

UNIVERSIDAD NACIONAL DE
ROSARIO

Facultad de Ciencias Médicas

Carrera de Doctorado en Ciencias Biomédicas

“Identificación de biomarcadores seminales de utilidad pronóstica en tratamientos de reproducción asistida”

Lic. Julieta Belén Grosso

Tesis para optar al título de doctora en ciencias biomédicas

Directora: Silvana Virginia Spinelli
Co-Directora: Karina Lucrecia Calvo

Lugar de realización:



2026

Parte de los resultados obtenidos en la investigación presentada en esta tesis ha sido publicada en los siguientes artículos y presentaciones a congresos:

Publicaciones científicas:

Grosso J.B., Zoff L., Calvo K., Maraval M.B., Perez M., Carbonaro M., Brignardello C., Morente C. y Spinelli S.V. Levels of seminal tRNA-derived fragments from normozoospermic men correlate with the success rate of ART. 2021 March. DOI: 10.1093/molehr/gaab017.

Presentaciones a congresos:

Grosso J.B., Velásquez S., Claus C., Calvo K.L., y Spinelli S.V. Analysis of inmunoendocrine parameters in seminal plasma and fertility markers in patients undergoing assisted reproductive treatments. 14th Latin American and Caribbean Congress of Immunology, 2024.

Grosso J.B., Velásquez S., Calvo K.L., y Spinelli S.V. Sensitivity of droplet digital PCR for the quantification of 5'tiRNA-Gly in seminal plasma and spermatozoa. LIX Congreso anual SAIB, 2023.

Grosso J.B., Claus C., Calvo K.L., Brignardello C., Morente C., Spinelli S.V. Evaluation of small non-coding RNA levels in spermatozoa from patients with negative outcomes in assisted reproductive technologies. Reunión Anual de la Sociedad de Biociencia, 2022.

Grosso J.B., Calvo K.L., Maraval M.B., Zoff L., Perez M., Carbonaro C., Brignadello C., Morente C., Spinelli S.V. Evaluation of tiRNAs as potential seminal biomarkers with prognostic utility in assisted reproduction treatments. Reunión Anual de Sociedad de Biociencia, 2020.

Abreviaturas

ANG.....	Angiogenina
ARNm.....	ARN mensajero
ARNt.....	ARN de transferencia
DHEA-s.....	Sulfato de dehidroepiandrosterona
Dex.....	Dexametasona
FIV.....	Fertilización in vitro
ICSI.....	Inyección intracitoplasmática de espermatozoides
IL.....	Interleucina
IMI.....	Infertilidad Masculina
Inexplicada	
IMC.....	Índice de Masa Corporal
LPS.....	Lipopolisacarido
miARN.....	micro ARN
OMS.....	Organización Mundial de la Salud
piARN.....	ARN que interactua con piwi
PS.....	Plasma Seminal
SDF.....	Fragmentación de ADN Espermático
SN.....	Sobrenadante
SPZ.....	Espermatozoides
sARNs.....	ARNs pequeños
T.....	Testosterona
TRA.....	Técnicas de Reproducción Asistida
tRF.....	Fragmento derivado del ARNt

Contenido

Abreviaturas	3
Resumen	9
1. Introducción.....	11
1.1. Factor Masculino.....	11
1.1.1. Sistema reproductor masculino	11
1.1.2. Fisiología del aparato reproductor Masculino	12
1.1.2.1. Espermatogénesis.....	12
1.1.2.2. Epitelio epididimario	14
1.1.2.3. Regulación hormonal.....	17
1.1.2.4. Composición del semen	18
1.1.2.4.1. El espermatozoide	19
1.1.2.5. Modulación del sistema inmunológico femenino	20
1.2. Infertilidad.....	21
1.2.1. Infertilidad masculina.....	22
1.2.1.1. Infertilidad masculina y estilo de vida	23
1.2.1.1.1. Infertilidad y estrés	23
1.2.1.1.2. Infertilidad y obesidad	25
1.3. Diagnóstico	26
1.3.1. Espermograma	26

1.3.2. Evaluación del grado de fragmentación del ADN espermático	28
1.4. Estrategias terapéuticas.....	30
1.5. Biomarcadores de infertilidad masculina	31
1.5.1. El plasma seminal como fuente de biomarcadores	32
1.5.1.1. ARN pequeños seminales como potenciales biomarcadores de Infertilidad masculina	33
1.5.1.1.1. miARN	35
1.5.1.1.2. piARN	36
1.5.1.1.3. Fragmentos derivados de ARNt	37
2. Objetivo	40
3. Materiales y métodos.....	42
3.1. Grupo de estudio	42
3.1.1. Relevamiento de datos de Historia Clínica de los pacientes	43
3.2. Procesamiento inicial de las muestras.....	43
3.3. Estudios de fragmentación del ADN espermático	44
3.4. Cuantificación hormonal en plasma seminal.....	44
3.5. Selección de biomarcadores	45
3.5.1. Revisión literaria y análisis bioinformáticos.....	45
3.5.2. Análisis bioinformáticos de RNAseq	45
3.6. Cultivo celular	46

3.6.1. Evaluación de la viabilidad celular mediante el uso de sales de tetrazolio (MTT)	47
3.7. Cuantificación de citoquinas.....	47
3.8. Extracción de ARN.....	47
3.8.1. Plasma Seminal	47
3.8.2. Espermatozoides.....	48
3.8.3. Extractos Celulares.....	48
3.8.4. Sobrenadantes de cultivos	49
3.9. Cuantificación de ácidos nucleicos	49
3.10. Northern blot	49
3.11. Tratamiento con DNAsa.....	50
3.12. Cuantificación de ARN	50
3.12.1. Retrotranscripción de las muestras	51
3.12.2. Ensayos de qPCR	52
3.12.3. Cuantificación mediante droplet digital PCR	54
3.13. Determinación de proteínas y análisis por Western blot.....	55
3.14. Análisis estadístico.....	56
4. Capítulo 1.....	57
4.1. Resultados.....	57
4.1.2. Parámetros clínicos de la corte de estudio	57

4.1.2.1. Factor Femenino.....	58
4.1.2.1.1. Parámetros clínicos de las donantes	59
4.1.2.1.2. Parámetros clínicos de las receptoras	59
4.1.2.2. Factor masculino	60
4.1.2.2.1. Parámetros demográficos y clínicos:	61
4.1.3. Parámetros seminales de la corte de estudio.....	64
4.1.3.1. Espermograma	64
4.1.3.2. Análisis del grado de fragmentación del ADN espermático (SDF)	65
4.1.3.3. Niveles hormonales en plasma seminal	66
4.1.3.4. Citoquinas en plasma seminal	70
4.1.4. Resultados del procedimiento de ICSI y desarrollo embrionario	72
4.1.5. Análisis de correlaciones entre los parámetros clínicos y seminales	73
4.2. Discusión	75
5. Capítulo 2.....	79
5.1. Resultados.....	79
5.1.1. Selección de Biomarcadores	79
5.1.1.1. Revisión bibliográfica y análisis bioinformáticos de ARNs pequeños en plasma seminal	79
5.1.1.2. Análisis bioinformáticas de datos de sRNA-seq	83
5.1.2. Fragmentos derivados del ARNt como biomarcador en plasma seminal.....	85

5.1.2.1. Análisis exploratorio de los niveles de ARNs pequeños en plasma seminal (cohorte 2015–2019)	86
5.1.2.2. Validación de los niveles de tRFs en una cohorte ampliada y recategorizada	88
5.1.3. Cuantificación de fragmentos derivados de ARNt en espermatozoides	89
5.1.4. Optimización del método de detección	92
5.1.5. Evaluación de marcadores transcriptómicos de madurez espermática	95
5.1.6. Cuantificación de niveles de Angiogenina en PS.....	96
5.1.7. Evaluación de posibles asociaciones clínicas mediante análisis de correlación	99
5.2. Discusiones.....	103
6. Capítulo 3.....	108
6.1. Resultados.....	108
6.1.1. Acción glucocorticoide sobre la contribución de 5'-tRF mediada por macrófagos.....	108
6.1.2. Acción androgénica sobre la contribución de 5'-tRF mediada por macrófagos	112
6.1.2. Efecto del plasma seminal sobre la respuesta macrofágica in vitro.....	117
7.2. Discusiones.....	120
7. Conclusiones	124
8. Bibliografía.....	126

Resumen

La infertilidad masculina constituye un problema de salud pública creciente y se encuentra implicada en aproximadamente el 40% de los casos de infertilidad en parejas en edad reproductiva. A pesar de los avances en medicina reproductiva, las herramientas diagnósticas actualmente disponibles presentan limitaciones para predecir el potencial fértil masculino y el éxito de las técnicas de reproducción asistida. En particular, un número significativo de pacientes presenta parámetros seminales dentro de los rangos considerados normales y, sin embargo, experimenta fallas reproductivas. En este contexto, el plasma seminal ha emergido como una fuente promisoría para la identificación de biomarcadores moleculares capaces de reflejar procesos biológicos asociados a la fertilidad masculina. Entre ellos, los ARN pequeños no codificantes han despertado un creciente interés debido a su abundancia y estabilidad en fluidos biológicos. El objetivo de esta tesis fue evaluar el valor pronóstico de fragmentos derivados de ARNt (tRF) presentes en plasma seminal de hombres normozoospermicos sometidos a procedimientos de ICSI con ovodonación, así como explorar su posible relación con mecanismos inmunoendocrinos asociados al éxito reproductivo. Para ello, se caracterizó clínica y seminalmente una cohorte de 88 pacientes normozoospermicos sometidos a tratamientos de ICSI. Los individuos fueron clasificados prospectivamente según el resultado del procedimiento en dos grupos: aquellos que lograron embarazo clínico (ICSI (+)) y aquellos que no lo lograron (ICSI (-)). Dentro de este último grupo se distinguieron los pacientes que presentaron dos o más ciclos fallidos (≥ 2 Fallas), criterio empleado como aproximación clínica a potenciales casos de infertilidad masculina inexplicada. A partir de un abordaje que combinó revisión bibliográfica, análisis bioinformáticos y validación experimental, se seleccionaron los fragmentos derivados de ARNt potencialmente relevantes (5'tRF-Val, 5'tRF-Gly, 5'tRF-Lys, 5'tRF-Glu), junto con miR-Let-7, utilizado como RNA de referencia perteneciente a otro biotipo y con una vía de biogénesis distinta. Su cuantificación en plasma seminal y espermatozoides se realizó mediante técnicas de biología molecular,

incluyendo qPCR y ddPCR. Asimismo, se evaluaron los niveles proteicos de angiogenina en plasma seminal, una ribonucleasa implicada en la generación de estos fragmentos. Finalmente, se realizaron estudios exploratorios in vitro destinados a investigar la posible contribución de macrófagos al contenido seminal de tRFs, así como el efecto del plasma seminal sobre la respuesta macrofágica.

Los resultados evidenciaron un aumento significativo en la abundancia de los tRFs seleccionados en plasma seminal en el grupo ICSI (-), mientras que a nivel espermático solo se detectó un incremento específico de 5'tRF-Lys. Asimismo, se observaron correlaciones entre estos fragmentos, parámetros clínicos y componentes inmunoendocrinos del plasma seminal, lo que sugiere una posible interacción entre el microambiente local y el perfil de tRFs. La optimización de su cuantificación mediante ddPCR permitió mejorar la sensibilidad y reproducibilidad analítica en su detección; sin embargo, su mayor costo y la complejidad operativa limitan su implementación en análisis clínicos de rutina. Los estudios funcionales exploratorios sugirieron además que células inmunes, como los macrófagos, podrían participar en la generación de estos fragmentos en respuesta a estímulos hormonales presentes en el microambiente seminal.

Los hallazgos de esta tesis aportan evidencia acerca del potencial de los 5'tRF como biomarcadores seminales asociados al éxito reproductivo en técnicas de reproducción asistida. Estos resultados contribuyen a una mejor comprensión de los mecanismos moleculares involucrados en la fertilidad masculina y abren nuevas perspectivas para el desarrollo de herramientas diagnósticas más precisas en el campo de la medicina reproductiva.

1. Introducción

En esta tesis doctoral nos enfocamos en el estudio del factor masculino como componente determinante de la reproducción humana y del éxito de las técnicas de reproducción asistida. Más allá de la mera producción de espermatozoides, la función reproductiva masculina involucra complejos procesos celulares, hormonales y moleculares que condicionan la competencia fecundante y el desarrollo embrionario temprano. Profundizar en estos mecanismos resulta esencial para comprender las bases biológicas de la infertilidad y avanzar hacia herramientas diagnósticas más precisas.

1.1. Factor Masculino

1.1.1. Sistema 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 el escroto. Éstos cumplen una función doble que consiste en producir espermatozoides y hormonas sexuales masculinas¹.

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^{1,2}. 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 deferente¹⁻³. 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 eyaculación¹.

1.1.2. Fisiología del aparato reproductor Masculino

1.1.2.1. Espermatogénesis

La espermatogénesis es el proceso mediante el cual se desarrollan los gametos masculinos, los espermatozoides. En humanos, su duración se estima en aproximadamente 74 días desde la espermatogonia hasta la formación del espermatozoide morfológicamente maduro, a lo que se suman 12 días adicionales correspondientes al tránsito epididimario necesario para completar su maduración funcional⁴. Este proceso continuo se inicia durante el desarrollo embrionario, cuando las células germinales primordiales migran hacia la gónada en formación y se expanden por mitosis para originar las células madre espermatogoniales, que permanecen en estado quiescente hasta la pubertad, momento en el cual reanudan la proliferación mitótica y dan comienzo a la espermatogénesis activa. Las espermatogonias, localizadas en la región basal de los túbulos seminíferos, se dividen por mitosis y, tras sucesivas replicaciones, se diferencian en espermátocitos primarios^{4,5}.

Los espermátocitos primarios duplican su contenido de ADN durante la interfase y se trasladan hacia el compartimiento luminal del citoplasma de la célula de Sertoli. Los espermátocitos primarios sufren la primera división meiótica para dar dos espermátocitos secundarios. Posteriormente, atraviesan rápidamente la segunda división meiótica para generar cuatro espermátidas haploides por cada espermátocito primario. Durante estas divisiones, la citocinesis es incompleta, lo que da lugar a la formación de un sincitio celular interconectado por puentes citoplasmáticos que permiten la sincronización del desarrollo^{4,6}. Las espermátidas haploides experimentan luego un proceso de diferenciación morfológica denominado espermiogénesis, en el cual se desarrollan las estructuras características del espermatozoide maduro, incluyendo el acrosoma, la pieza intermedia rica en mitocondrias y el flagelo.

En la etapa final, denominada espermiación, los espermatozoides son liberados hacia la luz tubular. Aunque estos espermatozoides son morfológicamente maduros, aún son inmóviles e incapaces de realizar la fertilización⁷. Desde la luz de los túbulos seminíferos

son transportados hasta el epidídimo donde sufren una maduración bioquímica mediante la cual adquieren motilidad progresiva y una cubierta glicoproteica. Los espermatozoides maduros son almacenados en el epidídimo hasta que se produzca la eyaculación^{5,8}.

A nivel molecular, la espermatogénesis está estrictamente regulada por cambios dinámicos en la expresión génica que acompañan la diferenciación celular. Las primeras etapas, en las que las células madre espermatogoniales experimentan meiosis, primero formando espermatocitos y luego espermátides, se caracterizan por dos ondas separadas de actividad transcripcional. A esto le sigue un silenciamiento transcripcional casi completo cuando las espermátidas redondas pierden la mayor parte del citoplasma y se diferencian en espermatozoides flagelados. El silenciamiento implica interacciones entre varios mecanismos epigenéticos, pero está impulsado principalmente por la condensación nuclear a través de la sustitución de la mayoría de las proteínas histonas por protaminas, que se unen más fuertemente al ADN. Esto, junto con la extensa metilación del ADN, da como resultado una fuerte represión transcripcional en el núcleo espermático⁹.

Diversos marcadores moleculares permiten identificar las distintas etapas de maduración germinal. Entre ellos se encuentran KIT y PLZF como marcadores de espermatogonias, TEX11 y KLHL10 en espermatocitos premeióticos, y GAPDHS y ZBPB1 en espermatozoides maduros. Asimismo, el transcripto SLFNL1, abundante en espermatozoides maduros, ha sido vinculado con funciones en la embriogénesis temprana, sugiriendo que ciertos ARN retenidos podrían cumplir roles funcionales tras la fecundación¹⁰.

En paralelo, las proporciones de ARN pequeños no codificantes varían dinámicamente a lo largo de la espermatogénesis^{11,12}. Durante las fases meióticas se observa un aumento en la expresión de piARN y miARN específicos, asociados a la regulación génica y al control de elementos transponibles. Sin embargo, esta dinámica no se detiene tras la espermiogénesis. A pesar de que el espermatozoide maduro se encuentra transcripcionalmente reprimido, la maduración epididimaria se asocia con una

remodelación activa de su repertorio de sARNs^{11,13} (Figura 1). En este sentido, se ha demostrado un incremento significativo de un subconjunto específico de aproximadamente 100 miARN en espermatozoides de cauda respecto de aquellos provenientes del caput, incluyendo miembros de las familias miR-34b/c, miR-17-92 y del clúster miR-880 del cromosoma¹⁴⁻¹⁶. Asimismo, durante el tránsito epididimario los espermatozoides adquieren progresivamente fragmentos derivados de ARNt, que llegan a constituir una fracción mayoritaria del repertorio de sARNs en espermatozoides maduros¹⁷.

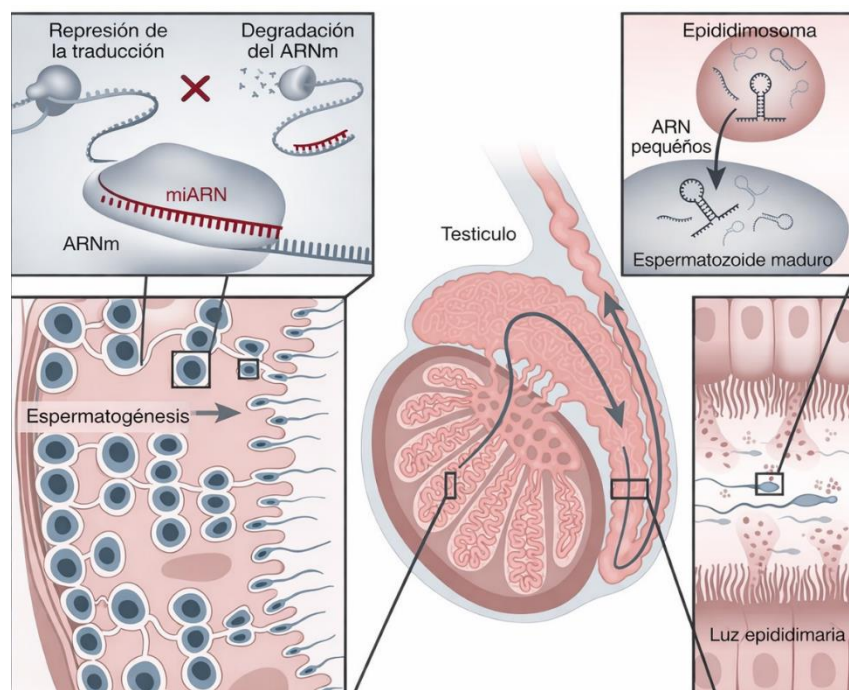


Figura 1. Remodelación de ARN en espermatozoides. Imagen adaptada y traducida, extraída de Hamilton et al. The developmental significance of sperm-borne ribonucleic acids and their potential for use as diagnostic markers for male factor infertility. F&S Reviews, Volume 3, Issue 1, p11 - 23 (2022). DOI: 10.1016/j.xfmr.2021.11.005

1.1.2.2. Epitelio epididimario

El epidídimo constituye una estructura fundamental del tracto reproductor masculino, en la cual los espermatozoides experimentan procesos de maduración bioquímica y funcional indispensables para adquirir motilidad progresiva y capacidad fecundante. Anatómicamente, se trata de un conducto único altamente contorneado, dividido en

tres regiones bien definidas: cabeza (caput), cuerpo (corpus) y cola (cauda). En humanos, el caput está compuesto principalmente por los conductos eferentes distales y el inicio del conducto epididimario¹⁸. Cada región epididimaria posee características estructurales y funcionales particulares que reflejan la naturaleza altamente segmentada de este órgano¹⁹.

El epitelio epididimario está compuesto por diversos tipos celulares, entre los que se incluyen células principales, apicales, estrechas, claras, basales y del halo. Estas células participan activamente en la generación de un microambiente luminal adecuado para la maduración espermática, proceso que depende del intenso intercambio de sustancias entre los espermatozoides y el fluido epididimal. Dicho fluido contiene iones, proteínas, lípidos, ARNs y otros metabolitos que pueden encontrarse libres o contenidos en vesículas extracelulares denominadas epididimosomas^{14,16}. Estas vesículas, secretadas principalmente por células principales y en menor medida por células claras, desempeñan un papel clave en la transferencia de componentes bioactivos hacia los espermatozoides^{14,16}.

Durante el tránsito epididimario, los espermatozoides experimentan cambios sustanciales en su perfil proteómico y lipídico. Los cambios en el perfil proteómico de los espermatozoides están asociados con la adquisición de funciones esenciales como la motilidad, la capacitación y la competencia. Paralelamente, la reorganización del perfil lipídico incrementa la fluidez de la membrana plasmática, modificación que resulta fundamental para eventos posteriores de la fecundación, como la interacción y fusión con la membrana del ovocito²⁰.

Evidencias recientes en modelos animales indican que en el epidídimo los espermatozoides incorporan activamente nuevas moléculas de ARNs pequeños (sARNs), modificando consecuentemente su repertorio de sARNs. Considerando que los espermatozoides son células transcripcionalmente inactivas, es evidente que la obtención de nuevos ARNs durante la maduración fuera de los testículos se debe a la comunicación entre los espermatozoides y el fluido epididimal, a través de epididimosomas¹⁶. Esta remodelación del repertorio de sARNs sugiere que el epidídimo

no solo participa en la maduración funcional del espermatozoide, sino también en su programación epigenética. De hecho, se ha propuesto que los sARNs cumplen funciones relevantes en la fecundación y el desarrollo embrionario temprano, e incluso en la transmisión de información epigenética intergeneracional^{16,21}.

Desde el punto de vista inmunológico, el epidídimo presenta un microambiente singular, diferente al testículo, considerado un órgano inmunoprivilegiado. La barrera hemato-epidídima, formada por uniones estrechas entre células epiteliales, es menos restrictiva que la barrera hemato-testicular, permitiendo la presencia de diversas células inmunes en el epitelio e intersticio¹⁹. Entre ellas destacan macrófagos, células dendríticas, linfocitos T ($\alpha\beta$ y $\gamma\delta$) y células B, los cuales participan en el delicado equilibrio entre inmunotolerancia a los espermatozoides y defensa frente a patógenos ascendentes^{19,22}.

Los macrófagos representan la población inmune más abundante del epidídimo. Se distribuyen densamente tanto en el intersticio como dentro del epitelio, especialmente en el segmento inicial y la cabeza, sitios de ingreso de los espermatozoides desde los testículos. En estas regiones, los macrófagos intraepiteliales forman prolongaciones citoplasmáticas que atraviesan las células epiteliales e, incluso, pueden extenderse hacia el lumen, lo que sugiere un rol en la vigilancia inmunológica y en la interacción con los gametos^{19,23}. Además, los macrófagos epididimarios integran señales metabólicas, hormonales e inmunorreguladoras, modulando su grado de polarización y regulando así tanto la homeostasis tisular como la respuesta frente a infecciones²³.

Cabe destacar que las respuestas inmunes difieren a lo largo del epidídimo. En roedores, las regiones proximales (caput) exhiben una respuesta inmunitaria más tolerogénica, mientras que las regiones distales (cauda) son más proclives a generar reacciones inflamatorias intensas ante infecciones bacterianas o estímulos locales. Este patrón se asocia con daño epitelial, fibrosis y obstrucción, con consecuencias adversas para la fertilidad masculina²².

1.1.2.3. Regulación hormonal

El eje hipotálamo-hipófisis-gonadal (HHG) desempeña un papel indispensable en la regulación de la reproducción masculina²⁴. En este eje, las neuronas hipotalámicas secretan de manera pulsátil la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) hacia la circulación del sistema porta hipotálamo-hipófisis, donde actúa sobre la adenohipófisis para inducir la liberación, también pulsátil, de las gonadotropinas foliculoestimulante (FSH) y luteinizante (LH). Estas hormonas hipofisarias son esenciales para el mantenimiento de la función gonadal, ya que regulan de manera complementaria tanto la producción de testosterona como el proceso de diferenciación espermática^{5,25}.

La LH ejerce su acción sobre las células intersticiales de Leydig mediante la unión a sus receptores específicos, promoviendo la síntesis y secreción de testosterona. Esta, a su vez, actúa por retroalimentación negativa sobre el hipotálamo y la hipófisis anterior, modulando la frecuencia e intensidad de la secreción de GnRH, LH y FSH, asegurando así el equilibrio del eje HHG.

Por otro lado, la FSH se une a receptores localizados en las células de Sertoli, estimulando la producción de proteína fijadora de andrógenos (ABP), inhibina y diversas moléculas parácrinas que favorecen el microambiente testicular. Estas sustancias no solo facilitan el soporte estructural y metabólico de las células germinales en diferenciación, sino que también regulan de manera indirecta la actividad esteroidogénica de las células de Leydig, estableciendo una comunicación funcional entre ambos compartimentos del testículo.

La testosterona, sintetizada por las células de Leydig, difunde hacia los túbulos seminíferos, donde se une a la ABP secretada por las células de Sertoli, lo que asegura concentraciones intratubulares elevadas de esta hormona, condición indispensable para la iniciación, progresión y mantenimiento del proceso espermatogénico²⁵.

El adecuado funcionamiento del eje HHG puede evaluarse de manera indirecta a través del espermograma, considerado la prueba biológica de referencia para valorar la

capacidad espermatogénica y, en consecuencia, la integridad funcional del sistema reproductor masculino.

1.1.2.4. Composición del semen

El semen es un fluido biológico compuesto por un 5% de espermatozoides (SPZ) y un 95% de plasma seminal (PS). Este último constituye una matriz bioquímica compleja que contiene azúcares, oligosacáridos, glucanos, lípidos, iones, metabolitos de bajo peso molecular, péptidos, proteínas, citoquinas, hormonas, ADN y ARN. Estos componentes pueden encontrarse libres en solución o empaquetados en vesículas extracelulares, principalmente exosomas, que funcionan como mediadores de la comunicación intercelular¹⁶. La compleja composición del PS proporcionan energía para el metabolismo y la motilidad de los espermatozoides y modulan la función de los espermatozoides regulando una cascada de eventos moleculares, como la maduración de los espermatozoides en el epidídimo y la capacitación durante el transporte²⁶.

El PS se origina principalmente de las secreciones de las glándulas sexuales anexas. Está constituido por secreciones derivadas del testículo y el epidídimo (2–5%), la próstata (20–30%), las vesículas seminales (65–75%) y las glándulas bulbouretrales ($\approx 1\%$)^{27,28}. Las vesículas seminales secretan prostaglandinas, implicadas en la motilidad y la función espermática y fructosa, esencial para nutrición de los espermatozoides. La próstata aporta ácido cítrico, enzimas proteolíticas como fibrinolisin y fibrinogenasas, hialuronidasa, antígeno prostático específico (PSA), además de iones como zinc, calcio y magnesio, que cumplen roles críticos en la estabilización del ADN espermático y en la capacitación de los gametos. Las glándulas bulbouretrales, en tanto, contribuyen con carbohidratos como galactosa, galactosamina, ácido galactosúrico, ácido siálico y metilpentosa, que participan en procesos de lubricación y modulación inmunológica^{27,28}.

