



Universidad Nacional de Rosario
Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas

“IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES SEMINALES DE UTILIDAD PRONÓSTICA EN TRATAMIENTOS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA”

Luciana Zoff

Tesina para optar al título de Licenciada en Biotecnología

Directora: Dra. Silvana V. Spinelli.

Co-Directora: Dra. Karina Calvo.

Instituto de Inmunología Clínica y Experimental de Rosario (IDICER)

Rosario, Argentina

2018

Agradecimientos

Quisiera agradecer a mi directora, la Dra. Silvana. V. Spinelli, por confiar en mi, por su paciencia y predisposición para la realización de esta tesina, tanto en lo experimental como en la escritura. Por transmitirme el compromiso de la ciencia con la sociedad y por todo lo aprendido. A mi Co-Directora, la Dra. Karina Calvo, por su buena predisposición y enseñarme tanto desde su trabajo y profesión. Gracias infinitas!

A la gente del IDICER por permitirme formar parte de su grupo, especialmente a la “Silvi banda” por hacer del lugar de trabajo un lugar cálido y alegre.

Al Centro Médico PROAR, por hacer posible este proyecto. A las chicas de PROAR, por la buena onda y la enseñanza transmitida.

A la gente de sala 9 por su hospitalidad y energía positiva, y ayudarme en la última etapa de mi trabajo.

A Lucas, gracias por tanto amor, paciencia, confianza, por acompañarme todos estos años y darme la fuerza necesaria para alcanzar lo que me proponga. Sos único.

A mis amigas del alma, la Vico, Elo, Sotti, Agos, Pame, por bancarme siempre aunque pasemos tiempo sin vernos...Las adoro!

A mi familia, por todo el amor y su apoyo incondicional. A mis hermanos Geo, Rolo y Fabri por darme siempre una mano en cada traspie y por todos los momentos compartidos. Por último, quiero agradecerles especialmente a mis padres, por todo lo que hicieron y hacen por mí. Gracias a ustedes soy lo que soy, estoy eternamente agradecida.

Indice

ABREVIATURAS	IV
RESUMEN	V
1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 Infertilidad y factor masculino.	1
1.2 Aparato reproductor masculino.	1
1.2.1 Composición del semen	2
1.2.2 Fisiología del sistema reproductor masculino.	3
1.2.2.1 Espermatogenesis.	3
1.2.2.2 Regulación hormonal.	5
1.3 Infertilidad Masculina.	6
1.3.1 Diagnóstico.	8
1.3.2 Estrategias terapéuticas	9
1.4 Biomarcadores.	11
1.4.1 Biomarcadores e infertilidad masculina	11
1.4.2 ARNs pequeños	12
1.4.2.1 microARNs	12
1.4.2.2 piARNs	13
1.4.2.3 Otros ARNs pequeños.	14
1.5 ARN pequeños como biomarcadores de infertilidad masculina	17
2 OBJETIVOS	19
3 MATERIALES Y MÉTODOS	20
3.1 Grupos de estudio	20
3.1.1 Relevamiento de datos de Historia Clínica de los pacientes	21
3.2 Procesamiento inicial de las muestras	21
3.3 Extracción de ARN	21
3.4 Cuantificación de ácidos nucleicos	23
3.5 Cuantificación de ARNs pequeños.	23
3.5.1 Diseño de oligos	24
3.5.2 Retrotranscripción de las muestras	27
3.5.3 Ensayos de qPCR	28
3.6 Análisis estadístico	29

4	RESULTADOS	30
4.1	Sección 1- Selección de ARNs pequeños que se proyecten como buenos candidatos para su empleo como biomarcadores seminales.	30
4.2	Sección 2- Puesta a punto y optimización de la técnica de extracción de ARN y cuantificación de ARNs pequeños mediante RT-qPCR a partir de muestras de plasma seminal.	35
4.2.1	Optimización de la técnica de extracción de ARNs seminales.	35
4.2.2	Puesta a punto de la técnica de q-PCR.	40
4.3	Sección 3- Cuantificación de ARNs pequeños seminales y estudios de asociación	45
4.3.1	Características generales de los grupos de estudio y análisis de datos clínicos.	45
4.3.2	Cuantificación de los ARNs pequeños seleccionados en muestras de plasma seminal de pacientes con diversas patologías reproductivas.	46
4.3.3	Estudios de correlación.	50
5	DISCUSIÓN	54
6	CONCLUSIONES	59
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

Abreviaturas

c	Carrier
I	Isopropanol
ICSI	Inyección intracitoplasmática de espermatozoides
miARN	Micro ARN
NOA	Azoospermia no obstruiva
OA	Azoospermia obstructiva
P	Pretratamiento con Buffer PEG
PEG	Polientilenglicol
piARN	ARNs asociados a PIWI
PS	Plasma seminal
ROS	Especies reactivas del oxígeno
tRFs	Fragmentos derivados de tARN
S	mezcla 1: 1 Solución Salina : Isopropanol
SLO	oligos <i>stem-loop</i>
T	Tratamiento estándar con TRI Reagent
tiARN	Mitades de tARN
tRFs	Fragmentos derivados de tARN
ON	<i>Over night</i> (Toda la noche)

Resumen

Comprender las causas subyacentes de la infertilidad masculina continúa siendo un importante desafío para los andrólogos. Esto es especialmente relevante en pacientes infértiles que muestran parámetros seminales normales y sin anomalías urogenitales o genéticas. En estos casos de infertilidad idiopática o inexplicada la identificación de nuevos biomarcadores podría ser de gran interés.

Los ARNs pequeños son reguladores claves tanto de procesos fisiológicos como patológicos con un gran impacto en la función reproductiva. Estas moléculas se encuentran en diversos fluidos biológicos, incluido el plasma seminal, donde posiblemente actúan como mensajeros paracrinos o endocrinos. Con la finalidad de evaluar su utilidad como nuevos posibles biomarcadores asociados a infertilidad idiopática en este trabajo se determinaron los niveles de diversos ARNs pequeños en plasma seminal de individuos normozoospermicos en el marco de un estudio prospectivo con parejas que se sometieron a uno o más tratamientos de ICSI con ovocitos donados. En función del resultado del procedimiento los pacientes fueron divididos en 3 grupos: el grupo control ICSI(+), 21 pacientes que lograron el embarazo; PII (por Posible Infertilidad Idiopática), 9 pacientes que se sometieron a más de un procedimiento de ICSI sin éxito; y x1, 11 individuos que realizaron solo 1 ciclo sin embarazo.

Mediante ensayos de RT-qPCR se lograron cuantificar los 8 de los 9 candidatos seleccionados: 5 tiARNs (tiARN^{Lys}, tiARN^{Glu}, tiARN^{Gly}, tiARN^{Phe} y tiARN^{Met}) y 3 miARNs (miR-107, miR-320 y let-7). Los resultados obtenidos al comparar los grupos demuestran que los niveles de tiARN^{Lys}, tiARN^{Glu} y tiARN^{Phe} se encuentran significativamente elevados en el grupo PII respecto a los controles. Por otro lado, miR-107 y los miembros de la familia let7 mostraron una tendencia opuesta, con niveles disminuidos en el plasma seminal de PII respecto a ICSI(+).

En suma, nuestros resultados muestran un perfil de ARNs pequeños alterado en pacientes que se sometieron a más de un ciclo fallido de ICSI con ovocitos donados (posibles casos de infertilidad idiopática), claramente diferenciado de los pacientes que lograron el embarazo. Además, los niveles de miARNs y tiARNs presentan comportamientos opuestos cuando se comparan los grupos de estudio, hecho que sugiere que estos dos tipos de moléculas tendrían roles diferentes en la regulación de la función reproductiva.

1 Introducción

1.1 Infertilidad y factor masculino.

La infertilidad afecta al 15% de la población mundial y el factor masculino está involucrado en aproximadamente la mitad de los casos. La naturaleza compleja de esta condición se debe a que cada individuo de la pareja aporta un bagaje único de características tanto a nivel genómico como proteómico y metabólico, las cuales interactúan en formas impredecibles. La frustración a la que se enfrentan las parejas se ve agravada por las dificultades que tienen los médicos en cuánto al diagnóstico y el tratamiento de la infertilidad, en particular en varones. De hecho, muchos casos de infertilidad masculina se definen como “sin causa aparente” o idiopáticos y, como tal, la mayoría de los diagnósticos tienden a ser de carácter descriptivo más que específico ¹.

1.2 Aparato reproductor masculino.

El sistema reproductor masculino se compone de los testículos, las vías espermáticas, las glándulas accesorias y el pene. Los testículos son órganos ovoideos que se localizan por fuera de la cavidad corporal en un saco de piel, el escroto. Éstos cumplen una función doble que consiste en producir espermatozoides y hormonas sexuales masculinas. Cada testículo se encuentra dividido en aproximadamente 250 compartimentos piramidales denominados lobulillos testiculares. Cada lobulillo se encuentra ocupado por uno a cuatro túbulos seminíferos que se alojan como ovillos envueltos en tejido conjuntivo laxo con abundancia de vasos sanguíneos y linfáticos, nervios y células intersticiales (células de Leydig). Los túbulos seminíferos producen las células germinales masculinas, los espermatozoides, mientras que las células intersticiales de Leydig secretan andrógeno testicular ².

Los conductos genitales intratesticulares se continúan con los túbulos seminíferos y conducen espermatozoides. Éstos incluyen los túbulos rectos, los cuales a su vez se continúan en la red testicular de la cual parten los conductillos eferentes, que confluyen de manera gradual para formar el conducto del epidídimo ^{2,3,4}.

Los conductos genitales extratesticulares (vía espermática), que transportan los espermatozoides desde el testículo hasta el meato del pene, son el conducto del epidídimo, el conducto deferente, el conducto eyaculador y la uretra. El conducto del epidídimo es un tubo único muy enrollado, que constituye la localización primaria para la maduración y almacenamiento de los espermatozoides. Durante la emisión del semen, los espermatozoides

son expulsados desde la cola del epidídimo hacia el conducto deferente (Figura 1) ^{2, 3, 4}. Las glándulas accesorias productoras de secreciones esenciales para la función reproductora del hombre, son las vesículas seminales, la próstata y las glándulas bulbouretrales (glándulas de Cowper). Estas secreciones son almacenadas por las glándulas y expulsadas durante la eyaculación ².

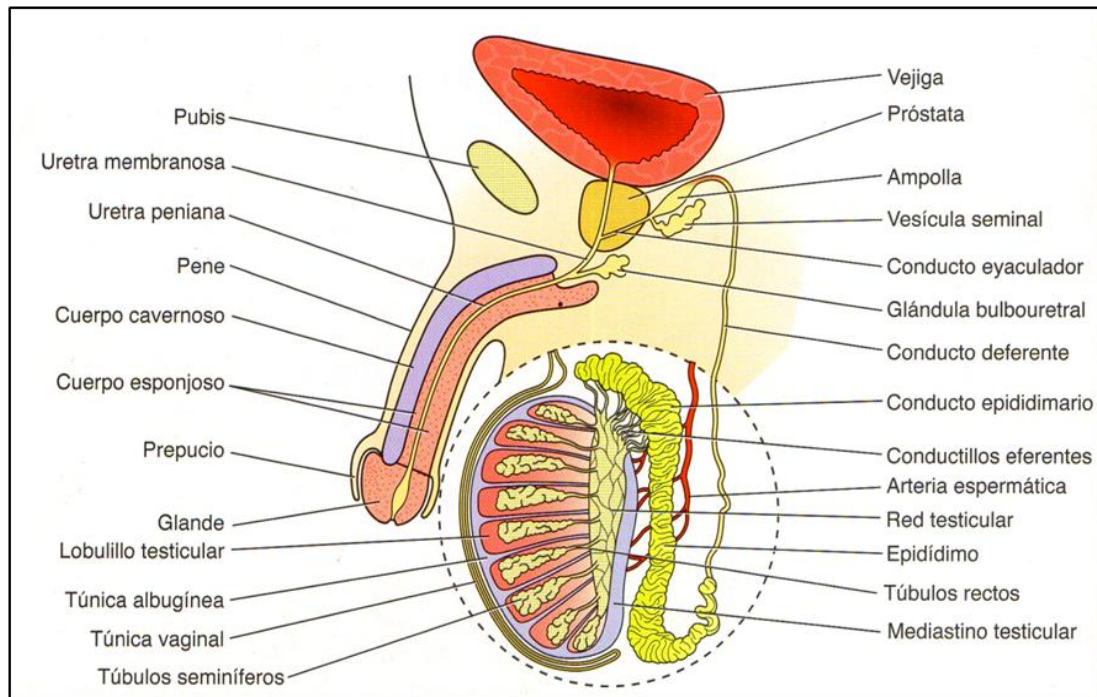


Figura 1. Diagrama esquemático de los componentes del sistema genital masculino. El testículo y el epidídimo se representan con un aumento diferente al de las otras estructuras. *Imagen extraída de Junqueira LC, Carneiro J: Histología Básica: Texto y Atlas, 12ª ed. 2013.*

1.2.1 Composición del semen

El semen contiene espermatozoides y una mezcla compleja de líquidos y moléculas que sustentan la viabilidad de los espermatozoides y facilitan la fecundación. Los espermatozoides representan menos del 5% del volumen del semen ⁵. Aproximadamente el 70% del volumen eyaculado humano se origina en las vesículas seminales. Estas son glándulas que producen una secreción amarillenta, levemente alcalina, que contiene sustancias importantes para los espermatozoides como fructosa, citrato, inositol, prostaglandinas, y varias proteínas. El monosacárido fructosa que se halla en el semen es el principal nutriente de los espermatozoides. La próstata contribuye con un líquido levemente ácido que contiene ácido cítrico y enzimas, en particular fosfatasa ácida y fibrinolisisina. Estas sustancias conforman el 20% del volumen del semen. Los órganos reproductivos restantes, las glándulas

bulbouretrales, el epidídimo, las glándulas uretrales y los conductos deferentes aportan una pequeña porción adicional al volumen del semen. En la eyaculación, los fluidos de todas estas fuentes denominado plasma seminal se mezclan con los espermatozoides para formar la combinación llamada semen ^{4,3,6}.

Poco después de la eyaculación, el semen coagula por acción de una enzima, producida en la próstata, a partir de un precursor similar al fibrinógeno producido en las vesículas seminales. Luego, pasado unos pocos minutos el semen comienza a fluidificarse por acción de otra enzima sintetizada en la próstata, la fibrinolisisina ⁴. Generalmente, la licuefacción completa del semen ocurre dentro de los 15 minutos, aunque en ocasiones puede tardar 1 hora. Un tiempo superior a 1 hora no es considerado normal. La dificultad para coagularse y a continuación licuarse está asociada con problemas de fertilidad (WHO, 2010) ⁷.

1.2.2 Fisiología del sistema reproductor masculino.

1.2.2.1 Espermatogenesis.

La espermatogenesis es el proceso mediante el cual se desarrollan los gametos masculinos, los espermatozoides. Se inicia en la pubertad y se lleva a cabo en los túbulos seminíferos. Las células en los túbulos seminíferos se disponen alrededor del lumen, los espermatogonios se encuentran en la base del epitelio cerca de la lámina basal y proliferan por mitosis. Existen dos tipos de espermatogonios, los tipos A y B. Los espermatogonios tipo A se dividen y dan células hijas que se siguen dividiendo. Algunas células hijas se diferencian en espermatogonios de tipo B que son los que van a diferenciarse en espermatozoides. Los espermatogonios de tipo B pasan por algunos ciclos mitóticos en los que las células no se separan del todo y, al final de esas divisiones, originan espermatocitos primarios. Éstos y sus descendientes siguen unidos por puentes citoplasmáticos hasta el final de la espermatogenesis. Los espermatocitos primarios duplican su DNA y entran en la primera división meiótica, dando como resultado espermatocitos secundarios. Los dos espermatocitos secundarios entran en la segunda división de la meiosis y cada uno origina dos células haploides, las espermátidas. Por último, estas células se diferencian en espermatozoides durante el proceso de maduración llamado espermiogénesis para luego ser liberados en la luz del tubo seminífero (Figura 2) ^{2,3}.

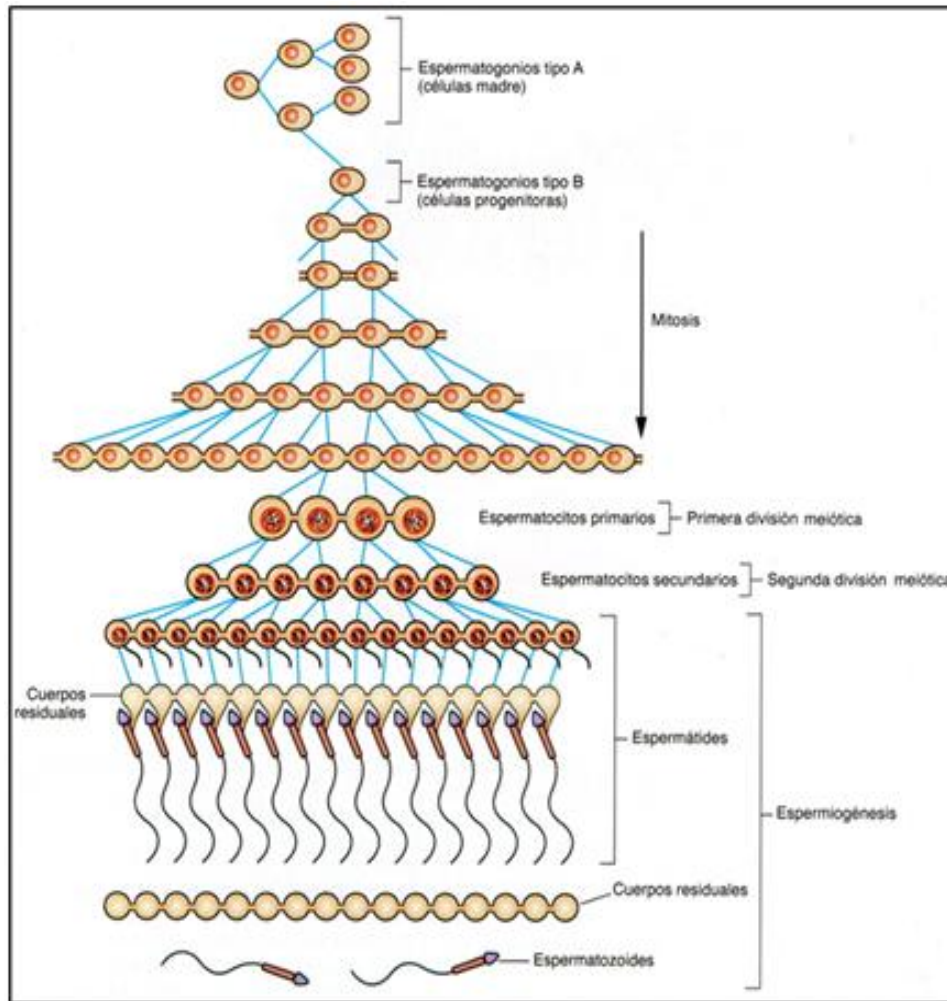


Figura 2. Esquema de la espermatogénesis y espermiogénesis humana. *Imagen extraída de Junqueira LC, Carneiro J: Histología Básica: Texto y Atlas, 12^a ed. 2013.*

El estroma de los túbulos seminíferos está compuesto por las células de Sertoli, células de gran tamaño con uno de sus extremos sobre la lámina basal y el otro contra la luz del tubo seminífero. Sus superficies laterales contienen numerosas invaginaciones donde se alojan las células del linaje espermatogénico. Se encargan de dar sostén, protección y aporte nutricional a los gametos en desarrollo (Figura 3) ⁶.

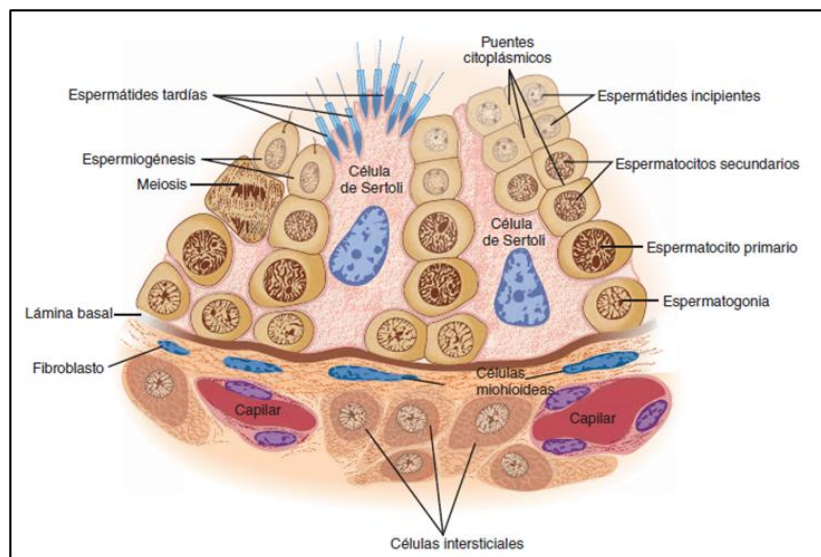


Figura 3. Esquema de un corte transversal de un túbulo seminífero. Las células germinales en desarrollo permanecen conectadas por puentes citoplásmicos y se rodean de citoplasma de las células de Sertoli conforme se desplazan de la lámina basal a la luz del túbulo seminífero. *Imagen extraída de Ganong: Fisiología Médica., 23^a ed, 2010.*

1.2.2.2 Regulación hormonal.

El fenómeno inicial en la pubertad es el inicio de la secreción púlsatil de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) por las neuronas hipotalámicas. Esta es secretada a la sangre portal hipotálamo – hipofisiaria, siendo liberada en concentraciones elevadas en el lóbulo anterior de la hipófisis donde estimula la producción igualmente púlsatil de las hormonas hipofisiarias foliculoestimulante (FSH) y luteinizante (LH). La FSH actúa sobre las células de Sertoli y promueve la síntesis y la secreción de proteína fijadora de andrógeno (ABP). Por su parte, la LH actúa sobre las células de Leydig y estimula la producción de testosterona. Ésta se difunde desde las células intersticiales de Leydig hacia el interior del túbulo seminífero y se combina con la ABP. De ese modo, se mantiene una alta concentración de testosterona en el túbulo seminífero, condición muy importante para estimular la espermatogénesis y para el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios masculinos. Por otra parte, el eje hipotálamo – hipofisiario es también controlado por mecanismos de retroalimentación negativa.

