proteína inducible por prolactina

PLA2G2A: Fosfolipasa A2

PLS: mínimos cuadrados parciales

PLS-DA: PLS pero combinado con análisis discriminante

PR: Espermatozoides con movilidad progresiva

PS: Fosfatidilcolina

PSA: Preproteína específica de antígeno prostático isoforma I

PUFAs: Ácidos grasos poliinsaturados

QC: Control de calidad

qPCR: Reacción en cadena de la Polimerasa cuantitativa

RNAseq: Secuenciación ARN

RNV: Recién Nacido Vivo

ROC: Receiver Operating Characteristic, o Característica Operativa del Receptor

RS-LC-MS/MS: Cromatografía de fase líquida reversa acoplada a tándem MS

SABP: Secretory actin-binding protein

SCD: Test de dispersión de la cromatina espermática

SCSA: Análisis de la estructura de la cromatina espermática

SDF: Fragmentación del ADN espermático

SEF: Sociedad Española de Fertilidad

SM: Esfingomielinas

SOD: Superóxido dismutasa

SU: Swim-up

SWATH: del inglés Sequential Windowed Acquisition of All Theoretical Fragment Ion Mass Spectra, espectrometría de masas de adquisición independiente de datos

TE: Trofoectodermo

TFA: ácido trifluoroacético

TG: Triacilgliceroles

TICS: cromatograma del total de iones analizados

TOF: Tiempo de vuelo

tR: Tiempo de retención

TRA: Técnica de Reproducción Asistida

TUNEL: Marcado de final de corte de dUTP de Terminal deoxinucleotidil transferasa

UHPLC-MS: Cromatografía líquida de Ultra Rendimiento acoplada a Espectometría de Masas

VHB: Virus Hepatitis B

VHC: Virus Hepatitis C

VHS: Anti-herpes simple virus

VIH: Virus Inmunodeficiencia Humana

Anexo 1: Proteínas identificadas en la librería.

La librería se depositó en el Consorcio ProteomeXchange a través del repositorio de socios PRIDE con el identificador del conjunto de datos PXZD006309. Estos datos se incluirán en un archivo Excel en la versión digital de esta tesis debido al extenso tamaño de la tabla.

En el Excel aparecen 3074 filas que corresponden a las proteínas, pero en realidad alguna de las proteínas están repetidas y corresponden con aquellas en las que el parámetro de fiabilidad de identificación = 0.

Anexo 2: Proteínas identificadas en las muestras objeto de estudio.

Estos datos se incluirán en un archivo Excel en la versión digital de esta tesis debido al extenso tamaño de la tabla.

Anexo 3: Proteínas obtenidas en el análisis PLS-DA con un *vip score* >1,5.

Estos datos se incluirán en un archivo Excel en la versión digital de esta tesis debido al extenso tamaño de la tabla.

Anexo 4: Análisis mediante STRING con las proteínas obtenidas con el análisis PLS-DA con *vip score* >1,5.

Estos datos se incluirán en un archivo Excel en la versión digital de esta tesis debido al extenso tamaño de la tabla.

Anexo 5: Proteínas seleccionadas del análisis STRING que se encuentran en mayor cantidad en el grupo E (verde) o en el NE (rojo).

Estos datos se incluirán en un archivo Excel en la versión digital de esta tesis debido al extenso tamaño de la tabla.

Anexo 6: Análisis mediante la base de datos DAVID de las 2228 proteínas identificadas mediante el análisis de SWATH y comparadas con las 20581 proteínas que forman parte del proteoma humano.

Estos datos se incluirán en un archivo Excel en la versión digital de esta tesis debido al extenso tamaño de la tabla.



Los problemas de fertilidad afectan aproximadamente al 8% de las parejas en edad reproductiva, siendo el factor masculino el responsable de aproximadamente el 50% de los casos. La única herramienta aceptada por la OMS (Organización Mundial de la Salud) para evaluar la fertilidad masculina, es el espermiograma o análisis básico del semen, pero su valor predictivo para pronosticar la capacidad masculina para iniciar un embarazo es limitado. Por ello es necesaria la elaboración de una herramienta que nos permita detectar defectos en los espermatozoides que pasen desapercibidos en el análisis básico del semen rutinario.

El reciente desarrollo de nuevas técnicas ómicas, como cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC/MS-MS) de última generación, ha abierto el camino al estudio de macromoléculas como las proteínas y los metabolitos o lípidos. El estudio del transcriptoma (conjunto de mRNAs), del proteoma (conjunto de proteínas) y del metaboloma (conjunto de metabolitos) es una herramienta potente para este fin, ya que el espermatozoide es una célula accesible y fácil de purificar, por lo que es idóneo para este tipo de análisis.

Debido a las modificaciones del transcriptoma, el estudio del proteoma y metaboloma es el que nos proporciona más información sobre las distintas funciones celulares. El objetivo de esta tesis es realizar los perfiles de proteínas y metabolitos en concreto lípidos, existentes diferencialmente en los espermatozoides de pacientes infértiles que acuden a nuestra clínica y logran obtener una gestación en comparación con aquellos pacientes que no lo logran, en tratamientos de ICSI (Inyección intracitoplasmática)- con el uso de ovocitos propios- o ICSI con ovocitos donados (DVOODN), identificando proteínas y lípidos que puedan estar implicados en la fertilidad o infertilidad masculina y que sean clave en la capacidad para iniciar una gestación a término.

De esta forma se aumentará el conocimiento sobre los componentes moleculares que forman el espermatozoide y que participan activamente en el proceso de reproducción con el fin de encontrar biomarcadores moleculares que permitan el desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico y/o selección espermática, que complementen al espermiograma.