Además de nutrientes y enzimas, el PS es rico en moléculas bioactivas que desempeñan un rol clave en la inmunomodulación del tracto reproductor femenino y protegen a las células germinales de la infección²⁹. Las citoquinas presentes en el semen derivan

principalmente de leucocitos residentes en el epidídimo y en otras partes del sistema reproductor masculino, siendo los linfocitos T colaboradores (Th) una de las principales fuentes ³⁰⁻³². Estas citoquinas regulan el reclutamiento de células inmunes y participan en la inducción de un microambiente tolerogénico en el endometrio, que favorece la supervivencia espermática y la implantación embrionaria. Es importante destacar que su producción es autónoma, es decir, independiente de las variaciones hormonales sistémicas^{29,33}.

En cuanto a las hormonas, las células de Leydig son la principal fuente de esteroides sexuales en el PS. Las concentraciones hormonales difieren marcadamente entre plasma seminal y sanguíneo: la testosterona seminal es en promedio siete veces menor que la sérica, aunque su acción local es significativa³⁴. Además de los andrógenos clásicos, el PS contiene otros esteroides en cantidades relevantes, como dehidroepiandrosterona (DHEA), su forma sulfatada (DHEA-s) y cortisol. Estas hormonas cumplen funciones locales vinculadas a la regulación de la motilidad espermática, la protección frente al estrés oxidativo y la modulación de la respuesta inmune femenina^{29,34}.

Desde un punto de vista funcional, el semen experimenta una serie de transformaciones inmediatamente después de la eyaculación. En condiciones fisiológicas, se liberan entre 2 y 3 ml de semen, conteniendo entre 60 y 100 millones de espermatozoides. Inmediatamente tras la emisión, el semen coagula por la acción de la vesiculasa, lo que facilita su retención en la vagina. Minutos más tarde, la acción de enzimas prostáticas como la fibrinolisisina y la fibrinogenasa inicia el proceso de licuefacción, que habitualmente se completa en un lapso de 15 minutos, aunque en algunos casos puede extenderse hasta 1 hora²⁷. Una licuefacción más lenta de lo normal se asocia con alteraciones en la fertilidad, ya que limita la liberación oportuna de los espermatozoides y reduce sus probabilidades de alcanzar el ovocito³⁵.

1.1.2.4.1. El espermatozoide

El espermatozoide es una célula altamente especializada cuya estructura está adaptada para transportar el material genético paterno y posibilitar la fecundación.

Morfológicamente se divide en tres regiones principales: cabeza, pieza intermedia y cola o flagelo. La cabeza espermática contiene el núcleo con el ADN altamente compactado mediante el reemplazo de histonas por protaminas, proceso que reduce el volumen nuclear, mejora la eficiencia hidrodinámica y protege la integridad genética frente a daños externos^{36–38}. En su región anterior se localiza el acrosoma, estructura esencial para la penetración de las cubiertas del ovocito durante la fecundación³⁹. La pieza intermedia conecta la cabeza con el flagelo y contiene una vaina mitocondrial responsable de la producción energética necesaria para la motilidad espermática. La cola o flagelo, formada por un axonema organizado en microtúbulos, genera las fuerzas propulsivas que permiten el desplazamiento del espermatozoide a través del tracto reproductivo femenino^{40,41}. Tras la eyaculación, los espermatozoides experimentan modificaciones estructurales y funcionales adicionales dentro del tracto reproductivo femenino, proceso conocido como capacitación, que incrementa su capacidad fecundante^{20,42}.

El desarrollo de las técnicas de biología molecular ha impulsado un renovado interés en la andrología, permitiendo ampliar la comprensión de la fisiología espermática. Tradicionalmente se consideraba que el espermatozoide tenía como única función la entrega del ADN paterno al ovocito, sin embargo, actualmente se reconoce que también transporta diversas moléculas bioactivas, entre ellas ARN, que participan en el desarrollo embrionario temprano y en la salud de la descendencia. Los ARN espermáticos fueron descritos inicialmente en humanos en la década de 1980 y posteriormente caracterizados mediante técnicas de secuenciación, identificándose tanto ARN codificantes como no codificantes, incluyendo ARN mensajeros (ARNm), ARN largos no codificantes (ARNlnc), microARN (miARN), ARN asociados a PIWI (piARN) y fragmentos derivados del ARNt (tRF)^{43–46}.

1.1.2.5. Modulación del sistema inmunológico femenino

El plasma seminal constituye un fluido biológicamente activo que contiene diversas moléculas de señalización capaces de ejercer efectos directos sobre los tejidos del tracto

reproductor femenino inmediatamente después de la eyaculación⁴⁷⁻⁴⁹. Entre estas se incluyen citocinas, quimiocinas, antígenos paternos y otros factores inmunológicos que inducen cambios en la expresión génica del epitelio cervical y endometrial, así como el reclutamiento de células inmunes tras el coito, caracterizado por la infiltración de monocitos, células dendríticas y linfocitos en el cérvix^{50,51}. Esta comunicación molecular favorece el establecimiento de mecanismos de tolerancia materna necesarios para la implantación y el adecuado desarrollo del embarazo. Aunque no resulta indispensable para que ocurra la fecundación, como lo evidencian las técnicas de reproducción asistida de alta complejidad⁵⁰.

1.2. Infertilidad

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la infertilidad se define como la incapacidad de una pareja sexualmente activa que no emplea métodos anticonceptivos de lograr el embarazo en el plazo de un año³⁵. Esta condición constituye un problema de salud pública relevante, con impacto médico, económico y psicosocial a nivel poblacional^{52,53}.

A nivel global, se estima que la infertilidad afecta aproximadamente al 15% de la población en edad reproductiva³⁵, y que el factor masculino está involucrado en aproximadamente el 40% de los casos⁵⁴. La naturaleza compleja de esta condición se debe a que cada individuo de la pareja aporta un bagaje único de características genómicas, proteómicas y metabolómicas, cuyas interacciones pueden influir de manera impredecible sobre el potencial reproductivo⁵⁵. 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 aproximadamente el 10% de las parejas afectadas, no se identifican alteraciones clínicas evidentes e incluso cuando se reconoce una causa clínica, los mecanismos moleculares subyacentes permanecen desconocidos en la mayoría de los casos⁵⁶.

1.2.1. Infertilidad masculina

En los últimos años, la infertilidad masculina ha sido reconocida como un problema de salud pública de alcance mundial⁵⁷. Datos provenientes del Global Burden of Disease Study evidencian que, entre 1990 y 2017, la prevalencia de infertilidad masculina mostró un incremento acumulado del 8,843%, con una tasa anual de aumento estimada del 0,291%⁵⁸. Cabe señalar que estas estimaciones podrían estar subestimadas, dado que la infertilidad masculina no constituye una condición de notificación obligatoria y una proporción significativa de los diagnósticos y tratamientos no se registra de manera sistemática en las bases de datos poblacionales⁵⁹.

La disminución de la fertilidad masculina puede originarse por múltiples causas que afectan la estructura y/o la función del sistema reproductor. Entre las principales se incluyen alteraciones en la espermatogénesis, trastornos endocrinos, infecciones del tracto genital, obstrucciones de los conductos deferentes y anomalías genéticas⁶⁰. Asimismo, diversas comorbilidades sistémicas, como enfermedades crónicas, neoplasias malignas —incluidos linfomas y leucemias— y la obesidad, han sido asociadas con un deterioro de la función reproductiva masculina^{61–63}. A estos factores se suman exposiciones adquiridas, tales como tóxicos ambientales, disruptores endocrinos y hábitos asociados al estilo de vida, que también han demostrado afectar la calidad seminal^{53,57}.

Estas alteraciones pueden manifestarse clínicamente como cambios en los parámetros del semen. Entre las anormalidades más frecuentes se encuentran la disminución del recuento espermático (oligozoospermia) o su ausencia total (azoospermia), la reducción de la motilidad (astenozoospermia), defectos morfológicos (teratozoospermia) y modificaciones en las características macroscópicas del eyaculado, como volumen o viscosidad^{64–66}.

En la práctica clínica, la evaluación del factor masculino continúa sustentándose principalmente en la historia clínica, el examen físico y el espermograma convencional^{35,67}. Si bien se han propuesto estudios complementarios, como el análisis

de la fragmentación del ADN espermático, la medición del estrés oxidativo y los estudios genéticos, todavía queda un porcentaje significativo de casos clasificados como infertilidad masculina inexplicada (IMI)^{68,69}. Estos pacientes se caracterizan por presentar parámetros seminales normales, ausencia de antecedentes clínicos relevantes y factores femeninos descartados⁷⁰. La incidencia promedio reportada para este grupo es cercana al 15%, aunque puede variar entre el 6% y el 37% según la población estudiada y los criterios diagnósticos utilizados⁷¹. Esta situación pone en evidencia las limitaciones de las herramientas diagnósticas tradicionales y subraya la necesidad de desarrollar nuevos enfoques que permitan comprender con mayor profundidad los mecanismos biológicos subyacentes y mejorar la estratificación clínica de los pacientes.

1.2.1.1. Infertilidad masculina y estilo de vida

En las últimas décadas se ha documentado una disminución sostenida en la calidad seminal, reflejada en la reducción del volumen del eyaculado y la concentración espermática⁷². Específicamente, la caída del recuento mundial de espermatozoides constituye actualmente un fenómeno ampliamente reconocido y continúa a un ritmo preocupante en el siglo XXI⁷³, lo que ha generado creciente inquietud en el campo de la salud reproductiva. Esta tendencia coincide con cambios profundos en los hábitos y condiciones ambientales asociados al estilo de vida moderno. Entre los factores que podrían explicar el deterioro progresivo de la calidad seminal se ha señalado la influencia de diversos determinantes conductuales y ambientales ampliamente extendidos — como una dieta inadecuada, la exposición a contaminantes y sustancias químicas, el tabaquismo, el consumo de alcohol, el estrés y el sedentarismo—, los cuales pueden afectar negativamente sobre la fertilidad^{64,74,75}.

1.2.1.1.1. Infertilidad y estrés

En las sociedades modernas el estrés es un factor de riesgo en la salud cada vez más preponderante. La infertilidad en sí misma es estresante debido a las presiones sociales, las pruebas, el diagnóstico, los tratamientos, los fracasos e incluso los costos

económicos con los que está asociada⁷⁶. Muchos estudios muestran que los hombres sometidos a tratamiento de infertilidad tienen una disminución en los parámetros del semen durante el mismo, pero es difícil distinguir si el estrés es una causa o una consecuencia de dicho fenómeno⁷⁷.

Un individuo estresado presenta además elevados niveles circulantes de cortisol, el glucocorticoide más importante en humanos. Esta hormona esteroidea es producida por la glándula suprarrenal y es esencial para el desarrollo normal y el mantenimiento de la homeostasis. En respuesta al estrés se activa el eje hipotálamo-hipofisario-adrenal y se induce la liberación de glucocorticoides, los cuales modulan la función de la mayoría de las células del cuerpo⁷⁸. Dada su naturaleza liposoluble, estas moléculas difunden libremente a través de la membrana plasmática y ejercen sus efectos mediante la unión al receptor citoplasmático de glucocorticoides, un miembro de la superfamilia de receptores nucleares de hormona⁷⁹. En su estado inactivo, este receptor permanece en el citosol, pero cuando se une a su ligando sufre cambios conformacionales y adquiere la capacidad de dimerizar y traslocarse al núcleo para actuar allí como un factor de transcripción⁸⁰.

Niveles elevados de cortisol afectan la función reproductiva a múltiples niveles en el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal: a nivel del hipotálamo, para disminuir la síntesis y liberación de GnRH, en la hipófisis, para inhibir la síntesis y liberación de LH y FSH, y en el testículo para modular la esteroidogénesis y/o espermatogénesis directamente^{81,82}. Asimismo, se ha detectado la expresión del receptor de glucocorticoides en células de Leydig⁸³, células de Sertoli⁸⁴ y células germinales⁸⁵. Por otra parte, estudios realizados en modelos animales demuestran que los niveles de cortisol se encuentran aumentados en tejido testicular de ratas estresadas^{85,86}.

El estrés tiene también un impacto negativo en la calidad del espermatozoide⁷⁶. Diversas evidencias indican que el estrés se encuentra relacionado negativamente con la calidad general del semen, y específicamente con una disminución en la concentración de espermatozoides y en su motilidad⁸⁷.

1.2.1.1.2. Infertilidad y obesidad

La obesidad constituye actualmente uno de los principales desafíos de salud pública a nivel mundial, afectando a más de un tercio de la población global⁶¹. En las últimas décadas, su prevalencia ha aumentado de manera sostenida también en hombres en edad reproductiva, alcanzando cifras estimadas entre el 15 y el 30%, lo que ha generado un creciente interés por comprender sus implicancias sobre la salud reproductiva masculina^{88,89}. Diversas investigaciones indican que la obesidad se asocia con un impacto negativo sobre la fertilidad del varón a través de mecanismos hormonales, metabólicos, inflamatorios y psicosociales que alteran la función testicular y la calidad espermática. Asimismo, numerosos estudios epidemiológicos han descrito una asociación positiva entre el incremento del índice de masa corporal (IMC) y la subfertilidad, reforzando el concepto del exceso de adiposidad como un factor relevante y potencialmente modificable en la capacidad reproductiva masculina⁹⁰.

Entre los mecanismos fisiopatológicos involucrados, uno de los efectos endocrinos mejor caracterizados es el hipogonadismo secundario asociado al aumento del tejido adiposo. Se ha observado una relación inversa entre el IMC y los niveles séricos de testosterona, atribuida en parte a alteraciones del eje hipotálamo–hipófisis–gonadal y al aumento de la aromatización periférica de andrógenos a estrógenos. Estas alteraciones hormonales contribuyen a la disminución de la testosterona circulante y a cambios en la relación testosterona/estradiol, afectando de manera directa la espermatogénesis y la función testicular^{61,88,90}. Estudios clínicos han demostrado que el incremento del IMC se correlaciona con alteraciones en parámetros seminales convencionales, incluyendo menor volumen eyaculatorio, reducción en la concentración espermática y alteraciones morfológicas⁹⁰.

En relación con la calidad seminal, diversas investigaciones han reportado asociaciones entre obesidad y disminución de la concentración, motilidad y recuento total de espermatozoides. A nivel molecular, se ha descrito que los hombres obesos presentan mayores índices de fragmentación del ADN espermático y alteraciones en la función mitocondrial, hallazgos que sugieren un deterioro de la integridad genómica del gameto

masculino mediado por estrés oxidativo y procesos inflamatorios crónicos de bajo grado^{61,90,91}. Estos mecanismos podrían comprometer no solo la fertilidad natural, sino también los resultados reproductivos en contextos de medicina reproductiva asistida.

Adicionalmente, la evidencia emergente sugiere que la obesidad paterna podría tener consecuencias más allá del individuo, influyendo en la salud metabólica de la descendencia independientemente del IMC materno. Estudios experimentales y clínicos han señalado que los espermatozoides de hombres obesos presentan perfiles epigenéticos diferenciales en comparación con individuos normopeso, lo que plantea la posibilidad de mecanismos de herencia epigenética mediada por el gameto masculino⁹².

Aunque algunos estudios no han identificado un efecto adverso claro de la obesidad masculina sobre los resultados de técnicas de reproducción asistida, la evidencia epidemiológica global continúa señalando una asociación consistente entre el aumento del IMC, la subfertilidad y un mayor tiempo hasta lograr el embarazo en parejas donde el varón presenta exceso de peso^{91,93}.

1.3. Diagnóstico

1.3.1. Espermograma

En la actualidad, el análisis del semen o espermograma constituye la herramienta básica para la evaluación de la fertilidad masculina. Este estudio comprende un examen macroscópico en el que se analizan parámetros como el color, el volumen, la viscosidad y el pH del semen, y un examen microscópico, que permite determinar la concentración, la motilidad, la viabilidad y la morfología de los espermatozoides³⁵.

El espermograma 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 fertilidad⁹⁴. Sin embargo, a pesar de que el análisis del semen constituye una prueba muy informativa, no invasiva y de bajo costo para el paciente, tiene limitaciones para predecir la fertilidad masculina. En primer lugar, el criterio de normalidad de los parámetros seminales varía de acuerdo con qué edición del manual

de laboratorio de la organización mundial de la salud (OMS) es empleada para la examinación y procesamiento del semen. Las primeras ediciones del Manual de la OMS establecieron límites de consenso para diferenciar entre hombres fértiles e infértiles. Sin embargo, en la quinta edición del manual (2010), se introdujo un cambio sustancial en la interpretación de los resultados del análisis seminal. En lugar de definir valores de corte basados en consenso clínico, se adoptó un enfoque basado en una población de referencia compuesta por hombres que habían logrado una concepción natural en un tiempo ≤ 12 meses. A partir de esta cohorte, se propusieron como límites inferiores de referencia los valores correspondientes al percentil 5 de los parámetros seminales³⁵. Esta modificación metodológica provocó una reclasificación diagnóstica de muchas parejas infértiles hacia categorías normozoospermia o alteraciones leves. En la sexta edición del Manual (2021), la población de referencia se amplió a 3.589 hombres fértiles provenientes de 12 países distribuidos en cinco continentes. Esta actualización incorporó datos de Asia y África con el objetivo de aumentar la diversidad geográfica⁹⁵. No obstante, persiste una subrepresentación de ciertas regiones, particularmente Latinoamérica, que cuenta solo con contribuciones marginales de América del Norte. La ausencia de muestras latinoamericanas significativas podría ignorar variaciones locales asociadas a factores como altitud, composición étnica o exposición a contaminantes ambientales⁹⁵, lo que potencialmente sesga la aplicabilidad de los valores de referencia en poblaciones específicas, como la argentina.

Un análisis seminal dentro de los rangos considerados normales no garantiza el potencial fértil masculino. Si bien los valores correspondientes al percentil 5 de los principales parámetros seminales se consideran útiles como límites inferiores de referencia, resultan insuficientes para establecer por sí solos un diagnóstico de infertilidad⁹⁵. Asimismo, diversos estudios han evidenciado un marcado solapamiento entre los valores de los parámetros seminales en hombres fértiles e infértiles, lo que limita su capacidad discriminativa⁹⁶.

Este solapamiento se explica, en parte, por la marcada variabilidad biológica de las muestras seminales, incluso aquellas procedentes del mismo individuo tomadas con

pocos días de diferencia. Factores fisiológicos, patológicos y ambientales contribuyen a esta variabilidad intra e interindividual, generando fluctuaciones en la concentración, motilidad y morfología espermática⁷¹.

Aunque la evaluación de los parámetros convencionales del semen resulta útil en casos evidentes de infertilidad masculina asociados a causas etiológicas específicas, ningún parámetro aislado ni la combinación de ellos posee un alto valor predictivo del estado fértil en la población general⁹⁷.

El análisis seminal convencional no está diseñado para evaluar aspectos funcionales o moleculares más complejos del espermatozoide, más allá de parámetros básicos como la concentración, la motilidad y la morfología. Sin embargo, el logro de una fertilidad exitosa no solo depende de que el espermatozoide alcance al ovocito, sino también de que pueda transmitir un material genético íntegro, libre de daño, y capaz de sostener un desarrollo embrionario normal. Asimismo, procesos fundamentales para la fecundación —como la interacción con el moco cervical, el transporte a través del tracto reproductor femenino y la unión e interacción con el ovocito— no son evaluados mediante el espermograma convencional. Estas etapas requieren pruebas funcionales más específicas, generalmente indicadas en pacientes que presentan dificultad para concebir y necesitan una evaluación más exhaustiva⁷¹. No obstante, estas pruebas resultan poco precisas y ambiguas dando resultados normales o no concluyentes, lo que conlleva al diagnóstico de IMI⁷¹. 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.

1.3.2. Evaluación del grado de fragmentación del ADN espermático

La prueba de fragmentación del ADN espermático (SDF, por sus siglas en inglés) constituye el estudio complementario al espermograma más utilizado en la práctica clínica, ya que aporta información adicional sobre la integridad genómica del gameto masculino, un aspecto que no puede ser evaluado mediante los parámetros seminales convencionales⁹⁸. Numerosos estudios indican que la medición de SDF permite una

caracterización adicional de la infertilidad por factor masculino, dado que los espermatozoides maduros carecen de la capacidad de reparar su propio ADN dañado y dependen exclusivamente de la maquinaria de reparación del ovocito tras la fecundación⁹⁸⁻¹⁰⁰.

La integridad del genoma paterno es vital para la fertilización y la formación de la descendencia. Después de la fertilización, el ADN espermático comienza a transcribirse activamente en la etapa de 4 células, contribuyendo al 50% del genoma embrionario. Por lo tanto, la integridad del ADN espermático en los espermatozoides eyaculados es un factor imprescindible para la fertilización exitosa, el desarrollo embrionario, la implantación y el embarazo¹⁰¹.

La fragmentación del ADN espermático definida como roturas de simple o doble cadena, es una de las causas de infertilidad masculina¹⁰². La etiología de SDF es multifactorial, puede ser causada por una variedad de factores como infección, varicocele, exposición a toxinas ambientales, quimioterapia, radioterapia, tabaquismo, consumo de drogas o edad avanzada^{103,104}. Además, el reemplazo de histonas y el reordenamiento de la cromatina están relacionados con la presencia de cortes de ADN¹⁰⁵. Otras causas de SDF pueden ser la apoptosis defectuosa de gametos dañados, la disminución de los antioxidantes seminales y la producción excesiva de especies reactivas de oxígeno¹⁰⁶.

Una revisión sistemática evidenció que el daño del ADN espermático se asocia significativamente con menores tasas de embarazo tanto en concepción natural como en inseminación intrauterina (IIU) y fertilización in vitro (FIV), así como con un mayor riesgo de pérdida gestacional en parejas sometidas a FIV o inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI)¹⁰⁷. En este sentido, diversos estudios clínicos han señalado que niveles de fragmentación superiores al 30% se vinculan con una menor probabilidad de lograr y mantener un embarazo a término, observándose además una disminución en las tasas de fecundación, deterioro de la calidad embrionaria y aumento de abortos espontáneos¹⁰². Sin embargo, la presencia de bajos niveles de fragmentación del ADN espermático no garantiza por sí sola una función reproductiva masculina normal, lo que

pone de manifiesto que la SDF constituye un marcador relevante, aunque no excluyente, dentro de la compleja red de factores que determinan el éxito reproductivo¹⁰⁶.

1.4. Estrategias terapéuticas

El desarrollo de las técnicas de reproducción asistida (TRA) permitió que muchas parejas con un amplio abanico de tipos de infertilidad puedan lograr el embarazo. 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 femenino para que ocurra la fecundación, mientras que las técnicas de alta complejidad involucran procedimientos que extraen los ovocitos del ovario, los combinan con los espermatozoides fuera del cuerpo, y luego colocan ovocitos fecundados (embriones) en el lugar apropiado en el tracto reproductor femenino para que tenga lugar el desarrollo. Entre los procedimientos de alta complejidad se encuentran:

Fecundación in vitro (FIV): La fecundación in vitro asegura la unión de los gametos fuera del aparato genital femenino. El proceso de la FIV consiste en la estimulación exógena de los ovarios mediante gonadotrofinas y la extracción de los óvulos mediante un procedimiento quirúrgico mínimamente invasivo (aspiración folicular eco-guiada)¹⁰⁸. Los ovocitos, rodeados por el complejo cumulus-corona, se colocan junto a una concentración normal de espermatozoides en un medio de cultivo 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 moderadas¹⁰⁹.

Inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI): Es una técnica de inseminación asistida mediante micromanipulación, en la cual se inyecta un solo espermatozoide en el interior del citoplasma de cada ovocito maduro. A diferencia de la FIV, el ovocito debe ser liberado del cúmulo oóforo y de la corona radiata antes de la manipulación (denudación). Durante el procedimiento se introduce un espermatozoide

seleccionado dentro del citoplasma del ovocito desnudo¹⁰⁹. Esta técnica es altamente eficiente con una tasa de fecundación entre el 70 y 80%¹¹⁰. 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 idiopática, 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-embiones evolucionan correctamente y algunos derivan en embriones de muy mala calidad con muy pocas posibilidades de implantación⁷¹.

Actualmente, la tecnología de reproducción asistida (TRA) se utiliza ampliamente para tratar la infertilidad humana, pero solo alrededor del 30% de los ciclos de FIV e ICSI dan como resultado un embarazo¹¹¹. Aunque este porcentaje aumenta con óvulos donados, no supera el 50%¹¹², lo que evidencia que el éxito reproductivo no depende solo de la capacidad del espermatozoide para penetrar el ovocito, sino también de su competencia funcional.

1.5. Biomarcadores de infertilidad masculina

Se considera un biomarcador a cualquier molécula biológica sensible de ser cuantificada objetivamente en el laboratorio y que funcione como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patogénicos o respuestas a una exposición o intervención terapéutica. La identificación de nuevos biomarcadores es un proceso laborioso y exigente. Teniendo en cuenta que un biomarcador puede ser un gen, una proteína, un ARN o un metabolito, las posibilidades son casi infinitas^{55,113}.

En el contexto de la infertilidad masculina, un buen biomarcador debería ser capaz de evaluar de manera precisa y mínimamente invasiva, la capacidad reproductiva masculina. Actualmente, el biomarcador más utilizado es el análisis de semen aunque, como ya se ha mencionado anteriormente, este estudio presenta ciertas limitaciones en cuanto a su eficacia diagnóstica.

El desarrollo de las tecnologías ómicas ha permitido realizar un abordaje global del problema de la infertilidad. A partir de estudios genómicos, proteómicos, metabolómicos y transcriptómicos en muestras de tejido testicular y espermatozoides, se han recopilado grandes cantidades de datos sobre posibles nuevos biomarcadores de la fertilidad masculina, aunque hasta la fecha no se ha logrado desarrollar nuevas herramientas fácilmente extrapolables a la clínica en este campo⁵⁵.

1.5.1. El plasma seminal como fuente de biomarcadores

El plasma seminal se ha utilizado durante mucho tiempo como una fuente clave para investigar la infertilidad masculina¹¹⁴ debido a que es el encargado de proporcionar un ambiente bioquímico a los espermatozoides para su nutrición, maduración, metabolismo, capacitación, protección y supervivencia^{50,115}. Su compleja composición ha sido y sigue siendo extensamente estudiada con el objeto de identificar posibles nuevos biomarcadores de infertilidad^{50,55}. La limitada utilidad de los biomarcadores utilizados históricamente para identificar la etiología subyacente de la infertilidad masculina ha impulsado la búsqueda de marcadores más fáciles de emplear, más rentables y con mayor capacidad predictiva de los resultados reproductivos¹¹⁶.

Diversos estudios proteómicos han permitido identificar distintas proteínas potencialmente asociadas con infertilidad masculina entre las que se destacan el antígeno prostático específico (PSA), fosfatasa ácida, semenogelina, albúmina, lactoferrina, la proteína secretora epididimaria E1, A4L, transferrina y el precursor de la ubiquitina, γ -glutamyltranspeptidasa^{55,115,117–120}. Desafortunadamente, el análisis proteómico del semen es complejo dadas las variaciones entre y dentro de los individuos, así como las fluctuaciones debidas a diversos factores como la edad, índice de masa corporal, entre otros. Además, ha sido difícil encontrar proteínas y péptidos en los espermatozoides y el semen que estén alterados de manera reproducible en varios fenotipos de infertilidad¹¹⁶. Todos estos aspectos hacen que la identificación de un conjunto común de proteínas sea un desafío^{55,116}.