1.3 Infertilidad Masculina.

La infertilidad es la incapacidad de una pareja sexualmente activa que no emplea métodos anticonceptivos de lograr el embarazo en el plazo de un año (WHO, 2010). La infertilidad afecta tanto a varones como a mujeres, encontrándose asociada en el 50 % de los casos a un factor masculino¹. La infertilidad masculina puede ser causada por problemas que afecten tanto a la producción de espermatozoides como al proceso de transporte de los mismos por los conductos espermáticos.

La producción de gametos masculinos puede verse alterada por el aumento de la temperatura escrotal como consecuencia de la varicocele, que consiste en la dilatación de las venas del plexo venoso pampiliforme⁶. Otras causas de infertilidad muy bien descritas son la Criptorquidia que ocurre por el descenso anormal de uno o ambos testículos hacia el escroto durante la vida fetal; anomalías cromosómicas como el síndrome de Klinefelter (cariotipo 47 XXY) y trastornos endocrinos como el hipogonadismo masculino⁶. Por otra parte, la integridad de la barrera hematotesticular puede verse afectada como consecuencia de traumatismos, infecciones, etc. Esta barrera es importante en el proceso de espermatogénesis debido a que permite mantener una composición adecuada del líquido testicular e impide el desarrollo de respuestas inmunitarias contra las células avanzadas del linaje espermatogénico. Asimismo, la espermatogénesis también es alterada fácilmente por infecciones locales, desnutrición, alcoholismo, algunos fármacos, pesticidas y radiaciones ionizantes, entre otros³.

Por otro lado, la incapacidad de transportar los espermatozoides desde los testículos al pene puede deberse a una obstrucción de los conductos espermáticos como consecuencia de infecciones severas en el epidídimo (epididimitis), próstata, vesículas seminales y en el tracto genitourinario. También puede ser consecuencia de una vasectomía, procedimiento quirúrgico que corta y sella los extremos de los conductos deferentes. Por otra parte, individuos con mutaciones en la proteína reguladora transmembrana de la fibrosis quística carecen de los conductos deferentes y pueden presentar una ausencia parcial o completa del epidídimo⁸. Otra causa de infertilidad es la eyaculación retrógrada en la cual los espermatozoides se dirigen hacia la vejiga y son eliminados en la orina.

La fertilidad masculina también puede verse afectada por la presencia de otras enfermedades como la diabetes, enfermedades del sistema nervioso central, tumores hipofisarios, entre otras⁶.

Todas estas patologías se traducen en una disminución en la fertilidad del varón, que se evidencia a través de una disminución en el recuento de espermatozoides en el semen, lo que se conoce como oligospermia, o en un caso extremo a su ausencia completa. Esta ausencia completa de espermatozoides en el semen se denomina azoospermia y constituye una de las formas más graves de infertilidad masculina ⁹. Casos de azoospermia se diagnostican en el 15% de los hombres infértiles y tiene dos formas: azoospermia obstructiva y azoospermia no obstructiva. La azoospermia obstructiva (OA) es causada por una obstrucción física en el aparato reproductor masculino. El resultado biológico de la misma es por lo tanto similar al de una vasectomía. La azoospermia no obstructiva (NOA) es un síndrome más complejo donde la azoospermia es secundaria a una incapacidad para producir espermatozoides ¹⁰. Asimismo, la disminución de la fertilidad masculina puede ser consecuencia de una disminución en la motilidad de los espermatozoides, lo que se conoce como astenozoospermia; alteraciones en su morfología, denominado terazoospermia; y por otro lado, puede deberse a anomalías en las características macroscópicas del semen, como es el volumen, la viscosidad, etc ⁹. Sin embargo, aproximadamente un 15 % de los casos de infertilidad masculina no tienen una causa aparente. En estos pacientes con infertilidad idiopática, el semen es normal, no cuentan con antecedentes clínicos de relevancia, y los factores femeninos de infertilidad han sido descartados ¹¹.

Aunque sobre las causas de infertilidad en estos pacientes se sabe muy poco, hay evidencias de que ciertos factores podrían estar contribuyendo con esta condición. Entre los posibles factores, se distinguen las especies reactivas del oxígeno (ROS), que se han encontrado en niveles elevados en pacientes infértiles con espermogramas normales ^{12, 13}. Las ROS afectan la fluidez de la membrana plasmática del espermatozoide lo que conlleva a una disminución de la movilidad y a una falla en la fusión de las gametas espermatozoide – ovocito. Asimismo, la integridad del DNA en el núcleo del espermatozoide también se ve afectada por varios factores, incluido ROS. Un alto porcentaje de daño en el DNA tiene un impacto negativo en la capacidad fecundante del espermatozoide y se encuentra correlacionado con la producción de abortos espontáneos ¹⁴. Por otra parte, se han encontrado mutaciones y polimorfismo en determinados genes de varones infértiles con espermogramas normales ¹⁵. Por último, la fecundación involucra múltiples procesos complejos e intrincados, entre los que se incluyen los procesos de capacitación e hiperactivación del espermatozoide. Defectos en cualquiera de estos puede impedir la fusión del espermatozoide con el ovocito y la formación del cigoto.

1.3.1 Diagnóstico.

En la actualidad, el análisis del semen o espermograma constituye la base de los estudios para evaluar la fertilidad masculina. Este consiste en: un examen macroscópico, en donde los parámetros que se evalúan son el volumen, la viscosidad y el pH del semen; y un examen microscópico donde se evalúa la concentración, la motilidad, la viabilidad y la morfología del espermatozoide. Este estudio en conjunto con un examen físico y un registro exhaustivo de la historia clínica del paciente contribuye al diagnóstico de infertilidad o a pronosticar el potencial de fertilidad ⁹.

Los parámetros normales del espermograma en la Quinta edición del Manual de la WHO (2010) ¹⁶ se obtuvieron de un estudio realizado en hombres con fertilidad comprobada dentro de los 12 meses, en 3 continentes y en 8 países. Se analizaron entre 400 y 1900 muestras de semen. Para la estadística se utilizó un intervalo de referencia de una cola por ser más apropiado, ya que los valores altos de los parámetros espermáticos no son considerados un detrimento de la fertilidad. La motilidad progresiva (PR) tiene en cuenta a todos los espermatozoides con movimiento activo linealmente o en grandes círculos, mientras que la motilidad no progresiva (NP) comprende todos los patrones de motilidad con ausencia de progresión. Se considera el 5to percentilo como el límite de referencia más bajo:

- Volumen: 1,5 ml.
- pH: $\geq 7,2$
- Concentración: $15,0 \times 10^6$ espermatozoides/ml
- Motilidad total (PR + NP): 40 %
- Motilidad Progresiva (PR): 32 % (5to centilo 95% IC: 31 - 34 %)
- Vitalidad: espermatozoides vivos 58 %
- Morfología (criterio estricto): 4 % de formas normales.

Sin embargo, si bien el análisis del semen constituye una prueba no invasiva, de bajo costo para el paciente y la información que provee es crítica, tiene limitaciones para predecir la fertilidad masculina. En primer lugar, el criterio de normalidad de los parámetros seminales, varía de acuerdo a qué edición del manual de laboratorio para la examinación y procesamiento del semen humano de la organización mundial de la salud (WHO) es empleada. En el 2010, la WHO estableció nuevos valores de referencia de los parámetros seminales, siendo marcadamente inferiores a los reportados previamente. Como consecuencia, esto resultaría en una re-clasificación de las parejas infértiles. Por otro lado, un análisis de

semen normal no es garantía del potencial de fertilidad masculina, debido a que varios estudios demostraron que hay un significativo solapamiento entre los valores de los parámetros seminales de pacientes fértiles e infértiles ¹⁷. Este solapamiento se debe en parte a la marcada variabilidad biológica entre las muestras de semen, incluso en aquellas procedentes del mismo individuo tomadas con una diferencia de unos pocos días. Varios factores fisiológicos, patologías, enfermedades y factores ambientales resultan en esta gran variabilidad observada. Esto conduce a una dificultad en la interpretación y manejo de los pacientes con valores anormales en los parámetros seminales. Por otra parte, muchos procesos claves en el proceso de fecundación como la interacción del espermatozoide con el moco cervical, su transporte hacia el ovocito y su interacción con el mismo, no son evaluados en el análisis de semen convencional. Estos pasos del proceso de fecundación deben ser evaluados por pruebas mucho más específicas, y generalmente son solicitadas en los pacientes que requieren un examen más exhaustivo dada su imposibilidad de concebir un hijo ¹¹.

Sin embargo, generalmente estas pruebas resultan poco precisas y ambiguas dando resultados normales o no concluyentes, lo que conlleva al diagnóstico de infertilidad idiopática. En este contexto, se pone en evidencia la necesidad de contar con nuevas herramientas diagnósticas más específicas, precisas y eficaces que permitan predecir la calidad del semen y el potencial del varón de engendrar hijos.

Por otra parte, en los casos de azoospermia no obstructiva se deben recurrir a técnicas invasivas para obtener un diagnóstico certero. Estos pacientes pueden presentar pequeños focos de producción espermática por lo que la biopsia testicular es el método indicado para clasificar apropiadamente la patología ^{18,19}.

1.3.2 Estrategias terapéuticas

En algunas enfermedades reproductivas masculinas hay procedimientos que permiten revertir esta situación, como es en el caso de azoospermia obstructiva. En este tipo de infertilidad, la reconstrucción microquirúrgica de los conductos obstruidos es el método generalmente indicado ⁸. Por otro lado, los pacientes con varicocele o criptorquidia también pueden ser intervenidos quirúrgicamente, resultando en la reversión de la dilatación de las venas testiculares y el descenso de los testículos, respectivamente.

Sin embargo, en muchos casos de infertilidad no es posible revertir esta condición. Aún así gracias al desarrollo de las técnicas de reproducción asistida muchas parejas pueden contrarrestar esta dificultad a la hora de concebir un hijo. Los procedimientos involucran

técnicas de baja y alta complejidad. Las técnicas de baja complejidad consisten en ubicar los espermatozoides en el lugar apropiado en el tracto reproductor de la mujer para que ocurra la fecundación, mientras que las técnicas de alta complejidad involucran procedimientos que extraen los óvulos no fecundados del ovario, los combinan con los espermatozoides fuera del cuerpo, y luego colocan ovocitos fecundados (embriones) o las mezclas de ovulos/espermatozoides en el lugar apropiado en el tracto reproductor femenino para que tenga lugar el desarrollo ^{5,20}. Entre los procedimientos de alta complejidad se encuentran:

Fecundación in vitro (FIV): La mujer es tratada con hormonas que estimulan la maduración de muchos folículos ováricos. Se recuperan luego los ovocitos de estos folículos y se recolectan espermatozoides del padre. Los ovocitos y los espermatozoides se combinan en un medio de cultivo (*in vitro*) donde tiene lugar la fecundación. Los embriones resultantes pueden ser entonces transferidos, entre el día 3 y 5, al útero de la mujer o congelarse para una implantación posterior. Esta técnica se aplica en el caso de trompas obstruidas, endometriosis, disfunciones ovulatorias y muestras de semen con anomalías moderadas.

Inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI): Es una técnica de fecundación in vitro modificada, en la cual un ovocito es sostenido mediante aspiración con una pipeta de vidrio. Luego se usa una más delgada con un extremo penetrante para ingresar en el ovocito e inyectar un espermatozoide. A diferencia de las otras técnicas mencionadas, el ovocito debe ser liberado de las células de la granulosa que lo rodean previo a la microinyección del espermatozoide, siendo altamente eficiente con una tasa de fecundación de entre el 70 y el 80% ²¹. Este tipo de procedimientos se recomiendan en pacientes cuyo recuento de espermatozoides es muy bajo (oligospermia) o nulo (pacientes azoospermicos de los cuales se hayan recuperado espermatozoides de material proveniente de biopsia testicular).

Asimismo, es la técnica indicada para pacientes con infertilidad inexplicada, ya que muchos de los pasos naturales involucrados en la fecundación, como son la capacitación, hiperactivación, unión a la zona pelúcida, y la reacción acrosómica, son pasados por alto. Sin embargo, no todos los pre-embryones evolucionan correctamente y algunos derivan en embriones de muy mala calidad con muy pocas posibilidades de implantación ¹¹.

Cuando la mujer no es capaz de producir sus propios óvulos o estos son de mala calidad se puede recurrir a la utilización de ovocitos donados, generalmente la donante es una mujer joven con fertilidad comprobada (ICSI con ovocitos donados).

1.4 Biomarcadores.

Se considera a un biomarcador a cualquier molécula biológica sensible de ser cuantificada objetivamente en el laboratorio y que funcione como un indicador de una vía fisiológica ¹. La identificación de nuevos biomarcadores es un proceso laborioso y exigente. Teniendo en cuenta que un biomarcador puede ser un gen, proteína, ARN o un metabolito, las posibilidades son casi infinitas. En el contexto de la infertilidad masculina un buen biomarcador debería permitir evaluar de una manera, precisa, eficaz y mínimamente invasiva el potencial del varón para engendrar hijos.

1.4.1 Biomarcadores e infertilidad masculina

En la actualidad, el biomarcador más ampliamente utilizado para predecir fertilidad masculina es el análisis del semen. Sin embargo, como ya se ha mencionado anteriormente presenta ciertas limitaciones en cuanto a su capacidad diagnóstica.

Durante las últimas décadas, se desarrollaron diversas herramientas con el objeto de caracterizar en mayor profundidad la función reproductiva masculina. Entre ellas, el dosaje de anticuerpos antiespermáticos (ASA) ha sido ampliamente utilizado aunque actualmente su eficacia predictiva se encuentra cuestionada ^{22, 23}. Por otro parte, entre los biomarcadores genéticos de infertilidad masculina se distinguen ciertas alteraciones cromosómicas en la forma de aberraciones estructurales, que son identificadas mediante análisis de cariotipo. Asimismo, microdeleciones del cromosoma Y se sabe que pueden actuar como marcadores de infertilidad masculina ²⁴.

Recientemente con el desarrollo de las tecnologías ómicas, se hizo posible hacer un abordaje global del problema de infertilidad, condición inicial para identificar nuevos biomarcadores. En este marco, se han realizado diversos estudios con el objeto de identificar proteínas en plasma seminal que pudieran constituirse como posibles biomarcadores de infertilidad masculina ^{25, 26, 27}. Entre las proteínas identificadas en plasma seminal de individuos sanos se encuentran el antígeno prostático específico (PSA), fosfatasa ácida, semenogelina, albumina, lactoferrina, entre otras ^{25, 28}. El estudio de los productos metabólicos celulares como posibles marcadores biológicos de fertilidad masculina se encuentra actualmente en sus inicios. A este respecto, la escasa bibliografía disponible propone diversos metabolitos capaces de discriminar distintas patologías reproductivas masculinas entre los que se destacan fosfocolina, fructosa y varios aminoácidos ^{29, 30}. Por otro lado, el estudio de la expresión génica mediante métodos de secuenciación y microarreglos,

ha permitido la identificación de mARNs y ARNs pequeños asociados a diversos tipos de infertilidad masculina. Estos estudios se han llevado a cabo tanto en muestras de plasma seminal, espermatozoides y en muestras de tejido testicular. Se ha postulado que algunas de estas moléculas con niveles alterados en distintas patologías reproductivas masculinas podrían constituirse como posibles biomarcadores ^{31, 1, 32}.

1.4.2 ARNs pequeños

Las estrategias de alta performance (secuenciación masiva o microarreglos) han permitido una rápida evaluación de los ARNs presentes en espermatozoides, identificando patrones de ARN que se correlacionan con la espermatogénesis, la motilidad del espermatozoide, procesos anti-apoptóticos en células germinales, reparación del ADN, y la modificación de histonas ¹. Sin embargo, estos conocimientos no han sido fácilmente extrapolados al ámbito clínico, dadas las dificultades de su implementación metodológica. En este marco, los ARNs pequeños extracelulares constituyen una alternativa prometedora. ARNs libres o extracelulares han sido detectados en varios fluidos biológicos humanos incluyendo plasma, suero, lagrimas, orina, líquido cefalorraquídeo, leche materna, saliva y plasma seminal, y se sugiere que sus niveles reflejan los cambios moleculares que tuvieron lugar en las células de las que derivan ³³. Además, los mismos son estables ya que se encuentran contenidos en microvesículas (exosomas) o unidos a complejos con proteínas y/o lípidos ^{1, 34, 35}.

Los ARNs pequeños son un tipo de ARN no codificante de entre 20 y 30 nucleótidos de longitud. Estas moléculas regulan diversos procesos biológicos, en general interfiriendo con la traducción del ARN mensajero a través de interacciones ARN-ARN. Existen distintos tipos, siendo las clases mejor estudiadas los ARNs pequeños de interferencia (siARNs), microARNs (miARNs), y ARNs asociados a Piwi (piARNs) ³⁶. Los perfiles de expresión de los ARNs pequeños se encuentran alterados en diversos procesos patológicos incluidos cáncer, enfermedades infecciosas y metabólicas, e infertilidad, entre otras ³⁷.

1.4.2.1 microARNs

Los microARNs (miARNs) son moléculas pequeñas de entre 20 y 24 nucleótidos procesadas a través de múltiples pasos que involucran varias enzimas, comenzando en el núcleo y continuando en el citoplasma. Participan en la regulación de la expresión génica en una amplia gama de organismos a través del clivaje o represión traduccional de sus mARNs ³⁶. Hasta la fecha se han identificado más de 2000 miARNs en humanos, cada uno de los cuales regula la expresión de decenas o cientos de genes. Además, con frecuencia cada

transcripto blanco contiene sitios de unión para múltiples miARNs, que se unen de manera cooperativa, resultando en la formación de complejas redes de control regulatorio ³⁸.

El mecanismo de biogénesis de los miARNs es un proceso complejo. Los miARNs son sintetizados inicialmente como largos precursores con extensa estructura secundaria, adoptando una estructura de hebilla. Estos precursores son degradados por las ribonucleasas DROSHA y DICER, liberando el miARN maduro que se asocia con un complejo del tipo RiSC (del inglés, RNAi Silencing Complex) compuesto por varias proteínas, incluida AGO. Este complejo es capaz de unirse a secuencias complementarias al miARN en la región 3' no codificante de mARNs blancos para así inhibir su traducción y/o promover su degradación a través de un mecanismo similar al descrito para la degradación de ARN en el proceso de ARN de interferencia ^{36, 39, 40}. El mecanismo que se llevará a cabo dependerá de la complementariedad de bases entre la secuencia semilla (del segundo al octavo nt del extremo 5') del miARN y su gen blanco. El miARN especificará la escisión del ARNm si existe una complementariedad casi perfecta de secuencias, mecanismo que prevalece en plantas. En el caso de que exista una complementariedad parcial se reprimirá la traducción, mecanismo observado en animales. En este último caso, se puede producir el bloqueo del paso de iniciación o elongación de la traducción, inhibiendo los factores eucarióticos pertinentes o causando un estancamiento del ribosoma. Asimismo, el miARN unido al ARNm blanco, puede incorporarse en unas estructuras dinámicas llamadas P-bodies (processing bodies), quedando de esta manera secuestrados e impidiendo el inicio de la traducción. Otra forma es reduciendo la estabilidad del transcripto debido a que la unión del miARN puede resultar en el reclutamiento de factores de deadenilación lo que hace al ARNm más susceptible a la degradación ^{36, 41}.

1.4.2.2 piARNs

Constituyen un amplio grupo de ARN pequeños no codificantes de entre 26 a 30 nucleótidos de longitud, con importantes funciones biológicas en células germinales. Estos interactúan de manera específica con las proteínas PIWI, de ahí su nombre piARNs (piwi-interacting ARNs). Cabe destacar, que las proteínas argonautas pueden separarse en base a la similitud de secuencia en dos clados filogenéticamente distintos, AGO y PIWI ⁴². Actualmente, se sabe que la función de los piARNs es mantener la integridad del genoma a través del silenciamiento de retrotransposones. Esto es de suma importancia en las células germinales que contienen información genética para las siguientes generaciones por lo que este mecanismo las protege del daño producido por la propagación de elementos móviles.

Diversas evidencias indican que deleciones en los genes implicados en la biogénesis de los piARN o su expresión defectuosa se asocian con defectos en la espermatogénesis ⁴². En la actualidad, muchos aspectos de la biogénesis de estos ARNs pequeños quedan por ser dilucidados, por lo que constituye un área de intensa investigación. A diferencia de los miARNs y siARNs, que dependen de las enzimas RNasa tipo III para convertir los precursores de ARN doble cadena en los ARNs pequeños funcionales, los piARNs derivan de ARNs simple cadena por lo que requieren de un procesamiento alternativo ⁴².

Por otro lado, hay evidencia de que los piARNs se disponen agrupados en clusters en distintos loci genómicos. Asimismo, estos clusters de piARN raramente contienen copias de transposones de longitud completa, sino que contienen fragmentos remanentes que son incapaces de transponer ⁴³.

Numerosos genes están involucrados en la generación de piARNs, en particular las proteínas PIWI que son requeridas para su biogénesis y función. Se han propuesto dos vías principales de biogénesis para estos ARNs no codificantes: la vía primaria que involucra la síntesis primaria de piARNs a partir de los clusters de piARNs mediante la ARN polimerasa II, y otra vía secundaria que produce piARNs secundarios a través de un mecanismo de amplificación denominado mecanismo de ping-pong ^{43,44}.

Por otra parte, debido a estos mecanismos de biogénesis, los piARNs comparten ciertas características. Entre éstas, se encuentran la tendencia a presentar en el extremo 5' un uracilo y una adenina en la posición 10. Asimismo, el extremo 3' se encuentra generalmente modificado por metilación del oxígeno 2'. Además, como se mencionó anteriormente los piARNs constituyen los ARN pequeños, unidos y funcionalmente relacionados a las proteínas PIWI ⁴⁴.

Por último, aunque la expresión de los piARNs se consideraba exclusiva de los tejidos gonadales, recientemente su presencia ha sido reportada en otros tipos de células, incluidas células del cerebro de ratón, células somáticas humanas malignas y no malignas, y en el plasma humano. Esto sugiere que la función que cumplen es mucho más amplia de lo que previamente se pensaba ⁴⁵.