El plasma seminal también proporciona vasta información respecto del metabolismo de los órganos reproductivos, y estos datos podrían tener un gran potencial en el diagnóstico de la infertilidad. Se ha reportado que el metaboloma del plasma seminal de los pacientes infértiles difiere significativamente respecto al de hombres fértiles¹¹⁴. La escasa bibliografía disponible propone diversos metabolitos potencialmente capaces de discriminar distintas patologías reproductivas masculinas entre los que se destacan fosfocolina, citrato, lactato y glicerilfosforilcolina, fructosa y varios aminoácidos^{55,114,121}.

Los estudios orientados a evaluar el potencial empleo de la cuantificación de metabolitos en plasma seminal como marcadores de fertilidad masculina se encuentran aún en una etapa inicial⁵⁵. No obstante, el perfil metabolómico del eyaculado constituye un campo en rápida expansión y muestra un prometedor potencial para el desarrollo de biomarcadores específicos asociados a distintos fenotipos de infertilidad¹¹⁶. Si bien se han alcanzado avances significativos en la caracterización metodológica del metabolismo espermático humano, su traslación a la práctica clínica requiere esfuerzos coordinados dirigidos a la validación clínica, la estandarización de los procedimientos y la integración de estos datos en esquemas diagnósticos^{116,121}.

Por último, estudios de transcriptómica han permitido demostrar que el plasma seminal alberga una amplia gama de ARNs^{122,123}, los cuales se pueden encontrar libres, contenidos en microvesículas llamadas exosomas o formando complejos con proteínas y/o lípidos. Dichos estudios han permitido la identificación de ARNm y ARNs pequeños con niveles alterados en distintas patologías reproductivas masculinas^{124,125}.

1.5.1.1. ARN pequeños seminales como potenciales biomarcadores de Infertilidad masculina

Una característica particularmente atractiva de los ARNs pequeños en cuanto a su posible utilización como biomarcadores es su estabilidad a la degradación química y enzimática. Una manifestación adicional de la estabilidad de estas moléculas, así como su potencial utilidad clínica, es su presencia en fluidos biológicos extracelulares incluyendo plasma, suero, lágrimas, orina, líquido cefalorraquídeo, plasma seminal,

leche materna y saliva^{122,123}. De hecho, durante los últimos años ha habido un gran interés en el desarrollo de técnicas que empleen ARNs pequeños como biomarcadores no invasivos en biopsias líquidas¹²⁶.

Los ARNs pequeños son un tipo de ARN no codificante de entre 20 y 30 nucleótidos de longitud. En el interior de las células, estas moléculas juegan un papel importante en la regulación de la expresión génica, en general interfiriendo con la traducción del ARN mensajero a través de interacciones ARN-ARN^{55,127}. Se desconoce aún la función que cumplen los ARNs pequeños en los fluidos extracelulares pero diversas evidencias sugieren que podrían ejercer un rol relevante en la comunicación intercelular¹²⁸.

Existen distintos tipos de ARN pequeños, siendo las clases más abundantes en fluidos extracelulares los YARN, los fragmentos derivados de ARNt (tRFs), ARN ribosómicos (rARN), microARNs (miARN) y ARNs asociados a PIWI (piARNs)^{122,123,129}.

Específicamente en plasma seminal, Hu y colaboradores demostraron que los piARNs son los ARNs pequeños más abundantes en individuos normozoospermicos y que los mismos se encuentran ausentes en pacientes vasectomizados¹³⁰. 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, fragmentos derivados de ARNt y YARNs¹²⁸.

Los primeros estudios orientados a identificar biomarcadores de ARN pequeños en plasma seminal se centraron principalmente en miARNs. Estos trabajos se enfocaron en el análisis de perfiles globales mediante secuenciación masiva o microarreglos para comparar muestras de pacientes infértiles con controles fértiles⁵⁵. Las cohortes analizadas incluyeron distintos tipos de infertilidad masculina, desde alteraciones moderadas como la oligospermia y astenozoospermia hasta cuadros más severos como la azoospermia. En estos trabajos se identificaron miARNs potencialmente asociados a las patologías en estudio entre los que se destacan miR-34, let-7-a, miR-181, miR-30 y miR-509.

En la última década, los tRFs han adquirido especial protagonismo en el ámbito de la biología reproductiva debido a su notable abundancia en semen. Estudios en mamíferos han demostrado que los tRFs se encuentran enriquecidos en el plasma seminal y diversas evidencias sugieren que estas moléculas podrían actuar sobre la progenie como reguladores epigenéticos^{17,131}.

En este contexto, modelos experimentales en ratón han demostrado que la dieta paterna puede modificar el perfil de tRFs en el esperma, alterando consecuentemente el metabolismo de la descendencia. Estos hallazgos posicionan a los tRFs como mediadores potenciales de herencia epigenética paterna, capaces de transmitir información ambiental adquirida hacia la siguiente generación¹⁷.

Además de su relevancia biológica, diversos estudios han explorado el potencial de los tRFs como biomarcadores en infertilidad masculina. Se ha reportado que determinados tRFs presentes en plasma seminal podrían predecir resultados clínicos en pacientes con distintos fenotipos de infertilidad masculina. En particular, Han et al. describieron que tRF-Val-AAC-010 posee potencial como biomarcador no invasivo para estimar la probabilidad de recuperación espermática en pacientes con azoospermia no obstructiva¹³². Asimismo, Hekim et al. reportaron que 5'tRF-Glu-CTC podría desempeñar un papel en la fisiopatología de la oligozoospermia y constituir un candidato prometedor como marcador molecular¹³³.

1.5.1.1.1. miARN

Los miARNs son moléculas pequeñas de entre 20 y 24 nucleótidos. Participan en la regulación de la expresión génica en una amplia gama de organismos a través del clivaje o represión traduccional de sus ARNm blancos¹³⁴. 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 regulatorio¹³⁵.

El mecanismo de biogénesis de los miARNs es un proceso complejo. Los miARNs son sintetizados en el núcleo como un largo precursor denominado microARN primario (pri-microARN). Este precursor es degradado por el microprocesador, este complejo se encuentra formado por la ribonucleasa DROSHA y una subunidad proteica de especificidad denominada DGCR8. El resultado del corte de DROSHA es una molécula de ARN de entre 70 y 100 nucleótidos denominada precursor del microARN (pre-microARN), el cual posee una estructura compleja de tallo y burbuja. El pre-microARN es posteriormente exportado del núcleo al citoplasma donde es procesado por DICER hasta adquirir la estructura del miARN maduro¹³⁶.

El miARN maduro se asocia con un complejo del tipo RiSC (del inglés, RNAi Silencing Complex) compuesto por varias proteínas, incluida AGO. Este complejo reconoce secuencias parcialmente complementarias en la región 3' no codificante (3'-UTR) de los ARNm diana, principalmente a través de la denominada región semilla (nucleótidos 2–8 del miARN), que es clave para el reconocimiento de los sitios diana. La interacción miARN-ARNm en mamíferos suele basarse en complementariedad imperfecta, lo que conduce mayoritariamente a una represión de la traducción o a la promoción de la degradación del ARNm. Dado que un único miARN puede dirigirse a múltiples transcritos y, a su vez, un ARNm puede ser regulado por diversos miARNs, el efecto de estos pequeños ARN en la regulación de redes génicas es extenso y complejo, constituyendo una parte fundamental en el control de la expresión génica^{137,138}.

1.5.1.1.2. piARN

Los ARNs que interactúan con las proteínas PIWI (piARNs) constituyen una clase de ARN pequeño no codificantes que posee una longitud de 24-31 nucleótidos (nt)¹³⁹. Los piARNs se encuentran predominantemente en los testículos de mamíferos y se expresan activamente en los espermatoцитos y espermátidas en paquiteno¹⁴⁰.

Los piARNs se unen a las proteínas piwi para formar un complejo piARN / PIWI. La principal función reportada de los piARNs es proteger la integridad del genoma paterno y las células somáticas gonadales contra la expresión de elementos transponibles¹²⁵, lo

que influye en la espermatogénesis, el reordenamiento del genoma, la regulación epigenética, la regulación de proteínas y el mantenimiento de células madre germinales¹³⁹.

Los piARNs desempeñan funciones importantes y directas en la espermatogénesis^{125,139} por lo que deleciones en los genes implicados en la biogénesis de los piARNs o su expresión desregulada a menudo conducen a la infertilidad masculina^{125,141}.

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 humano¹⁴².

1.5.1.1.3. Fragmentos derivados de ARNt

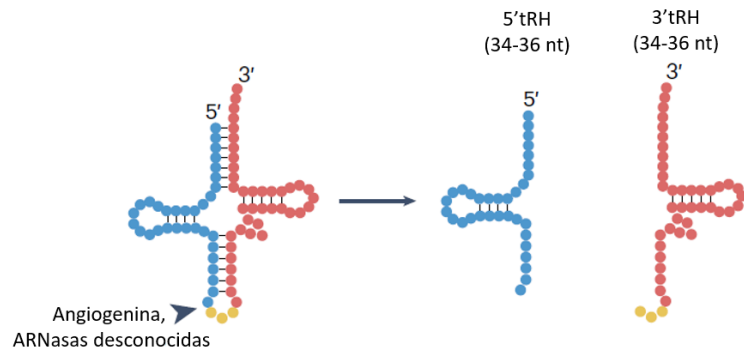
Los tRFs, también conocidos como ARN derivados de ARNt (tdRs) o ARN pequeños derivados de ARNt (tsARNs), se generan a partir de la escisión específica en determinados sitios del ARNt. Aunque no hay un consenso en cuanto a su nomenclatura, generalmente se nombran de acuerdo a su origen y se distinguen los siguientes subtipos: las mitades 5' y 3' (5'-tRH y 3'-tRH), también referidas en la literatura como ARN inducidos por estrés derivados del ARNt (tiARN), los fragmentos 5' y 3' derivados de ARNt (5'-tRF y 3'-tRF), y los fragmentos internos (i-tRF). Estas subclases se distinguen además por su extensión nucleotídica. En este sentido, los 5'tRF se clasifican en 5'-tRF-a (14–16 nt), 5'tRF-b (22–24 nt) y 5'-tRF-c (27–30 nt), mientras que los 3'-tRF comprenden al menos dos variantes predominantes, 3'-tRF-a (≈18 nt) y 3'-tRF-b (≈22 nt) (Figura 2)^{131,143}.

Diversos estudios han demostrado que los fragmentos derivados de ARNt estarían involucrados en una variedad de procesos celulares incluidos la regulación de la expresión génica, apoptosis, modulación de la respuesta al daño al ADN, formación de gránulos de estrés, represión de la traducción, entre otros^{144–146}.

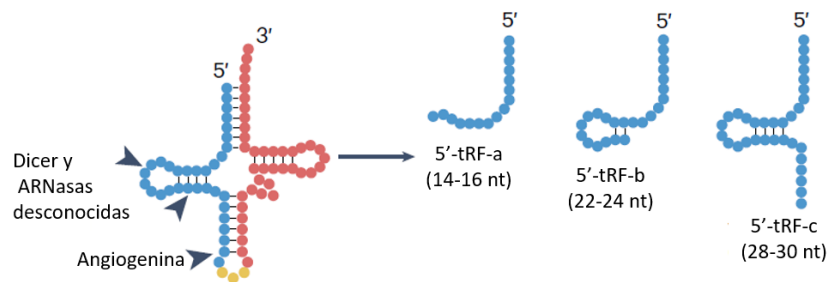
Estas moléculas no constituyen simples productos de degradación del ARN de transferencia (ARNt), sino que se generan mediante escisiones específicas mediadas por ribonucleasas entre las que se destaca la angiogenina¹³¹.

La angiogenina pertenece a la superfamilia RNasa A y se localiza predominantemente en el núcleo en condiciones fisiológicas basales, donde permanece inactiva debido a su asociación con su inhibidor RNH1. Sin embargo, frente a distintos estímulos de estrés celular, la angiogenina se disocia de RNH1, lo que conduce a su activación y a la escisión citoplasmática del ARNt en el bucle del anticodón^{131,145,147}. Asimismo, se ha descrito que, en condiciones experimentales in vitro, puede escindir en el bucle TΨC, originando fragmentos 3' más cortos (3'-tRF). Cabe destacar que la actividad de la angiogenina puede verse modulada por modificaciones postranscripcionales del ARNt lo que sugiere un mecanismo adicional de regulación en la biogénesis de estos fragmentos¹³¹.

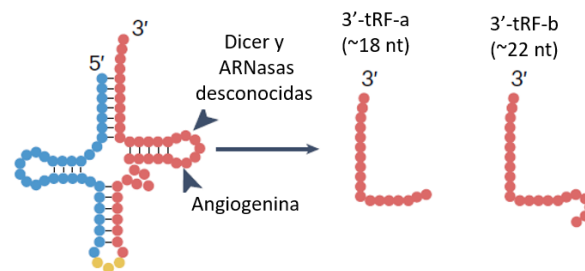
Mitades de ARNt



5'-tRF



3'-tRF



i-tRF

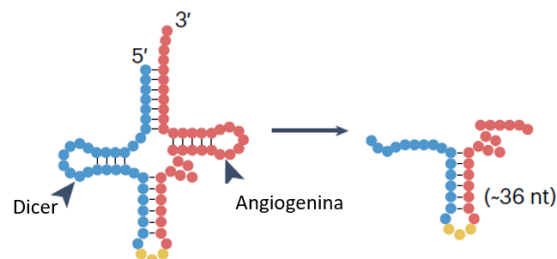


Figura 2. Biogénesis y clasificación de los fragmentos derivados del ARNt. Imagen adaptada y traducida, extraída de Muthukumar et al. Roles and regulation of tRNA-derived small RNAs in animals. Nature Reviews Molecular Cell Biology volume 25, pages359–378 (2024). <https://doi.org/10.1038/s41580-023-00690-z>

2. Objetivo

A pesar de los avances en medicina reproductiva, la capacidad de predecir el resultado de procedimientos de reproducción asistida continúa siendo limitada, particularmente en hombres normozoospermicos en quienes los parámetros seminales convencionales no permiten explicar el fracaso reproductivo. En este contexto, el plasma seminal ha emergido como una fuente promisorio de biomarcadores moleculares, y diversos estudios han descrito la presencia abundante de ARN pequeños, incluyendo fragmentos derivados de ARNt, sin embargo, su utilidad pronóstica en modelos clínicos controlados permanecen insuficientemente exploradas. Sobre la base de estos antecedentes, se plantea la hipótesis de que determinados fragmentos derivados de ARNt presentes en plasma seminal podrían constituir biomarcadores pronósticos con potencial relevancia biológica en el microambiente reproductivo.

En función de lo expuesto, el **objetivo general** de la presente tesis se centra en evaluar el valor pronóstico de fragmentos derivados de ARNt en plasma seminal de hombres normozoospermicos sometidos a ICSI con ovodonación, e investigar su posible relación con mecanismos inmunoendocrinos asociados al éxito reproductivo.

Para ello se llevaron los siguientes **objetivos específicos**:

- Caracterizar clínica y seminalmente una cohorte de hombres normozoospermicos sometidos a ICSI con ovodonación, estableciendo un modelo que permita aislar el factor masculino y extrapolar los hallazgos al estudio de la infertilidad masculina idiopática.
- Identificar fragmentos derivados de ARNt abundantes en plasma seminal mediante revisión bibliográfica y análisis bioinformáticos, y validar experimentalmente su presencia en plasma seminal y espermatozoides.
- Cuantificar los sARNs seleccionados y la enzima angiogenina —posible responsable de su biogénesis— mediante técnicas moleculares complementarias (qPCR, ddPCR y Western blot), evaluando su desempeño

analítico y su asociación con el resultado del procedimiento de ICSI en el modelo de estudio.

- Contextualizar funcionalmente los hallazgos clínicos mediante estudios exploratorios in vitro orientados a evaluar la regulación de la producción de fragmentos derivados de ARNt por macrófagos y la posible influencia del microambiente seminal en dicha modulación.

3. Materiales y métodos

3.1. Grupo de estudio

Los pacientes incorporados en este estudio fueron seleccionados por la Dra. Karina Calvo de entre aquellos individuos que se encontraban realizando tratamientos de reproducción asistida en el Centro Médico PROAR durante el periodo 2015-2022.

Se incorporaron 88 voluntarios con parámetros espermáticos superiores al quinto percentil según el manual de la Organización Mundial de la Salud 2010³⁵ (individuos normozoospermicos), sin ninguna enfermedad relevante o terapia concomitante, que se sometieron a tratamientos de ICSI utilizando óvulos de donantes. Por su parte, todas las receptoras tenían menos de 50 años y ausencia de antecedentes de endometriosis. Las donantes de ovocitos fueron mujeres de fertilidad conocida y buena respuesta ovárica.

A estos pacientes se les solicitó hacer uso del remanente de la muestra remitida en el marco de su tratamiento de reproducción asistida.

El seguimiento de estos pacientes fue realizado por médicos especialistas de dicha institución, quienes registraron los datos de las historias clínicas, realizaron exámenes físicos 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 trabajo contó con la aprobación del Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNR (expediente n° 44487/0004).

Estos pacientes fueron clasificados prospectivamente en dos grupos de acuerdo con los resultados del procedimiento de reproducción asistida:

ICSI (+): Grupo control constituido por individuos que lograron el embarazo clínico mediante ICSI (n= 40).

ICSI (-): Grupo constituido por individuos que no lograron el embarazo clínico mediante ICSI (n= 36). Dentro de este grupo se distinguió un subgrupo:

≥2 Fallas: Pacientes que realizaron dos o más procedimientos de ICSI con resultados negativos (n= 16).

Se excluyeron 12 de los individuos por no realizar el procedimiento de ICSI antes del 1 de marzo del 2025, por lo que la corte quedó finalmente conformada por 76 pacientes.

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), grupo y factor sanguíneo, raza y resultados de los procedimientos de ICSI fueron extraídas 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 con las normas del Manual de la Organización Mundial de la Salud³⁵. 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 Estambul¹⁴⁸. Se consideró embarazo a la presencia de saco gestacional mediante ecografía en la 6ta 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 minutos a 1.500 g para la separación en plasma seminal y espermatozoides. Las muestras fueron preservadas en nitrógeno líquido hasta su traslado a un freezer de -70 °C.

3.3. Estudios de fragmentación del ADN espermático

Se utilizó el kit comercial Halosperm[®] (Halotech ADN, SL, Madrid, España) para evaluar el nivel de fragmentación de ADN espermático, el cual está basado en el test de dispersión de la cromatina espermática. Las muestras de semen se diluyeron con solución fisiológica a una concentración de espermatozoides de $7-8 \times 10^6$ células/mL, y se siguieron las instrucciones del fabricante. Las muestras fueron visualizadas al microscopio óptico, se cuantificaron y clasificaron los espermatozoides como se indica en la Figura 3. Por último, se calcularon los porcentajes de espermatozoides con ADN fragmentado.



Figura 3. Fragmentación de los espermatozoides. Imagen traducida, extraída de Fernández et al. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. Fertil Steril. 2005;84(4):833-842. doi:10.1016/j.fertnstert.2004.11.089

3.4. Cuantificación hormonal en plasma seminal

Se utilizaron kits comerciales de ELISA, DRG Instruments GmbH, Marburg, Alemania, para la determinación cuantitativa de Cortisol (#EIA1887R), DHEA-s (#EIA-1562) y Testosterona (#EIA1559) en PS. En todos los casos se siguieron las instrucciones del fabricante. Las lecturas de absorbancia a 450nm se registraron con un lector de microplacas Epoch (BioTek).

3.5. Selección de biomarcadores

3.5.1. Revisión literaria y análisis bioinformáticos

Con el objetivo de seleccionar candidatos para el análisis exploratorio inicial, se realizó una revisión sistemática de la literatura disponible en PubMed hasta 2019, enfocada en estudios que analizaran la presencia de ARNs pequeños (sARNs) en plasma seminal mediante técnicas de secuenciación masiva o microarray. La selección de los candidatos se basó en tres criterios: 1) Que los sARNs se encontraran en elevada abundancia en el fluido seminal, 2) que los estudios reportaran asociaciones entre estos sARNs y alteraciones reproductivas masculinas, y 3) que los resultados estuvieran descritos en al menos dos estudios independientes.

Para evaluar la posibilidad de que los sARNs seminales anotados como piARN correspondan a otras especies de ARN pequeño no codificante, se realizaron alineamientos BLAST con la colección NCBI de secuencias de nucleótidos no redundantes de humanos. Para aquellas secuencias que mostraron alta similitud con transcripciones de ARNt, también se empleó una base de datos específica para fragmentos derivados de ARNt (MINTbase, <https://cm.jefferson.edu/MINTbase/>).

3.5.2. Análisis bioinformáticos de RNAseq

Los datos de sRNA-seq de muestras de PS se obtuvieron del Atlas de ARN de biofluidos humanos de Hulstaert et al¹²². Los archivos FASTQ correspondientes al conjunto de datos se descargaron del Archivo Europeo de Genomas y Fenomas (EGA—EGAS00001003917) con el permiso de los autores correspondientes. Los archivos fueron sujetos a controles de calidad siguiendo procedimientos estándar. Brevemente, los adaptadores de secuenciación se recortaron utilizando cutadapt, los contaminantes conocidos se filtraron utilizando la base de datos UNIVEC y se utilizó FASTQC 0.11.9¹⁴⁹ para el control de calidad. Luego, las secuencias se asignaron realizando una serie de alineaciones. Primero, se utilizó bowtie2 2.4.4¹⁵⁰ para alinear todas las secuencias con secuencias de referencia curadas para ARNt (gtRNAdb¹⁵¹), ARNr (rFAM¹⁵² , RNACentral),

miARN (mirBASE¹⁵³) y YARN. Las secuencias restantes se alinearon con el genoma humano de referencia (GRCh38) utilizando HISAT2 2.2.1¹⁵⁴. Todas las estadísticas y visualizaciones relacionadas con los datos de sRNA-seq se construyeron analizando los resultados en Pandas y visualizando con Plotly.

3.6. Cultivo celular

Para los estudios in vitro se empleó la línea premonocítica humana THP-1, derivada de leucemia monocítica aguda. Las células se cultivaron en suspensión en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) y 100 U/ml de penicilina-estreptomicina (Medio de cultivo completo, MCC), manteniéndose a 37 °C con 5% de CO₂. Para inducir la diferenciación a macrófagos, las células se sembraron en placas de 12 pocillos a una densidad de 1×10^6 células por pocillo en medio completo conteniendo 10 ng/ml de forbol-12-miristato-13-acetato (PMA, Sigma-Aldrich). Tras 24 hs de incubación, el medio fue reemplazado por MCC y las células se mantuvieron en recuperación durante 48 hs adicionales antes de la aplicación de los tratamientos experimentales.

Para evaluar el efecto de estímulos hormonales sobre la producción de tRF en macrófagos, las células THP-1 fueron tratadas con distintas concentraciones de dexametasona (Dex) o testosterona (T) en condiciones basales (M0) o en presencia de lipopolisacárido (LPS) para inducir un estado proinflamatorio (M1). Luego de 24 hs de incubación con los distintos estímulos, se recolectaron las células y sus respectivos sobrenadantes (SN) para los análisis posteriores.

Adicionalmente, las células THP-1 fueron incubadas durante 24 hs con un pool de plasma seminal humano diluido 1:100, empleado como medio condicionado, a fin de evaluar la respuesta macrofágica frente a factores del microambiente reproductivo. Luego, se recolectaron células y sobrenadantes para su posterior procesamiento.

3.6.1. Evaluación de la viabilidad celular mediante el uso de sales de tetrazolio (MTT)

La viabilidad celular fue evaluada mediante el ensayo colorimétrico de MTT, basado en la reducción metabólica de este compuesto por la enzima succinato deshidrogenasa, presente en la mitocondria. Las células viables producen la sal insoluble formazán, lo cual se evidencia a través de un cambio en su coloración. Las células fueron plaqueadas en placas de 96 pocillos, diferenciadas con PMA y expuestas a los distintos tratamientos a estudiar. Luego de 24 hs de tratamiento, se aspiró el medio y se agregó una solución de 500 ug/ml de MTT (solución madre de 5 mg/ml en agua) en medio de cultivo. Tras incubar 4 hs, los cristales de formazán formados se disolvieron en DMSO y se leyó la absorbancia a 570 nm en lector de microplacas (Bio Tek).

3.7. Cuantificación de citoquinas

Se determinaron los niveles de las citoquinas IL-1 β , IL-8, IL-6 e IL-10, en plasma seminal y en los sobrenadantes de cultivo mediante los kits comerciales BD OptEIA™ Human IL-8 ELISA Set (#555244), BD OptEIA™ Human IL-10 ELISA Set (#555157), BD OptEIA™ Human IL-6 ELISA Set (#555220) y BD OptEIA™ Human IL-1 β ELISA Set (#557953). En todos los casos se siguieron las indicaciones del fabricante. Las muestras se diluyeron en distintos factores en assay diluent (PBS 1X; SFB 10% v/v; Tween-20 0.05% v/v) para asegurar que se encontraran dentro del rango de la curva estándar. La lectura se llevó a cabo en un lector de microplacas (Bio Tek), registrando los valores de absorbancia a 450 nm, a los cuales se les sustrajeron los valores a 570 nm como corrección.

3.8. Extracción de ARN

3.8.1. Plasma Seminal

La extracción de ARN de plasma seminal se llevó a cabo incorporando modificaciones al protocolo estándar de extracción de ARN con TRI Reagent® (Molecular Research Center, MRC, Inc), como se describe a continuación: El PS se descongeló rápidamente en un

baño de agua a 37 °C, y se centrifugó a 12.000 g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego, se mezcló 0,2 ml de PS con 0,25 ml de buffer TRI Reagent® (0,15% NaCl, 1% SDS, 2,5 mM EDTA, 0,1 M Tris HCl pH= 8). A continuación, se agregó 9 mg de PEG 20 K para precipitar polisacáridos¹³⁰. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos, seguido por centrifugación a 12.000 g durante 10 minutos a 4 °C. La fase acuosa se mezcló con 0,8 ml de Trizol, 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 con agitación periódica y se centrifugó a 12.000 g por 20 minutos a 4 °C. A continuación, se transfirió aproximadamente 0,7 ml de la fase acuosa y se agregó igual volumen de una mezcla 1:1 Isopropanol frío: Solución salina (0,8 M citrato de sodio y 1,2 M NaCl) como solución precipitante. Seguidamente se incubó por 90 minutos a -20 °C. Luego, se centrifugó a 12.000 g por 15 minutos a 4 °C, se descartó el sobrenadante y se lavó dos veces el pellet de ARN con 1 ml de etanol 75%. Después, se dejó secar el pellet por 3 minutos y se disolvió en agua mili-Q®. Finalmente, se centrifugó a 12.000 g durante 10 minutos y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo.

3.8.2. Espermatozoides

Para la extracción de ARN en espermatozoides de los pacientes normozoospermicos analizados, se procedió de la siguiente manera: Sin descongelar las muestras se agregó a cada una 0,8 ml de Trizol, se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente y se añadió 0,22 ml de cloroformo. Luego se continuó de la misma manera que en el protocolo de extracción de ARN para plasma seminal.

3.8.3. Extractos Celulares

A los extractos celulares preservados en Trizol en el -70 °C se les agregó 200 µl de cloroformo, y se los centrifugó a 12.000 g a 4 °C durante 15 minutos. A continuación, se colectó la fase acuosa, y se agregó igual volumen de isopropanol frío y 1 µl glucógeno (Invitrogen). Se incubó una noche a -70 °C. Al día siguiente, se centrifugó cada muestra a 12.000 g a 4 °C durante 15 minutos, se removió el sobrenadante por inversión, y el

pellet se lavó dos veces con etanol al 75%, centrifugando a 12.000 g a 4 °C durante 5 minutos entre cada lavado. El pellet se resuspendió en 30 µl de agua mili-Q® y se guardó a -70 °C.

3.8.4. Sobrenadantes de cultivos

Para extraer el ARN de los sobrenadantes de cultivo, el mismo se descongeló en baño de agua a 37 °C, y se centrifugó a 12.000 g durante 10 minutos a 4 °C, se tomó 400 µl del sobrenadante y se le agregó 2 µl de spike-in control (C. elegans miR-39, 3,2x10⁸ copias, Qiagen). Seguidamente, se agregó 800 µl de Trizol y se continuó con el protocolo estándar descrito previamente para aislamiento de ARN a partir de extractos celulares.

3.9. Cuantificación de ácidos nucleicos

Se cuantificaron los ácidos nucleicos a partir de 2 µl de las soluciones de ARN obtenidas de las muestras de espermatozoides y extractos celulares. 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 A₂₆₀/A₂₈₀. Se empleó un lector Epoch (BioTek) equipado con placa de micro-volúmenes Take3™. Las muestras de PS y de SN de cultivo no fueron cuantificadas dado que en estudios previos se observó que los niveles de ARN presentes en dichas muestras se encontraban por debajo del límite de detección de esta técnica.

3.10. Northern blot

Las muestras de ARN se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizantes al 10% (urea-TBE) y posteriormente se transfirieron a membranas de nylon con carga positiva. En cada calle se sembró ARN purificado a partir de 200 µl de plasma seminal o 1 µg de ARN extraído a partir de SPZ. Las membranas se fijaron mediante *cross-linking* por radiación UV. Posteriormente, las membranas se hibridaron ON a 40 °C con sondas de ADN marcadas con digoxigenina (DIG) en solución DIG Easy Hyb (Tabla I). Tras la hibridación, se realizaron lavados de baja astringencia (dos lavados con 2 × SSC/0,1% SDS a temperatura ambiente) seguidos de un lavado de alta

astringencia (1 × SSC/0,1% SDS a 40 °C). Luego, las membranas se bloquearon durante 30 minutos a temperatura ambiente con reactivo de bloqueo y se incubaron durante 30 minutos con anticuerpo anti-digoxigenina conjugado a fosfatasa alcalina, seguido de lavados con 1 × TBS-T. La detección se realizó mediante quimioluminiscencia utilizando CDP-Star listo para usar y las señales se registraron con el sistema GE HealthCare Amersham Imager 600, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Tabla I. Sondas utilizadas para la técnica de Northern blot

Transcripto	Sonda
5'tRF-Gly	5'-CTACCACTGAACCACCAATGC-3
5'tRF-Lys	5'-CTGATGCTCTACCGACTGAGCTATCCGGGC-3
5'tRF-Glu	5'-TAACCACTAGACCACCAGGGA-3
5'tRF-Val	5'-TAACCACTACACTACGGAAAC-3

3.11. Tratamiento con DNAsa

Las muestras de ARN obtenidas de espermatozoides y extractos celulares fueron tratadas con DNAsa. Para ello se llevó a cabo una reacción que involucra 2 µg de ARN en 16 µl finales, 2 µl de buffer DNAsa y 1 µl de DNAsa PROMEGA 1U/ml. La reacción se llevó a cabo a 37 °C durante 30 minutos. A continuación, se agregó 1 µl de DNase stop Solution y se incubó a 65 °C durante 10 minutos para desactivar la enzima.

3.12. Cuantificación de ARN

Los niveles de los ARNs pequeños se determinaron a través de la técnica stem-loop RT-qPCR descrita por Chen y colaboradores¹⁵⁵. Primero, el oligo stem-loop RT se unió a una porción del extremo 3' de una molécula de ARN pequeño y luego se realizó una RT utilizando una transcriptasa reversa. A continuación, el producto de la RT se amplificó y cuantificó realizando una qPCR convencional.

Los niveles de ARNs mensajeros se determinaron a través de RT-qPCR en dos pasos: primero se realizó la transcripción inversa para sintetizar el ADN copia empleando oligo dT y luego la qPCR.

3.12.1. Retrotranscripción de las muestras

El ADN copia se sintetizó a partir de 8,5 µl de la solución de ARN en las muestras de PS y SN de cultivo, y 1 µg de ARN en las muestras de SPZ y líneas celulares, por la transcriptasa reversa M-MLV (Thermo). Se utilizaron oligo stem-loop (SLO) específicos para cada ARN pequeño (Tabla I) y el oligo dT para los ARNs mensajeros. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 20 µl. Brevemente, se mezcló 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 minutos. Luego, se sometió a un shock térmico en hielo por al menos 1 minuto y se adicionó una mezcla compuesta por: 1X First - Strand Buffer; 0.01M DTT; 2 U/µl de un inhibidor de RNasa, RNasaOUT; y 10 U/ µl de la enzima M-MLV. La mezcla resultante, se incubó a 16 °C durante 30 minutos para que tenga lugar la hibridación ARN-SLO, seguido por una incubación a 37 °C durante 50 minutos 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.

Tabla II. Oligos utilizados para la técnica de Stem-loop retrotranscripción de ARNs pequeños

Transcripto	Oligo Stem-loop
5'tRF-Gly	5'-GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCA GAGGAGACCGCGAGA -3'
5'tRF-Lys	5'-GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCA GAGGAGACCGTCTCA -3'
5'tRF-Glu	5'-GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCA GAGGAGACCGTGCCG -3'
5'tRF-Val	5'-GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGACGGCGAA-3'
3'tRF-Phe	5'-GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCA GAGGAGACCGGTGCC-3'
miR-320- a/b	5'-GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCA GAGGAGACTYGCCC-3'
let-7 b/c	5'-GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGACAACCAY-3'
let-7 a/d/e/f/g	5'-GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGACAAC TR T-3'

tRF: ARN pequeño derivados del ARNt. miR: microARN. Los nucleótidos en **negrita** son los que hibridan con el extremo 3' del ARN pequeño. 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.

3.12.2. Ensayos de qPCR

La amplificación por qPCR se realizó empleando la mezcla HOT FIREpol EvaGreen Plus (Solys Biodyne), en el sistema StepOne-Real Time PCR (Thermo Fisher Scientific). La mezcla incluye dNTPs, MgCl₂, el colorante EvaGreen, el colorante de referencia pasiva ROX y la ADN Polimerasa HOT FIREpol, que se activa mediante una incubación a 95 °C durante 15 minutos. Para la amplificación de los ARNs pequeños se emplearon oligos directos específicos para cada uno y oligo reverso universal en una concentración final 0,25 µM. Mientras que para la amplificación de ARNm se usó oligos directos y reversos específicos en una concentración final 0,5 µM. Para la cuantificación conjunta de todos los miembros de la familia let-7 se realizó una PCR multiplex, empleando una mezcla de oligonucleótidos directos que hibridan con las distintas isoformas del miARN. Se mezcló 0,5 µl de la primers mix con 5 µl de una dilución 1/20 de la solución de ADN copia obtenida, 2 µl de la mix Solis Biodine y se llevó a un volumen final de 10 µl con agua mili-Q®.

Para el análisis de los resultados de las muestras de pacientes se empleó el método de cuantificación relativa para lo cual se realizó, para cada determinación, una curva estándar a partir de diluciones seriadas del pool de muestra a analizar. La homogeneidad y especificidad de los productos de PCR obtenidos en cada muestra fueron confirmadas mediante análisis de curvas de “melting”. La qPCR constó de un paso inicial de calentamiento de 15 minutos a 95 °C, seguido por 40 ciclos, cada uno incluyendo 10 segundos a 95 °C (desnaturalización), 20 segundos a 60 °C (hibridación) y 20 segundos a 72 °C (elongación).

Los niveles de cada ARN pequeño en las muestras de PS de los distintos grupos de pacientes analizados fueron normalizados usando como control endógeno a miR-320. Este miARN fue seleccionado debido a que en estudios previos realizados tanto en el laboratorio como por Hu y colaboradores, se observó que sus niveles se mantienen estables entre los distintos grupos de pacientes¹³⁰. Para las muestras de espermatozoides y cultivos celulares los niveles de ARN pequeño fueron normalizados

usando la concentración inicial de ARN, ya que se observó una gran variabilidad en los niveles de U6, lo que impidió usarlo como control endógeno.

Tabla III. Oligos utilizados para la técnica de q-PCR de ARNs pequeños y ARNs mensajeros.

Transcripto	Oligo directo	Oligo reverso
5'tRF-Gly	5'-GGCGGAGCATTGGTGGTTCAGTGGTAGAAT -3'	5'-TGGTGCAGGGTCCGAGGTATT-3' (*)
5'tRF-Lys	5'-GGCGGGCCCCGGCTAGCTCAGTCGGTAGAGCA - 3'	5'-TGGTGCAGGGTCCGAGGTATT-3' (*)
5'tRF-Glu	5'-GGCGGTCCCTGGTGGTCTAGTGGTTAGGATT -3'	5'-TGGTGCAGGGTCCGAGGTATT-3' (*)
5'tRF-Val	5'-GGGTTTCCGTAGTGTAGTGGTTATCACG-3'	5'-TGGTGCAGGGTCCGAGGTATT-3' (*)
3'tRF-Phe	5'-GGCGGTCCCTGGTTCGATCCCGGGTTTC-3'	5'-TGGTGCAGGGTCCGAGGTATT-3' (*)
miR-320- a/b	5'- GGCGGAAAAGCTGGGTTG AGA-3'	5'-TGGTGCAGGGTCCGAGGTATT-3' (*)
let-7- d	5'- GGCGGAGAGGTAGTAGGTTGC-3'	5'-TGGTGCAGGGTCCGAGGTATT-3' (*)
let-7-i/g	5'- GGCGGTGAGGTAGTAGTTTGT-3'	5'-TGGTGCAGGGTCCGAGGTATT-3' (*)
let-7-e	5'- GGCGGTGAGGTAGGAGGTTGT-3'	5'-TGGTGCAGGGTCCGAGGTATT-3' (*)
let-7-a-f	5'-GGCGGTGAGGTAGTAGRTTGT-3'	5'-TGGTGCAGGGTCCGAGGTATT-3' (*)
TEX11	5'- CCTCTTGAAAGGCGAAACATCT-3'	5'-ACCCAACAGATTCTCTTTCATGA-3'
ZBPB	5'- TCAAAAGAGTCCACACGTGTT-3'	5'- TTTGTGCAGTGCGGTTTTCT-3'
GAPDHS	5'- TAACCCTGGCTCCATGAACATT-3'	5'- AACCCTTCCACGATCCCAAATC-3'
SLFN1	5'- TCGTGGGAGTAGAGGACAGC-3'	5'- CGGGAAAGATCTGAGGCTTGA-3'

(*) Oligo reverso universal

3.12.3. Cuantificación mediante droplet digital PCR

La amplificación por ddPCR se realizó empleando la mezcla ddPCR™ Supermix for probes (Bio-Rad, #1863010) a la cual se le agregó una mezcla de oligos en una concentración final 900 nM y 1,2 uM, la sonda TaqMan marcada con el fluoróforo FAM™ en una concentración final de entre 450 y 750 nM y, por último, se agregó el ADN copia. Las placas se cubrieron con un sello térmico de aluminio perforable, se sellaron utilizando un sellador de placas de PCR PX1 (BioRad), se mezclaron mediante agitación vorticial y se centrifugaron.

La generación de gotas se realizó utilizando el Automated Droplet Generation Oil for Probes (Bio-Rad, #1864110) en el equipo QX200 AUTO DG (BioRad). A continuación se procedió a realizar una PCR de punto final la cual consistió en un paso inicial de 30 segundos a 95 °C, y continuó con 40 - 50 ciclos comprendidos por un paso de 15 segundos a 95 °C, un paso de hibridación de 60 segundos en un rango de temperaturas de 50 a 60 °C, y una elongación de entre 1 y 2 minutos a 60 °C, y finalizó con una etapa de 10 minutos a 98 °C, para desnaturalizar la enzima. A continuación, los tubos se incubaron ON a 12 °C, para estabilizar las mezclas, mejorando la lectura de la fluorescencia de las gotas

Tabla III. Oligos y sonda TaqMan utilizadas en la amplificación por ddPCR de 5'-tRF-Gly

	Secuencia
Oligo directo	5'-GGTGGTTCAGTGGTA-3'
Oligo reverso	5'-CAGGGTCCGAGGTA-3'
Sonda TaqMan	5'-FAM-CGTCTCCTCTGGTGCG-BHQ1-3'

Para finalizar, las gotas se leyeron en un lector de gotas QX200 (BioRad) configurado para leer en el canal FAM y se analizaron utilizando el software QuantaSoft™ Analysis Pro 1.0.596. El software realizó el recuento automático de gotas para cada caso, que luego se revisó manualmente verificando el número de copias/20 µl de las muestras y

la separación de las nubes de amplificación. Se requiere un número mínimo de gotas aceptadas para garantizar una detección óptima en el análisis: los ensayos positivos deben tener al menos 6.000 gotas aceptadas, los negativos deben tener 10.000 o más.

3.13. Determinación de proteínas y análisis por Western blot

Las concentraciones de proteínas en las muestras de plasma seminal se determinaron mediante el kit Pierce™ BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific, #A55865), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las lecturas de absorbancia se realizaron a 560 nm utilizando un lector de microplacas BioTek. Para los análisis posteriores, se sembraron volúmenes de plasma seminal que contuvieran 25 µg de proteína total, ajustando el volumen final a 20 µl mediante la adición de PBS. Como marcador de peso molecular se utilizó Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (Bio-Rad). Las proteínas se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) al 15%, y posteriormente se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon durante 1 hs a temperatura ambiente con una solución de PBS-Tween suplementada con BSA al 5%, y luego se incubaron toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario monoclonal anti-Angiogenina 1 (sc-74528, Santa Cruz Biotechnology), diluido 1:8.000. Posteriormente, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con HRP (Jackson ImmunoResearch, 115-035-003), diluido 1:10.000. La detección de la señal se realizó mediante quimioluminiscencia utilizando el reactivo Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Las imágenes se adquirieron utilizando el sistema Amersham Imager 600. La cuantificación de las bandas se llevó a cabo mediante el software ImageJ, y los valores obtenidos se relativizaron al volumen inicial de plasma seminal utilizado en cada muestra.

3.14. Análisis estadístico

Las comparaciones entre los diferentes grupos de pacientes se realizaron mediante pruebas no paramétricas. Para comparaciones múltiples se utilizó el análisis de la varianza de Kruskal–Wallis, seguido del post hoc de Dunn, mientras que las comparaciones por pares se efectuaron mediante la prueba U de Mann–Whitney. Las variables categóricas se analizaron utilizando la prueba de chi-cuadrado. Para los estudios in vitro, se emplearon pruebas paramétricas. Las comparaciones múltiples se realizaron mediante ANOVA de una vía, seguido de pruebas post test de Tukey o Dunnett, según correspondiera, y las comparaciones entre dos grupos se evaluaron mediante la prueba t de Student. Las correlaciones se determinaron utilizando el coeficiente de correlación de Spearman. En todos los casos, se consideró estadísticamente significativo un valor de $p \leq 0,05$. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software GraphPad Software GraphPad Prism versión 8.0 (San Diego, CA, EE. UU.).

4. Capítulo 1

La evaluación clínica actual de la fertilidad masculina presenta limitaciones importantes, lo que favorece el subdiagnóstico de infertilidad o subfertilidad en individuos con espermogramas dentro de rangos de normalidad. En este capítulo se describe un modelo que permite explorar la capacidad reproductiva de individuos normozoospermicos en procedimientos de ICSI, minimizando la influencia del factor femenino mediante la utilización de ovocitos donados. Este enfoque permite identificar individuos con recurrencia de fracaso reproductivo y considerarlos como potenciales casos de infertilidad masculina inexplicable (IMI). En este contexto, se presenta una caracterización clínica y demográfica de la cohorte estudiada, junto con la evaluación del espermograma como herramienta diagnóstica inicial del factor masculino. Asimismo, se analizan parámetros seminales no incluidos en el estudio convencional, como el perfil hormonal y los niveles de mediadores inflamatorios en plasma seminal, incluyendo citoquinas. Este abordaje integral permite explorar su asociación con la calidad seminal y la capacidad reproductiva masculina, así como identificar posibles variables de confusión vinculadas al resultado reproductivo.

4.1. Resultados

4.1.2. Parámetros clínicos de la corte de estudio

Se incorporaron 76 pacientes normozoospermicos que se sometieron a un tratamiento de ICSI utilizando óvulos de donantes en el Centro Médico PROAR durante los años 2015-2022.

Prospectivamente, de acuerdo a los resultados obtenidos luego del tratamiento de reproducción asistida de ICSI con ovocitos donados, los pacientes fueron clasificados en:

- **ICSI (+):** tratamiento exitoso, definido como la obtención de embarazo clínico.

- **ICSI (-):** fracaso en el tratamiento, definido como la ausencia de embarazo clínico. A su vez en este último grupo se distinguieron aquellos pacientes que tenían más de un ciclo fallido de tratamiento de reproducción asistida (**≥2 Fallas**) (Figura 4).

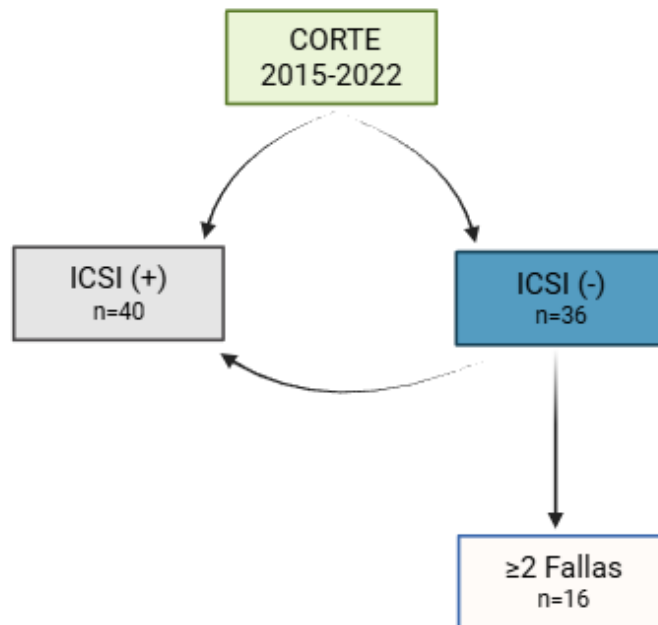


Figura 4. Diagrama de flujo de la clasificación de los pacientes normozoospermicos

Con el objetivo de evaluar la homogeneidad entre los grupos de pacientes, se analizaron diversos parámetros clínicos asociados a la infertilidad. Estos datos fueron obtenidos a partir del relevamiento de las historias clínicas realizado por el personal del Centro Médico PROAR, y fueron utilizados para realizar los análisis estadísticos pertinentes.

4.1.2.1. Factor Femenino

En este estudio, el factor femenino estuvo representado tanto por la donadora del ovocito como por la receptora. Con el fin de garantizar que las diferencias observadas entre los grupos no se vieran influenciadas por posibles sesgos asociados al factor

femenino, se evaluaron variables clínicas relevantes de las donadoras y de las receptoras.

4.1.2.1.1. Parámetros clínicos de las donantes

Las donantes de ovocitos fueron mujeres con fertilidad comprobada y buena respuesta ovárica. Todas presentaban un índice de masa corporal menor a 30 kg/m² y ciclos menstruales regulares con una duración comprendida entre 25 y 35 días. La edad máxima fue de 32 años, sin observarse diferencia significativa en la edad entre los grupos analizados (Figura 5).

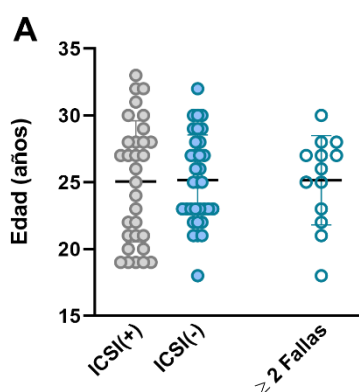


Figura 5. Distribución de la edad de las donantes de ovocitos en los distintos grupos de estudio. ICSI (+): parejas con resultados positivos en ICSI (n=40). ICSI (-): parejas con resultado negativo en el procedimiento de ICSI (n=36). ≥ 2 Fallas: parejas del grupo ICSI (-) con 2 o más fallas en el procedimiento de la ICSI (n=16). Los resultados se expresan como media ± SEM. Kruskal-Wallis test seguido del post test Dunn

4.1.2.1.2. Parámetros clínicos de las receptoras

Si bien la ovodonación permite excluir el factor ovárico en el ICSI, diversos estudios han señalado que factores como el IMC y la edad materna pueden impactar negativamente en la receptividad endometrial afectado el resultado de la ICSI^{156–159}. En este contexto, los parámetros clínicos evaluados en las mujeres receptoras fueron la edad, el IMC y la distribución racial. Al comparar a los pacientes de acuerdo al resultado de la ICSI no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la edad (Figura 6-A). Del mismo modo, la distribución racial tampoco presentó diferencias significativas entre los

grupos (Figura 6-B). Finalmente, el IMC no mostró diferencias significativas entre los grupos, tanto al ser analizado como variable continua (Figura 6-C) como categóricas (Figura 6-D).

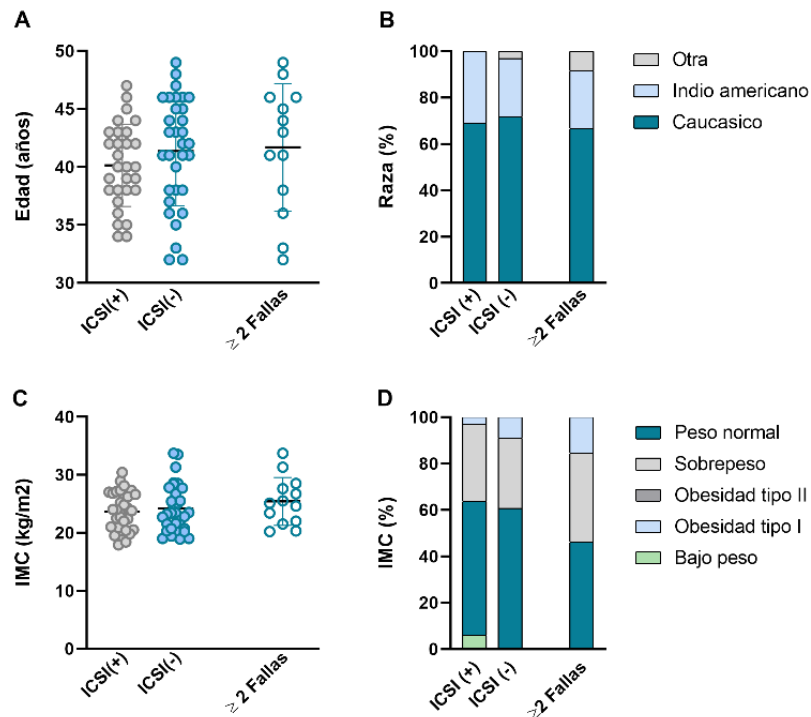


Figura 6. Características demográficas y antropométricas de las receptoras. Distribución de edad (A), raza (B) e índice de masa corporal (C–D) en los grupos de estudio. ICSI (+): pacientes con resultado positivo en el procedimiento de ICSI (n=40). ICSI (-): pacientes con resultado negativo (n=36). ≥2 Fallas: subgrupo de pacientes ICSI (-) con dos o más fallas previas en el procedimiento (n=16). Los resultados cuantitativos se expresan como media $\pm$ SEM, Kruskal-Wallis test seguido del post test Dunn. Los resultados cualitativos se expresan como porcentaje, test de Chi-cuadrado.

4.1.2.2. Factor masculino

Para caracterizar el factor masculino y evaluar su posible impacto en los resultados de la ICSI, se evaluaron variables demográficas y clínicas, junto con parámetros seminales obtenidos mediante espermograma convencional. Además, se incorporó el análisis de fragmentación del ADN espermático, un marcador que en ocasiones se emplea para complementar la evaluación de la calidad seminal. De manera complementaria, se estudiaron mediadores immuno-endocrinos, con el fin de obtener una visión más completa del aporte masculino en el procedimiento.

4.1.2.2.1. Parámetros demográficos y clínicos:

La edad constituye un factor determinante que impacta negativamente en la calidad seminal y se ha asociado con un incremento en la fragmentación del ADN espermático^{160,161}. Incluso se puede evidenciar, a partir de los 45 años, una reducción progresiva del volumen seminal atribuida al deterioro funcional de las glándulas accesorias¹⁶². Nuestra cohorte estuvo conformada por hombres menores a los 60 años, de los cuales solo el 20 % supera los 45 años (Figura 7-A), presentando una mediana de 39 años. Al analizar la distribución etaria en relación con los resultados de la ICSI, no se observaron diferencias significativas entre los grupos (Figura 7-B). Otro factor relevante en la calidad seminal es el IMC. El sobrepeso y la obesidad en hombres se han asociado consistentemente con una disminución en la calidad del semen, un mayor daño en el ADN espermático y un incremento en el riesgo de infertilidad¹⁶³. Al evaluar nuestra cohorte de estudio se puede observar que solo el 15.9% de los hombres que se sometieron al ICSI presentó un índice de masa corporal normal, mientras que el 60,3% correspondió a sobrepeso y el 23,8% a obesidad grado I o II (Figura 7-C). Al comparar los distintos grupos según el resultado de la ICSI, no se observaron diferencias significativas en el IMC (Figura 7-D), evidenciándose además una distribución similar entre ellos (Figura 7-E). Asimismo, debe considerarse que tanto los parámetros seminales como los perfiles hormonales, por ejemplo los niveles de testosterona, pueden variar entre distintos grupos étnicos, como resultado de la interacción de factores genéticos, ambientales y sociodemográficos^{164,165}. En nuestra cohorte, todos los participantes pertenecían a un mismo sector sociodemográfico, lo que minimiza la influencia de este factor. En cuanto a la composición racial, el 83% correspondió a individuos caucásicos y el 17% a indioamericanos (Figura 7-F). Al analizar la distribución de los pacientes según los resultados de ICSI, no se observaron diferencias significativas entre los grupos (Figura 7-G), lo que indica una distribución semejante en términos raciales dentro de la población estudiada. Finalmente, los pacientes fueron clasificados de acuerdo con su grupo y factor sanguíneo, considerando que diversos estudios han propuesto una posible asociación entre los grupos sanguíneos ABO y la infertilidad masculina^{166,167}. En nuestra cohorte de estudio observamos un 52,4% de paciente grupo O, 35.3% del grupo

A y un 12.33% del grupo B, ninguno de los pacientes era del tipo AB. Por otra parte al analizar el factor RH, el 80% de nuestra corte presentaba RH+ (Figura 7-H). Al comparar la distribución de los grupos sanguíneos ABO en los grupos planteados no se observaron discrepancias (Figura 7-I), incluso la distribución del factor RH tampoco presentó diferencias estadísticas entre los grupos (Figura 7-J).