1.4.2.3 Otros ARNs pequeños.

Además de las clases de ARNs pequeños mencionadas anteriormente, hay otros tipos de ARNs pequeños que cumplen funciones regulatorias. Estos incluyen: los ARNs pequeños nucleares (snARNs) que participan en el proceso de splicing del mRNA; los ARNs pequeños

nucleolares (snoARNs) que están involucrados en el procesamiento y modificación de bases del rARN en el nucléolo; y los ARNs pequeños de interferencia (siARNs) ⁴⁶. Este último además de constituir un mecanismo de defensa contra los ácidos nucleicos exógenos (como virus), participa en el mantenimiento de la integridad del genoma a través del silenciamiento de los elementos móviles ⁴¹. Otro tipo de ARNs pequeños son los denominados YARNs que son moléculas que se pliegan en estructuras características de bucle-tallo de manera similar a los tARNs. Son componentes del complejo ribonucleoproteico Ro60, que constituye un blanco de los anticuerpos en los pacientes con lupus eritematoso sistémico. Si bien sus funciones fisiológicas están muy poco caracterizadas, hay evidencias que indican que estarían involucrados en diversos procesos celulares como la replicación del ADN cromosómico, en la respuesta al daño por UV, y en la regulación de la biogénesis de ARNs pequeños ³⁵.

Por otro lado, recientemente se ha descrito una nueva clase de ARNs pequeños no codificantes que corresponden a fragmentos derivados de los tARNs. Originalmente fueron detectados mediante estudios de secuenciación masiva y desestimados como resultados producto de la ruptura al azar de los tARNs. Sin embargo, la recurrencia de las lecturas de estos fragmentos ^{47, 48}, sugirió que estos ARNs pequeños podrían ser funcionales ^{49, 50}. Se ha demostrado que los fragmentos de tARN (tRFs) pueden derivar de los precursores de tARNs en el núcleo o de los tARNs maduros en el citoplasma ⁴⁷. Aunque no hay un consenso en cuanto a su nomenclatura, generalmente se nombran de acuerdo a su origen y se distinguen los siguientes subtipos: 5' tRFs corresponden a los fragmentos derivados del extremo 5' del tARN maduro y producidos por cortes en el D-loop o entre el D-loop y el loop del anticodón. Con 3' tRFs se designan a los fragmentos derivados desde el extremo 3' del tARN maduro y producidos por clivaje en el T-loop o justo antes del mismo; y con tiARNs (o tARN-h) se nombran a las mitades de tARNs producidas por corte en el loop del anticodón del tARN maduro. Por otro lado, los tsARNs (o tRF-1) derivan del procesamiento de los precursores de tARNs en el núcleo y se caracterizan por poseer en el extremo 3' una cola de poli U (Figura 4) ⁴⁶.

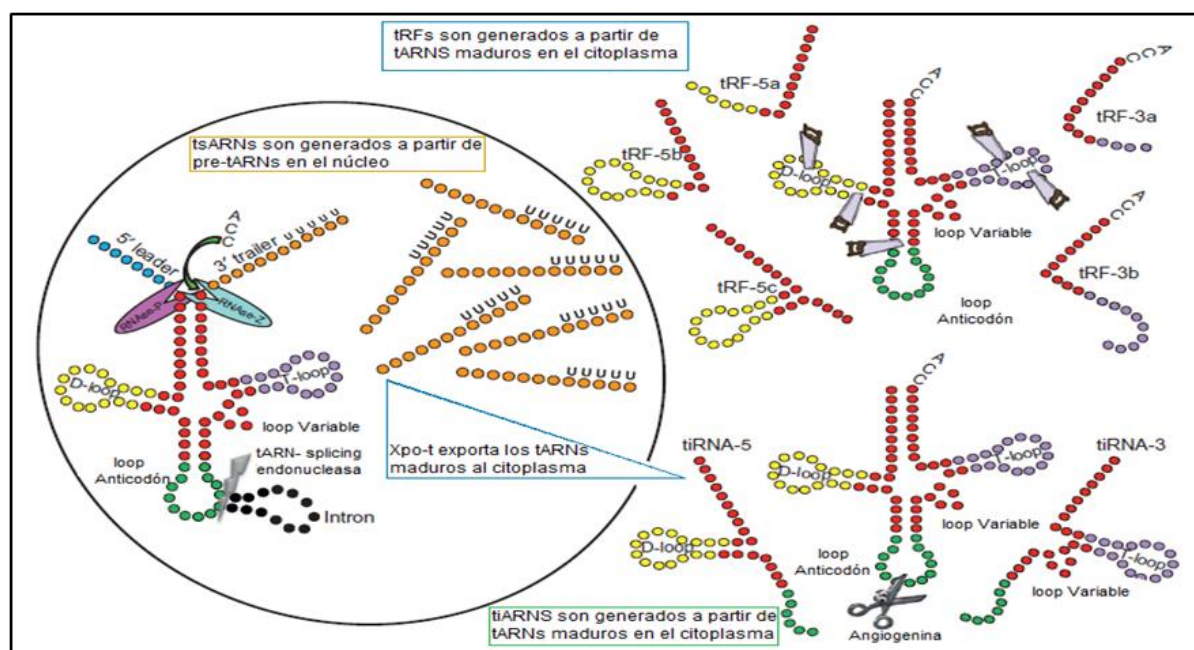


Figura 4. Biogénesis de los tRFs. Imagen extraída de Balatti.V et al. *Role of the tRNA-Derived Small RNAs in Cancer: New Potential Biomarkers and Target for Therapy* (135), 2017.

Aunque se sabe muy poco acerca de las vías de biogénesis de los tRFs, varios trabajos han permitido dilucidar algunos aspectos de los mecanismos de generación de estos fragmentos de tARN. Por un lado, en la generación de los tiARNs se encontró involucrada la ribonucleasa Angiogenina que corta en el loop del anticodón, resultando en la formación de los 3'tiARNs y 5'tiARNs^{51, 52}. Por otro lado, aunque en el caso de los 5'tRFs y 3'tRFs no hay acuerdo con respecto a la necesidad de Dicer en la biogénesis⁵³, varios trabajos coinciden en la participación de la proteína AGO^{54, 53}. Por otra parte, en cuanto a los tsARNs hay una fuerte evidencia de que se generan durante el procesamiento del pre-tARN dado que el extremo 5' se corresponde con el sitio de corte de la RNasa Z (corta el extremo 3' durante el procesamiento del pre-tARN) y el extremo 3' se corresponde con la señal de terminación de la transcripción de la ARN polimerasa III⁵⁵.

Se ha postulado que estos tRFs están involucrados en una variedad de procesos celulares incluidos la regulación de la expresión génica, apoptosis, modulación de la respuesta al daño al DNA, entre otros⁵⁵. Además, se ha observado que los tRFs se producen en condiciones de stress, donde se piensa que podrían cumplir funciones en el silenciamiento de retrotransposones⁵⁶. Asimismo, se encontró que se acumulan en los gametos y tejidos del sistema reproductor, en los cuales se produce una reactivación natural de la transcripción de los retrotransposones como consecuencia de la reprogramación epigenética⁵⁶. Mas aún, se vio

que ciertos 5'tRFs y tiARNs acumulados en los espermatozoides cumplen un rol transgeneracional y regulan en el cigoto la transcripción de los genes asociados a retrotransposones con repeticiones terminales largas (LTRs) por un mecanismo todavía desconocido^{57, 58}.

Por último, varios tRFs se han encontrado asociado a diversas patologías como cáncer, enfermedades neurodegenerativas e infecciones virales⁵⁹.

1.5 ARN pequeños como biomarcadores de infertilidad masculina

En los últimos años se han realizado diversos trabajos avocados a la caracterización de los perfiles de expresión de ARNs pequeños, especialmente miARNs, en espermatozoides y tejido testicular, con el objeto de dilucidar su implicancia en la fertilidad masculina^{60, 61, 32}. Estudios recientes caracterizaron el perfil de expresión de miARNs en espermatozoides de individuos sanos, e identificaron una población estable de miARNs expresados de manera abundante⁶¹. Además, se encontró que varios de estos miARNs estarían potencialmente relacionados con la espermatogénesis y embriogénesis⁶¹. Por otro lado, Masood Abu-Halima y colaboradores estudiaron el perfil de expresión de miARNs en muestras de tejido testicular procedentes de pacientes con distintos tipos de azoospermia e identificaron miARNs asociados a las distintas patologías estudiadas³².

Por otro lado, existen varios trabajos que relacionan los ARN pequeños en plasma seminal y distintos tipos de infertilidad. En la mayoría de los casos se trata de análisis de perfiles globales de ARNs pequeños, empleando métodos de secuenciación masiva o microarreglos, en muestras de plasma seminal de pacientes infértiles y de controles sanos^{18, 62, 63, 33, 64}. Asimismo, diversos trabajos describieron los perfiles de ARN pequeños en plasma seminal de individuos normozoospermicos^{64, 35}. Hu y colaboradores demostraron que los piARNs son los ARNs pequeños más abundantes en plasma seminal y que los mismos se encuentran ausentes en individuos vasectomizados⁶⁴. Por otra parte, Vojtech y colaboradores analizaron el perfil de ARNs pequeños contenidos en la fracción exosomal del plasma seminal de individuos sanos e identificaron abundantes niveles de miARNs, tARNs, fragmentos de tARNs (principalmente tiARNs y 5' tRFs) y YARNs³⁵. Cabe mencionar que los exosomas son microvesículas subcelulares rodeadas por membrana que se postula que median la comunicación entre células.

Paralelamente, en otros trabajos se evaluó el perfil de ARNs pequeños seminales asociados a distintas enfermedades reproductivas humanas^{63, 33, 64, 18, 10, 62}. Los tipos de infertilidad

masculina analizados abarcan desde pacientes subfértiles, oligospermicos y astenozoospermicos hasta pacientes con la forma más grave de infertilidad, la azoospermia. En todos los trabajos se identificaron ARNs pequeños potencialmente asociados a las patologías en estudio entre los que se destacan miR-34, let-7-a, miR-181, miR-30 y miR-509.

Por otra parte, Salas Huetos y colaboradores analizaron ARNs pequeños asociados a infertilidad idiopática en espermatozoides ⁶⁵. En este trabajo se identificaron 57 miARNs diferencialmente expresados en pacientes infértiles. Sin embargo, hasta la fecha no se han reportado estudios que describan perfiles de expresión de ARNs pequeños seminales asociados a infertilidad idiopática.

2 Objetivos

Este trabajo de tesina propuso evaluar el empleo de la cuantificación de ARNs pequeños en plasma seminal de individuos normozoospermicos como predictores de buena calidad espermática con el objeto de identificar nuevos biomarcadores de infertilidad idiopática.

Para ello, se llevaron adelante los siguientes objetivos específicos:

- Selección de ARNs pequeños, plausibles de ser cuantificados en el laboratorio, que se proyecten como buenos candidatos para biomarcadores de enfermedades reproductivas masculinas en base a relevamientos bibliográficos y bioinformáticos.
- Puesta a punto y optimización de la técnica de extracción de ARN y cuantificación de ARNs pequeños mediante RT-qPCR a partir de muestras de plasma seminal.
- Cuantificación de los ARN pequeños seleccionados en muestras de plasma seminal de individuos normozoospermicos fértiles y con diagnóstico presuntivo de infertilidad idiopática que se sometieron a tratamientos de ICSI utilizando óvulos de donantes.
- Correlación de los datos obtenidos con parámetros clínicos y de laboratorio para contribuir a la caracterización de la posible función que dichas moléculas podrían estar llevando a cabo en la fisiopatología de la enfermedad.

3 Materiales y Métodos

3.1 Grupos de estudio

Los pacientes con diversas patologías reproductivas fueron seleccionados por la Dra. Karina Calvo (codirectora del proyecto, bioquímica del Laboratorio de alta complejidad de PROAR) de entre los individuos que concurrieron al Centro Médico PROAR y que se encontraban realizando tratamientos de reproducción asistida en la institución. En ese marco, el seguimiento de todos los pacientes fue realizado por médicos especialistas del Centro Médico PROAR, quienes registraron los datos de la historia clínica del paciente, realizaron el examen físico y solicitaron los estudios bioquímicos pertinentes. Asimismo, el equipo médico realizó los tratamientos de reproducción asistida e informó su evolución. En todos los casos, la incorporación de las personas se efectuó una vez que otorgaron su libre consentimiento a participar. El presente proyecto cuenta con la aprobación del Comité de Bioética de la Fac. de Cs. Médicas de la UNR. (expte n° 44487/0004). Asimismo, este trabajo de tesina fue evaluado y aprobado por el Comité de Bioética de la Fac. de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas de la UNR.

Individuos Normozoospermicos. Se incorporaron 41 voluntarios, con parámetros espermáticos superiores al quinto percentil según manual de la Organización Mundial de la Salud (WHO 2010), que se sometieron a tratamientos de ICSI y utilizaron óvulos de donantes (para minimizar los posibles factores de infertilidad femenina). La conducta terapéutica fue definida por el médico tratante en el marco de cada tratamiento de reproducción asistida. A estos pacientes se les solicitó hacer uso del plasma seminal (PS) que se desecha de la muestra de semen que suministra al laboratorio en el marco de su tratamiento. Estos pacientes fueron clasificados de acuerdo a los resultados reproductivos en dos grupos:

- **ICSI (+):** Grupo control constituido por individuos que lograron el embarazo clínico mediante el tratamiento de reproducción asistida de alta complejidad, ICSI (n=21).
- **ICSI (-):** Pacientes que no lograron el embarazo clínico mediante ICSI. A su vez, dentro de este grupo se distinguen: los pacientes designados como **x1** que realizaron un solo procedimiento de ICSI y obtuvieron un resultado negativo (n=11), y los individuos que realizaron dos o más procedimientos de ICSI con resultados negativos (n= 9), en los que se presume posible infertilidad idiopática, **PII**.

Pacientes Azoospermicos. Se reclutaron 16 pacientes con azoospermia. El paciente hizo entrega de una muestra de semen previo a realizarse la Biopsia Testicular programada en el marco de su tratamiento de reproducción asistida de alta complejidad.

3.1.1 Relevamiento de datos de Historia Clínica de los pacientes

Las características clínicas generales de los pacientes como son la edad, índice de masa corporal (IMC) y resultados del/los procedimientos de ICSI fueron extraídos de las historias clínicas por el personal del Centro médico PROAR. El análisis de semen fue realizado por el equipo Bioquímico de PROAR de acuerdo a las normas del Manual de la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2010) ⁷. Los parámetros seminales que se midieron incluyeron concentración espermática (espermatozoides $\times 10^6/\text{mL}$), % vitalidad y % motilidad.

La valoración de los embriones obtenidos por ICSI fue realizada por el equipo bioquímico responsable del Laboratorio de alta complejidad de PROAR en base a la clasificación del Consenso de Estambul ⁶⁶. Se considero embarazo a la presencia de saco gestacional mediante ecografía en la 6^{ta} semana.

3.2 Procesamiento inicial de las muestras

Las muestras de semen se obtuvieron por masturbación con una abstinencia no mayor a 5 días y se dejaron licuar por al menos 30 minutos a 37°C. Cada muestra fue procesada antes de la hora de recolección, se homogenizó, se separó parte de la muestra para realizar gradiente de densidad y obtener espermatozoides seleccionados para ICSI. El resto de la muestra no utilizada se centrifugó 5 min a 1500g para la obtención de PS libre de células. El PS se preservó en nitrógeno líquido hasta su traslado a un freezer de -70°C.

3.3 Extracción de ARN

Para la puesta a punto de la técnica de extracción de ARN se empleó un pool de muestras de PS de 5 individuos normozoospermicos y se evaluó la incorporación de distintas modificaciones al protocolo estándar de extracción de ARN con TRI Reagent® (Molecular Research Center, MRC, Inc) que se describe a continuación:

Brevemente, el PS congelado se descongeló rápidamente en un baño de agua a 37°C, y se centrifugó durante 10 min a 16,000 g. Luego, 0,2 ml se mezclaron con 0,8 ml de TRI Reagent, se incubó la mezcla durante 5 minutos a temperatura ambiente y se agregaron 0,22 ml de cloroformo, se incubó durante otros 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 16,000 g por 20 min. A continuación, se transfirió aproximadamente 0,7 ml de la fase acuosa

y se agregó igual volumen de Isopropanol frío para precipitar el ARN. Luego, se centrifugó a 12,000g por 15 minutos, se removió el sobrenadante y se lavó dos veces el pellet de ARN con 1 ml de etanol 75%. Después, se dejó secar el pellet de ARN por 3-5 minutos y se disolvió en agua estéril. Finalmente, se centrifugó a 16,000 g durante 20 min y se transfirió la solución final de ARN a un tubo nuevo.

Alternativamente, se evaluó un pretratamiento con 0,25 ml de buffer PEG (2 %P/V polietilenglicol 20K, 0,15% NaCl, 1% SDS, 2,5mM EDTA, 0,1 M Tris HCl pH= 8) para eliminar los polisacáridos⁶⁴. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos, seguido por centrifugación a 13,000 g durante 10 minutos a 4°C y la fase acuosa se mezcló con 0,8 ml de TRI Reagent para continuar con el protocolo. Asimismo, se evaluaron diversas variantes en el paso de precipitación: adición de 1 µg de glucógeno como carrier, empleo de una mezcla 1:1 Isopropanol frío: Solución salina (0,8 M citrato de sodio y 1,2 M NaCl) como solución precipitante y distintos tiempos de precipitación (ON a -70°C o 2hs a -20°C). Las abreviaturas empleadas para referirse a los diferentes protocolos analizados durante la puesta a punto de la técnica de extracción de ARN se resumen en la Figura 5.

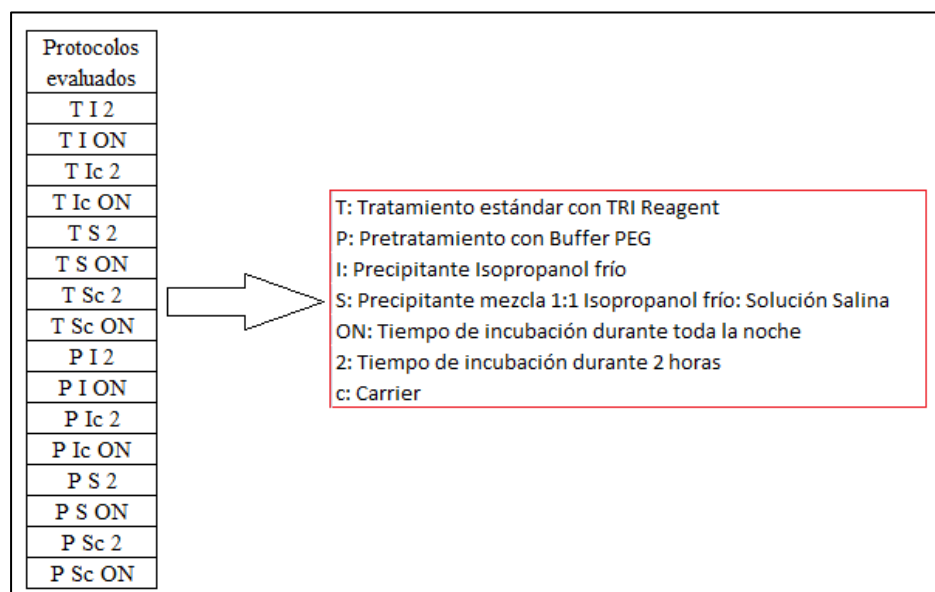


Figura 5. Nomenclatura de las distintas variantes del protocolo de extracción de ARN analizadas.

Como resultado de la puesta a punto de la técnica de extracción de ARN se estableció el protocolo definitivo que consistió en la incorporación del pretratamiento con el Buffer PEG, y en el paso de precipitación se incluyeron las siguientes condiciones: precipitación con mezcla 1:1 Isopropanol frío : Solución Salina, durante 2 hs a -20°C y en ausencia de carrier.

Dada la dificultad de identificar buenos controles endógenos para qPCR en muestras provenientes de fluidos extracelulares, se evaluó el agregado de $3,2 \times 10^8$ copias del ARN sintético cel-miR-39 (Qiagen) en el paso inicial del protocolo.

Para la extracción de ARN en las muestras de biopsia testicular (BT) de los pacientes azoospermicos analizados, se procedió de la siguiente manera: se poterizó un fragmento pequeño ($1-2 \text{ cm}^2$) de la muestra de tejido testicular con 1 ml de TRI Reagent hasta obtener un homogenado. A continuación, éste se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente, seguido por centrifugación a 12,000 g durante 10 minutos a 4°C y se transfirió la capa acuosa a un tubo nuevo. Luego, se agregó 0,22 ml de cloroformo y se continuó de la misma manera que en el protocolo estándar de extracción de ARN.

3.4 Cuantificación de ácidos nucleicos

Los espectros de absorbancia entre 240 y 300 nm fueron obtenidos a partir de 2uL de las soluciones de ARN. En el caso de las muestras de biopsia testicular, la concentración de ARN se determinó a través de la medida de absorbancia a 260 nm y la pureza del ARN fue verificada por el cociente A_{260}/A_{280} . Se empleó un lector Epoch (BioTek) equipado con placa de micro-volúmenes Take3™.

3.5 Cuantificación de ARNs pequeños.

La determinación de los niveles de los ARNs pequeños se determinó a través de la técnica *stem-loop* RT-qPCR descrita por Chen y colaboradores⁶⁷ (Figura 6). Esta técnica incluye dos pasos: una retrotranscripción (RT) y una reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR). Primero, el oligo *stem-loop* RT (SLO) se une a una porción del extremo 3' de una molécula de ARN pequeño y luego se realiza una RT utilizando una transcriptasa reversa. Luego, el producto de la RT es amplificado y cuantificado realizando una qPCR convencional, utilizando un oligo directo específico para cada ARN pequeño y un oligo reverso universal, y un colorante fluorescente (en este caso EVAGreen), el cual se intercala en el ADN doble hebra (ADNdh) de forma no específica. Este colorante se excita mediante luz azul ($\lambda_{\text{max}} = 488 \text{ nm}$) y emite luz verde ($\lambda_{\text{max}} = 522 \text{ nm}$).

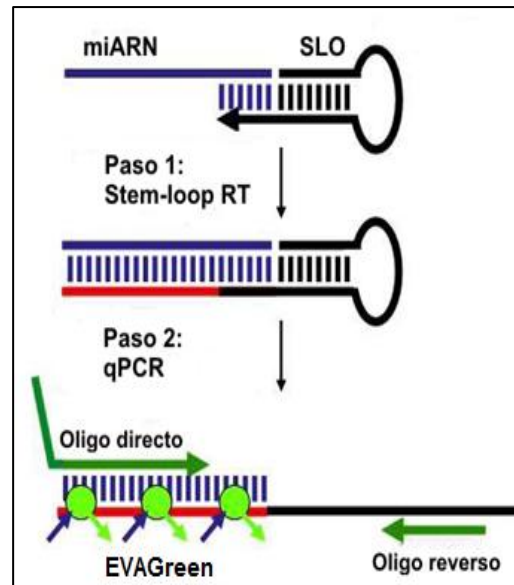


Figura 6. Descripción esquemática de la técnica *stem-loop* RT qPCR.

3.5.1 Diseño de oligos

Las secuencias de los miARNs fueron obtenidas del sitio www.mirbase.org y en el caso de los 5' tiARNs (también anotados como piARNs), de la base de datos de secuencias nucleóticas de NCBI.

Los oligos fueron diseñados según la técnica descrita por Chen y colaboradores⁶⁷ (Tablas I y II). Como oligo reverso en la qPCR se utilizó el oligo reverso universal: 5'-TGTTGCAGGGTCCGAGGTATT-3'.

A continuación, se muestran las secuencias de los ARN pequeños y en el caso de los miARNs los alineamientos de los distintos miembros de las familias que fueron cuantificados:

5' tiARNs:

tiARN^{Glu}: 5'-TCCCTGGTGGTCTAGTGGTTAGGATTCGGCAC-3'

tiARN^{Gly}: 5'-AGCATTGGTGGTTCAGTGGTAGAATTCTCGC-3'

tiARN^{Lys}: 5'-GCCCCGGCTAGCTCAGTCGGTAGAGCATGAGAC-3'

tiARN^{Phe}: 5'-TCCCTGGTTCGATCCCGGGTTTCGGCAC-3'

tiARN^{Met}: 5'-AGAGATAGCAGAGTGGCGCAGCGGAAGC-3'

miARNs:**miR-320:**

miR-320a-3p: 5'-AAAAGCTGGGTTGAGAGGGCGA-3'

miR-320b-3p: 5'-AAAAGCTGGGTTGAGAGGGCAA-3'

miR-107:

miR-107-3p: 5'-AGCAGCATTGTACAGGGCTATCA-3'

let-7:

let-7a-5p: 5'-TGAGGTAGTAGGTTGTATAGTT-3'

let-7b-5p: 5'-TGAGGTAGTAGGTTGTGTGGTT-3'

let-7c-5p: 5'-TGAGGTAGTAGGTTGTATGGTT-3'

let-7d-5p: 5'-AGAGGTAGTAGGTTGCATAGTT-3'

let-7e-5p: 5'-TGAGGTAGGAGGTTGTATAGTT-3'

let-7f-5p: 5'-TGAGGTAGTAGATTGTATAGTT-3'

let-7g-5p: 5'-TGAGGTAGTAGTTTGTACAGTT-3'

miR-30:

miR-30a-5p: 5'-TGTAACATCCTCGACTGGAAG-3'

miR-30b-5p: 5'-TGTAACATCCTACACTCAGCT-3'

miR-30c-5p: 5'-TGTAACATCCTACACTCTCAGC-3'

miR-30d-5p: 5'-TGTAACATCCCGACTGGAAG-3'

miR-30e-5p: 5'-TGTAACATCCTTGACTGGAAG-3'

cel- miR- 39:

cel-miR-39-5p: 5'-TCACCGGGTGTAATCAGCTTG-3'

Para optimizar la RT-qPCR de familias de miARNs compuestas por múltiples miembros se emplearon cebadores degenerados tanto para el paso de retrotranscripción como para la qPCR (PCR multiplex). Los nucleótidos diferentes entre los miembros de una familia de miARNs se encuentran subrayados.

Tabla I. Oligos utilizados para la técnica de stem-loop RT-qPCR en la cuantificación de tiARNs.			
Transcripto	Oligo para RT	Oligo Directo	Tamaño del amplicón
tiARN^{Glu}	5' – GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACCA GAGGAGACC <u>GTGCCG</u> –3'	5' – GGCGG <u>TCCCTGGTGGTC</u> <u>TAGTGGTTAGGATT</u> –3'	73 pb
tiARN^{Gly}	5' – GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACCA GAGGAGACC <u>GCGAGA</u> –3'	5' – GGCGG <u>AGCATGGTGGT</u> <u>TCAGTGGTAGAAT</u> –3'	72pb
tiARN^{Lys}	5' – GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACCA GAGGAGACC <u>GTCTCA</u> –3'	5' – GGCGG <u>GCCCGGCTAGCT</u> <u>CAGTCGGTAGAGCA</u> –3'	73 pb
tiARN^{Phe}	5' – GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACCA GAGGAGACC <u>GGTGCC</u> –3'	5' – GGCGG <u>TCCCTGGTTCGA</u> <u>TCCCGGTTTC</u> –3'	70pb
tiARN^{Met}	5' – GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACCA GAGGAGACC <u>GCTTCC</u> –3'	5' – GGCGG <u>AGAGATAGCAGA</u> <u>GTGGCGCAGC</u> –3'	69pb

tiARN: mitad de tARN; **RT:** retrotranscripción. Los nt en **negrita** son los que hibridan con el extremo 3' del tiARN. Los nt en **gris** son los coincidentes con el extremo 5' del tiARN.

Tabla II. Oligos utilizados para la técnica de stem-loop RT q-PCR en la cuantificación de miARNs.			
Transcripto	Oligo para RT	Oligo directo	Tamaño del amplicón
miR-320- a/b	5' - GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCA GAGGAGACTYGCC-3'	5' - GGCGGAAAAGCTGGGTTG AGA-3'	63 pb
miR-107	5' - GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCA GAGGAGACTGATAG-3'	5' - GGCGGAGCAGCATTGTAC AGGG-3'	63 pb
let-7-a/f	5' - GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCA GAGGAGACAACRT-3'	5' - GGCGGTGAGGTAGTAGRT TGT -3'	63 pb
let-7-b/c	5' - GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCA GAGGAGACAACCA-3'	5' - GGCGGTGAGGTAGTAGRT TGT-3'	63 pb
let-7-d	5' - GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCA GAGGAGACAACRT-3'	5' - GGCGGAGAGGTAGTAGGT TGC-3'	63 pb
Let-7-e	5' - GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCA GAGGAGACAACRT-3'	5' - GGCGGTGAGGTAGGAGGT TGT-3'	63 pb
Let-7-g	5' - GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCA GAGGAGACAACRT-3'	5' - GGCGGTGAGGTAGTAGTT TGT-3'	63 pb
miR-30-a/d	5' - GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCA GAGGAGACCTTCCA-3'	5' - GGCGGTGTAACATCCYC GAC-3'	63 pb
miR-30-b	5' - GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCA GAGGAGACAGCTGA-3'	5' - GGCGGTGTAACATCCTA CACT-3'	63 pb
miR-30-c	5' - GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCA GAGGAGACGCTGAG-3'	5' - GGCGGTGTAACATCCTA CACT-3'	63 pb
miR-30-e	5' - GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCA GAGGAGACCTTCCA-3'	5' - GGCGGTGTAACATCCTT GAC-3'	63 pb
Cel-miR-39	5' - GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCA GAGGAGACCAAGCT-3'	5' - GGCGGTACCCGGGTGTA ATC-3'	63 pb

miR: microARN; RT: retrotranscripción. Los nt en **negrita** son los que hibridan con el extremo 3' del miARN. Los nt en **gris** son los coincidentes con el extremo 5' del miARN. Las letras en los oligos corresponden al código de letras para bases degeneradas establecido por la Unión Internacional de Bioquímica (IUB), siendo R = A,G e Y = C,T

3.5.2 Retrotranscripción de las muestras

El ADNc (ADN copia) fue sintetizado, a partir de 8,5 µl de la solución de ARN en las muestras de PS y 1 µg de ARN en las muestras de BT, por la transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen). Se utilizaron SLO específicos para cada ARN pequeño y las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 20 µl. Brevemente, se mezclaron 1 µl de oligo dT (0,5 µg/ µl), 2 µl de una mix de SLO (0,5 µM c/u), 1 µl dNTPs (10 mM c/u) y 8,5 µl de ARN. La

mezcla se incubó a 65°C durante 5 min. Luego, se enfrió rápidamente en hielo por al menos 1 minuto y se adicionó una mezcla compuesta por: 1X First - Strand Buffer; 0.01M DTT; 2 U/ μ l de un inhibidor de RNasa, RNasaOUT; y 10 U/ μ l de la enzima M-MLV. La mezcla resultante, se incubó a 16°C durante 30 min para que tenga lugar la hibridación ARN-SLO, seguido por una incubación a 37°C durante 50 min para que la enzima M-MLV catalice la retrotranscripción reversa y por último se incubó a 75 °C durante 15 minutos para que se desnaturalice la enzima.

3.5.3 Ensayos de qPCR

La amplificación por qPCR fue realizada empleando la mezcla HOT FIREpol EvaGreen Plus (Solys Biodyne), en el sistema StepOne-Real Time PCR (Thermo Fisher Scientific). La mezcla incluye, la ADN Polimerasa HOT FIREpol, que se activa mediante una incubación a 95°C durante 12 minutos; dNTPs; MgCl₂; el colorante EvaGreen; y el colorante de referencia pasiva ROX.

Para la amplificación de los ARNs pequeños se emplearon oligos directo (específicos para cada ARN pequeño) y el oligo reverso universal en una concentración final 0,5 μ M. y 4 μ l de una dilución 1/20 de la solución de ADNc obtenida, en un volumen final de 10 μ l.

El ensayo de cuantificación relativa utilizado para el análisis de los resultados obtenidos fue el Método Comparativo ($\Delta\Delta$ Ct). Los niveles de cada ARN pequeño en las muestras de PS de los distintos grupos de pacientes analizados fueron normalizados usando como control endógeno el miR-320, y los niveles relativos se calcularon con respecto al valor promedio de Δ Ct obtenido para los individuos ICSI(+).

La homogeneidad y especificidad de los productos de PCR obtenidos en cada muestra fueron confirmados mediante análisis de curvas de “melting” o disociación luego de finalizada la amplificación.

La qPCR constó de un estadio inicial de calentamiento de 15 min a 95°C, seguido por 40 ciclos, cada uno incluyendo 10 s a 95°C (desnaturalización), 20 s a 60°C (hibridación) y 20 s a 72°C (elongación).

Para la preamplificación del ADNc del cel-miR-39 de las muestras de PS de los pacientes, se realizó una PCR empleando la enzima Platinum *Taq* ADN Polimerasa (Invitrogen). Las reacciones se llevaron a cabo según instrucción del fabricante en un volumen final de 25 μ L, empleando como molde una dilución al medio de la solución de ADNc de cada uno de los pacientes. El perfil térmico empleado incluyó un paso previo de calentamiento de 3 minutos a

95°C, seguido por 15 ciclos, cada uno compuesto por 15 s a 95°C (desnaturalización); 30 s a 60°C (hibridación) y 30 s a 72°C (extensión).

3.6 Análisis estadístico

Las comparaciones de los niveles de cada ARN pequeño entre los distintos grupos de pacientes se efectuaron por medio de pruebas no paramétricas, el análisis de la variancia de Kruskal-Wallis y la U de Mann-Whitney. Las correlaciones entre los niveles de diferentes ARNs pequeños en las muestras de PS del conjunto completo de pacientes, y entre los niveles de ARNs pequeños y los parámetros clínicos y de laboratorio, se realizaron utilizando el test de correlación de Spearman. El nivel de significación estadística se fijó en $p < 0.05$.

4 Resultados

4.1 Sección 1- Selección de ARNs pequeños que se proyecten como buenos candidatos para su empleo como biomarcadores seminales.

Para realizar la selección de los ARNs pequeños a medir se utilizó información disponible en la bibliografía que describe perfiles de ARNs pequeños en muestras de plasma seminal mediante métodos de secuenciación masiva o microarreglos.

El criterio empleado en la presente tesina para la selección de los miARNs candidatos se basó en tres condiciones: 1) Que estos miARNs se encuentren en abundancia en el fluido analizado, de manera de maximizar las posibilidades de su cuantificación mediante RT-qPCR; 2) que en los trabajos antes mencionados, estas moléculas hayan mostrado cierto grado de asociación con enfermedades reproductivas masculinas y 3) que se trate de resultados reproducibles (ARNs pequeños descritos en al menos dos trabajos independientes). Cabe mencionar que en el criterio de selección de los candidatos fue crucial el hecho de que se encontraran en abundancia en el plasma seminal, debido a que la concentración de ARN total en fluidos extracelulares es muy baja.

En la Figura 7 se muestra un diagrama de Venn que integra los resultados obtenidos por distintos grupos de investigación ^{64, 18, 62, 10, 63, 35}. En base a datos de secuenciación masiva provenientes de diversos trabajos realizados con muestras de plasma seminal de individuos normozoospermicos ^{64, 35, 18}, se seleccionaron 25 ARNs pequeños que arrojaron un alto número de lecturas (top 15 de cada publicación) y por lo tanto se encontrarían en gran abundancia en dicho fluido. Paralelamente, a partir de trabajos donde se realizó un análisis comparativo de perfiles de ARNs pequeños en distintas enfermedades reproductivas masculinas ^{64, 18, 62, 10, 63}, se seleccionaron 35 miARNs cuyos niveles en plasma seminal se encontraban significativamente alterados en pacientes respecto a controles sanos, todos ellos validados en una cohorte independiente de pacientes ^{64, 18, 62, 10, 63}.

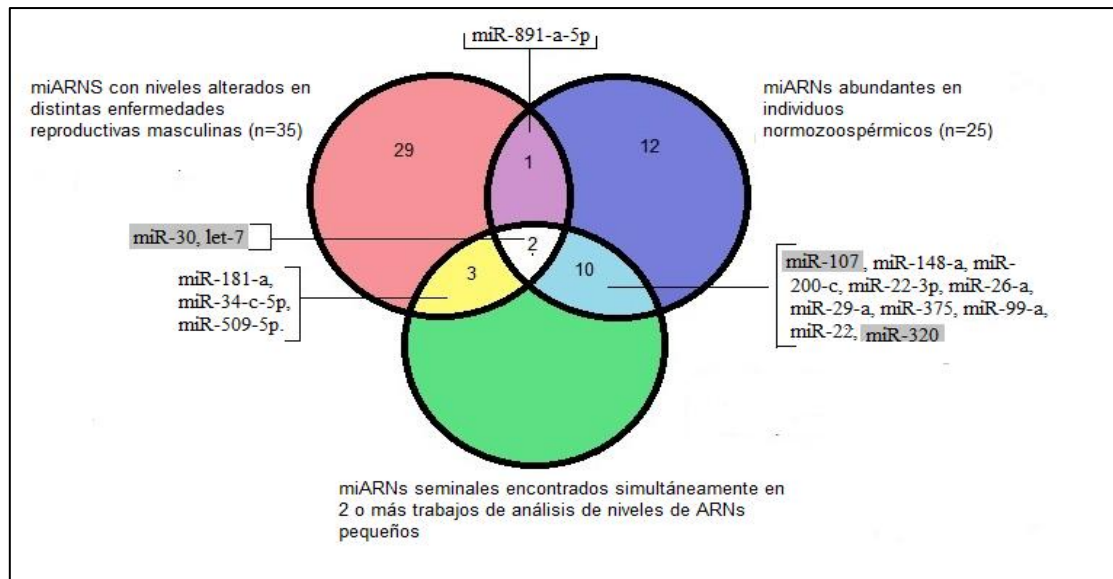


Figura 7. Diagrama de Venn. Diagrama que integra los resultados obtenidos por distintos trabajos que emplean muestras de plasma seminal. miARNs abundantes en individuos normozoospermicos (conjunto azul), con niveles alterados en distintas enfermedades reproductivas masculinas (conjunto rosa) y que se encuentran simultáneamente en 2 o más publicaciones (conjunto verde). Se muestran los miARNs que se encuentran en las intersecciones, se resaltan en gris los seleccionados para su cuantificación.

En el diagrama de Venn se observa claramente que solo 2 familias de miARNs, let-7 y miR-30, cumplen con los tres criterios enunciados; en otras palabras, se encuentran de manera abundante en muestras de plasma seminal, en más de un trabajo ^{64, 35, 18} y están asociados a enfermedades reproductivas masculinas ^{10, 63}. En varios trabajos independientes que emplearon métodos de secuenciación de última generación encontraron tanto a let-7 como a miR-30 entre los top 15 miARNs más abundantes de plasma seminal ^{64, 18, 35}. Además, hay evidencia que sugiere que niveles alterados de let-7a se encontrarían asociados a pacientes con zoospermia no obstructiva y oligospermia ¹⁰, mientras que niveles alterados de miR-30 se han observado en pacientes con oligoastenozoospermia ⁶³.

En base a lo expuesto, los miRNAs de las familias let7 y miR-30 fueron seleccionados para su cuantificación en este trabajo de tesina. Asimismo, se cuantificaron los miR-320 y miR-107 como potenciales controles endógenos, dado que ambos son abundantes en muestras de plasma seminal y sus niveles aparentan ser estables al analizar muestras de individuos con diversas alteraciones reproductivas ⁶⁴.

Por otro lado, dada la fuerte asociación entre piARNs e infertilidad masculina se exploró la posibilidad de cuantificar estas moléculas en nuestra cohorte de pacientes. Para ello, se analizaron los resultados obtenidos por dos trabajos independientes ^{64, 33}. En el trabajo de Hu

y colaboradores, se identificaron por primera vez y se cuantificaron piARNs en muestras de plasma seminal de individuos normozoospermicos⁶⁴. Por otro lado, en el trabajo de Hong y colaboradores se analizaron los perfiles de expresión de piARNs seminales asociados a distintos tipos de infertilidad, específicamente azoospermia no obstructiva y astenoospermia. En este trabajo se identificaron 5 piARNs, los cuales presentaban un elevado potencial diagnóstico como se determinó mediante el análisis de curvas ROC³³.

Al intentar comparar los resultados obtenidos por ambos grupos se observó que la nomenclatura empleada en cada trabajo era distinta. Mediante el empleo del programa informático BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) se lograron asociar los loci identificados por cada grupo y se observó que 4 de los 5 piARNs asociados a infertilidad masculina en el trabajo de Hong y col se correspondían con loci abundantes en individuos normozoospermicos en el trabajo de Hu y col (Tabla III). Sorprendentemente, las secuencias de estos “supuestos” piARNs se alinearon con 100% de homología con distintos tipos de ARN de transferencia (tARN) (tabla III). Estos datos sugieren que estas secuencias se encontraban mal anotadas y se tratan en realidad de fragmentos 5' de tARN o tiARNs.

TABLA III. Nomenclatura y alineamientos de los piARNs analizados en está tesina.				
piARNs con niveles alterados en PS de pacientes con ERM (Hong y col)	piARNs abundantes en individuos normozoospermicos (Hu y col)	BLAST		Nombre empleado en el trabajo de tesina
		Alineamiento	Sequense ID	
piR-43772	DQ-575660	TPA: Homo sapiens tRNA-Glu-CTC-2-1 gene	HG983760.1	tiARN ^{Glu}
piR-31925	DQ-570814	TPA: Homo sapiens tRNA-iMet-CAT-2-1 gene	HG984144.1	tiARN ^{Met}
piR- 31068	DQ-570956	TPA: Homo sapiens tRNA-Gly-GCC-5-1 gene	HG983819.1	tiARN ^{Gly}
piR- 43773	DQ- 575661	Human Phe-tRNA	K.00350.1	tiARN ^{Phe}
piR-30198	-			

EMR: enfermedades reproductivas masculinas. **PS:** Plasma seminal

A la luz de estas evidencias se reanalizaron todos los loci identificados como posibles piARNs seminales por secuenciación masiva⁶⁴ y se observó que aproximadamente el 88% del número total de lecturas obtenidas presentan homología con sólo tres tARNs (tARN-Glu, tARN-Lys y tARN-Gly) (Figura 8).

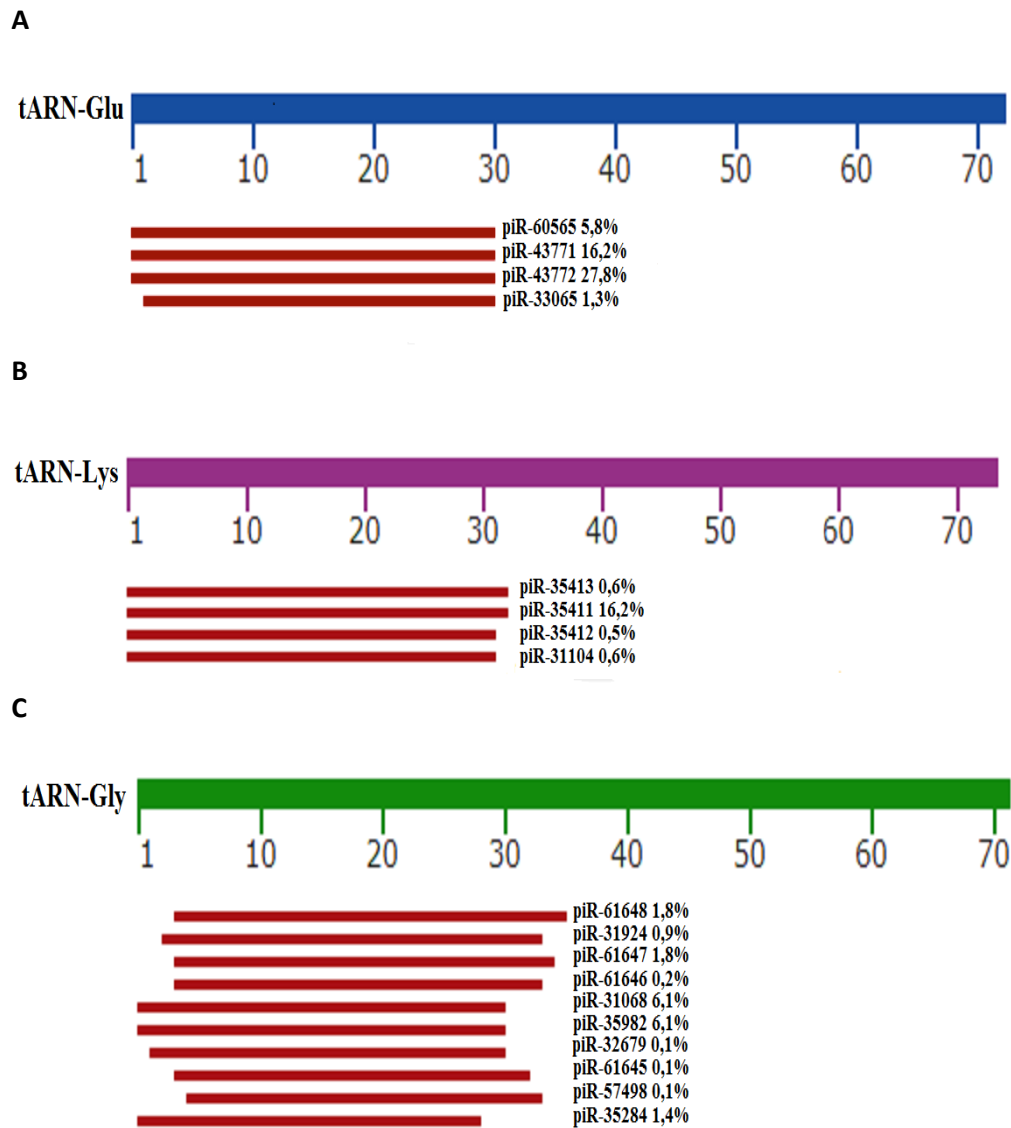


Figura 8. Alineamientos entre tARN-Glu (A), tARN-Lys (B) y tARN-Gly (C) y los loci identificados por NGS (Hu et al) que presentan alta homología con dichos tARNs. Para cada loci se indica el nombre del piARN y la abundancia relativa (%) de las lecturas obtenidas.