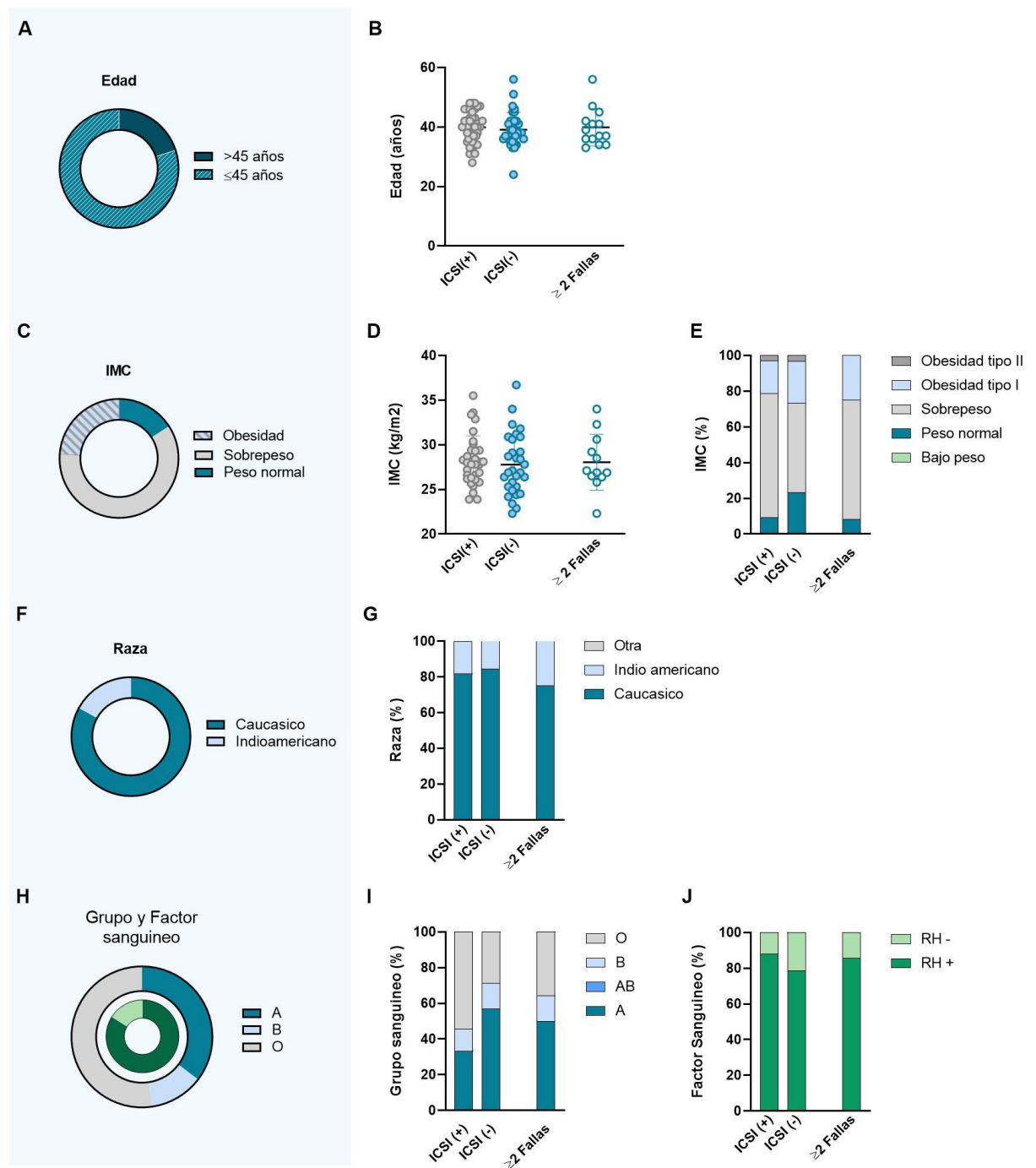


Figura 7. Características clínicas y demográficas del factor masculino. Distribución de edad (A–B), índice de masa corporal (IMC) en forma cuantitativa (C–D) y cualitativa (E), raza (F–G) y grupo y factor sanguíneo (H–J) en los grupos de estudio. Los datos presentados en el cuadro celeste corresponden a la cohorte total. ICSI (+): pacientes con resultado positivo en el procedimiento de ICSI (n=40). ICSI (-): pacientes con resultado negativo (n=36). ≥2 Fallas: subgrupo de pacientes ICSI (-) con dos o más fallas previas en el procedimiento (n=16). Los resultados cuantitativos se expresan como media ± SEM, Kruskal-Wallis test seguido del post test Dunn. Los resultados cualitativos se expresan como porcentaje, test de Chi-cuadrado.

4.1.3. Parámetros seminales de la corte de estudio

4.1.3.1. Espermograma

Dado que el espermograma constituye la base de los estudios en la evaluación de la fertilidad masculina, se procedió a la recolección y análisis de los resultados obtenidos por los sujetos enrolados en el presente estudio. El análisis de semen fue realizado por el equipo Bioquímico de PROAR conforme con las normas del Manual de la Organización Mundial de la Salud 2010³⁵. Dentro de los parámetros macroscópicos del semen se evaluaron el volumen, la licuefacción, el color, el pH y la viscosidad. En todos los casos, se observó una licuefacción completa. El volumen eyaculado se encontró dentro del rango fisiológico normal (1,5–7,0 ml). El color fue consistentemente blanquecino-opalescente, sin evidencia de hematospermia ni signos visibles de infección. El pH presentó una mediana de 8,0, valor considerado adecuado para mantener la viabilidad espermática y neutralizar la acidez del tracto vaginal. Por último, la viscosidad fue evaluada de forma subjetiva, sin registrar casos de hiperviscosidad ni hipoviscosidad.

Los análisis microscópicos incluyeron la evaluación de la concentración espermática ($\times 10^6$ /ml), motilidad total (%) y vitalidad (%). La concentración espermática fue ≥ 15 millones/ml en todos los casos, sin observarse diferencias estadísticamente significativas entre los grupos analizados (Figura 8-A). La vitalidad espermática presentó valores $\geq 58\%$, también sin diferencias significativas entre grupos (Figura 8-B). En cuanto a la motilidad total —que incluye tanto la motilidad progresiva como la no progresiva— los valores obtenidos se mantuvieron dentro del rango de referencia en toda la cohorte, sin diferencias entre los grupos (Figura 8-C).

Cabe destacar que, en este estudio, se excluyó la evaluación de la morfología espermática dado que se trata de un parámetro de baja reproducibilidad interobservador y con difusos criterios de normalidad debidos a la elevada variabilidad intraindividual^{168,169}.

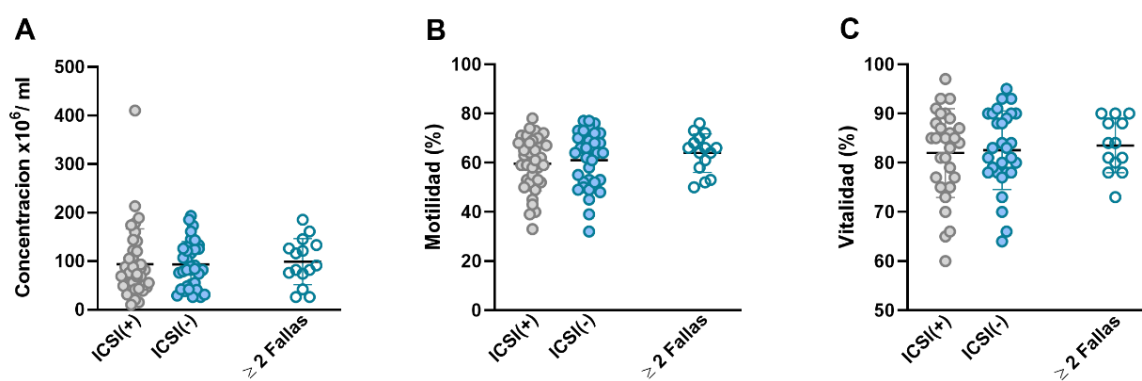


Figura 8. Parámetros seminales del examen microscópico. Distribución de la concentración espermática por mililitro (A), el porcentaje de motilidad total (B) y el porcentaje de vitalidad (C) en los grupos de estudio. ICSI (+): pacientes con resultado positivo en el procedimiento de ICSI (n=40). ICSI (-): pacientes con resultado negativo (n=36). ≥2 Fallas: subgrupo de pacientes ICSI (-) con dos o más fallas previas en el procedimiento (n=16). Los resultados se expresan como media ± SEM, Kruskal-Wallis test seguido del post test Dunn.

4.1.3.2. Análisis del grado de fragmentación del ADN espermático (SDF)

El análisis de la fragmentación del ADN espermático no forma parte del espermograma estándar definido por la OMS, sin embargo se considera un estudio complementario relevante en la evaluación de la infertilidad masculina³⁵. En el presente estudio se dispuso de resultados SDF en 35 pacientes de la cohorte. Estos análisis fueron realizados sobre la misma muestra utilizada para el procedimiento de ICSI y fueron solicitados en el marco del tratamiento de reproducción asistida.

La Figura 9-A muestra a modo de ejemplo, como se diferencian las muestras de espermatozoides con ADN fragmentado de otras con ADN íntegro. Tal como se observa en la Figura 9-B, no se detectaron diferencias significativas entre los grupos en cuanto al grado de fragmentación del ADN observado. Solo un paciente de cada grupo presentó valores superiores al 30%.

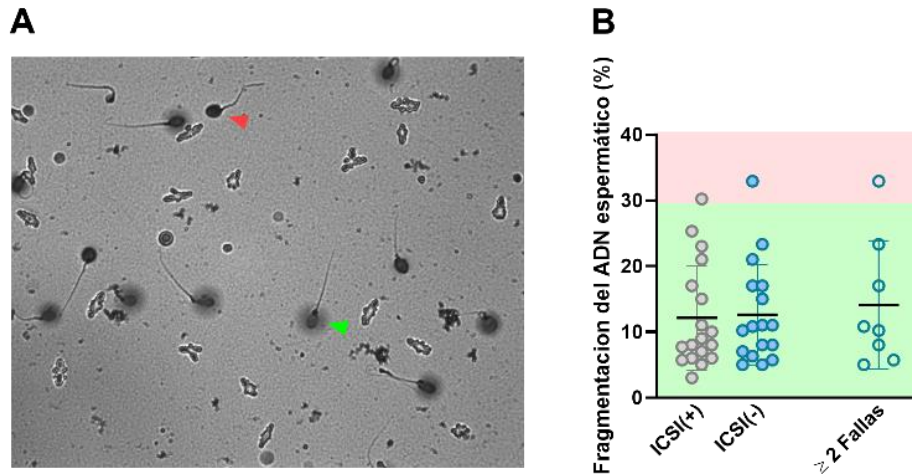


Figura 9. Fragmentación del ADN espermático. (A) Fotografía del análisis de fragmentación de ADN espermático obtenida mediante microscopía óptica (40X). Las puntas de flecha verdes indican espermatozoides con ADN íntegro, mientras que las puntas de flecha rojas señalan espermatozoides con ADN fragmentado. (B) Distribución del porcentaje de fragmentación en espermatozoides de pacientes normozoospermicos en los grupos de estudio. ICSI (+): pacientes con resultado positivo en el procedimiento de ICSI (n=18). ICSI (-): pacientes con resultado negativo (n=17). ≥ 2 Fallas: subgrupo de pacientes ICSI (-) con dos o más fallas previas en el procedimiento (n=8). Los resultados se expresan como media $\pm$ SEM, Kruskal-Wallis test seguido del post test Dunn.

4.1.3.3. Niveles hormonales en plasma seminal

El plasma seminal constituye un entorno bioquímico inmediato al que están expuestos los espermatozoides. En numerosos casos, los niveles hormonales en plasma seminal, no se correlacionan con los niveles detectados en sangre periférica, lo que resalta la importancia de su evaluación directa en el eyaculado¹⁷⁰. Con el objetivo de explorar si las dificultades reproductivas observadas en nuestra cohorte podrían estar asociadas a desregulaciones hormonales locales, se determinaron los niveles de hormonas esteroidea en plasma seminal.

En primer lugar, se cuantificaron los niveles de testosterona, hormona clave para la espermatogénesis y la función de los órganos sexuales accesorios. Nuestra cohorte de estudio presentaba una mediana de 2,87 ng/ml y un rango intercuartil de 1,4. Al comparar los diferentes grupos de la cohorte no se observaron diferencias significativas (Figura 10-A).

Asimismo, se evaluaron los niveles de cortisol en el plasma seminal, la principal hormona relacionada con la respuesta a estrés, la cual está presente en concentraciones mensurables en este fluido. Los valores obtenidos en la cohorte analizada (mediana 39,75 ng/ml y rango intercuartil 13,5.) se ubicaron dentro de los rangos previamente reportados en hombres normozoospermicos^{29,170}. Al comparar los distintos grupos de estudio, no se observaron diferencias significativas en los niveles de esta hormona (Figura 10-B).

Se determinaron los niveles de DHEA-s, la forma sulfatada e inactiva de la DHEA, una hormona esteroidea con efectos antiglucocorticoides involucrada en la modulación de la respuesta al estrés¹⁷¹⁻¹⁷³. Nuestra cohorte de estudio presentó una mediana de 2.134 ng/ml y un rango intercuartil de 1.668. Al comparar los niveles detectados en los distintos grupos no se observaron diferencias significativas (Figura 10-C).

Finalmente se analizó la relación cortisol/DHEA-s, ya que un desbalance entre ambas hormonas podría favorecer un ambiente proinflamatorio o estresante para los espermatozoides, afectando su funcionalidad. Como se muestra en la Figura 10-D, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio, sin embargo, se evidenció una tendencia a la disminución de los niveles en el grupo de ≥ 2 Fallas.

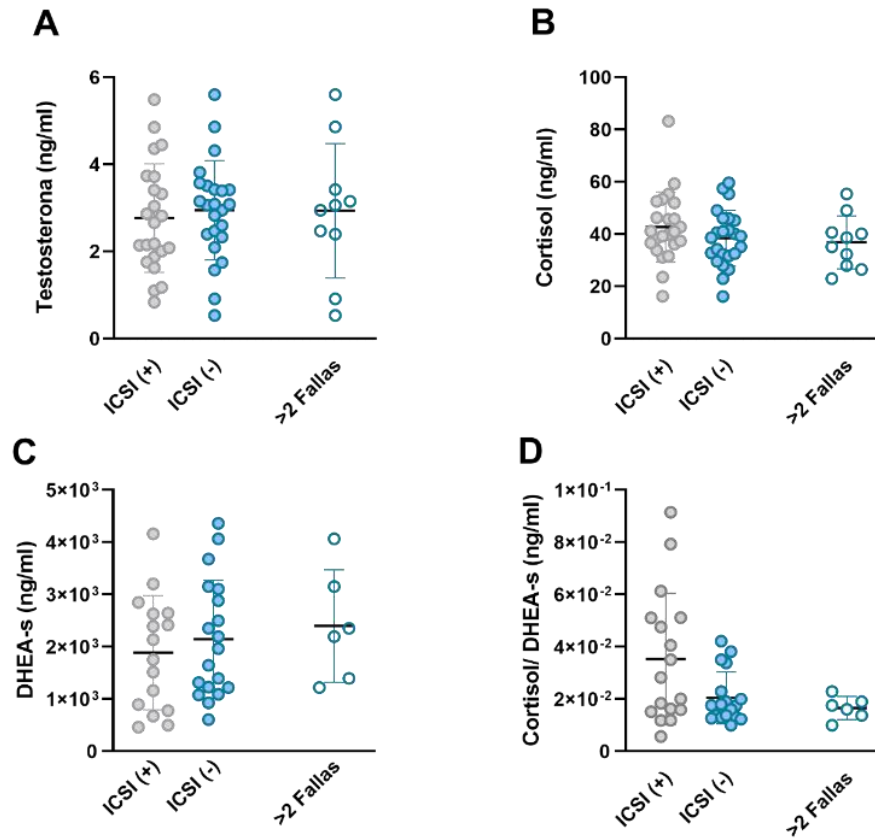


Figura 10. Niveles hormonales en plasma seminal. Distribución de testosterona (A), cortisol (B), sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEA-S) (C) y la relación cortisol/DHEA-S (D) en los grupos de estudio. ICSI (+): pacientes con resultado positivo en el procedimiento de ICSI (n=23). ICSI (-): pacientes con resultado negativo (n=24). ≥2 Fallas: subgrupo de pacientes ICSI (-) con dos o más fallas previas en el procedimiento (n=10). Los resultados se expresan como media ± SEM, Test Kruskal–Wallis seguido de prueba post test de Dunn.

Debido a que el índice de masa corporal se ha asociado con alteraciones en los niveles séricos de hormonas reproductivas masculinas^{174,175}, en el presente estudio se evaluó el impacto del IMC sobre las concentraciones de hormonas esteroideas determinadas en el plasma seminal. Tal como se muestra en la Figura 11, el análisis comparativo entre grupos clasificados según el IMC reveló diferencias significativas en los niveles de cortisol y DHEA-S (Figura 11-B,C), mientras que no se observaron diferencias en las concentraciones de testosterona (Figura 11-A).

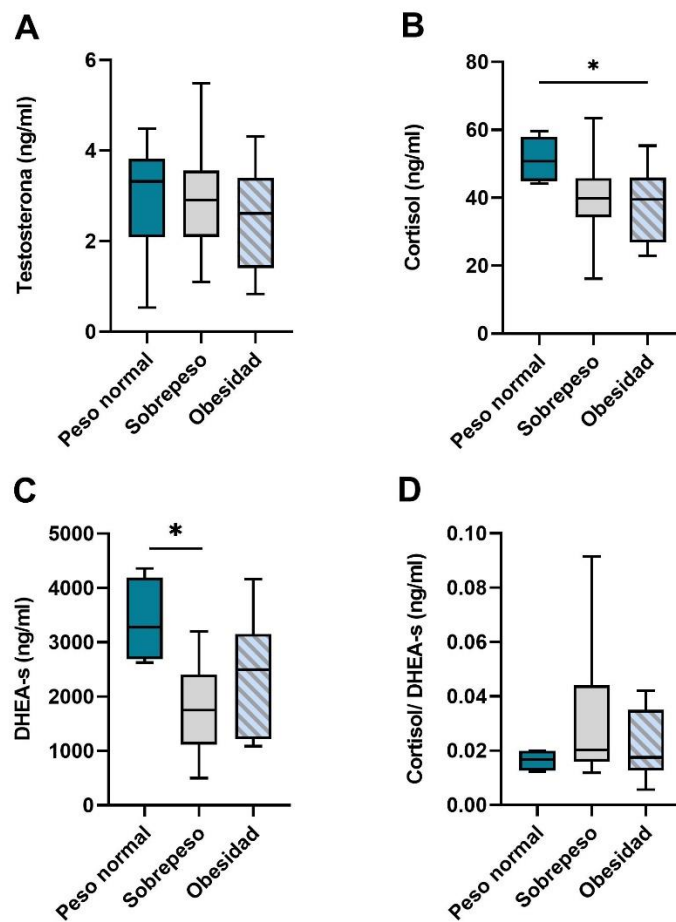


Figura 11. Niveles hormonales en plasma seminal. Distribución de testosterona (A), cortisol (B), sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEA-s) (C) y de la relación cortisol/DHEA-s (D) en los grupos de estudio. ICSI (+): pacientes con resultado positivo en el procedimiento de ICSI (n=23). ICSI (-): pacientes con resultado negativo (n=24). ≥ 2 Fallas: subgrupo de pacientes ICSI (-) con dos o más fallas previas en el procedimiento (n=10). Los diagramas de caja representan los valores mínimo y máximo de cada grupo, y la línea central indica la mediana. * $p \leq 0,05$, Test de Kruskal–Wallis seguido de prueba post test de Dunn.

Con el objetivo de reducir el potencial efecto de confusión asociado al IMC, el análisis de la cuantificación de mediadores hormonales se restringió al subgrupo de pacientes con sobrepeso, dado que este representó la mayor proporción de la cohorte analizada. En este subgrupo se observaron diferencias significativas en los niveles de cortisol entre los pacientes que lograron el embarazo y aquellos que no lo lograron, registrándose valores disminuidos en estos últimos (Figura 12-B). En contraste, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones de testosterona (Figura 12-A), DHEA (Figura 12-C) ni en la relación cortisol/DHEA-s entre los grupos. No

obstante, esta última variable mostró una tendencia a valores menores en el grupo ICSI (-), atribuible a las variaciones observadas en los niveles de cortisol. (Figura 12-D).

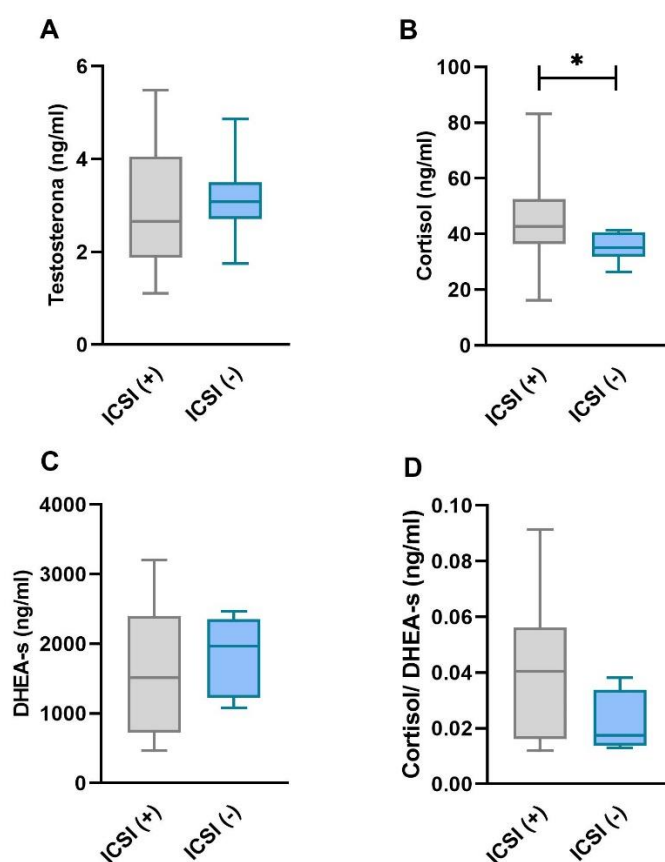


Figura 12. Niveles hormonales en plasma seminal de individuos con sobrepeso. Distribución de testosterona (A), cortisol (B), sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEA-s) (C) y de la relación cortisol/DHEA-s (D) en los grupos de estudio. ICSI (+): pacientes con resultado positivo en el procedimiento de ICSI (n=19). ICSI (-): pacientes con resultado negativo (n=9). Los diagramas de caja representan los valores mínimo y máximo de cada grupo, y la línea central indica la mediana. * $p \leq 0,05$, Test de Mann-Whitney.

4.1.3.4. Citoquinas en plasma seminal

El plasma seminal constituye un entorno inmunológicamente activo, que contiene diversos componentes del sistema inmunitario^{176,177}. Las citoquinas desempeñan funciones fisiológicas clave en la regulación de la función espermática, la capacidad de fertilización y la protección frente al estrés celular¹⁷⁷. Alteraciones en los niveles de estas

moléculas pueden reflejar el estado inmunológico o la presencia de infecciones en el sistema reproductor masculino, con impacto directo sobre la calidad y funcionalidad del esperma^{176,178,179}.

Entre las citoquinas de perfil antiinflamatorio, se seleccionó la interleucina-10 (IL-10) debido a su función crítica como mediadora inmunorreguladora en el sistema reproductor masculino. IL-10 ejerce un papel central en el control de la respuesta inmune local, preservando un entorno inmunológicamente tolerante. Diversos estudios han reportado niveles alterados de IL-10 en el plasma seminal de hombres infértiles^{180,181}. En nuestra cohorte, los niveles de IL-10 presentaron una mediana de 4,9 pg/ml y un rango intercuartílico de 5. Al comparar los distintos grupos analizados, no se observaron diferencias significativas en la concentración de esta citoquina, lo que indica que los niveles seminales de IL-10 no se asocian con fallas repetidas de ICSI (Figura 13-A).

La interleucina 1 beta (IL-1 β) es una citoquina proinflamatoria ampliamente caracterizada, con un rol fundamental en la fisiología testicular. En nuestra cohorte, los niveles de IL-1 β en plasma seminal presentaron una mediana de 7,16 pg/ml, con un rango intercuartil de 7,8, valores consistentes con los reportados en varones fértiles con parámetros seminales normales^{177,182}. Al comparar los niveles entre los distintos grupos del estudio, no se observaron diferencias estadísticamente significativas (Figura 13-B).

La interleucina-8 (IL-8) es una citoquina proinflamatoria con una potente capacidad quimiotáctica y activadora de neutrófilos, lo que la convierte en un componente clave de la defensa inmunológica del tracto reproductor masculino frente a infecciones¹⁸³. En nuestra cohorte los niveles de IL-8 en plasma seminal presentaron una mediana de 3.495 pg/ml, con un rango intercuartil de 6.825. El análisis comparativo evidenció diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, observándose concentraciones disminuidas de IL-8 en los pacientes ICSI (-) en comparación con aquellos que lograron el embarazo (Figura 13-C).

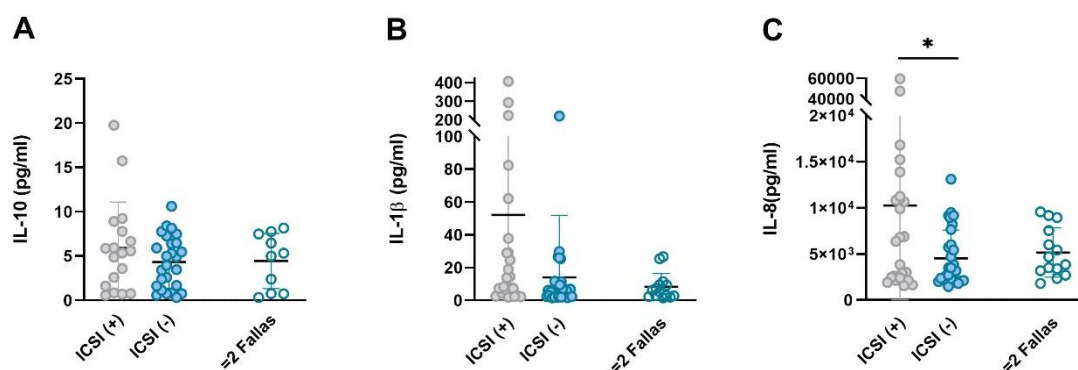


Figura 13. Niveles de citoquinas en plasma seminal. Distribución de las interleuquinas IL-10 (A), IL-1 β (B) e IL-8 (C) en el plasma seminal de los grupos de estudio. ICSI (+): pacientes con resultado positivo en el procedimiento de ICSI (n=25). ICSI (-): pacientes con resultado negativo (n=30). ≥ 2 Fallas: subgrupo de pacientes ICSI (-) con dos o más fallas previas en el procedimiento (n=14). Los resultados se expresan como media $\pm$ SEM. * $p \leq 0,05$, Test Kruskal–Wallis seguido de prueba post test de Dunn.