La Figura 8 también pone en evidencia que todos estos fragmentos de tARNs corresponden a las mitades 5' de ARNs de transferencia.

En base a lo expuesto anteriormente, en este trabajo se decidió cuantificar los niveles de los siguientes tiARNs: tiARN^{Glu}, tiARN^{Lys}, tiARN^{Gly}, dado que se encuentran expresados de manera abundante en muestras de plasma seminal de individuos normozoospermicos, y también tiARN^{Phe} y tiARN^{Met}, que aunque en menor abundancia, se encontrarían asociados a enfermedades reproductivas masculinas.

4.2 Sección 2- Puesta a punto y optimización de la técnica de extracción de ARN y cuantificación de ARNs pequeños mediante RT-qPCR a partir de muestras de plasma seminal.

4.2.1 Optimización de la técnica de extracción de ARNs seminales.

El plasma seminal es una muestra compleja con una alta concentración de polisacáridos y proteínas, hecho que dificulta los procedimientos para la extracción de ARN a partir de las mismas. Por esta razón, en una primera etapa de este proyecto de tesina se procedió a la puesta a punto y optimización de un protocolo de extracción de ARN a partir de muestras de plasma seminal. Las variantes analizadas incluyeron la incorporación de distintas modificaciones a la técnica estándar de extracción de ARN con TRI Reagent, como se indica en el esquema expuesto en la Figura 9.

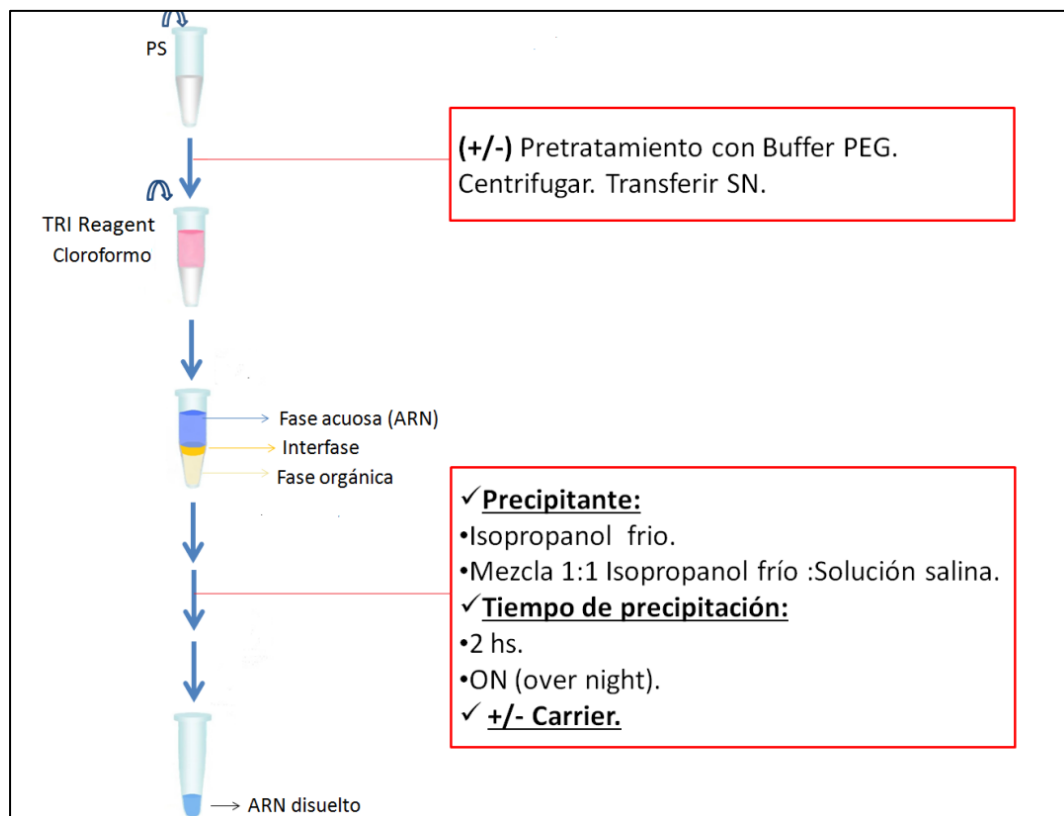


Figura 9. Diagrama de los protocolos analizados. Se representa el protocolo estándar de extracción de ARN con TRI Reagent en muestras de PS. En los recuadros rojos se indican las modificaciones incorporadas al protocolo convencional que fueron evaluadas durante la puesta a punto de la técnica de extracción de ARN.

Una de las modificaciones que se evaluó fue el pretratamiento con una solución buffer que contiene PEG 20K (P). Esta estrategia permite eliminar parte de los polisacáridos presentes en

las muestras de plasma seminal ⁶⁴. Por otra parte, en el paso de precipitación se analizaron distintas alternativas que incluyen: el tipo de precipitante, Isopropanol (I) o una mezcla 1:1 Isopropanol frío : Solución salina (0,8 M citrato de sodio y 1,2 M NaCl) (S); el tiempo de precipitación, durante toda la noche a -70°C (ON, por su expresión en inglés over night) o 2 hs a -20°C (2); y el empleo o no de 1 µg de glucógeno como carrier (c). La solución precipitante alternativa se sugiere entre las indicaciones del fabricante del reactivo TRI Reagent para los casos de muestras que presentan un alto contenido de polisacáridos y proteoglicanos, dado que permite precipitar el ARN de manera efectiva mientras que los polisacáridos y proteoglicanos se mantienen en forma soluble.

Durante el transcurso de la puesta a punto, la primera dificultad se hizo evidente al intentar resuspender el ARN purificado luego de llevar adelante la técnica, producto de la gran coprecipitación de contaminantes. Por ello, se decidió realizar una centrifugación de las soluciones obtenidas de manera de precipitar los contaminantes no solubles y recuperar los sobrenadantes enriquecidos en ARN.

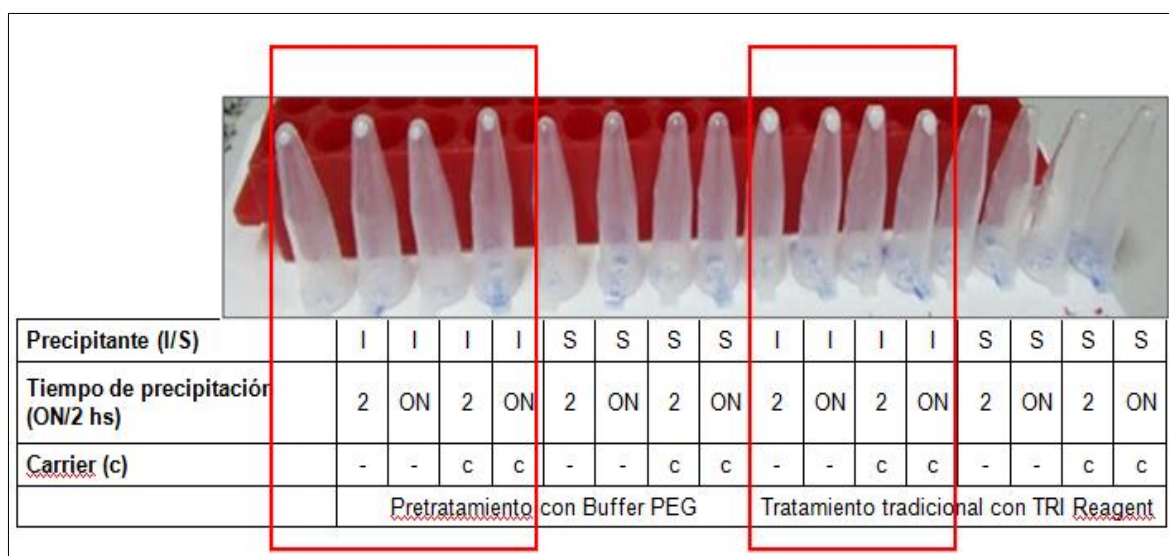


Figura 10. Pellet obtenido después de la centrifugación final de la solución de ARN para remover contaminantes insolubles. En los recuadros rojos se indican las condiciones que presentaron una mayor cantidad de contaminantes no solubles.

En la figura 10 se puede observar que el empleo de la solución alternativa (mezcla 1:1 Isopropanol frío: solución salina) coprecipita una menor proporción de contaminantes insolubles, independientemente de la realización o no del pretratamiento con PEG, del tiempo de precipitación empleado y de la utilización de carrier.

Luego, se realizaron espectros de absorbancia entre 240 y 300 nm para intentar cuantificar el ARN total presente en las muestras y evaluar su pureza (Figura 11). Desafortunadamente, la sensibilidad de estas técnicas espectrofotométricas no resultó suficiente para detectar ARN en estas muestras, como resulta evidenciado en la ausencia de pico claro a 260 nm en los espectros. Diversas publicaciones estiman la concentración de ARN en PS en 20-50 ng/mL, y hacen referencia a la necesidad de sistemas de alta sensibilidad para su detección, no disponibles en el laboratorio ⁶⁸.

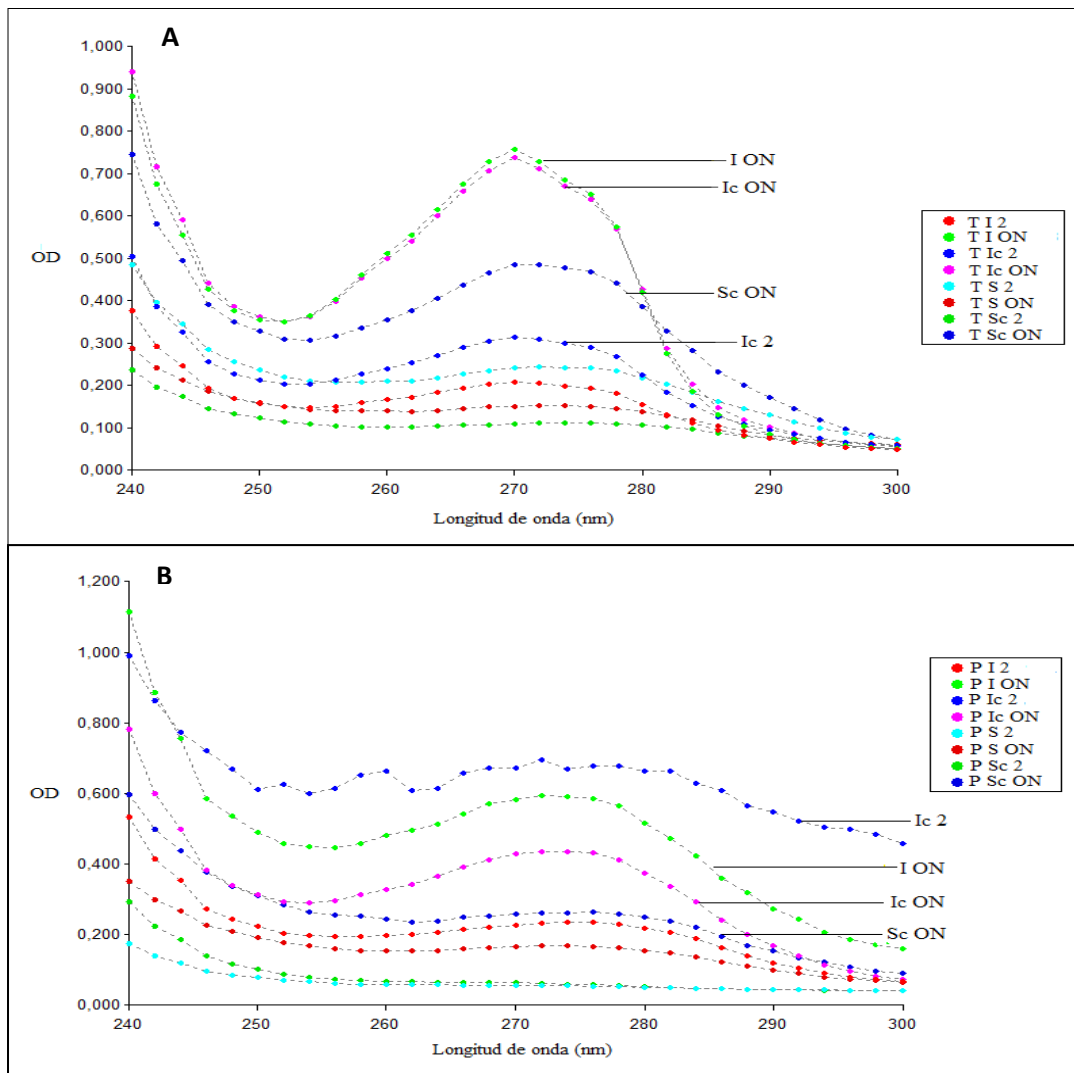


Figura 11. Espectros de absorbancia entre 240 y 300 nm de las soluciones de ARN obtenidas mediante distintas variantes del protocolo tradicional. En A) se muestran los espectros que corresponden a los protocolos con un tratamiento inicial estándar con TRI Reagent (T) con las distintas variantes en las condiciones de los pasos posteriores de la técnica de extracción analizadas, mientras que en B) se muestran los espectros que corresponden a los protocolos en donde se realizó un pretratamiento con Buffer PEG (P) en combinación con las diferentes variables en las condiciones de los pasos ulteriores de la extracción estudiadas. Se resaltan las 4 muestras con mayores picos de absorbancia a 270-280 nm.

Asimismo, en la figura se observa que al comparar los distintos protocolos, en muchas muestras correspondientes a las variantes I y ON hay un fuerte pico a 270-280 nm, rango donde absorben contaminantes proteicos (Figura 11, muestras resaltadas).

Luego, para evaluar la factibilidad de cuantificar ARNs pequeños en las muestras obtenidas, se realizaron ensayos de stem loop RT- qPCR para los ARNs pequeños let-7, tiARN^{Glu} y tiARN^{Lys}, en el marco de una prueba piloto. La Figura 12 muestra, a modo de ejemplo, los valores de Ct obtenidos para el tiARN^{Glu}, resultados similares se obtuvieron para el tiARN^{Lys} y let-7.

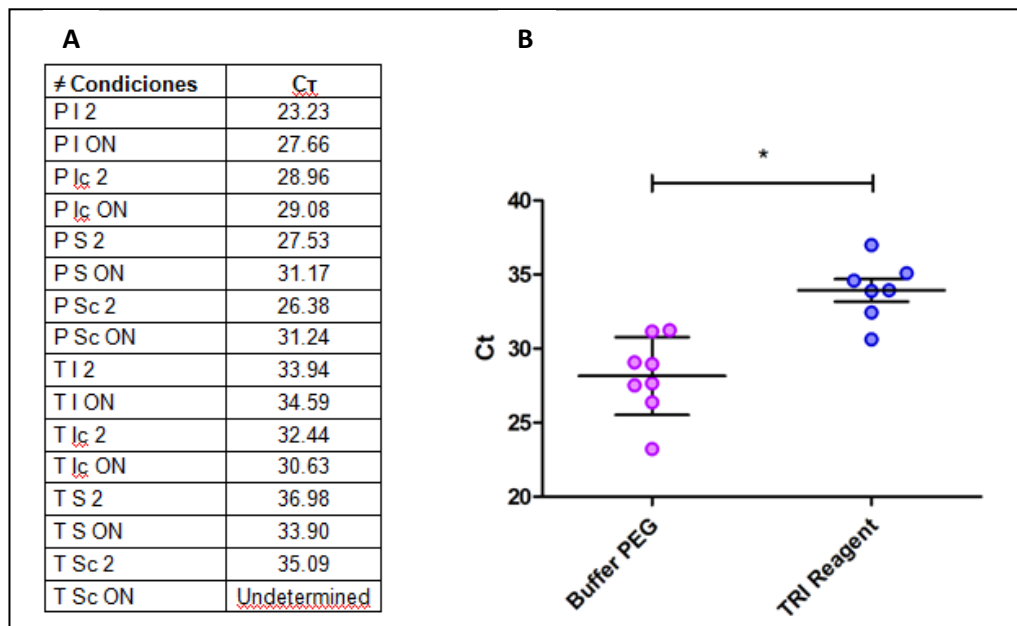


Figura 12. RT-qPCR para tiARN^{Glu}. A) tabla con los valores de Ct obtenidos para el amplicón tiARN^{Glu} en las distintas variantes de protocolo analizadas. B) Valores de Ct para tiARN^{Glu} en variantes del protocolo tradicional según si se realizó o no el pretratamiento con buffer PEG. Las líneas corresponden a media \pm desvío estándar. * $p < 0.05$.

Los resultados obtenidos demuestran que la eficiencia en la cuantificación de ARNs pequeños es significativamente mayor al realizar un pretratamiento con buffer PEG. Por otra parte, con respecto al empleo de carrier no se observan diferencias en la eficiencia que justifique su empleo.

En base a lo expuesto anteriormente, se estableció el protocolo definitivo que incluye las siguientes modificaciones del protocolo estándar: un pretratamiento con Buffer PEG; como precipitante una mezcla 1:1 Isopropanol : Solución Salina; un tiempo de precipitación de 2 hs a -20°C y ausencia de carrier.

Por último, se determinó que el volumen óptimo de muestra a procesar es de 400 μL , debido a que al emplear un volumen mayor aumenta exponencialmente el número de tubos a procesar, hecho que dificulta la labor sin mejorar de manera substancial la sensibilidad de la técnica.

4.2.2 Puesta a punto de la técnica de q-PCR.

En primer lugar, se evaluó la factibilidad de cuantificar los ARN pequeños seleccionados en la primera sección de resultados empleando muestras de plasma seminal de un pool de 5 pacientes normozoospermicos, logrando detectar todos los candidatos con excepción del miR-30. En este caso, se pudieron descartar inconvenientes técnicos en la qPCR dado que sí se obtuvo producto amplificado cuando se empleó ARN obtenido a partir de un cultivo de células JURKAT (control positivo, línea celular inmortalizada de linfocito T).

Luego, para la puesta a punto de la técnica de qPCR para cada ARN pequeño, se realizaron curvas estándar a partir de una dilución 1/10 de una muestra de ADNc (ADN copia) procedente de tejido testicular. Se realizaron diluciones seriadas en órdenes de 10, las cuales se amplificaron y determinaron por triplicado. A partir de los resultados de Ct, se construyó una gráfica Ct vs la concentración del ARN pequeño. De la gráfica se analizó: la desviación estándar entre los diferentes puntos, el coeficiente de regresión (R^2) para determinar que tan bien se ajustan los datos de Ct a la recta de regresión, la pendiente de la recta (m) que debe ser cercana a -3,32 lo que corresponde a una eficiencia de amplificación del 100% y el rango dinámico.

En todas las muestras también se cuantificó el ARN sintético proveniente de *C. elegans* cel-miR-39 que fue adicionado durante el proceso de purificación de ARN para su posible empleo como control endógeno. En este caso, para la realización de la curva estándar se empleó una dilución 1/10 de una muestra de ADNc generada a partir de 1.6×10^8 copias/ μL de ARN sintético.

La fórmula empleada para calcular la eficiencia de amplificación a partir de la pendiente está dada por: $\text{EFICIENCIA} = [(10^{-1/M}) - 1] \times 100$. En la Figura 13 se muestra a modo de ejemplo la curva estándar para el caso del tiARN^{Glu} y en la tabla IV se describen los datos obtenidos al realizar las curvas estándares para cada uno de los ARNs pequeños analizados.

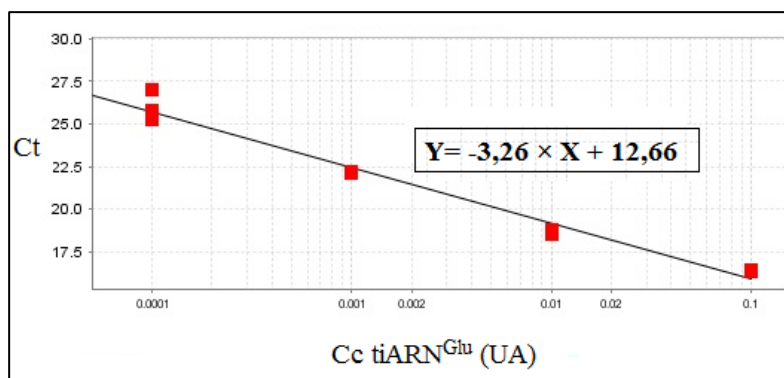


Figura 13. Curva estándar de cuantificación del tiARN^{Glu}. Se midieron por triplicado diluciones seriadas en órdenes de 10 de una solución de ADNc procedente de una muestra de biopsia testicular. La concentración del tiARN^{Glu} se expresa en unidades arbitrarias (UA) respecto a la cc del ARN pequeño en la muestra original de ADNc.

Tabla IV. Datos extraídos a partir de las curvas de calibración de los distintos ARNs pequeños en estudio.			
ADNc	m	R²	Eficiencia de amplificación (%)
tiARN^{Glu}	-3,26	0.976	102.47
tiARN^{Gly}	-3.38	0.970	97,51
tiARN^{Lys}	-3.37	0.986	97.73
tiARN^{Phe}	-3.42	0.865	95.93
tiARN^{Met}	-3.30	0.958	100.91
miR-320	-3.24	0.927	103.49
miR-107	-3.42	0.921	96.08
let-7	-3.386	0.947	97.41
cel-miR- 39	-3.3	0.969	101.04
m: pendiente, R²: Coeficiente de Regresión.			

A continuación, se procedió a la cuantificación de los ARNs pequeños en las muestras de plasma seminal del set completo de pacientes y en dos muestras testigos de biopsia testicular, una procedente de un paciente con azoospermia no obstructiva (NOA) que no evidencia producción de espermatozoides en estudios de anatomía patológica y la otra de un paciente con azoospermia obstructiva (AO), con espermatogénesis normal. En la tabla V se resumen los datos obtenidos.

Tabla V. Cuantificación de los ARNs pequeños en muestras de PS y BT				
	Plasma seminal		Biopsia testicular*	
	Detectado	Ct^a	NOA	OA
			Ct^a	Ct^a
tiARN^{Glu}	54/57	29.58 (7.65)	14.09 (0.19)	15.03 (1.81)
tiARN^{Gly}	45/57	31.82 (7.12)	19.25	17.48 (0.33)
tiARN^{Lys}	56/57	32.73 (7.03)	14.70 (1.02)	14.41 (0.7)
tiARN^{Phe}	51/57	31.14 (6.59)	24.23 (0.54)	23.18 (0.22)
tiARN^{Met}	33/57	33.34 (3.74)	23.34 (0.45)	23.63
miR-320	57/57	29.84 (1.58)	24.06 (0.22)	24.39 (0.8)
miR-107	31/57	35.75 (2.47)	25.48 (0.72)	26.17 (0.39)
let-7	53/57	32.17 (2.07)	22.84 (0.27)	24.23 (1.5)
cel-miR- 39	29/57	34.62 (2.28)	-	-
cel-miR- 39**	57/57	26.17 (7.29)	-	-
Total de muestras de PS procesadas 57				
^a Valores de Ct se indican como la mediana y el rango intercuartil (RI)				
* Se emplearon muestras testigos de dos pacientes: uno con azoospermia obstructiva (OA) y otro con azoospermia no obstructiva (NOA)				
** Valores de Ct obtenidos luego de la preamplificación				
PS: plasma seminal. BT: biopsia testicular.				

Se puede observar que el miR-107 y tiARN^{Met} se detectaron con altos valores de Ct, y sólo en aproximadamente la mitad de las muestras, a diferencia de los restantes ARNs pequeños. Por esta razón, se descartó el empleo del miR-107 como control endógeno. Asimismo, el miR-320 que también se proyectó como un posible control endógeno en la primera sección de resultados, se detectó en todas las muestras analizadas y los valores de Ct no mostraron una variación importante entre los distintos grupos de pacientes por lo que se reforzó su empleo como posible control endógeno (Figura 14). Por otro lado, el cel-miR-39 agregado de manera exógena durante la extracción de ARN, se detectó en aproximadamente la mitad de las muestras (29/57) por lo que se decidió realizar una preamplificación. Luego de llevar a cabo este procedimiento, si bien se logró detectar el cel- miR-39 en todas las muestras, la dispersión de los valores de Ct fue considerable (Figura 14).

En base a lo expuesto, se definió como control endógeno para los cálculos de $\Delta\Delta Ct$ el empleo de miR-320.

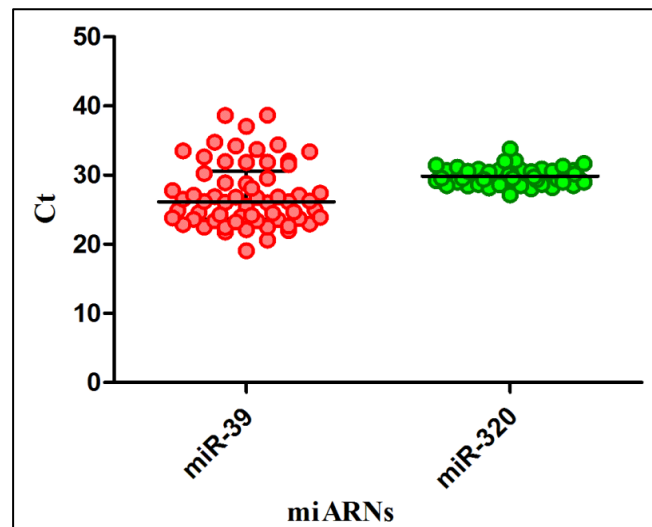


Figura 14. Valores de Ct obtenidos para la cuantificación de miARNs miR-39 y miR-320 en muestras de plasma seminal de la cohorte de pacientes en estudio. Las líneas representan la mediana de los valores obtenidos.

Por último, se evaluó la expresión relativa de los ARNs pequeños extracelulares en las muestras de plasma seminal de los pacientes respecto a los niveles de expresión observados en el tejido testicular procedente del paciente con OA (Figura 15), resultados similares se observaron al relativizar respecto a la biopsia del paciente con NOA. Cabe mencionar que la muestra empleada como referencia constituye una buena aproximación de lo que sería una muestra de individuo sano o “control”, factible de obtener trabajando en el marco de las normas éticas que rigen la investigación en seres humanos.

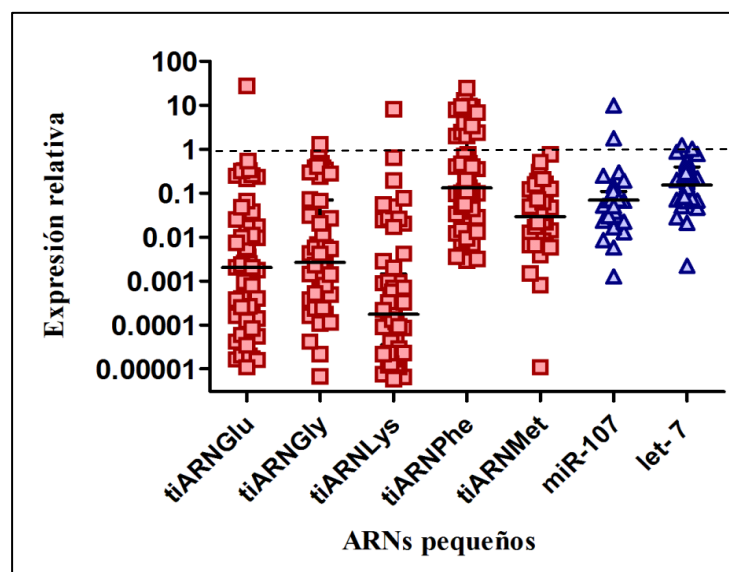


Figura 15. Expresión Relativa de let-7, miR-107, tiARN^{Glu}, tiARN^{Lys}, tiARN^{Gly}, tiARN^{Phe}, tiARN^{Met} en PS de pacientes respecto a sus niveles en la muestra de BT del paciente con AO . Las líneas representan la mediana de los valores obtenidos.

En la Figura 15 se puede observar que, como era de esperar, los niveles intracelulares de todos los ARNs pequeños analizados son notablemente mayores que los extracelulares. Además, se observó que no hay un correlato directo entre la concentración intracelular de estas moléculas y sus niveles extracelulares, sugiriendo que los niveles extracelulares no serían el mero resultado de la lisis celular. Un sin número de publicaciones sugieren que los niveles de ARNs en compartimentos extracelulares se encuentran regulados por procesos activos ⁶⁹. A este respecto, Sharma y colaboradores demostraron que vesículas procedentes del epidídimo, denominadas epididimosomas, se fusionan con los espermatozoides durante su tránsito por el epidídimo, dotándolos de un complemento de ARNs pequeños que los define como espermatozoides maduros ⁵⁷. Por otro lado, el hecho de que los niveles de los ARN pequeño estudiados en esta tesina sean semejantes en las dos muestras testigos de tejido testicular analizadas, sugiere que la expresión de estos ARNs pequeños en tejido sería estable e independiente de la capacidad del individuo de producir espermatozoides.

4.3 Sección 3- Cuantificación de ARNs pequeños seminales y estudios de asociación

4.3.1 Características generales de los grupos de estudio y análisis de datos clínicos.

Dada la dificultad de realizar un diagnóstico preciso de los pacientes con infertilidad idiopática, para este trabajo de tesina se realizó un estudio prospectivo que incluyó 41 pacientes normozoospermicos que se sometieron a 1 o más tratamientos de ICSI utilizando óvulos de donantes en el centro médico PROAR durante los años 2015-2017. En el transcurso del estudio se distinguieron tres grupos de pacientes normozoospermicos:

- a. individuos que lograron el embarazo clínico mediante ICSI (n= 21), los cuales a partir de aquí serán referidos como **ICSI (+)**,
- b. pacientes que se sometieron a solo un procedimiento de ICSI con un resultado negativo (n=11); a partir de aquí **×1** y
- c. pacientes que se sometieron a 2 o más tratamientos de ICSI con resultados negativos (n=9), en los que se presume un factor masculino asociado a la falla reproductiva (**PII**, por Posible Infertilidad Idiopática)

Diversos estudios indican que la disminución de la fertilidad femenina con la edad se debe principalmente al envejecimiento ovárico, siendo el componente endometrial menos relevante. Se ha observado que con el uso de ovocitos de donantes que rondan entre los 20 y casi 30 años de edad, la tasa de nacidos vivos no declinan con la edad de la mujer ⁷⁰.

En este estudio se incorporó también un grupo de pacientes azoospermicos (n=16), dado que se trata de una patología muy bien caracterizada en la que se han reportado alteraciones en el perfil de ARNs pequeños. En la tabla VI se exponen las características clínicas, de los grupos de estudio analizados. Para el grupo de pacientes normozoospermicos, se incluyeron los datos obtenidos del análisis del semen: concentración espermática ($\times 10^6/\text{mL}$), % vitalidad y % motilidad. Como se puede observar los distintos grupos no muestran diferencias significativas en las variables analizadas.

Tabla VII. Características clínicas de los grupos de estudio					
Variable	Normo			Azoo	p
	ICSI (+)	x1	PII		
Edad	40 (8.5)	38 (7)	36 (7)	41 (12.5)	ns
Parámetros seminales					
Cc espermática, $\times 10^6/\text{mL}$	76 (43.5)	52 (84)	116 (71)	-	ns
Vitalidad espermática, %	84.5 (13.5)	86.5 (10.5)	86 (10.75)	-	ns
Motilidad, %	62.5 (13.75)	69 (9)	66 (9)	-	ns
Normo: pacientes normozoospermicos. ICSI (+): pacientes con resultados positivos en ICSI. x1: Pacientes con un resultado negativo en un solo procedimiento de ICSI. PII: posible infertilidad idiopática. Azoo: pacientes azoospermicos. ns: no significativo. Los valores se expresan como la mediana y el rango intercuartil					

4.3.2 Cuantificación de los ARNs pequeños seleccionados en muestras de plasma seminal de pacientes con diversas patologías reproductivas.

En este trabajo se cuantificaron los niveles de 7 ARNs pequeños, 5 tiARNs: tiARN^{Glu}, tiARN^{Gly}, tiARN^{Lys}, tiARN^{Phe}, tiARN^{Met} y dos miARNs: miR-107 y let-7, en muestras de plasma seminal de pacientes normozoospermicos (ICSI (+), x1 y PII) y azoospermicos. Los niveles relativos fueron determinados por la técnica de stem-loop RT qPCR, descrita en la sección de Materiales y Métodos, utilizando el Método Comparativo Ct ($\Delta\Delta\text{Ct}$). Se empleó como control endógeno el miR-320 y como calibrador el promedio de ΔCt de los individuos ICSI (+).

En primer lugar, se compararon los niveles relativos de los distintos ARNs pequeños analizados entre el grupo completo de pacientes normozoospermicos y el grupo de pacientes azoospermicos con el objeto de validar nuestro modelo de estudio y comparar nuestros datos con los descritos en la bibliografía. La Figura 16 muestra los resultados obtenidos al cuantificar los niveles de los tiARNs. En ningún caso se encontraron diferencias significativas entre los grupos aunque se observó que sus niveles tienden a ser menores en el grupo de azoospermicos. Esta tendencia es más acentuada en el caso de los tiARN^{Glu} ($p = 0.08$, Figura 16 A) y tiARN^{Met} ($p=0.09$, Figura 16 E). Estos resultados no se condicen con datos publicados por otros autores en donde los niveles de los tiARNs, tiARN^{Glu}, tiARN^{Gly}, tiARN^{Met} y tiARN^{Phe}, se encontraron significativamente disminuidos en individuos azoospermicos con respecto a controles sanos³³. Esta diferencia entre nuestros datos y los publicados podría deberse a deficiencias metodológicas identificadas en el trabajo de Hong y col, las cuales se explicarán en detalle en la sección de discusión.

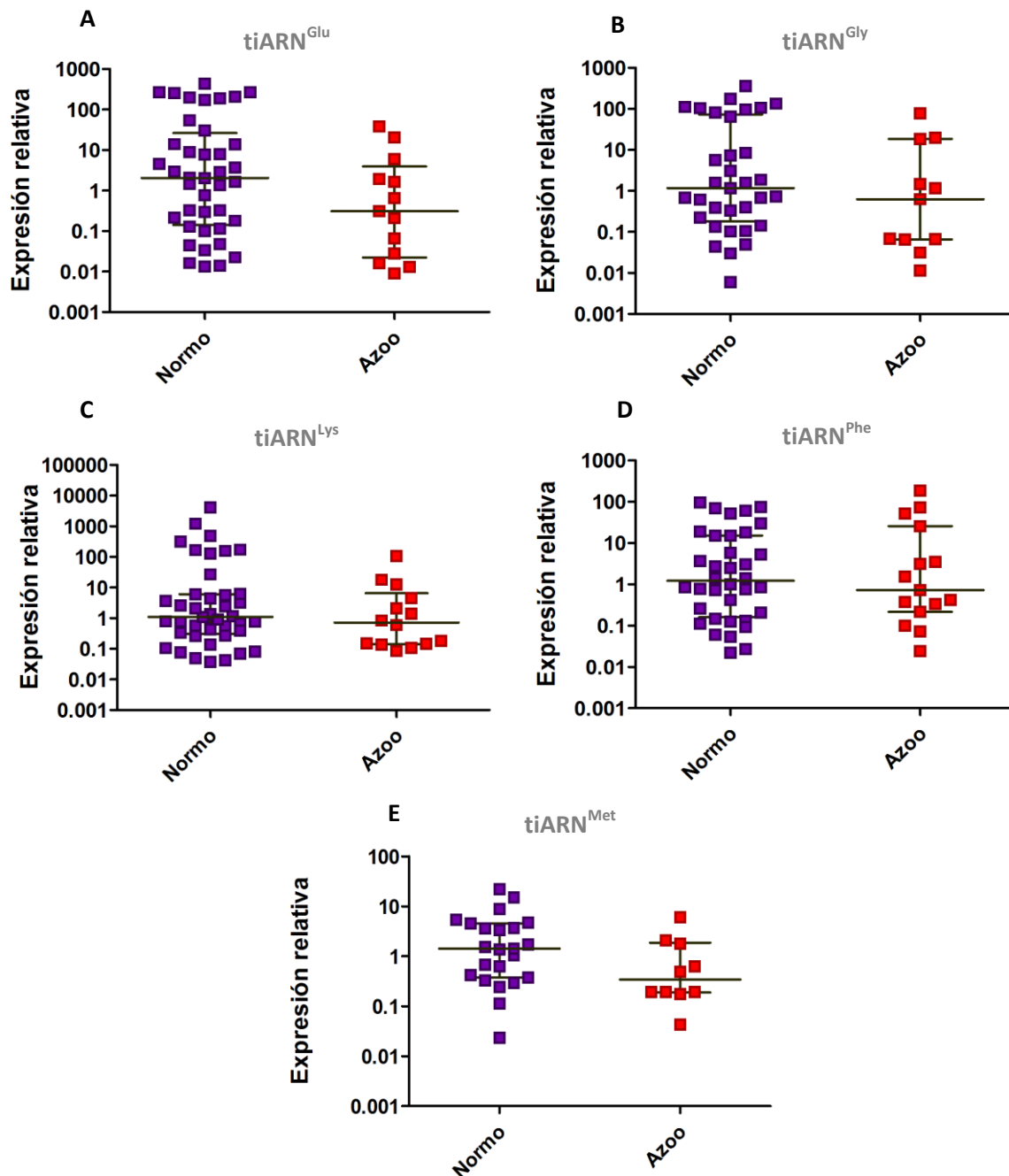


Figura 16. Expresión relativa de los niveles de los tiARN^{Glu} (A), tiARN^{Gly} (B), tiARN^{Lys} (C), tiARN^{Phe} (D) y tiARN^{Met} (E) en muestras de plasma seminal de pacientes normozoospermicos (Normo) y azoospermicos (Azoo).

Por otra parte, se analizaron los niveles de los miARN-107 y let-7 en muestras de pacientes normozoospermicos y azoospermicos (Figura 17). Al comparar tanto los niveles seminales de miR-107 como de let-7 entre ambos grupos, no se hallaron diferencias con significado estadístico. Estos datos concuerdan con otros trabajos que, mediante métodos de secuenciación de última generación, hallaron que los niveles de let-7 y miR-107 no se

encuentran alterados en muestras de individuos con distintas patologías reproductivas (azoospermia y astenozoospermia) ^{64, 18} aunque difieren de otros estudios que asocian alteraciones en los niveles de let-7a con azoospermia no obstructiva ¹⁰.

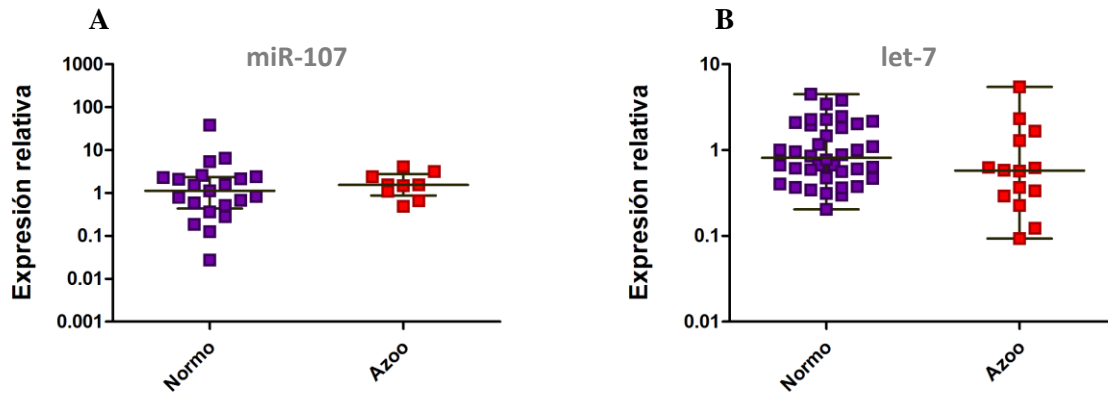


Figura 17. Expresión relativa de los niveles de miR-107 (A) y let-7 (B) en las muestras de plasma seminal de los pacientes normozoospermicos (Normo) y azoospermicos (Azoo).

A continuación, se cuantificaron los niveles relativos de los ARNs pequeños seleccionados en los distintos grupos de pacientes normozoospermicos definidos en el marco del estudio prospectivo según el éxito (ICSI (+)) o fracaso ($\times 1$ y PII) de los procedimientos de reproducción asistida de alta complejidad realizados. En la Figura 18 se muestran los resultados obtenidos para los tiARN^{Glu}, tiARN^{Lys}, tiARN^{Phe}, tiARN^{Gly} y tiARN^{Met} y se puede observar que en todos los casos los niveles de estos ARNs pequeños se encuentran aumentados en el grupo PII, con medianas que se ubican entre 3,67 y 26,8 UA, respecto a los niveles en el grupo ICSI (+). Análisis estadísticos realizados sobre el conjunto de datos para evaluar si los grupos difieren entre sí (prueba de Kruskal – Wallis), arrojaron diferencias significativas para los tiARN^{Glu} y tiARN^{Lys} ($p=0,0476$ y $p=0,0061$, respectivamente), discriminando el grupo PII del ICSI (+) en pruebas post-test (Dunn's Multiple Comparison Test) (Figura 18 A y C). Por otra parte, al analizar los resultados obtenidos para el tiARN^{Phe} se observó que sus niveles no difieren significativamente en pruebas globales pero si lo hacen al comparar solo los 2 grupos mejor caracterizados (PII e ICSI (+)), mostrando valores aumentados en el grupo PII respecto a ICSI(+) ($p=0,0356$, Prueba U de Mann-Whitney) (Figura 18 D). Por último, tanto el tiARN^{Gly} como el tiARN^{Met} no mostraron diferencias significativas de sus niveles al comparar los distintos grupos (Figura 18 B y E). Sin embargo,

los resultados obtenidos para el $\text{tiARN}^{\text{Met}}$ no pueden considerarse concluyentes dada la baja frecuencia de detección de este tiARN (33/57) descrita en la segunda sección de resultados.