4.1.4. Resultados del procedimiento de ICSI y desarrollo embrionario

Se evaluaron parámetros correspondientes al desempeño del procedimiento de ICSI y al desarrollo embrionario temprano. Los parámetros analizados fueron la tasa de fertilización, definida como la relación entre el número de ovocitos fertilizados y el total de ovocitos en metafase II inyectados, el porcentaje de blastulación, calculado como la proporción de blastocitos desarrollados respecto del total de ovocitos fertilizados y la calidad embrionaria al día 5 (D5), evaluada según criterios morfológicos estandarizados. La valoración de estos parámetros fue realizada por el equipo bioquímico del Laboratorio de Alta Complejidad de PROAR. Como se muestra en la Figura 14 tanto el porcentaje de fertilización como el de embriones óptimos en el día 5 (D5) no presentaron diferencias significativas entre los grupos ICSI (+) e ICSI (-). En contraste, el porcentaje de blastulación fue significativamente menor en los pacientes que no alcanzaron el embarazo (Figura 14-B). Este análisis permite contextualizar el desenlace clínico y pone de manifiesto que, si bien no se observaron diferencias en los parámetros clínicos y seminales entre los grupos, sí se evidencian discrepancias en la progresión embrionaria final.

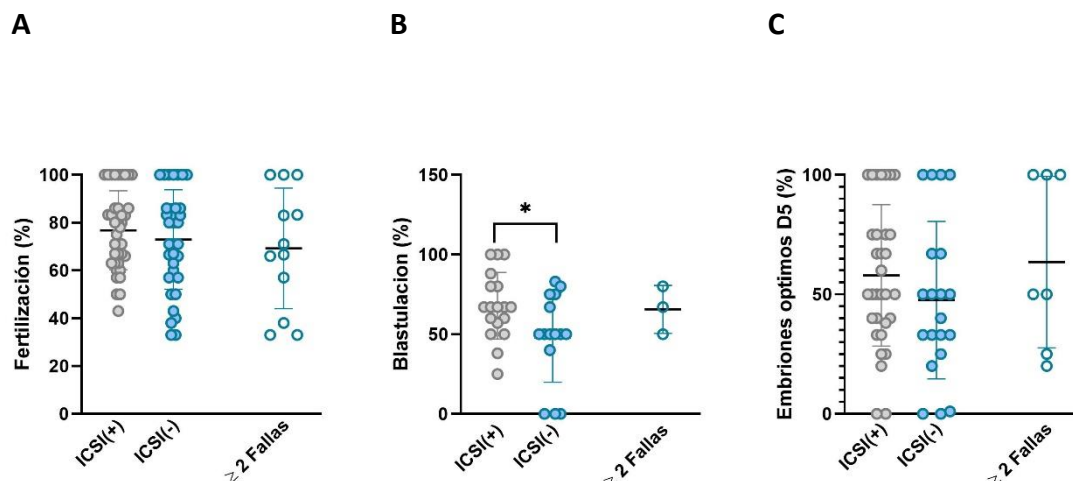


Figura 14. Parámetros embrionarios. Distribución del porcentaje de fertilización tras el procedimiento de ICSI (A), de la tasa de blastulación (B) y del porcentaje de embriones de calidad óptima al día 5 de desarrollo (C) en los grupos de estudio. ICSI (+): pacientes con resultado positivo en el procedimiento de ICSI (n=39). ICSI (-): pacientes con resultado negativo (n=35). ≥ 2 Fallas: subgrupo de pacientes ICSI (-) con dos o más fallas previas en el procedimiento (n=2). Los resultados se expresan como media ± SEM. *p≤0,05, Test de Kruskal–Wallis seguido de prueba post test de Dunn.

4.1.5. Análisis de correlaciones entre los parámetros clínicos y seminales

Con el objetivo de explorar las posibles asociaciones entre los distintos parámetros clínicos y seminales analizados, se realizó un análisis de correlación de Spearman. Tal como se observa en la Figura 15, se identificaron múltiples asociaciones de carácter fisiológico. Entre ellas, destacó la correlación positiva entre los niveles de testosterona y de DHEA-s ($R = 0,624$), consistente con la relación biosintética entre ambas moléculas. Asimismo, se observó una correlación positiva ($R=0,746$) entre el porcentaje de vitalidad espermática y el de motilidad, reflejando la estrecha relación funcional entre ambos parámetros que contribuyen a la calidad espermática. En cuanto a las citoquinas presentes en el plasma seminal, se evidenciaron asociaciones significativas entre sus niveles, lo que sugiere la existencia de mecanismos de regulación coordinada dentro del microambiente inmunológico seminal (IL-8 e IL-1 $R=0,556$; IL-8 e IL-10 $R:0,525$).

De manera interesante, se detectó una correlación negativa entre el porcentaje de fragmentación del ADN espermático y los niveles de cortisol ($R = -0,664$), lo que podría indicar un efecto protector del eje glucocorticoide sobre la integridad genómica espermática. En línea con lo anterior, se observó una correlación positiva ($R = 0,865$) entre el porcentaje de blastulación y la relación cortisol/DHEA-s.

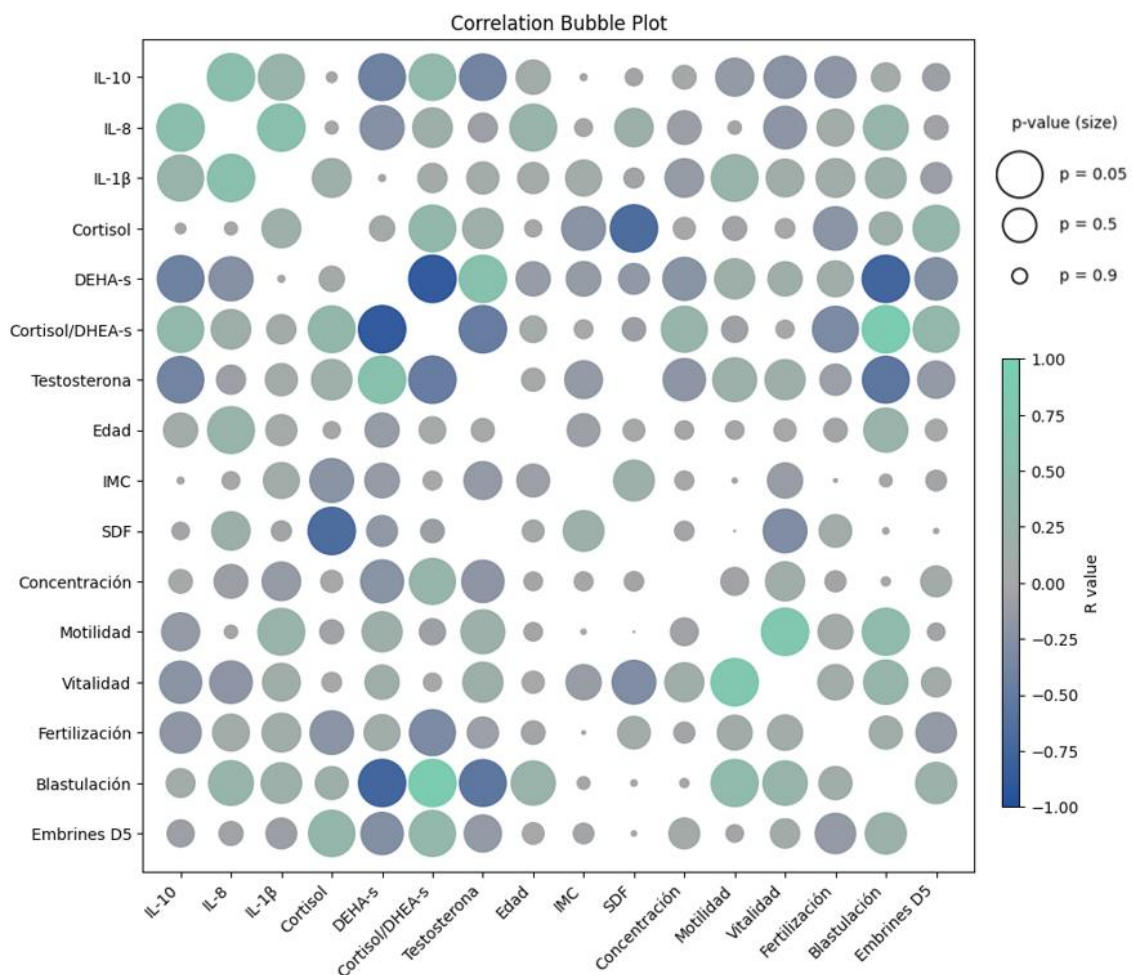


Figura 15. Matriz de correlaciones entre parámetros clínicos, seminales y parámetros del desarrollo embrionario. El tamaño de los círculos indica el valor de p (p pequeño = círculo mayor), mientras que el color representa el coeficiente de correlación de Spearman (R). Solo se muestran las correlaciones fuera de la diagonal principal.

4.2. Discusión

El presente capítulo tuvo como propósito establecer y validar un modelo clínico controlado para el estudio del factor masculino en reproducción asistida, utilizando una cohorte de hombres normozoospermicos sometidos a ICSI con ovodonación. Este diseño permitió minimizar la influencia del factor femenino y aislar, en la medida de lo posible, variables atribuibles al factor masculino, generando un escenario adecuado para explorar determinantes asociados al éxito reproductivo en un contexto de infertilidad aparentemente inexplicada.

Los resultados obtenidos evidencian que la cohorte analizada es homogénea en términos de variables demográficas, clínicas y seminales convencionales. No se identificaron diferencias significativas entre los grupos ICSI (+) e ICSI (–) en parámetros tradicionalmente vinculados con la calidad seminal, incluyendo edad, índice de masa corporal, parámetros del espermograma, fragmentación del ADN espermático ni perfiles hormonales e inflamatorios en plasma seminal.

Entre los factores clínicos evaluados, variables tradicionalmente asociadas con la función reproductiva masculina, como la edad y el índice de masa corporal no mostraron diferencias significativas entre los grupos ICSI (+) e ICSI (–). Si bien una proporción considerable de la cohorte presentó sobrepeso u obesidad, los parámetros seminales convencionales se mantuvieron dentro de los rangos de normalidad y no se asociaron con el resultado reproductivo. Los parámetros espermáticos analizados en este estudio fueron consistentes con los rangos de referencia establecidos por la OMS³⁵. Estos resultados indican que alteraciones funcionales sutiles no logran ser detectadas por el espermograma convencional, lo que resalta la necesidad de incorporar estudios complementarios para una evaluación más integral del factor masculino. Entre estos, la fragmentación del ADN espermático se ha consolidado como un marcador clínicamente relevante¹⁰⁵. Sin embargo, en nuestra cohorte solo un individuo por grupo superó el 30%, lo que indica que el daño significativo del ADN no fue un rasgo predominante en la población estudiada.

Considerando que el plasma seminal constituye el microambiente inmediato al que están expuestos los espermatozoides, se analizó su perfil hormonal. En nuestra cohorte, las concentraciones de testosterona seminal resultaron más elevadas que las informadas en estudios previos^{170,184,185}, posiblemente debido a diferencias metodológicas o poblacionales^{186,187}. No obstante, no se detectaron diferencias significativas entre los grupos evaluados. En cuanto al cortisol seminal, los valores obtenidos se encontraron dentro de los rangos previamente descritos^{29,170}, y tampoco evidenciaron diferencias significativas entre los grupos. Si bien el cortisol es un mediador central del eje del estrés y posee efectos inmunometabólicos potencialmente relevantes en el microambiente reproductivo, los resultados sugieren que su posible contribución podría estar modulada por otras variables clínicas. En cuanto a la DHEA-s, su evaluación resulta de interés dado que la mayoría de los estudios disponibles en la literatura evalúan DHEA libre y no su forma sulfatada^{170,188}. Sin embargo, al igual que para las otras hormonas analizadas, no se detectaron diferencias significativas entre los grupos.

Finalmente, el análisis de la relación cortisol/DHEA-s —considerada un indicador más sensible del estado funcional del eje del estrés, particularmente en contextos de inflamación de bajo grado¹⁸⁹— tampoco evidenció diferencias significativas entre los grupos, lo que indica que el balance entre estas hormonas no se asoció de manera diferencial con el desenlace reproductivo.

Aunque el análisis global no evidenció diferencias hormonales entre los grupos ICSI (+) e ICSI (-), la estratificación según IMC reveló diferencias significativas en los niveles de cortisol y DHEA-s, lo que sugiere que el estado metabólico podría modular el microambiente endocrino seminal. Estos hallazgos se alinean con la evidencia que indica que el sobrepeso y la obesidad alteran la función del eje hipotálamo-hipofisiario-adrenal y modifican la producción y el metabolismo de esteroides adrenales^{190,191}. Particularmente, dentro del subgrupo con sobrepeso, los pacientes ICSI (-) presentaron niveles significativamente disminuidos de cortisol respecto de los ICSI (+), lo que sugiere una posible interacción entre el estado metabólico y la regulación del eje del estrés en el microambiente seminal. Si bien el exceso de glucocorticoides se asocia con efectos

inhibitorios sobre el eje hipotálamo-hipofisario-gonadal^{174,175}, niveles relativamente bajos también podrían reflejar una alteración en la capacidad adaptativa del eje frente al estrés metabólico crónico. En esta línea, la tendencia observada en la relación cortisol/DHEA-s —aunque no significativa— sugiere que el balance entre esteroides adrenales podría ser también biológicamente.

En línea con estos resultados, el análisis de correlación reveló una asociación negativa entre el porcentaje de fragmentación del ADN espermático y los niveles de cortisol seminal así como una correlación positiva entre el porcentaje de blastulación y la relación cortisol/DHEA-s. Estos resultados sugieren una posible relación entre el equilibrio hormonal del eje del estrés, la integridad espermática y el desarrollo embrionario temprano. Este hallazgo es consistente con evidencias experimentales que demuestran que la exposición controlada a glucocorticoides, como la dexametasona, mejora parámetros espermáticos tales como la supervivencia y la motilidad, y que determinados perfiles hormonales vinculados al eje del estrés podrían predecir el éxito en ICSI^{192,193}.

Desde el punto de vista inmunológico, el plasma seminal contiene diversas citoquinas que contribuyen a regular el microambiente reproductivo y la función espermática^{27,177}. En este contexto, se evaluaron IL-10, IL-1 β e IL-8 como indicadores del estado inmunológico local. En nuestra cohorte, los niveles de IL-10 —citoquina asociada a perfiles inmunorreguladores— se mantuvieron dentro de los rangos reportados en condiciones fisiológicas¹⁹⁴ y no mostraron diferencias entre los grupos. De manera similar, la IL-1 β , utilizada como marcador de inflamación local, presentó concentraciones compatibles con valores basales¹⁸² y tampoco evidenció diferencias asociadas al resultado reproductivo. Por su parte, la IL-8, una citoquina típicamente abundante en plasma seminal y vinculada a procesos de vigilancia inmunológica local, mostró niveles dentro de los rangos descritos en la literatura⁴⁷. En conjunto, estos resultados indican que, en esta cohorte de individuos normozoospermicos, el perfil de citoquinas seminales no se asoció de manera diferencial con el desenlace reproductivo.

En relación con los parámetros de desarrollo embrionario obtenidos tras la ICSI, solo el porcentaje de blastulación fue significativamente menor en los pacientes que no alcanzaron embarazo. En contraste, no se observaron diferencias en la tasa de fertilización ni en el porcentaje de embriones óptimos al día 5. Estos resultados sugieren que, si bien los embriones que alcanzan el estadio de blastocito presentan una calidad comparable entre los grupos, la probabilidad de que los embriones fertilizados progresen hasta ese estadio es menor en los pacientes ICSI (–). Este patrón podría indicar la presencia de factores sutiles asociados al componente masculino que afectan la progresión embrionaria temprana sin impactar de manera evidente en la calidad morfológica de los blastocitos que logran desarrollarse.

En conjunto, estos hallazgos indican que los parámetros clínicos clásicos y los mediadores complementarios evaluados no permiten discriminar el resultado reproductivo en este modelo. Estos resultados refuerzan la hipótesis de que, en hombres normozoospermicos, los determinantes del éxito o fracaso en ICSI podrían asociarse con alteraciones moleculares más sutiles, no detectables mediante las herramientas diagnósticas convencionales. En este contexto, se justifica la exploración de nuevos biomarcadores moleculares en plasma seminal como estrategia para identificar indicadores pronósticos más sensibles.

5. Capítulo 2

Este capítulo se profundiza en el análisis molecular del factor masculino, centrando el estudio en ARNs pequeños seminales y en su posible valor como biomarcadores reproductivos. A partir de la identificación y cuantificación de fragmentos derivados de ARNt, así como de la evaluación de la angiogenina, enzima vinculada a su biogénesis, se analiza su asociación con el resultado de ICSI en una cohorte clínicamente homogénea. Este enfoque permite trascender las limitaciones de los parámetros seminales convencionales y explorar determinantes moleculares que podrían contribuir al éxito o fracaso reproductivo en contextos de infertilidad aparentemente inexplicada.

5.1. Resultados

5.1.1. Selección de Biomarcadores

5.1.1.1. Revisión bibliográfica y análisis bioinformáticos de ARNs pequeños en plasma seminal

Como etapa preliminar, se realizó una revisión sistemática de la literatura disponible en PubMed con el objetivo de identificar estudios que evaluaran la presencia de ARNs pequeños en plasma seminal mediante técnicas de secuenciación masiva o microarrays. Esta revisión constituyó una primera aproximación conceptual al tema y sirvió de base para la formulación de las hipótesis y el diseño experimental del presente trabajo. Se consideraron las publicaciones disponibles hasta el año 2020^{125,128,130,195–198}.

Diversos trabajos que emplearon secuenciación de última generación identificaron a miR-let-7 entre los 15 miARN más abundantes del plasma seminal^{128,130,197}. Además, se ha reportado que niveles alterados de let-7a se asocian con pacientes con azoospermia no obstructiva y oligospermia¹⁹⁸.

Si bien la mayoría de los estudios se limitaron a describir patrones de expresión de miARN alterados en pacientes con diferentes tipos de infertilidad masculina, Hu et al. (2014) examinó exhaustivamente los niveles de sARNs seminales libres de células en

hombres normozoospermicos e identificó al menos 995 piARN seminales presentes en estos individuos, pero ausentes en hombres vasectomizados¹³⁰. De manera complementaria, Hong et al. (2016) reportaron cinco piARN seminales con niveles de expresión alterados en pacientes infértiles ¹²⁵.

No obstante, nuestro análisis bioinformático reveló que las secuencias de los piARN más abundantes en el plasma seminal (≥ 10 RPM.) no presentan preferencia por uridina en el extremo 5', una característica distintiva de los piARN¹⁹⁹. Con el fin de evaluar si estos sARNs anotados como piARNs podrían corresponder en realidad a otras especies de ARN, comparamos las 20 secuencias más abundantes (que representan el 94,5% del total detectado por Hu et al.¹³⁰) con el genoma humano. Este análisis mostró que el 80% se alinea con secuencias de ARNt (Tabla 1). De manera consistente, cuatro de los cinco piARNs descritos por Hong también presentaron alineamiento con las secuencias de ARNt (Tabla 2).

Tabla 1. Alineamiento de a pares utilizando la herramienta BLASTn de los piARN seminales descritos por Hu et al

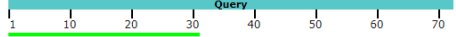
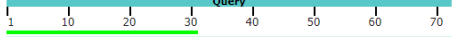
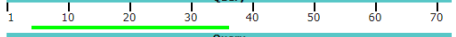
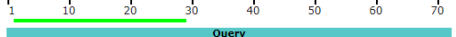
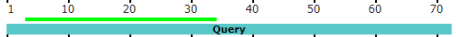
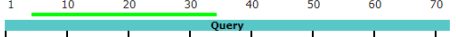
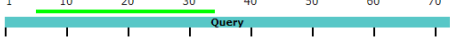
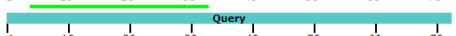
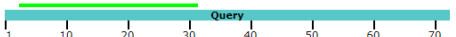
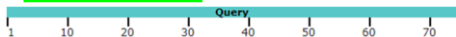
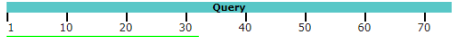
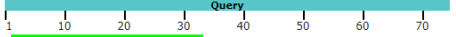
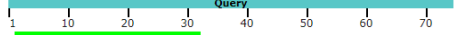
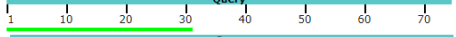
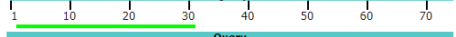
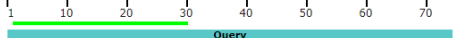
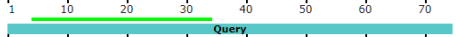
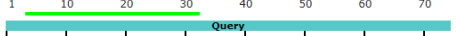
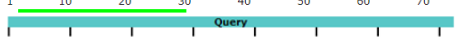
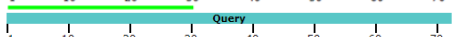
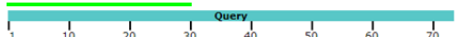
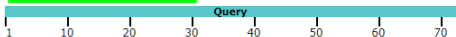
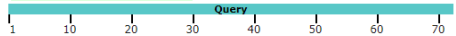
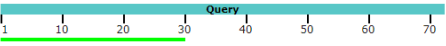
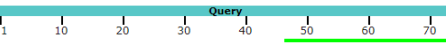
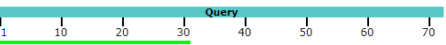
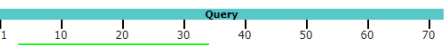
Query	ID	Query cover	Valor E	Identidad	Alineamiento
ARnt-Gly	DQ597916	43%	5e-15	100%	
	DQ570956	43%	5e-15	100%	
	DQ595536	44%	1e-15	100%	
	DQ595535	43%	5e-15	100%	
	DQ597218	38%	2e-13	100%	
	DQ571813	43%	5e-15	100%	
	DQ595534	41%	2e-14	100%	
	DQ590386	40%	6e-14	100%	
	DQ595533	40%	6e-14	100%	
	DQ597916	40%	6e-14	100%	
ARnt-Lys	DQ570956	40%	6e-14	100%	
	DQ597348	43%	2e-14	96.9%	
	DQ570992	43%	1e-15	100%	
	DQ597347	43%	1e-15	100%	
	DQ597346	41%	5e-15	100%	
	DQ570991	41%	5e-15	100%	
	DQ597345	40%	2e-14	100%	
	DQ597344	39%	6e-14	100%	
	DQ593356	40%	2e-14	100%	
	DQ593049	39%	6e-14	100%	
ARnt-Glu	DQ575492	37%	2e-13	100%	
	DQ575660	41%	2e-14	100%	
	DQ575659	41 %	2e-14	100%	
	DQ594453	42%	5e-15	100%	
	DQ592953	40%	6e-14	100%	
	DQ575658	34%	8e-12	100%	

Tabla 2. Alineamiento de a pares utilizando la herramienta BLASTn de los piARNs seminales descritos en Hong et al.

piARN	ID	AR *	Identidad		Alineamiento
piR-43771	DQ575659.1	16.15%	100%	ARNt-Glu	
piR-43773	DQ575661.1	0.01%	100%	ARNt-Phe	
piR-31068	DQ570956.1	6.09%	100%	ARNt-Gly	
piR-31925	DQ571813.1	0.89%	100%	ARNt-Gly	

* Abundancia relativa en la base de datos de piARN del plasma seminal de Hong et al¹²⁵

Posteriormente, validamos estos resultados mediante la interfaz web MINTbase, un repositorio que contiene fragmentos de ARNt presentes en múltiples tejidos humanos. Curiosamente, los tRF derivados de solo tres ARNt (ARNt-Glu, ARNt-Lys y ARNt-Gly) representan más del 60% de todo el ARNs seminal detectado en hombres normozoospermicos (88% de las lecturas en el conjunto de datos de piARN) y todos son fragmentos largos que se alinean con la mitad 5' del ARNt. (Figura 16). Por su parte, cuatro de los cinco piARN propuestos por Hong¹²⁵ presentan similitud de secuencia con fragmentos derivados de ARNt. Específicamente, piR-43772 muestra similitud de secuencia con 5'tRF-Glu, piR-31068 con 5'tRF-Gly, piR-31925 con 5'tRF-Gly y piR-43773 con 3'tRF-Phe.

A partir de la revisión literaria seleccionamos como candidatos a la familia de miR-let-7, 5'tRF-Glu, 5'tRF-Lys, 5'tRF-Gly y 3'tRF-Phe.



Figura 16. Alineamientos múltiples de ARN pequeños seminales con similitud de secuencia con ARNt específicos. Se muestran los alineamientos correspondientes a secuencias con similitud a ARNt-Glu-CTC (A), ARNt-Lys-CTT (B) y ARNt-Gly-GCC (C). La abundancia relativa de cada secuencia en la base de datos de piARN seminales se indica junto a su identificador (ID).

5.1.1.2. Análisis bioinformáticas de datos de sRNA-seq

Con el objetivo de contrastar nuestros hallazgos con información disponible en bases de datos públicas, se realizó un análisis exploratorio de datos de secuenciación de ARN pequeños provenientes del Human Biofluid RNA Atlas, que incluye dos muestras de plasma seminal previamente procesadas¹²². Este abordaje tuvo como finalidad examinar la consistencia general del perfil de sARNs reportado en plasma seminal en un conjunto de datos independiente.

El procesamiento bioinformático se realizó a partir de las lecturas crudas, considerando exclusivamente aquellas que alineaban con el genoma humano. Al focalizar el análisis en moléculas de ARNs pequeños, aproximadamente el 40% de las lecturas de ambas muestras correspondió a fragmentos derivados de ARNt (Figura 17-A). Dentro de este conjunto, cerca del 90% se atribuyó principalmente a fragmentos provenientes de

cuatro ARNt: Val (41%), Gly (32,8%), Lys (9,99%) y Glu (7,06%) (Figura 17-B). Estos resultados fueron concordantes con los hallazgos previos y respaldan la predominancia de fragmentos derivados de ARNt en el plasma seminal.



Figura 17. Perfil de ARN pequeños en plasma seminal. (A) Distribución porcentual de las principales clases de ARN pequeños altamente abundantes en PS. (B) Proporción relativa de los diferentes subtipos de fragmentos derivados de ARNt (tRFs).

Con el objetivo de verificar experimentalmente la presencia de las cuatro secuencias de sARNs más abundantes identificadas en el plasma seminal, se realizó un análisis mediante Northern blot en muestras de plasma seminal y espermatozoides (SPZ) provenientes de individuos ICSI (+) y de un individuo ICSI (-). En cada calle se sembró ARN purificado a partir de 200 μ L de plasma seminal o 1 μ g de ARN total extraído de SPZ. Este abordaje permitió detectar la presencia de estos fragmentos en ambas fracciones del semen.

A pesar de que el 5'tRF-Val constituye una de las especies más abundantes en el plasma seminal según los análisis de expresión realizados, su detección mediante Northern blot resultó marcadamente menos eficiente en comparación con otros tRFs como 5'tRF-Gly, 5'tRF-Glu o 5'tRF-Lys (Figura 18). Esta aparente discrepancia no reflejaría diferencias en abundancia relativa, sino limitaciones inherentes a las metodologías basadas en hibridación. Los ARNt contienen numerosas modificaciones post-transcripcionales que pueden interferir con el apareamiento de bases y disminuir la eficiencia de unión de las sondas, reduciendo la sensibilidad del ensayo^{200,201}. Dado que estas modificaciones no

se distribuyen de manera uniforme entre las distintas especies de ARNt, su impacto sobre la accesibilidad de las regiones diana podría variar diferencialmente entre fragmentos.

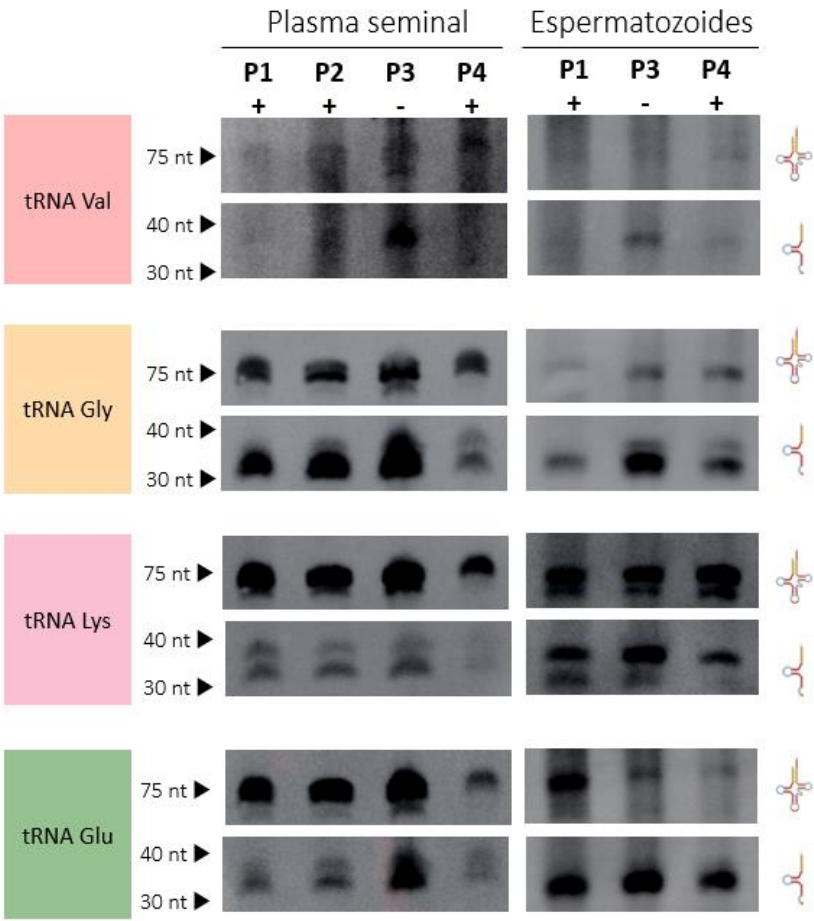


Figura 18. Análisis por Northern blot de fragmentos derivados de ARNt en plasma seminal y espermatozoides. Se utilizaron sondas específicas para 5'-tRF Val, 5'-tRF Gly, 5'-tRF Lys y 5'-tRF Glu con el fin de detectar los correspondientes fragmentos derivados de ARNt. Los pacientes ICSI (+) se indican con el símbolo +, mientras que los pacientes ICSI (-) se indican con el símbolo -.

5.1.2. Fragmentos derivados del ARNt como biomarcador en plasma seminal

La selección de candidatos para evaluar su potencial como biomarcadores se realizó en dos etapas. Inicialmente, y considerando la evidencia disponible en la literatura, se seleccionaron fragmentos derivados de ARNt previamente reportados como piARNs y

descritos en este capítulo, en base a su abundancia en plasma seminal y su posible asociación con la fertilidad masculina. Estos candidatos, 5'tRF-Glu, 5'tRF-Lys, 5'tRF-Gly y 3'tRF-Phe, junto con el miARN let-7, fueron evaluados en un análisis exploratorio realizado en muestras recolectadas entre 2015 y 2019 (n=66). Posteriormente, y a partir de la disponibilidad de datasets de secuenciación de sARNs que ampliaron el conocimiento sobre la composición del sARNs en plasma seminal, se incorporó la cuantificación de 5'tRF-Val para su evaluación en una cohorte ampliada.

Durante el período 2020–2025, la cohorte original fue ampliada mediante la incorporación de nuevos pacientes hasta el año 2022. Dado que el estudio se diseñó de manera prospectiva, se realizó el seguimiento longitudinal de los pacientes luego de su primer procedimiento de ICSI. El relevamiento y actualización de las historias clínicas se extendió hasta marzo de 2025, lo que permitió reclasificar a los pacientes según el resultado acumulado de sus ciclos de ICSI. Aquellos inicialmente clasificados como ICSI (–) tras un único ciclo fallido fueron reevaluados en intentos posteriores y reclasificados según su evolución clínica: los que lograron el embarazo pasaron al grupo ICSI (+), mientras que quienes continuaron con ciclos fallidos fueron incorporados al subgrupo con ≥ 2 Fallas. La cohorte final quedó conformada por 40 pacientes ICSI (+) y 36 pacientes ICSI (–), de los cuales 16 presentaban dos o más ciclos fallidos.

Este seguimiento permitió reclasificar a los pacientes según el resultado acumulado de sus ciclos de ICSI, minimizando la inclusión de casos con un único ciclo fallido y generando grupos clínicamente más homogéneos. En el contexto de ICSI con ovodonación, la recurrencia del fracaso reproductivo incrementa la probabilidad de un componente masculino subyacente.

5.1.2.1. Análisis exploratorio de los niveles de ARNs pequeños en plasma seminal (cohorte 2015–2019)

El análisis comparativo entre los grupos de estudio reveló que los niveles de 5'tRF-Glu y 5'tRF-Lys se encontraban significativamente incrementados en los individuos que no lograron el embarazo (ICSI (–)). Con el objetivo de profundizar este análisis, dentro del

grupo ICSI (-) se distinguió un subgrupo de pacientes que había presentado más de un ciclo fallidos (≥ 2 Fallas). Al focalizar el análisis en este subgrupo, se observaron diferencias significativas en los niveles de los tres tRF más abundantes: 5'tRF-Glu, 5'tRF-Lys y 5'tRF-Gly (Figura 19-A,B,C). Además, también se detectó un aumento del fragmento menos abundante 3'tRF-Phe-GAA (Figura 19-E). En contraste, los niveles del miARN let-7 no mostraron variaciones entre los grupos analizados (Figura 19-D), indicando que este miARN seminal se mantiene estable en el plasma seminal de hombres normozoospermicos. En conjunto, estos resultados sugieren que las diferencias observadas se restringen principalmente a fragmentos derivados de ARNt y no reflejan una alteración global de todos los ARNs pequeños evaluados. Esta desregulación selectiva de tRFs posiciona a estos fragmentos como potenciales biomarcadores de calidad espermática.

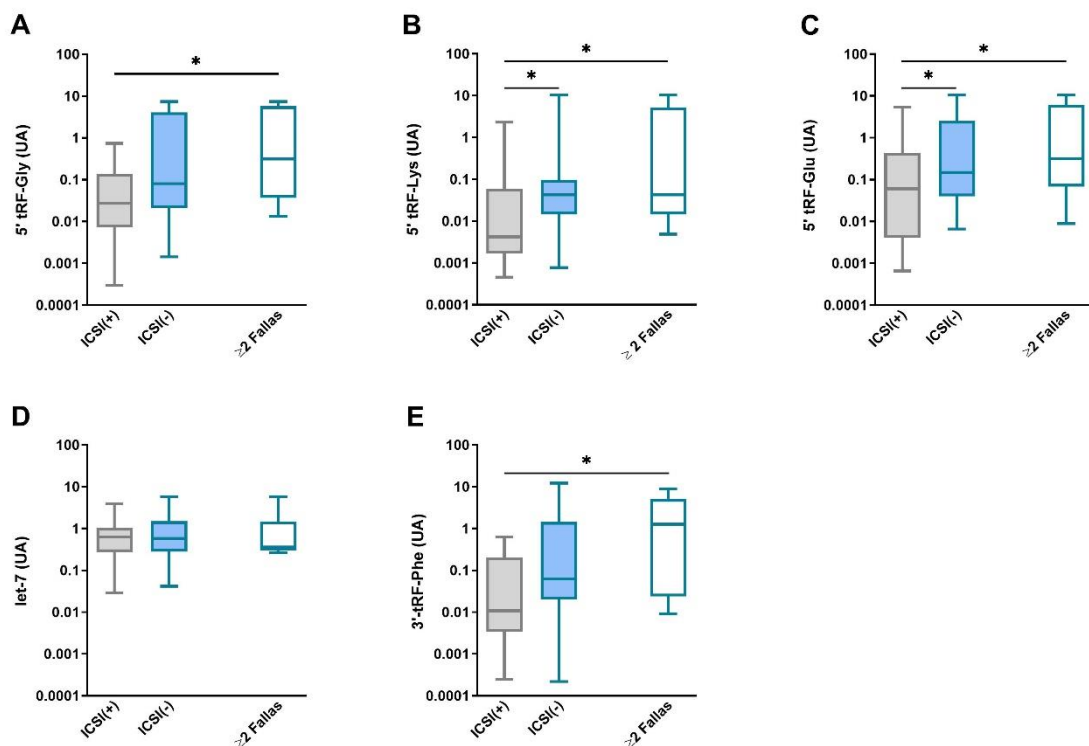


Figura 19. Niveles de ARN pequeños en plasma seminal de parejas masculinas sometidas a ICSI con ovocitos donados. Se muestran los niveles seminales de 5'tRF-Gly (A), 5'tRF-Lys (B), 5'tRF-Glu (C), let-7 (D) y 3'tRF-Phe (E) en muestras correspondientes a parejas masculinas que lograron el embarazo (ICSI

(+), n=31) y a aquellas que no lo lograron (ICSI (-), n=25). Dentro del grupo ICSI (-) se distinguieron adicionalmente los casos con dos o más ciclos fallidos (≥ 2 Fallas, n=10). Los diagramas de caja representan los valores mínimo y máximo de cada grupo, y la línea central indica la mediana. * $p \leq 0,05$, Test Kruskal-Wallis seguido de prueba post test de Dunn.

5.1.2.2. Validación de los niveles de tRFs en una cohorte ampliada y recategorizada

Para esta etapa de validación, la cohorte original fue ampliada mediante la incorporación de nuevos pacientes hasta el año 2022. Las muestras fueron retrotranscriptas nuevamente y se seleccionaron para su cuantificación los cuatro fragmentos derivados de ARNt más abundantes identificados en el análisis bioinformático. En este contexto, además de los 5'tRF-Gly, 5'tRF-Glu y 5'tRF-Lys evaluados en el análisis preliminar, se incorporó el 5'tRF-Val, dado que representaba el tipo de tRF más abundante en plasma seminal según datos de sRNA-seq. Por su parte, el fragmento derivado de ARNt-Phe 3' fue excluido del análisis final debido a que en el análisis exploratorio mostró una señal débil y, además, correspondía a un fragmento generado a partir del extremo 3' del ARNt.

Como se observa en la Figura 20, el análisis comparativo entre los grupos de estudio evidenció niveles significativamente elevados de 5'tRF-Gly, 5'tRF-Glu y 5'tRF-Val en el PS de los individuos ICSI (-) en comparación con los ICSI (+). Por su parte, los niveles de 5'tRF-Lys no mostraron diferencias significativas entre ambos grupos, lo que podría atribuirse a limitaciones técnicas, dado que las concentraciones de este fragmento se encontraban próximas al límite de detección del método.

Al estratificar la cohorte según el número de ciclos fallidos, se observó que los niveles de 5'tRF-Gly, 5'tRF-Glu, 5'tRF-Lys y 5'tRF-Val se encontraban significativamente incrementados en los individuos pertenecientes al subgrupo ≥ 2 Fallas (Figura 20-A,B,C). En contraste, los niveles del miARN let-7, en concordancia con lo observado en los estudios preliminares, no mostraron diferencias significativas entre los grupos analizados (Figura 20-D).

En conjunto, estos hallazgos, en línea con el análisis preliminar, refuerzan la hipótesis de una alteración específica del perfil de tRFs en pacientes con fallas en la ICSI, particularmente en aquellos con fallas recurrentes del procedimiento.

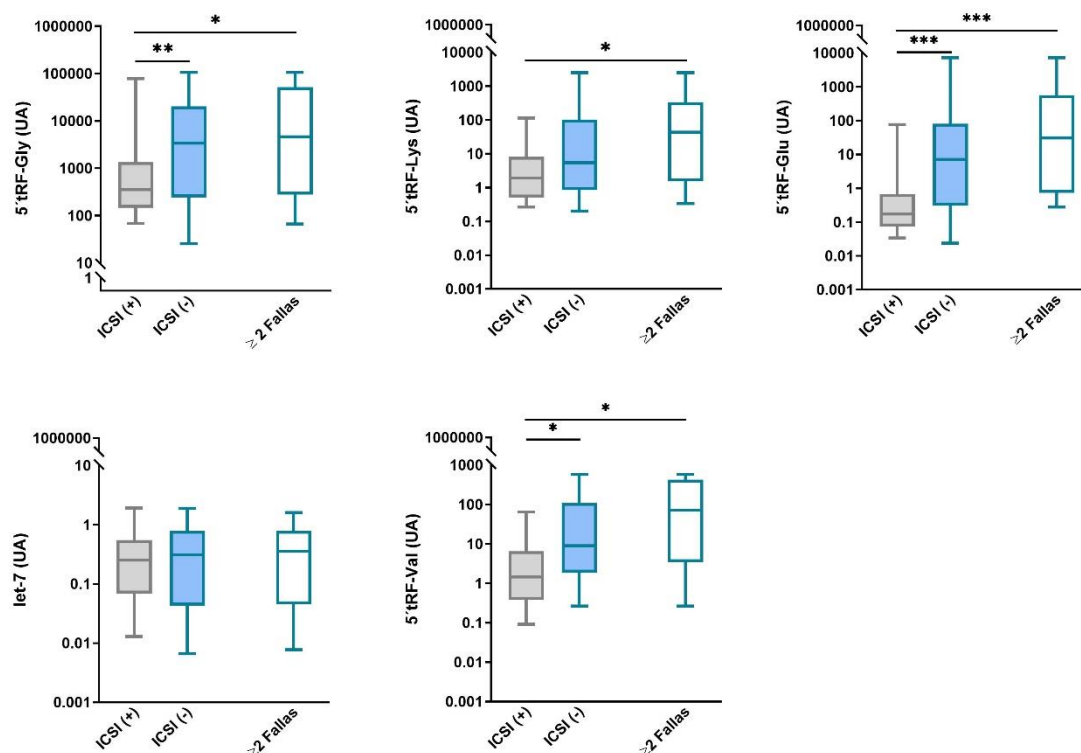


Figura 20. Niveles de los fragmentos de ARNt más abundantes y let-7 en plasma seminal de parejas masculinas sometidas a ICSI con ovocitos donados. Se muestran los niveles seminales de 5'-tRF-Gly (A), 5'-tRF-Lys (B), 5'-tRF-Glu (C), let-7 (D) y 5'-tRF-Val (E) en muestras correspondientes a parejas masculinas que lograron el embarazo (ICSI (+), n=40) y a aquellas que no lo lograron (ICSI (-), n=36). Dentro del grupo ICSI (-) se distinguieron adicionalmente los casos con dos o más ciclos fallidos (≥2 Fallas, n=16). Los diagramas de caja representan los valores mínimo y máximo de cada grupo, y la línea central indica la mediana. *p≤0,05; **p≤0,01; ***p≤0,001, Test de Kruskal–Wallis seguido de prueba post test de Dunn.

5.1.3. Cuantificación de fragmentos derivados de ARNt en espermatozoides

Debido a que durante el procedimiento de ICSI los espermatozoides se lavan del PS y se inyectan directamente en el citoplasma de los ovocitos maduros, se propuso evaluar si los niveles elevados en plasma seminal eran un reflejo de niveles alterados en espermatozoides.

En línea con la estrategia previamente aplicada en plasma seminal, se cuantificaron los niveles relativos de diversos fragmentos derivados de ARNt -específicamente 5'tRF-Gly, 5'tRF-Lys, 5'tRF-Glu, 5'tRF-Val junto con el microARN let-7, con el objetivo de evaluar si sus niveles en espermatozoides difieren entre los grupos de estudio. Este análisis se llevó a cabo en 36 muestras de espermatozoides provenientes de pacientes incluidos en la cohorte ampliada (2015-2022): 18 de ellos clasificados como ICSI (+) y 18 como ICSI (-), de los cuales 6 presentaban dos o más ciclos fallidos (≥ 2 Fallas).

El análisis comparativo evidenció un aumento significativo de 5'tRF-Lys en los individuos ICSI (-), particularmente en aquellos pertenecientes al subgrupo ≥ 2 Fallas. En contraste, los niveles de 5'tRF-Gly, 5'tRF-Glu, 5'tRF-Val y let-7 no mostraron diferencias significativas entre los grupos analizados (Figura 21).

Estos hallazgos se encuentran en línea con lo observado en plasma seminal donde se observa un aumento de los niveles de 5'tRF en los pacientes ICSI (-), pero en espermatozoides la desregulación pareciera ser menos pronunciada y se restringe principalmente a 5'tRF-Lys.

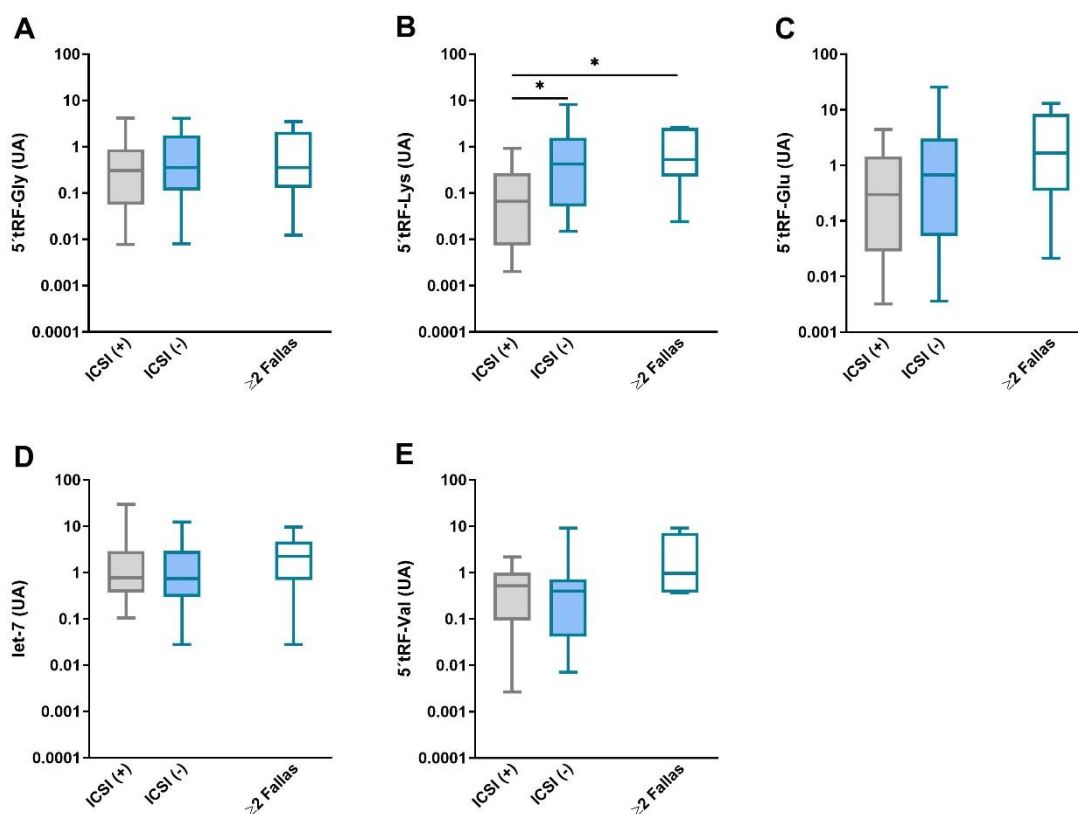


Figura 21. Niveles de los fragmentos de ARNt más abundantes y let-7 en espermatozoides de parejas masculinas sometidas a ICSI con ovocitos donados. Se muestran los niveles de 5'-tRF-Gly (A), 5'-tRF-Lys (B), 5'-tRF-Glu (C), let-7 (D) y 5'-tRF-Val (E) en espermatozoides correspondientes a la cohorte 2018–2022, provenientes de parejas que lograron el embarazo (ICSI (+), n=18) y de aquellas que no lo lograron (ICSI (-), n=18). Dentro del grupo ICSI (-) se distinguieron adicionalmente los casos con dos o más ciclos fallidos (≥ 2 Fallas, n=6). Los diagramas de caja representan los valores mínimo y máximo de cada grupo, y la línea central indica la mediana. * $p \leq 0,05$, Test de Kruskal–Wallis seguido de prueba post test de Dunn.

Por último, se realizó un análisis de correlación entre los niveles de tRFs en PS y en SPZ con el objetivo de evaluar si las concentraciones detectadas en PS pueden considerarse un indicador de los niveles intracelulares espermáticos. Para este análisis se utilizó el test de correlación de Spearman. Tal como se muestra en la Figura 22, no se observaron asociaciones significativas entre los niveles de tRFs en PS y SPZ en ninguno de los casos analizados. En contraste, las correlaciones significativas se evidenciaron exclusivamente dentro de un mismo compartimiento biológico.

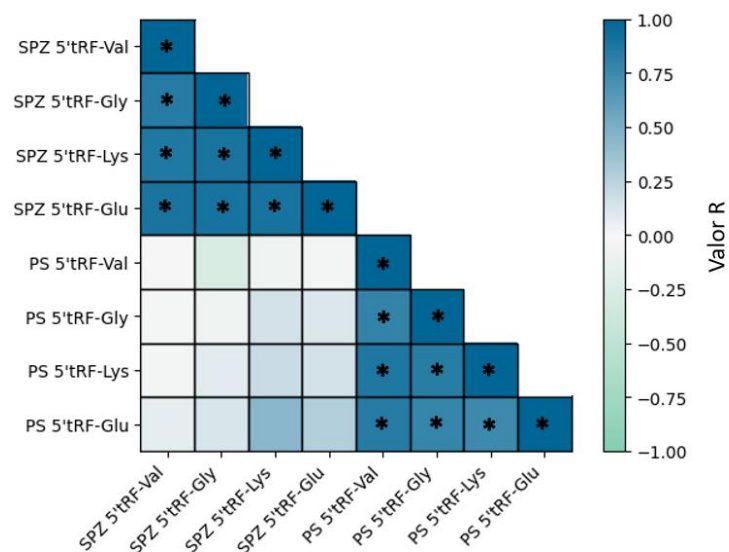


Figura 22. Matriz de correlaciones entre los niveles de tRFs en plasma seminal y espermatozoides. Los asteriscos (*) indican las correlaciones estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$). La escala de color representa el coeficiente de correlación (R de Spearman).

5.1.4. Optimización del método de detección

Dada la variabilidad observada en la cuantificación de los tRFs mediante la técnica de RT-qPCR, y con el objetivo de optimizar la precisión y reproducibilidad de las mediciones, se decidió evaluar un método alternativo para la cuantificación de estos sARNs. En este contexto, la ddPCR se posiciona como una técnica de alta sensibilidad que permite la cuantificación absoluta de la molécula diana sin necesidad de curvas estándar y con una menor variabilidad interensayo. Además, tolera de manera más eficiente la presencia de posibles inhibidores de la PCR y posee un límite de detección significativamente menor en comparación con la qPCR, lo que facilita la cuantificación de moléculas de baja abundancia²⁰².

Con el objetivo de comparar la qPCR y la ddPCR se seleccionó para un análisis exploratorio al 5'tRF-Gly, por tratarse del tRF más abundante en PS que pudo detectarse claramente por NB. En una primera etapa, se realizó la puesta a punto de la ddPCR para la cuantificación de tRFs en PS. Para ello se diseñaron los primers y la sonda TaqMan específicos, se optimizó la concentración de cada componente de la reacción y se

ajustaron distintos parámetros técnico, incluyendo el número de ciclos (40-50), la temperatura de hibridación (50-60°C) y el tiempo de elongación (1-2 minutos). Asimismo, se evaluó la cantidad de muestra a utilizar, considerando que, si bien el rango dinámico de la técnica abarca entre 1 y 120.000 copias en 20 µl de reacción, el sistema es más eficiente cuando el número de copias es bajo.

Al comparar ambas metodologías, se observó que, independientemente de la técnica empleada, los niveles de 5'tRF-Gly en PS se encuentran aumentados en los individuos que no lograron el embarazo. También en aquellos con más de un ciclo fallido se detectaron diferencias significativas, siendo en este caso la ddPCR la técnica que mostró mayor robustez estadística (Figura 23-A). Además, la ddPCR presentó un mayor porcentaje de detección de muestras (Figura 23-B) y, particularmente en el grupo ICSI (+), evidenció un menor coeficiente de variación (Figura 23-C).

Estos resultados indican que la ddPCR incrementó la sensibilidad analítica y disminuyó la variabilidad de las mediciones, lo que fortaleció la consistencia de los hallazgos y la posicionó como una herramienta más robusta para la cuantificación de 5'tRF-Gly en plasma seminal.

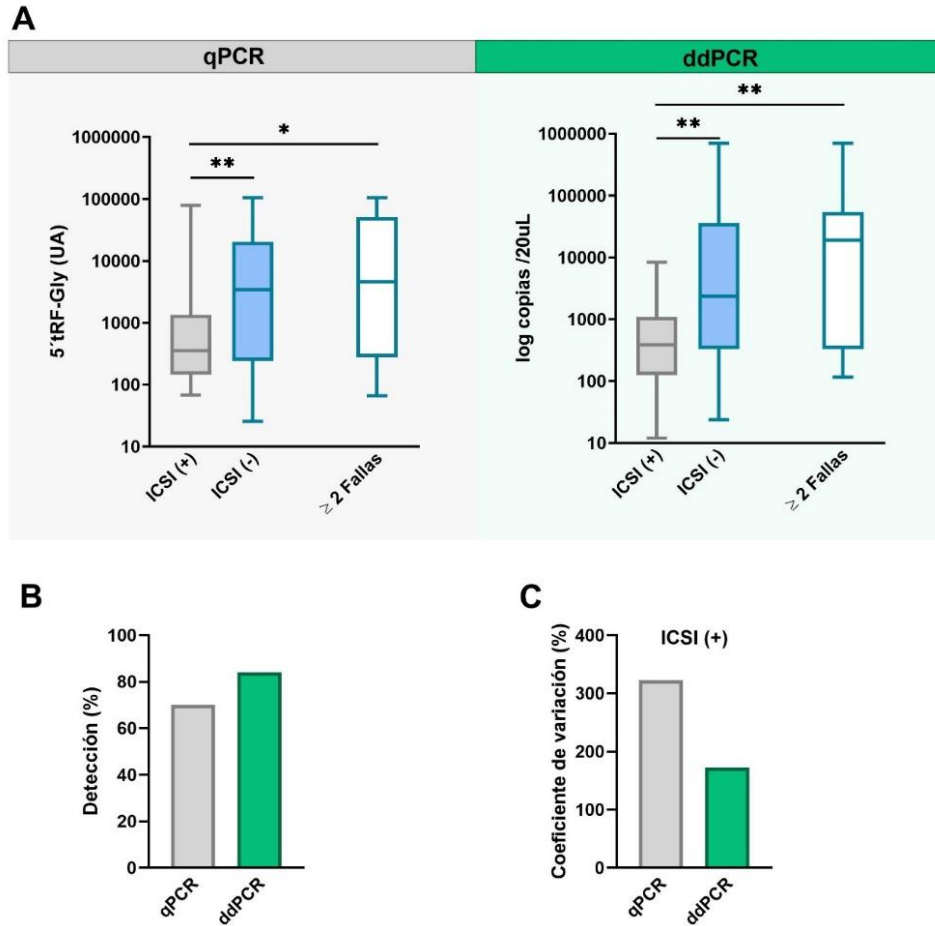


Figura 23. Comparación entre qPCR y ddPCR para la cuantificación de tRF en plasma seminal. Niveles de 5'-tRF-Gly en plasma seminal de la cohorte 2015–2022 determinados por qPCR (gris) y ddPCR (verde) (A). Porcentaje de detección de 5'-tRF-Gly en muestras analizadas mediante qPCR y ddPCR (B). Coeficiente de variación correspondiente a los individuos del grupo ICSI (+)(C). Los diagramas de caja representan los valores mínimo y máximo, y la línea central indica la mediana. Las barras indican los porcentajes. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$. Test de Kruskal–Wallis seguido de prueba post test de Dunn o Test de Mann–Whitney, según corresponda.