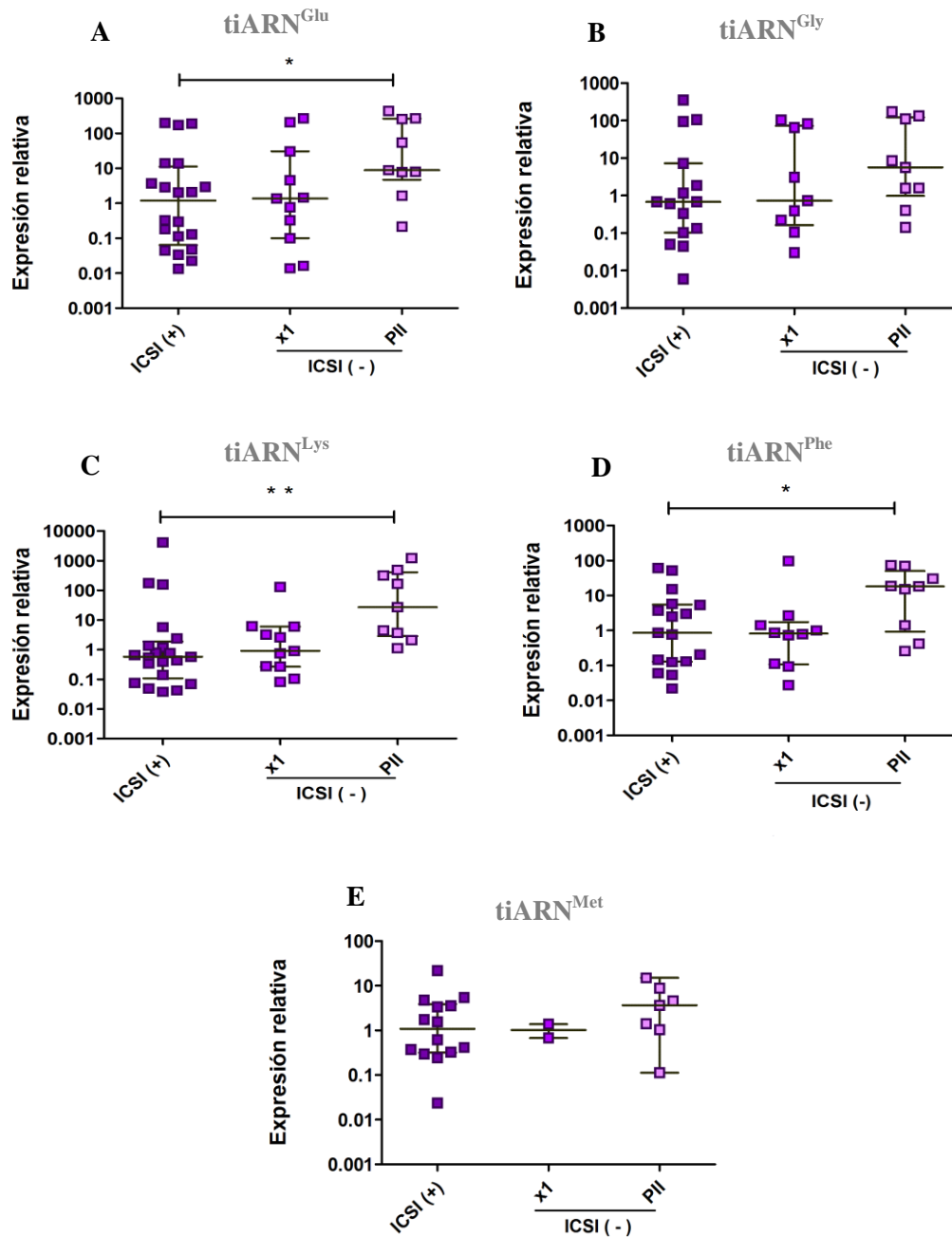


Figura 18. Expresión relativa de los niveles de los $\text{tiARN}^{\text{Glu}}$ (A), $\text{tiARN}^{\text{Gly}}$ (B), $\text{tiARN}^{\text{Lys}}$ (C), $\text{tiARN}^{\text{Phe}}$ (D) y $\text{tiARN}^{\text{Met}}$ (E) en muestras de plasma seminal de los grupos ICSI (+): pacientes con resultados positivos en ICSI; x1: Pacientes con un resultado negativo en un solo procedimiento de ICSI; y PII: posible infertilidad idiopática. $P^* < 0.05$, $P^{**} < 0.01$

Se cuantificaron también los niveles de miR-107 y los miembros de la familia de let-7 en las muestras de pacientes normozoospermicos (Figura 19). De manera consistente con la bibliográfica^{64, 18}, los niveles del miR-107 no se vieron alterados en los grupos analizados (Figura 19 A), aunque en este caso, al igual que con el tiARN^{Met}, la frecuencia de detección del miARN resulto muy baja (31/57, *Resultados- Sección 2*).

Por otra parte, al cuantificar los niveles de los miARNs de la familia let-7 se observó una tendencia opuesta a la descripta para los tiARNs analizados en este trabajo de tesina. En este caso los niveles detectados en PII resultaron menores respecto de los obtenidos en el grupo ICSI (+) (mediana= 0,40, Figura 19 B). Esta tendencia cobró significado estadístico al comparar los niveles de let-7 sólo entre los grupos PII y ICSI (+) ($p=0,0372$, Prueba U de Mann-Whitney).

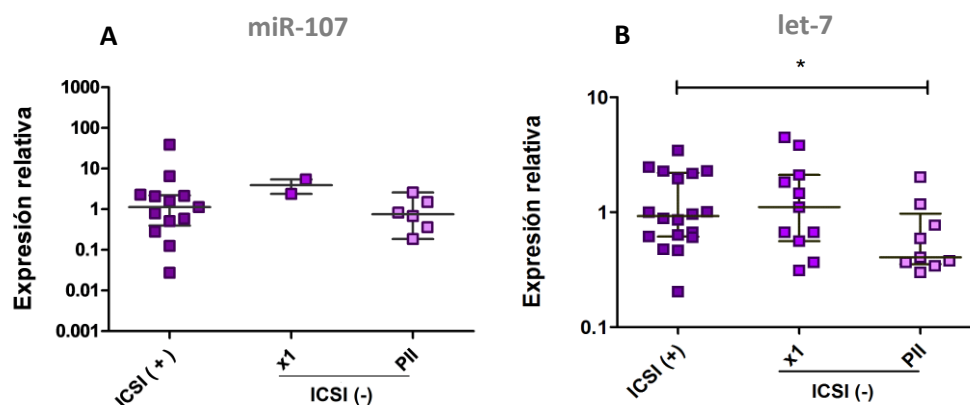


Figura 19. Expresión relativa de los niveles de los miARN-107 (A) y let-7 (B) en muestras de plasma seminal de los grupos ICSI (+): pacientes con resultados positivos en ICSI; x1: Pacientes con un resultado negativo en un solo procedimiento de ICSI; y PII: posible infertilidad idiopática. $P^* < 0.05$

4.3.3 Estudios de correlación.

Con el objeto de identificar asociaciones de relevancia clínica, se llevaron a cabo estudios de correlación entre los datos obtenidos en este trabajo de tesina respecto a la cuantificación de los niveles de ARNs pequeños y parámetros clínicos y de laboratorio relevado de la Historia Clínica de los pacientes que participaron del estudio. Las variables analizadas fueron: edad, peso, talla e IMC del paciente, parámetros espermáticos (concentración, vitalidad, motilidad y morfología), antigüedad de la muestra, edad de la pareja y parámetros asociados al procedimiento de ICSI (% de fertilización, % de división y % de embriones óptimos para transferir). En todos los casos se calculó coeficiente de correlación de Spearman (R),

encontrándose solo asociaciones débiles entre la edad de los pacientes normozoospermicos y los niveles de $\text{tiARN}^{\text{Gly}}$ y $\text{tiARN}^{\text{Phe}}$ (Figura 20).

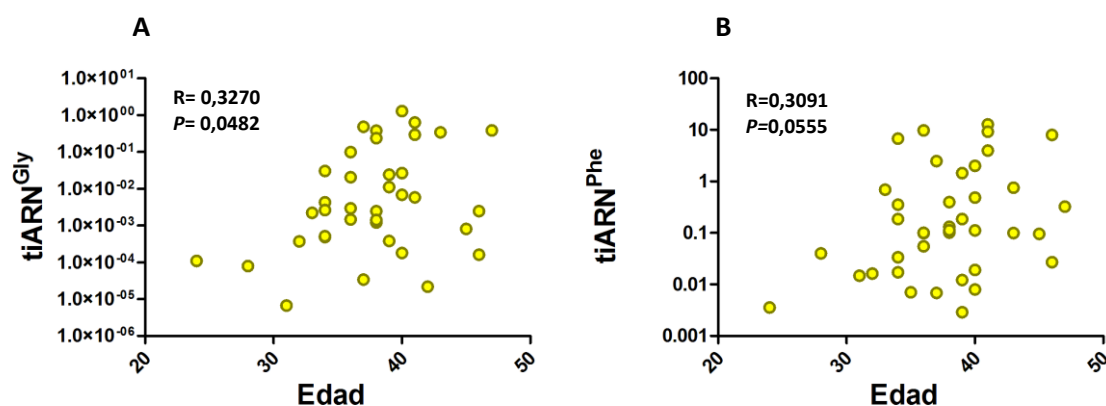


Figura 20. Correlación entre los niveles de $\text{tiARN}^{\text{Gly}}$ (A) y $\text{tiARN}^{\text{Phe}}$ (B) y la variable edad en los pacientes normozoospermicos. **R:** Coeficiente de correlación de Spearman.

Llamativamente, al comparar los valores obtenidos para los ARNs pequeños, se observó que los niveles de los tiARN s correlacionaron fuertemente y de manera directa ($R > 0$) entre sí mientras que no lo hicieron con ninguno de los miARN s analizados. Asimismo, tampoco se encontró una asociación entre miR-107 y let-7 (Tabla VII).

Tabla VII. Correlación de los niveles de ARNs pequeños.								
	$\text{tiARN}^{\text{Glu}}$	$\text{tiARN}^{\text{Gly}}$	$\text{tiARN}^{\text{Lys}}$	$\text{tiARN}^{\text{Phe}}$	$\text{tiARN}^{\text{Met}}$	miR-107	let-7	
$\text{tiARN}^{\text{Glu}}$		0.887	0.872	0.641	0.496	-0.163	-0.001	R
$\text{tiARN}^{\text{Gly}}$	< 0.0001		0.758	0.618	0.436	0.162	-0.114	
$\text{tiARN}^{\text{Lys}}$	< 0.0001	< 0.0001		0.588	0.373	-0.185	-0.052	
$\text{tiARN}^{\text{Phe}}$	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001		0.224	-0.043	0.064	
$\text{tiARN}^{\text{Met}}$	0.005	0.023	0.035	0.234		0.008	0.130	
miR-107	0.398	0.438	0.327	0.832	0.971		-0.057	
let-7	0.993	0.474	0.717	0.664	0.493	0.771		
	p							

R: Coeficiente de correlación de Spearman. Se resaltan los ARNs pequeños que correlacionan.

En la figura 21, se puede apreciar con mejor nivel de detalle los resultados obtenidos que muestran una correlación muy fuerte y con un significado estadístico elevado entre los niveles de $\text{tiARN}^{\text{Glu}}$ y $\text{tiARN}^{\text{Gly}}$; $\text{tiARN}^{\text{Glu}}$ y $\text{tiARN}^{\text{Lys}}$; $\text{tiARN}^{\text{Gly}}$ y $\text{tiARN}^{\text{Lys}}$ (Figura 21 A, B, C). Por otra parte, la relación entre los niveles de $\text{tiARN}^{\text{Phe}}$ con cada uno de los $\text{tiARN}^{\text{Glu}}$, $\text{tiARN}^{\text{Gly}}$ y $\text{tiARN}^{\text{Lys}}$, es moderada pero con un significado estadístico alto (Figura 21 D, E, F), mientras que se observa una correlación más débil pero con significado entre los niveles

del $\text{tiARN}^{\text{Met}}$ con cada uno de los $\text{tiARN}^{\text{Glu}}$, $\text{tiARN}^{\text{Gly}}$, y $\text{tiARN}^{\text{Lys}}$ (Figura 21 G, H, I). Por último, no se encontró una asociación entre los niveles de $\text{tiARN}^{\text{Phe}}$ y $\text{tiARN}^{\text{Met}}$.

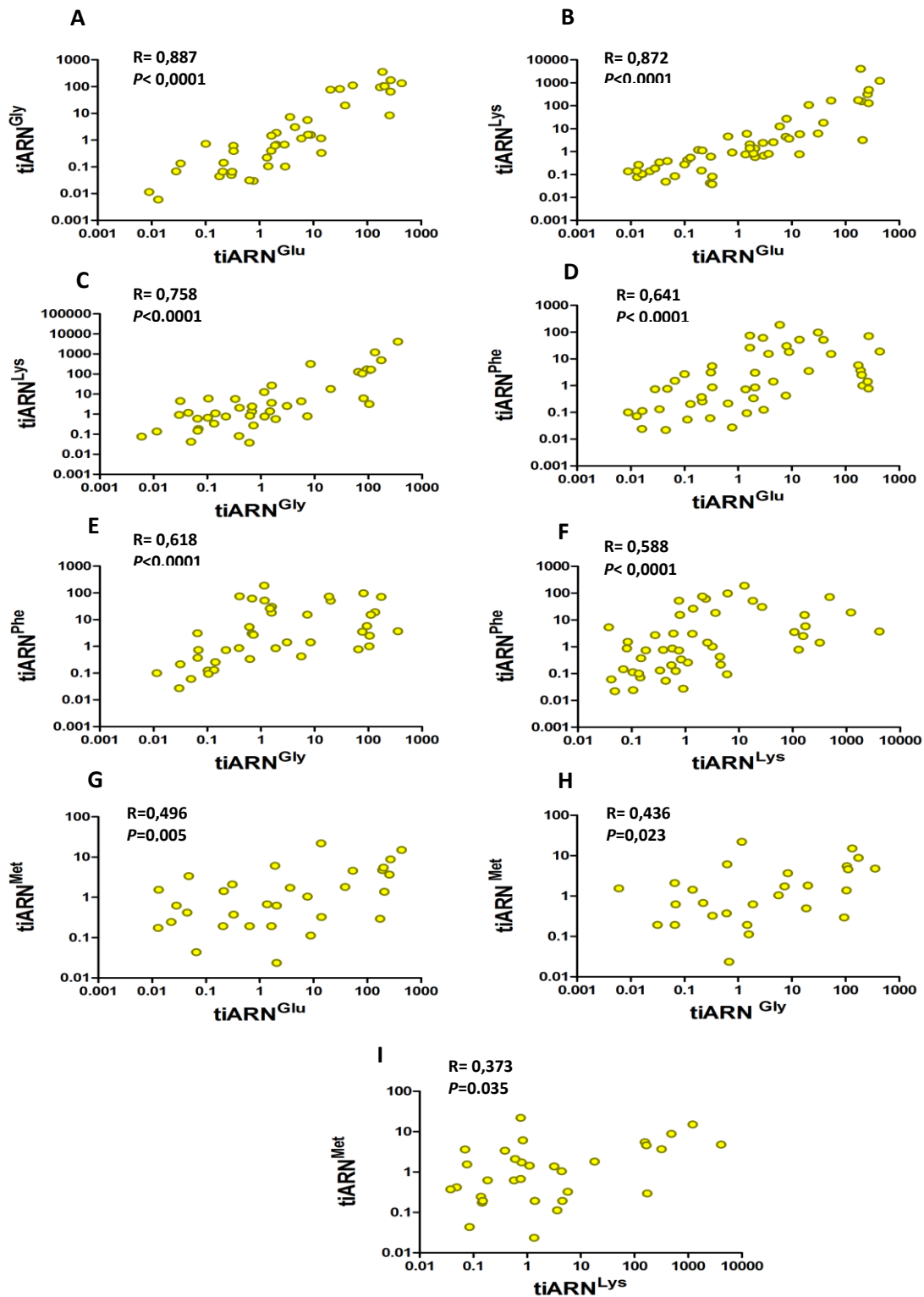


Figura 21. Correlación entre los niveles de ARNs pequeños de muestras de plasma seminal del set completo de pacientes. $\text{tiARN}^{\text{Glu}}$ y $\text{tiARN}^{\text{Gly}}$ (A); $\text{tiARN}^{\text{Glu}}$ y $\text{tiARN}^{\text{Lys}}$ (B); $\text{tiARN}^{\text{Gly}}$ y $\text{tiARN}^{\text{Lys}}$ (C); $\text{tiARN}^{\text{Phe}}$ y $\text{tiARN}^{\text{Glu}}$ (D); $\text{tiARN}^{\text{Phe}}$ y $\text{tiARN}^{\text{Gly}}$ (E); $\text{tiARN}^{\text{Phe}}$ y $\text{tiARN}^{\text{Lys}}$ (F); $\text{tiARN}^{\text{Met}}$ y $\text{tiARN}^{\text{Glu}}$ (G); $\text{tiARN}^{\text{Met}}$ y $\text{tiARN}^{\text{Gly}}$ (H); $\text{tiARN}^{\text{Met}}$ y $\text{tiARN}^{\text{Lys}}$ (I). R: Coeficiente de correlación de Spearman.

El hecho que los niveles de miRNAs y tiARNs muestren comportamientos opuestos cuando se comparan los distintos grupos de estudio sugiere que estos dos tipos de ARNs pequeños podrían tener diferentes implicancias en la competencia reproductiva.

5 Discusión

Los ARNs pequeños no codificantes (< 200 nucleótidos) cumplen importantes roles en la regulación post-transcripcional y traduccional de un sinnúmero de procesos biológicos, y en reiteradas ocasiones se han encontrado asociados a diferentes enfermedades reproductivas masculinas. Diversos estudios demuestran que tanto miARNs como piARNs cumplen funciones importantes en la producción de espermatozoides en mamíferos y son producidos de manera abundante en las células germinales durante todo el proceso de espermatogénesis⁷¹. Recientemente, se han descrito nuevas clases de ARNs pequeños potencialmente asociados al control de la competencia reproductiva, entre las que se destacan los fragmentos derivados de tARNs. Estas moléculas han sido implicadas en la regulación de varios procesos celulares como son la apoptosis, control de la síntesis proteica y silenciamiento génico, entre otros⁵⁹.

Además, investigaciones recientes demuestran que los ARNs pequeños no sólo cumplen importantes funciones dentro de las células, sino también pueden ser exportados en vesículas extracelulares (exosomas) o unidos a lípidos o proteínas, para circular a través del cuerpo y afectar a las células a gran distancia. Estos ARN extracelulares están presentes en una variedad de fluidos corporales incluyendo plasma, orina y saliva, donde son notablemente estables y resisten la degradación a pesar de la presencia de RNasa^{69, 72}. En este contexto, en el presente trabajo de tesis se cuantificaron diversos ARNs pequeños en muestras de plasma seminal con el objeto de evaluar su potencial utilidad como biomarcadores no invasivos de infertilidad idiopática masculina. En base a un extenso trabajo de relevamiento bibliográfico y análisis de secuencias se seleccionan 9 candidatos, 5 tiARNs: tiARN^{Glu}, tiARN^{Gly}, tiARN^{Lys}, tiARN^{Phe}, tiARN^{Met} y 4 miARNs: miR-107 y la familia de let-7, miR-30 y miR-320. La selección de los mismos se realizó en función de la información disponible en relación a su abundancia en plasma seminal, su potencial asociación con enfermedades reproductivas masculinas y la reproducibilidad de los datos recabados.

Cabe mencionar que los tiARNs seleccionados fueron anotados inicialmente como piARNs. Sin embargo, en este trabajo de Tesis se pudo demostrar que estos “supuestos” piARNs se alinean con perfecta homología de secuencia a fragmentos derivados de tARN, específicamente a mitades 5' de tARN (*Resultados-Sección 1, Figura 8*). A este respecto, diversas evidencias sugieren que existen numerosos errores en la anotación de estas secuencias de ARNs pequeños. Estos piARNs clasificados ambigua o erróneamente

representan una minoría, aproximadamente el 1%, y se corresponden con la gran mayoría de los supuestos piARNs expresados en tejidos extragonadales en mamíferos⁴⁵.

El plasma seminal es una muestra compleja con una alta concentración de polisacáridos y proteínas que dificultan la extracción del ARN. Por ello, en una primera etapa de esta tesina se evaluaron distintas variantes del protocolo tradicional de extracción de ARN con TRI-Reagent, lográndose establecer un protocolo óptimo de extracción de ARN a partir de muestras de plasma seminal. Empleando esta técnica se lograron cuantificar todos los ARNs pequeños seleccionados con excepción de los miembros de la familia miR-30, que no pudieron ser detectados en nuestra cohorte de pacientes en discrepancia con datos publicados^{64, 18, 35}. La falta de reproducibilidad en los datos obtenidos a partir del análisis de bibliotecas de miARNs extracelulares es una dificultad recurrente que enfrentan los investigadores que trabajan en estos tópicos y podría asociarse a la ausencia de protocolos internacionalmente estandarizados para llevar a cabo su cuantificación⁷³.

Por otra parte, tanto el tiARN^{Met} como el miR-107, sólo se lograron cuantificar en aproximadamente la mitad de las muestras analizadas con valores de Ct sobre el límite de detección de la técnica de qPCR (*Resultados-Sección 2, Tabla V*). A este respecto, diversas publicaciones demuestran que el tiARN^{Met} se encontraría en baja abundancia en plasma seminal de individuos normozoospermicos^{64, 35}, en concordancia con nuestros resultados; mientras que para el caso del miR-107 la información disponible es controversial^{18, 64, 35}.

La azoospermia es una patología fácilmente diagnosticable que constituye un caso extremo de infertilidad masculina y por ello ha sido extensamente estudiada. En diversas publicaciones se han reportado perfiles de ARNs pequeños alterados asociados a esta condición^{64, 18, 33, 62, 10} y dicha información ha sido utilizada en este trabajo para la selección de candidatos. Sin embargo, en nuestro grupo de pacientes no se observaron diferencias significativas entre individuos normozoospermicos y azoospermicos, aunque los niveles de los tiARNs tendieron a ser menores en el segundo grupo (*Resultados-Sección 3, Figura 16*). Estos resultados no se conciben con datos publicados por otros autores en donde los niveles de los tiARNs: tiARN^{Glu}, tiARN^{Gly}, tiARN^{Met} y tiARN^{Phe}, se encontraron significativamente disminuidos en pacientes azoospermicos con respecto a controles sanos³³. Esta inconsistencia entre ambos trabajos podría deberse a diferencias durante el procesamiento de las muestras de plasma seminal. En el trabajo de Hong y colaboradores las muestras de plasma seminal fueron centrifugadas sólo una vez a 3000 rpm por 5 minutos, mientras que en el presente trabajo se lo hizo dos veces, primero 5 min a 1500g y luego a 16,000g por 10 min. Al realizar los

experimentos en nuestro laboratorio se hizo evidente que con una sola centrifugación la eliminación tanto de las células espermáticas como de los residuos celulares es muy poco eficiente dado que al final de la última centrifugación todavía se observó la presencia de un abundante precipitado. Por esta razón, es probable que en dicho trabajo se hayan cuantificado ARNs pequeños intracelulares, lo que se condice con el hecho de que en los pacientes normozoospermicos se encontraran niveles mayores de tiARNs en comparación con los pacientes azoospermicos donde la concentración de espermatozoides es prácticamente nula, y además esto explicaría la correlación directa que los autores observan entre niveles de los ARNs pequeños y el porcentaje de vitalidad de los espermatozoides.

Por otro lado, al comparar los niveles de los miARNs: miR-107 y la familia de let-7 entre los grupos normozoospermicos y azoospermicos, no se hallaron diferencias con significado estadístico (*Resultados-Sección 3, Figura 17*). Diversas publicaciones validan estos resultados^{64,18}. Sin embargo, un trabajo reciente publicado por Wu y colaboradores sugiere que los niveles de let-7-a serían mayores en pacientes con azoospermia no obstructiva en comparación con controles sanos¹⁰. En este punto, se puede inferir que en este trabajo de Tesina, la cuantificación conjunta de todos los miembros de la familia podría estar enmascarando alteraciones en los niveles de un miembro particular de la familia, en este caso let-7-a.

Cómo se mencionó en párrafos anteriores, el objetivo de este trabajo se centró en identificar posibles nuevos biomarcadores seminales de infertilidad idiopática. Sin embargo, debido a la dificultad de realizar un diagnóstico preciso de estos pacientes, en esta tesina se realizó un estudio prospectivo en el cual los pacientes fueron clasificados de acuerdo al éxito o fracaso de los tratamientos de reproducción asistida de alta complejidad. En este estudio se distinguieron el grupo ICSI (+), formado por pacientes que lograron el embarazo clínico mediante ICSI, y otros dos grupos formados por pacientes que no lograron el embarazo clínico (ICSI (-)) que se dividieron entre aquellos a los que se le realizó un solo procedimiento ($\times 1$) y los que fueron considerados como pacientes con posible infertilidad idiopática (PII), en función de las fallas repetidas en tratamientos de ICSI.

En este marco, al comparar los niveles de los tiARNs entre los tres grupos, ICSI (+), $\times 1$ y PII, se observó que en todos los casos los mismos resultaron mayores en las muestras del grupo PII en comparación con el grupo ICSI (+), siendo esta diferencia estadísticamente significativa para el caso de los tiARN^{Glu}, tiARN^{Lys} y tiARN^{Phe} (*Resultados-Sección 3, Figura 18*). Llamativamente, los datos obtenidos al analizar los miARNs mostraron una

tendencia opuesta, con niveles menores en el grupo PII en comparación con el grupo ICSI (+), la cual cobró significado estadístico al comparar let-7 entre los grupos PII e ICSI (+) (*Resultados-Sección 3, Figura 19*). Este patrón opuesto entre los niveles de los tiARNs y los miARNs en el grupo PII se vio reforzado al realizar los estudios de correlación en donde se pudo observar que los tiARNs correlacionaron fuertemente entre ellos, pero no con los miARNs (*Resultados-Sección 3, Tabla VII*). El hecho de que los niveles de miRNAs y tiARNs muestren tendencias opuestas al comparar los distintos grupos de estudio sugiere que estos dos tipos de ARNs pequeños podrían tener diferentes implicancias en la competencia reproductiva.

En este punto, cabe recordar que los niveles de los ARNs pequeños en plasma seminal son producto de una conjunción de procesos distintos que tienen lugar tanto en los espermatozoides como en los tejidos del sistema reproductor masculino, incluidos mecanismos de biogénesis, de secreción, absorción, y degradación, entre otros. Además, la estabilidad de estas moléculas en plasma seminal depende según se encuentren libres o contenidas en microvesículas o formando complejos con proteínas. Sin embargo, para la realización de los procedimientos de ICSI los espermatozoides son lavados del plasma seminal e inyectados directamente en el citoplasma de los ovocitos. Entonces, dado que en nuestro modelo de estudio los pacientes son clasificados según el éxito o fracaso del tratamiento se podría suponer que las alteraciones observadas en los niveles seminales de los ARNs pequeños analizados podrían tener un correlato con lo que sucede dentro del espermatozoide. En este sentido, el hecho de que let-7 se encuentre disminuido en las muestras del grupo PII podría tener relevancia fisiológica, debido a que se trata de un miARN esencial que se encuentra fuertemente asociado a procesos de diferenciación y desarrollo. Además, let-7 es el miARN más abundante en plasma seminal sugiriendo que esta molécula jugaría un rol importante en los procesos reproductivos ⁷⁴.

Por otro lado, el que los tiARNs se encuentren con niveles aumentados en el grupo PII podría también estar asociado a alteraciones en la función reproductiva. Publicaciones recientes sugieren que la producción de tiARNs por la acción de la enzima angiogenina se ve incrementada en respuesta a distintos tipos de stress, y que estos ARNs pequeños actuarían reprimiendo la síntesis global de proteínas contribuyendo con el ensamblaje de los denominados Gránulos de Stress ⁷⁵. La asociación observada, tanto por nosotros como por otros investigadores, entre el proceso de envejecimiento y los niveles de tiARNs, refuerza esta hipótesis (*Resultados-Sección 3, Figura 20*) ⁷⁶. Asimismo, hay evidencia de que diversos

tiARNs cumplen un rol transgeneracional en la regulación de genes en el cigoto por mecanismos aún desconocidos ^{57, 58}.

En suma, el análisis realizado en este trabajo de tesina ofrece una estimulante aproximación frente al potencial uso de ARNs pequeños seminales como biomarcadores no invasivos de enfermedades reproductivas masculinas, que ante un análisis más exhaustivo, podría mejorar la calidad de los métodos de diagnóstico de dichas patologías.

6 Conclusiones

- Se logró poner a punto una técnica para la cuantificación de ARNs pequeños a partir de muestras de plasma seminal.
- Se describió un perfil de ARNs pequeños alterado en pacientes con diagnóstico presuntivo de infertilidad idiopática (más de un ciclo fallido de ICSI con ovocitos donados), significativamente distinto del observado en pacientes que lograron el embarazo. Los niveles de miARNs y tiARNs presentaron comportamientos opuestos al comparar los grupos de estudio, hecho que sugiere que estos dos tipos de moléculas tendría roles diferentes en la regulación de la función reproductiva.

Referencias bibliográficas

1. Kovac JR, Pastuszak AW, Lamb DJ. The use of genomics, proteomics, and metabolomics in identifying biomarkers of male infertility. *Fertil Steril*. 2013;99(4):998-1007. doi:10.1016/j.fertnstert.2013.01.111
2. Junqueira L, Carneiro J. *Histología Básica. Texto Y Atlas*. 12^a. (Panamericana M, ed.). Rio de Janeiro: Ltda, Guanabara Koogan; 2013.
3. Ross MH, Pawlina W, Negrete JH. *Histología : Texto Y Atlas Color Con Biología Celular Y Molecular*. 5^a. (Ed. Médica Panamericana 2007, ed.). Médica Panamericana; 2007.
4. Hib J. *Histología de Di Fiore: Texto Y Atlas*. 2^a. (Promed E, ed.). Buenos Aires; 2009.
5. Sadava D, Heller G, Orians G, Purves W, Hillis D. *Vida. La Ciencia de La Biología*. 8^a. (Panamericana EM, ed.); 2009.
6. Barrett KE, Barman SM, Boitano S, Heddwen, Brooks L. *GANONG Fisiología Médica*. 23^a. (McG-H, ed.); 2010.
7. *WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen Fifth Edition*. 5^a. World Health Organization, Department of Reproductive Health and Research; 2010.
8. Wosnitzer M, Goldstein M, Hardy MP. Review of Azoospermia. *Landes Biosci*. 2014;4(1):e28218. doi:10.4161/spmg.28218
9. Mundt LA, Graff L, Shanahan K. *Graff: Análisis de Orina Y de Los Líquidos Corporales*. 2^a. (Panamericana EM, ed.). Médica Panamericana; 2011.
10. Wu W, Hu Z, Qin Y, et al. Seminal plasma microRNAs: Potential biomarkers for spermatogenesis status. *Mol Hum Reprod*. 2012;18(10):489-497. doi:10.1093/molehr/gas022
11. Hamada A, Esteves SC, Nizza M, Agarwal A. Unexplained Male infertility: diagnosis and Management. *Int braz j urol*. 2012;38(5):576-594. doi:10.1590/S1677-55382012000500002

12. Shekarriz M, Thomas AJ, Agarwal A. Incidence and level of seminal reactive oxygen species in normal men. *Urology*. 1995;45(1):103-107. doi:10.1016/S0090-4295(95)97088-6
13. Venkatesh S, Shamsi MB, Deka D, Saxena V, Kumar R, Dada R. Clinical implications of oxidative stress & sperm DNA damage in normozoospermic infertile men. *Indian J Med Res*. 2011;134(3):396-398.
14. Loft S, Kold- Jensen T, Hjollund NH, et al. Oxidative DNA damage in human sperm influences time to pregnancy. *Hum Reprod*. 2003;18(6):1265-1272. doi:10.1093/humrep/deg202
15. Jensen M, Leffers H, Petersen JH, et al. Frequent polymorphism of the mitochondrial DNA polymerase gamma gene (POLG) in patients with normal spermiograms and unexplained subfertility. *Hum Reprod*. 2004;19(1):65-70. doi:10.1093/humrep/deh038
16. Edition F. Examination and processing of human semen. *World Health*. 2010;Edition, V(10):286. doi:10.1038/aja.2008.57
17. Lewis SEM. Is sperm evaluation useful in predicting human fertility? *Reproduction*. 2007;134(1):31-40. doi:10.1530/REP-07-0152
18. Wang C, Yang C, Chen X, et al. Altered profile of seminal plasma microRNAs in the molecular diagnosis of male infertility. *Clin Chem*. 2011;57(12):1722-1731. doi:10.1373/clinchem.2011.169714
19. Esteves SC, Miyaoka R, Agarwal A. An update on the clinical assessment of the infertile male. *Clinics*. 2011;66(4):691-700. doi:10.1590/S1807-59322011000400026
20. Curtis H, Barnes NS, Schnek A, Flore G. *Biología*. 6a ed. (Panamericana M, ed.); 2004.
21. Neri Q V., Lee B, Rosenwaks Z, Machaca K, Palermo GD. Understanding fertilization through intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Cell Calcium*. 2014;55(1):24-37. doi:10.1016/J.CECA.2013.10.006
22. Leushuis E, van der Steeg JW, Steures P, et al. Immunoglobulin G antisperm antibodies and prediction of spontaneous pregnancy. *Fertil Steril*. 2009;92(5):1659-1665. doi:10.1016/j.fertnstert.2008.08.082

23. Zini A, Fahmy N, Belzile E, Ciampi A, Al-Hathal N, Kotb A. Antisperm antibodies are not associated with pregnancy rates after IVF and ICSI: systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod.* 2011;26(6):1288-1295. doi:10.1093/humrep/der074
24. Hopps CV, Mielnik A, Goldstein M, Palermo GD, Rosenwaks Z, Schlegel PN. Detection of sperm in men with Y chromosome microdeletions of the AZFa, AZFb and AZFc regions. *Hum Reprod.* 2003;18(8):1660-1665. doi:10.1093/humrep/deg348
25. Pilch B, Mann M. Large-scale and high-confidence proteomic analysis of human seminal plasma. *Genome Biol.* 2006;7(5):R40. doi:10.1186/gb-2006-7-5-r40
26. Milardi D, Grande G, Vincenzoni F, et al. Proteomic approach in the identification of fertility pattern in seminal plasma of fertile men. *Fertil Steril.* 2012;97(1):67-73.e1. doi:10.1016/j.fertnstert.2011.10.013
27. Batruch I, Lecker I, Kagedan D, et al. Proteomic Analysis of Seminal Plasma from Normal Volunteers and Post-Vasectomy Patients Identifies over 2000 Proteins and Candidate Biomarkers of the Urogenital System. *J Proteome Res.* 2011;10(3):941-953. doi:10.1021/pr100745u
28. Fung KYC, Glode LM, Green S, Duncan MW. A comprehensive characterization of the peptide and protein constituents of human seminal fluid. *Prostate.* 2004;61(2):171-181. doi:10.1002/pros.20089
29. Hamamah S, Seguin F, Barthelemy C, et al. 1H nuclear magnetic resonance studies of seminal plasma from fertile and infertile men. *J Reprod Fertil.* 1993;97(1):51-55. doi:10.1530/JRF.0.0970051
30. Jayaraman V, Ghosh S, Sengupta A, Srivastava S, Sonawat HM, Narayan PK. Identification of biochemical differences between different forms of male infertility by nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. *J Assist Reprod Genet.* 2014;31(9):1195-1204. doi:10.1007/s10815-014-0282-4
31. Boissière A, Gala A, Ferrières-Hoa A, et al. Cell-free and intracellular nucleic acids: new non-invasive biomarkers to explore male infertility. *Basic Clin Androl.* 2017;27(1):7. doi:10.1186/s12610-017-0052-0
32. Abu-Halima M, Backes C, Leidinger P, et al. MicroRNA expression profiles in human

- testicular tissues of infertile men with different histopathologic patterns. *Fertil Steril*. 2014;101(1):78-86.e2.
33. Hong Y, Wang C, Fu Z, et al. Systematic characterization of seminal plasma piRNAs as molecular biomarkers for male infertility. *Sci Rep*. 2016;6(1):24229. doi:10.1038/srep24229
34. Li H, Huang S, Guo C, Guan H, Xiong C. Cell-Free Seminal mRNA and MicroRNA Exist in Different Forms. Gromoll J, ed. *PLoS One*. 2012;7(4):e34566. doi:10.1371/journal.pone.0034566
35. Vojtech L, Woo S, Hughes S, et al. Exosomes in human semen carry a distinctive repertoire of small non-coding RNAs with potential regulatory functions. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(11):7290-7304. doi:10.1093/nar/gku347
36. Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell*. 2004;116(2):281-297. doi:10.1016/S0092-8674(04)00045-5
37. Lawrie CH. MicroRNAs: A Brief Introduction. In: *MicroRNAs in Medicine*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2013:1-24. doi:10.1002/9781118300312.ch1
38. Lewis BP, Shih I, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. Prediction of Mammalian MicroRNA Targets. *Cell*. 2003;115(7):787-798. doi:10.1016/S0092-8674(03)01018-3
39. Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol*. 2009;11(3):228-234. doi:10.1038/ncb0309-228
40. Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(8):509-524. doi:10.1038/nrm3838
41. Naqvi AR, Islam MN, Choudhury NR, Haq QMR. The fascinating world of RNA interference. *Int J Biol Sci*. 2009;5(2):97-117.
42. Weick E-M, Miska EA. piRNAs: from biogenesis to function. *Development*. 2014;141(18):3458-3471. doi:10.1242/dev.094037
43. Czech B, Hannon GJ. One Loop to Rule Them All: The Ping-Pong Cycle and piRNA-

-
- Guided Silencing. *Trends Biochem Sci.* 2016;41(4):324-337.
doi:10.1016/J.TIBS.2015.12.008
44. Weick E-M, Miska EA. piRNAs: from biogenesis to function. *Development.* 2014;141(18):3458-3471. doi:10.1242/dev.094037
 45. Tosar JP, Rovira C, Cayota A. piRNA-sized non-coding RNA fragments simulate expression of PIWI-interacting RNAs in non-gonadal tissues . *Comun Pers Manuscrito en proceso publicación.*
 46. Balatti V, Pekarsky Y, Croce CM. Role of the tRNA-Derived Small RNAs in Cancer: New Potential Biomarkers and Target for Therapy. *Adv Cancer Res.* 2017;135:173-187. doi:10.1016/bs.acr.2017.06.007
 47. Lee YS, Shibata Y, Malhotra A, Dutta A. A novel class of small RNAs: tRNA-derived RNA fragments (tRFs). *Genes Dev.* 2009;23(22):2639-2649. doi:10.1101/gad.1837609
 48. Soares AR, Fernandes N, Reverendo M, et al. Conserved and highly expressed tRNA derived fragments in zebrafish. *BMC Mol Biol.* 2015;16(1):22. doi:10.1186/s12867-015-0050-8
 49. Kawaji H, Nakamura M, Takahashi Y, et al. Hidden layers of human small RNAs. *BMC Genomics.* 2008;9(1):157. doi:10.1186/1471-2164-9-157
 50. Wang Q, Lee I, Ren J, Ajay SS, Lee YS, Bao X. Identification and Functional Characterization of tRNA-derived RNA Fragments (tRFs) in Respiratory Syncytial Virus Infection. *Mol Ther.* 2013;21(2):368-379. doi:10.1038/MT.2012.237
 51. Li S, Hu G-F. Emerging role of angiogenin in stress response and cell survival under adverse conditions. *Cell Physiol.* 2012;227(7):2822-2826. doi:10.1002/jcp.23051
 52. Thompson DM, Parker R. Stressing Out over tRNA Cleavage. *Cell.* 2009;138(2):215-219. doi:10.1016/J.CELL.2009.07.001
 53. Soares AR, Santos M. Discovery and function of transfer RNA-derived fragments and their role in disease. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2017;8(5):e1423. doi:10.1002/wrna.1423
 54. Kumar P, Anaya J, Mudunuri SB, Dutta A. Meta-analysis of tRNA derived RNA

- fragments reveals that they are evolutionarily conserved and associate with AGO proteins to recognize specific RNA targets. *BMC Biol.* 2014;12(1):78.
doi:10.1186/s12915-014-0078-0
55. Kumar P, Kuscu C, Dutta A. Biogenesis and Function of Transfer RNA-Related Fragments (tRFs). *Trends Biochem Sci.* 2016;41(8):679-689.
doi:10.1016/J.TIBS.2016.05.004
56. Martinez G. tRNA-derived small RNAs: New players in genome protection against retrotransposons. *RNA Biol.* 2018;15(2):170-175. doi:10.1080/15476286.2017.1403000
57. Sharma U, Conine CC, Shea JM, et al. Biogenesis and function of tRNA fragments during sperm maturation and fertilization in mammals. *Science (80-)*. 2016;351(6271):391-396. doi:10.1126/science.aad6780
58. Chen Q, Yan M, Cao Z, et al. Sperm tsRNAs contribute to intergenerational inheritance of an acquired metabolic disorder. *Science.* 2016;351(6271):397-400.
doi:10.1126/science.aad7977
59. Soares AR, Santos M. Discovery and function of transfer RNA-derived fragments and their role in disease. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2017;8(5):1-13.
doi:10.1002/wrna.1423
60. Krawetz SA, Kruger A, Lalancette C, et al. A survey of small RNAs in human sperm. *Hum Reprod.* 2011;26(12):3401-3412. doi:10.1093/humrep/der329
61. Salas-Huetos A, Blanco J, Vidal F, Mercader JM, Garrido N, Anton E. New insights into the expression profile and function of micro-ribonucleic acid in human spermatozoa. *Fertil Steril.* 2014;102(1):213-222.e4.
doi:10.1016/j.fertnstert.2014.03.040
62. Wu W, Qin Y, Li Z, et al. Genome-wide microRNA expression profiling in idiopathic non-obstructive azoospermia: significant up-regulation of miR-141, miR-429 and miR-7-1-3p. *Hum Reprod.* 2013;28(7):1827-1836. doi:10.1093/humrep/det099
63. Abu-Halima M, Ludwig N, Hart M, et al. Altered micro-ribonucleic acid expression profiles of extracellular microvesicles in the seminal plasma of patients with oligoasthenozoospermia. *Fertil Steril.* 2016;106(5):1061-1069.e3.

- doi:10.1016/j.fertnstert.2016.06.030
64. Hu L, Wu C, Guo C, Li H, Xiong C. Identification of microRNAs predominately derived from testis and epididymis in human seminal plasma. *Clin Biochem.* 2014;47(10-11):967-972. doi:10.1016/J.CLINBIOCHEM.2013.11.009
 65. Salas-Huetos A, Blanco J, Vidal F, et al. Spermatozoa from normozoospermic fertile and infertile individuals convey a distinct miRNA cargo. *Andrology.* 2016:1028-1036. doi:10.1111/andr.12276
 66. Balaban B, Brison D, Calderon G, et al. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Hum Reprod.* 2011;26(6):1270-1283. doi:10.1093/humrep/der037
 67. Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(20):e179-e179. doi:10.1093/nar/gni178
 68. Laurent LC, Abdel-Mageed AB, Adelson PD, et al. Meeting report: discussions and preliminary findings on extracellular RNA measurement methods from laboratories in the NIH Extracellular RNA Communication Consortium. *J Extracell Vesicles.* 2015;4(1):26533. doi:10.3402/jev.v4.26533
 69. Alipoor SD, Mortaz E, Garssen J, Movassaghi M, Mirsaeidi M, Adcock IM. Exosomes and Exosomal miRNA in Respiratory Diseases. *Mediators Inflamm.* 2016;2016:1-11. doi:10.1155/2016/5628404
 70. Centers for Disease Control and Prevention, American Society for Reproductive Medicine S for ART. *2013 Assisted Reproductive Technology. National Summary Report.* Atlanta (GA): US Dept of Health and Human Services; 2015.; 2013.
 71. He Z, Kokkinaki M, Pant D, Gallicano GI, Dym M. Small RNA molecules in the regulation of spermatogenesis. *Reproduction.* 2009;137(6):901-911. doi:10.1530/REP-08-0494
 72. Chen X, Ba Y, Ma L, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res.* 2008;18(10):997-1006. doi:10.1038/cr.2008.282

-
73. Rice J, Roberts H, Burton J, et al. Assay Reproducibility in Clinical Studies of Plasma miRNA. Hoheisel JD, ed. *PLoS One*. 2015;10(4):e0121948. doi:10.1371/journal.pone.0121948
 74. Lee H, Han S, Kwon CS, Lee D. Biogenesis and regulation of the let-7 miRNAs and their functional implications. *Protein Cell*. 2016;7(2):100-113. doi:10.1007/s13238-015-0212-y
 75. Emara MM, Ivanov P, Hickman T, et al. Angiogenin-induced tRNA-derived stress-induced RNAs promote stress-induced stress granule assembly. *J Biol Chem*. 2010;285(14):10959-10968. doi:10.1074/jbc.M109.077560
 76. Dluzen DF, Noren Hooten N, Evans MK. Extracellular RNA in aging. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2017;8(2):e1385. doi:10.1002/wrna.1385