En paralelo, se compararon ambas técnicas en relación con la cuantificación de 5'tRF-Gly en SPZ. En este caso, no se observaron aumentos en los niveles de 5'tRF-Gly en los individuos ICSI (-), independientemente de la técnica empleada, en contraste con los resultados obtenidos en plasma seminal. Además los porcentajes de detección de ambas técnicas fueron del 100%. Asimismo, se observó un menor coeficiente de variación en los individuos ICSI (+) cuando se emplea ddPCR (Figura 24).

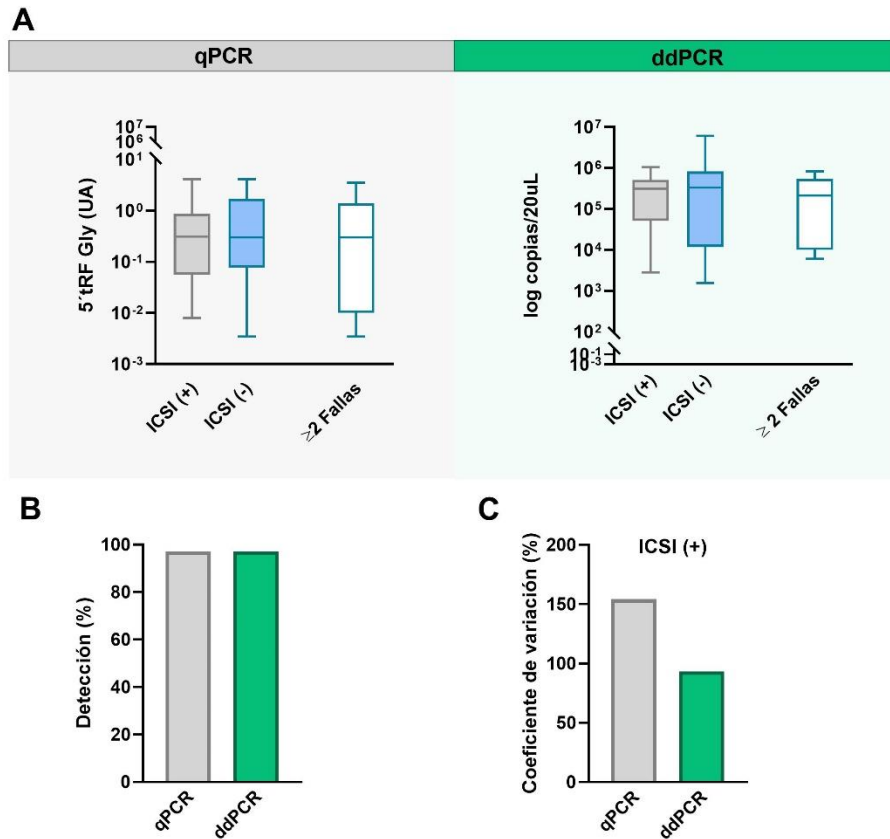


Figura 24. Comparación entre qPCR y ddPCR para la cuantificación de tRF en espermatozoides. Niveles de 5'-tRF-Gly en plasma seminal de la cohorte 2018–2022 determinados por qPCR (gris) y ddPCR (verde) (A). Porcentaje de detección de 5'-tRF-Gly en muestras analizadas mediante qPCR y ddPCR (B). Coeficiente de variación correspondiente a los individuos del grupo ICSI (+)(C). Las barras indican los porcentajes. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$. Test de Kruskal–Wallis seguido de prueba post test de Dunn o Test de Mann–Whitney, según corresponda.

5.1.5. Evaluación de marcadores transcriptómicos de madurez espermática

Con el objetivo de evaluar si los niveles alterados de tRFs en PS se asociaban con la presencia de SPZ con distintos grados de madurez en el semen, se realizó un análisis exploratorio para el cual se seleccionaron 17 muestras comparables entre los grupos ICSI (+) ($n=10$) e ICSI (-) ($n=7$). En estas muestras se cuantificaron los transcritos correspondientes al marcador de espermatocitos premeióticos TEX11, el marcador asociado a embriogénesis temprana SLFN1, y los marcadores de espermatozoide maduro GAPDH-s y ZBPB1.

El transcripto de TEX11 fue detectado únicamente en una muestra del grupo ICSI (–) (1/7) y en cinco muestras del grupo ICSI (+) (5/10). Por su parte, ZBPB1 se detectó en dos muestras del grupo ICSI (–) (2/7) y en seis del grupo ICSI (+) (6/10). En ambos casos, la detección fue esporádica y cercana al límite de sensibilidad de la técnica, lo que limita la solidez del análisis comparativo. En contraste, los transcriptos correspondientes a GAPDH-s y SLFN1 fueron detectables en todas las muestras; sin embargo, no se observaron diferencias significativas en sus niveles de expresión entre los grupos ICSI (+) e ICSI (–) (Figura 25).

Estos resultados indican que los transcriptos detectados de manera consistente (GAPDH-s y SLFN1) no mostraron asociación con el resultado de la ICSI en la cohorte analizada. Asimismo, la detección esporádica y cercana al límite de detección observada para TEX11 y ZBPB1 impide establecer asociaciones robustas.

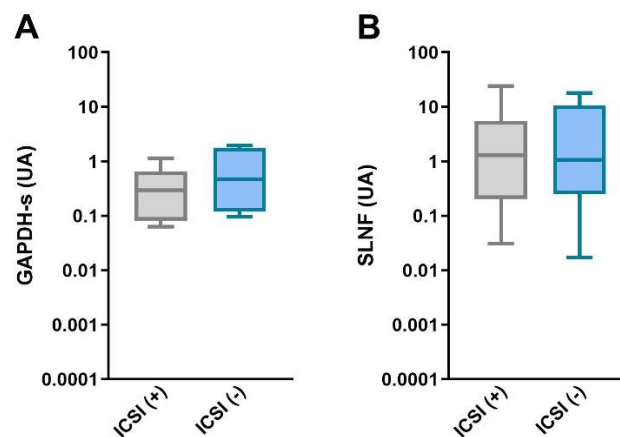


Figura 25. Marcadores de madurez espermática. Se muestran los niveles de GAPDH-s (A) y SLNF (B) en espermatozoides de pacientes normozoospermicos correspondientes a la cohorte 2018–2019. Las muestras corresponden a pacientes con resultado positivo en el procedimiento de ICSI (ICSI (+), n=10) y a pacientes con resultado negativo en un único procedimiento de ICSI (ICSI (–), n=7). Los diagramas de caja representan los valores mínimo y máximo de cada grupo, y la línea central indica la mediana. Test de Mann–Whitney.

5.1.6. Cuantificación de niveles de Angiogenina en PS

La ribonucleasa angiogenina (ANG) es la principal enzima involucrada en la generación de tRFs mediante la escisión específica en el bucle anticodón de los ARNt maduros²⁰³. Además de su expresión intracelular en tejidos del tracto reproductor masculino, como

el epidídimo y la próstata, la ANG es una proteína secretada con reconocida actividad biológica extracelular, incluyendo su rol en la angiogénesis^{204,205}. Esta característica adquiere particular relevancia en el contexto seminal, ya que sugiere la posibilidad de que los tRFs detectados en PS puedan generarse localmente por acción de ANG secretada, y no exclusivamente como consecuencia de su liberación desde células.

Con el objetivo de evaluar la posible contribución de ANG a la biogénesis de tRFs en el compartimento seminal, se determinaron sus niveles en PS mediante Western blot en pacientes ICSI (+) y pacientes ≥ 2 Fallas. Este subgrupo fue seleccionado en lugar del grupo ICSI (-) porque representa un fenotipo clínico más homogéneo y definido de fracaso reproductivo persistente, lo que permite evaluar la asociación con ANG en un contexto de recurrencia del fallo y posible infertilidad inexplicada. La cuantificación se realizó normalizando la señal respecto del volumen inicial de muestra procesada (Figura 26-A).

Al comparar los niveles de ANG entre los pacientes ICSI (+) y aquellos con más de un ciclo fallido (≥ 2 Fallas), no se observaron diferencias estadísticamente significativas en sus niveles en PS (Figura 26-B). Posteriormente, se analizó la posible asociación entre los niveles de ANG y los distintos tRFs cuantificados en plasma seminal. El análisis de correlación no evidenció asociaciones significativas entre la expresión de ANG y ninguno de los tRFs evaluados (Tabla 3).

En conjunto, estos resultados sugieren que la alteración observada en los niveles de tRFs en plasma seminal no estaría directamente asociada a cambios en la expresión total de angiogenina en este compartimento.

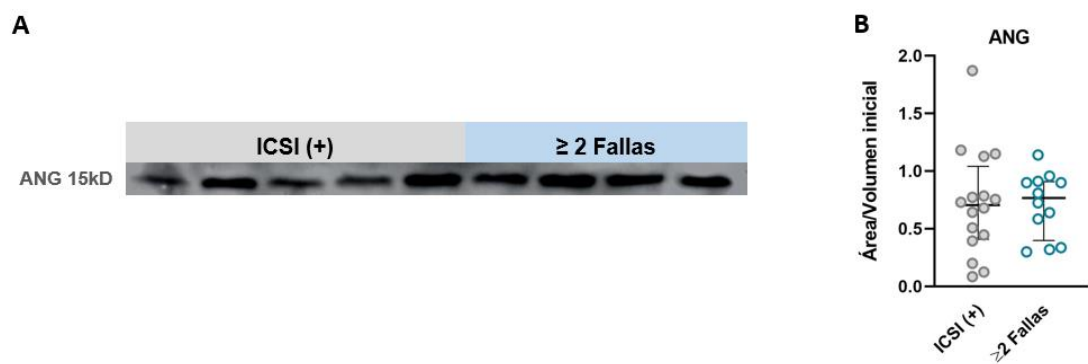


Figura 26. Detección de angiogenina en plasma seminal. (A) Imagen representativa del análisis por Western blot correspondiente a la detección de ANG en muestras de plasma seminal. (B) Niveles relativos de ANG en plasma seminal de pacientes con resultado positivo en el procedimiento de ICSI (ICSI (+)) y de pacientes con dos o más ciclos fallidos (≥ 2 Fallas). La cuantificación se realizó normalizando la señal respecto del volumen inicial de muestra procesada. Los resultados se expresan como media $\pm$ SEM. Test de Mann–Whitney.

Tabla 3. Análisis de correlaciones entre ANG y los tRFs más abundantes en PS

tRF	ANG	
	R Spearman	Valor p
5'tRF-Gly	0,18	0,43
5'tRF-Lys	0,13	0,59
5'tRF-Glu	-0,14	0,56
5'tRF-Val	0.34	0,31

5.1.7. Evaluación de posibles asociaciones clínicas mediante análisis de correlación

Finalmente, se evaluó la asociación entre los niveles de ARNs pequeños en semen y la enzima angiogenina en PS, con distintos parámetros clínicos, seminales y del desarrollo embrionario. Los niveles de ARNs pequeños en espermatozoides no mostraron asociaciones significativas con ninguno de los parámetros analizados.

En contraste, en el plasma seminal se identificaron algunas correlaciones de baja magnitud. En particular, los niveles de 5'tRF-Val se correlacionaron con el porcentaje de vitalidad espermática, mientras que los niveles de let-7 mostraron asociación con la concentración espermática y el porcentaje de fertilización. No obstante, en todos los casos los coeficientes de correlación fueron bajos ($R \leq 0,5$), lo que indica una relación débil entre las variables. Por su parte, los niveles de ANG en plasma seminal mostraron una correlación positiva con los niveles de DHEA-s ($R = 0,8$) y testosterona ($R = 0,5$), y una correlación negativa con la relación cortisol/DHEA-s ($R = -0,6$).

Estos resultados indican que los tRFs no se asocian fuertemente con los parámetros seminales y reproductivos evaluados.

Tabla 4. Análisis de correlaciones entre los niveles de ARNs pequeños seminales y ANG con parámetros clínicos, seminales y del desarrollo embrionario.

		Plasma seminal						Espermatozoides				
		5'tRF Gly	5'tRF Lys	5'tRF Glu	5'tRF Val	Let-7	ANG	5'tRF Gly	5'tRF Lys	5'tRF Glu	5'tRF Val	Let-7
Parámetros clínicos	Edad (años)	0.813	0.092	0.190	0.270	0.157	0.867	0.072	0.102	0.246	0.234	0.743
	IMC (kg/m ²)	0.697	0.800	0.208	0.504	0.634	0.161	0.666	0.482	0.684	0.862	0.804
Parámetros seminales	Concentración (x10 ⁶ /ml)	0.192	0.234	0.656	0.262	0.048	0.153	0.716	0.983	0.849	0.316	0.173
	Motilidad (%)	0.131	0.222	0.935	0.217	0.564	0.223	0.878	0.710	0.967	0.242	0.074
	Vitalidad (%)	0.241	0.391	0.513	0.019	0.428	0.071	0.719	0.448	0.567	0.881	0.985
	SDF (%)	0.361	0.245	0.448	0.299	0.576	0.103	0.996	0.891	0.748	0.611	0.905
	Testosterona (ng/ml)	0.706	0.750	0.507	0.052	0.756	0.037	0.308	0.322	0.251	0.817	0.243
	Cortisol (ng/ml)	0.583	0.088	0.506	0.051	0.409	0.347	0.685	0.760	0.896	0.360	0.557
	DHEA-s (ng/ml)	0.434	0.236	0.690	0.967	0.930	0.001	0.820	0.773	0.856	0.492	0.357
	Cortisol/DHEA-s (ng/ml)	0.431	0.105	0.514	0.273	0.774	0.030	0.512	0.483	0.605	0.808	0.400
	IL-10 (pg/ml)	0.791	0.519	0.953	0.212	0.679	0.308	0.807	0.650	0.698	0.834	0.350
	IL-1 (pg/ml)	0.505	0.265	0.216	0.179	0.971	0.553	0.594	0.433	0.925	0.896	0.371
	iL-8 (pg/ml)	0.498	0.300	0.283	0.915	0.833	0.830	0.079	0.161	0.324	0.974	0.711
ICSI y desarrollo embrionarios	Fertilización (%)	0.791	0.427	0.588	0.838	0.048	0.229	0.984	0.985	0.691	0.830	0.279
	Blastulación (%)	0.554	0.526	0.684	0.818	0.352	0.801	0.933	0.722	0.761	0.486	0.120
	Embriones Op D5 (%)	0.164	0.065	0.508	0.519	0.069	0.835	0.863	0.869	0.530	0.568	0.991

Valor p

El color de cada casillero indica el coeficiente de correlación de Spearman, mientras que número corresponde al valor de p. Los valores de p resaltados en negrita representan correlaciones estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$).

Como se muestra en la Figura 27, al realizar el análisis de correlación considerando únicamente los individuos ICSI (+), el porcentaje de vitalidad espermática se correlacionó negativamente con los niveles de ARNs pequeños presentes en plasma seminal, así como con los niveles de 5'tRF-Val en espermatozoides. En este mismo grupo, los niveles de 5'tRF-Gly en plasma seminal también mostraron una correlación negativa con la motilidad espermática. Estos resultados sugieren que, en pacientes con resultado reproductivo favorable, niveles elevados de tRFs se asocian de manera inversa con parámetros espermáticos relevantes. En relación con el perfil endocrino, y en concordancia con lo observado en la cohorte completa, los niveles plasmáticos de ANG se correlacionaron positivamente con DHEA-s ($R = 0,7$) y testosterona ($R = 0,8$), y mostraron una correlación inversa con la relación cortisol/DHEA-s ($R = -0,7$).

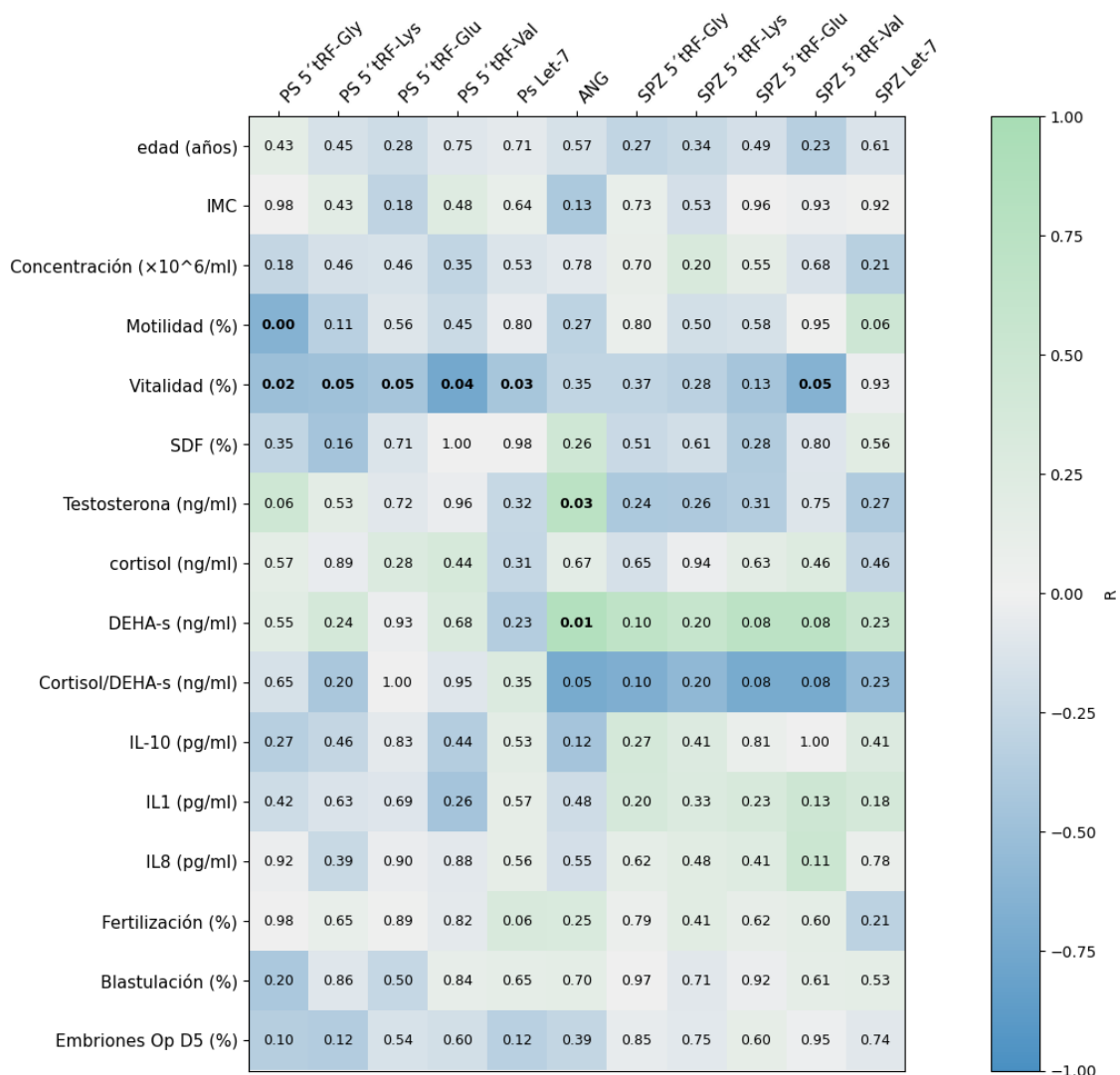


Figura 27. Matriz de correlaciones entre los niveles de ARNs pequeños seminales y ANG con parámetros clínicos, seminales y del desarrollo embrionario en individuos ICSI (+). El color de cada casillero indica el coeficiente de correlación de Spearman, mientras que número corresponde al valor de p. Los valores de p resaltados en negrita representan correlaciones estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$)

En contraste, en los individuos ICSI (–) se observaron correlaciones negativas entre los niveles de IL-8 y los niveles de 5'tRF-Gly, 5'tRF-Glu y 5'tRF-Val en plasma seminal, asociaciones que no se evidenciaron en el grupo ICSI (+). Al restringir el análisis a los individuos pertenecientes al subgrupo ≥ 2 Fallas, estas correlaciones aumentaron en magnitud, indicando una relación inversa más marcada entre el componente inflamatorio y los tRFs (Tabla 5).

En conjunto, los datos no demuestran correlaciones de alta magnitud entre los tRFs y los parámetros reproductivos analizados; sin embargo, las asociaciones detectadas sugieren que estos pequeños ARN podrían integrarse en un perfil molecular más amplio del microambiente seminal, reflejando alteraciones funcionales sutiles que no son captadas por los parámetros convencionales.

Tabla 5. Análisis de correlaciones entre los niveles de tRFs en SPZ y los niveles de IL-8 en los distintos grupos de estudio

SPZ	ICSI (+)		ICSI (-)		≥2 Fallas	
	p	R	P	R	p	R
IL-8 vs 5'tRF-Gly	0,630	0,148	0,005	-0.628	0,017	-0,943
IL-8 vs 5'tRF-Lys	0,483	0,204	0,030	-0,513	0,033	-0,886
IL-8 vs 5'tRF-Glu	0,417	0,235	0,030	-0,513	0,050	-0,829

Los valores en **negrita** son estadísticamente significativos.

5.2. Discusiones

Dado que los ARNs pequeños circulantes han sido propuestos como biomarcadores no invasivos prometedores, el presente trabajo tuvo como objetivo caracterizar el repertorio de ARNs pequeños presentes en el plasma seminal humano y evaluar su posible asociación con fallas en la ICSI, mediante una aproximación que combinó una revisión sistemática de la literatura, análisis bioinformáticos de datos de secuenciación masiva y validaciones experimentales en cohortes de pacientes. Los resultados obtenidos demostraron que los fragmentos derivados de ARNt constituyen la población predominante de ARNs pequeños en el plasma seminal y que sus niveles se encuentran alterados en individuos que no lograron el embarazo por ICSI, particularmente en aquellos con múltiples ciclos fallidos. Estos hallazgos sugieren que los tRFs aportan información complementaria a los parámetros seminales convencionales, reforzando su potencial utilidad como biomarcadores en el contexto de la reproducción asistida.

Uno de los hallazgos centrales de este trabajo fue que los fragmentos derivados de ARNt constituyen la población predominante de ARN pequeños en el plasma seminal humano. Este resultado contrasta con el enfoque predominante en la literatura, que ha centrado el análisis del plasma seminal principalmente en los miARN. Los análisis bioinformáticos realizados mostraron que una proporción sustancial de secuencias originalmente anotadas como piARNs corresponden en realidad a fragmentos derivados de ARNt.

En particular, el análisis de los datos reportados por Hu¹³⁰ reveló que más del 80% de los piARNs más abundantes se alinean con secuencias de ARNt, observación que fue confirmada mediante la plataforma MINTbase. En concordancia con estos hallazgos, Tosar et al. demostraron que muchas secuencias humanas anotadas como piARNs en distintas bases de datos presentan una identidad del 100% con otros ARN no codificantes, y que estas secuencias ambiguas representan la gran mayoría de los piARNs descritos en tejidos extragonadales¹⁴². Estos resultados permiten reinterpretar datos previamente publicados y sugieren que los fragmentos derivados de ARNt han sido subestimados o incorrectamente clasificados en el contexto del plasma seminal.

Estos hallazgos fueron respaldados por el análisis de un set de datos independiente proveniente del Human Biofluid RNA Atlas¹²², donde aproximadamente el 40% de las lecturas en plasma seminal correspondieron a tRFs. De manera consistente, el trabajo de Godoy et al. describió un perfil similar de sARNs en 12 biofluidos humanos, incluido el PS¹²³. La validación experimental mediante Northern blot confirmó la presencia de dichos fragmentos en plasma seminal y espermatozoides, respaldando los resultados obtenidos en los análisis bioinformáticos.

El análisis de los niveles de ARNs pequeños en plasma seminal reveló de manera consistente un aumento significativo de los tRFs en los individuos que no lograron el embarazo mediante ICSI, especialmente en aquellos con más de un ciclo fallido. Este patrón se observó tanto en el análisis exploratorio como en la validación posterior, y afectó a múltiples fragmentos derivados de ARNt, lo que sugiere una alteración global del perfil de tRFs más que cambios aislados en moléculas individuales. En concordancia con estas observaciones, estudios recientes han vinculado la expresión de tRFs espermáticos con distintos aspectos de la fertilidad masculina y resultados en reproducción asistida. Hua et al. demostraron que determinados tRFs se correlacionan con la calidad embrionaria en FIV²¹. Asimismo, Han et al. y Hekim et al. han propuesto a los tRFs como potenciales biomarcadores de alteraciones en la fertilidad masculina^{132,133}.

Funcionalmente, los tRFs han sido previamente asociados con procesos clave de la biología reproductiva, incluyendo la regulación de la traducción, la respuesta celular al estrés y la comunicación intercelular^{11,17,131}. En este sentido, un número creciente de estudios ha demostrado asociaciones significativas entre la expresión de tRFs y distintos parámetros de la calidad espermática, tales como la motilidad, la vitalidad y la integridad del ADN, lo que refuerza su relevancia funcional en el contexto de la fertilidad masculina^{11,131}.

Un hallazgo particularmente relevante de este estudio fue la ausencia de correlación entre los niveles de tRFs en plasma seminal y en espermatozoides, ya que durante el procedimiento de ICSI estas células son separadas del plasma seminal antes de la

microinyección. En los espermatozoides solo se observó niveles significativamente aumentados de 5'tRF-Lys en los pacientes que no lograron el embarazo, en concordancia con lo observado en plasma seminal. En relación con el estado funcional de los espermatozoides, el estudio preliminar de marcadores de madurez celular permitió detectar únicamente la expresión de GAPDH-S como marcador de madurez espermática y de SLFN1 como marcador asociado a embriogénesis temprana, sin observarse diferencias significativas entre ICSI (+) e ICSI (-). En conjunto, estos resultados indican que las fallas en la ICSI observadas en esta cohorte no se asociaron con alteraciones detectables en los marcadores de maduración espermática evaluados.

Desde una perspectiva metodológica, la implementación de ddPCR permitió una cuantificación absoluta más sensible y reproducible, con un mayor porcentaje de detección de muestras y menor variabilidad, especialmente en individuos ICSI (+). La capacidad de la ddPCR para detectar diferencias significativas en los niveles de 5'tRF-Gly incluso en subgrupos de pacientes con múltiples fallas de ICSI resalta su utilidad como herramienta metodológica para futuros estudios y potenciales aplicaciones. Sin embargo, al considerar la aplicabilidad clínica de una metodología, es fundamental evaluar no solo su sensibilidad analítica, sino también aspectos prácticos como el costo, la complejidad operativa y el tiempo requerido para la obtención de resultados. En este sentido, si bien la ddPCR demostró una mayor sensibilidad y robustez analítica en la cuantificación de tRFs de baja abundancia, estas ventajas deben ponderarse frente a sus limitaciones prácticas. A diferencia de la qPCR, que requiere un equipamiento relativamente simple y ampliamente disponible en laboratorios clínicos, la ddPCR demanda una infraestructura más compleja y costosa, lo que incrementa significativamente el costo del ensayo. Estudios previos estimaron que el costo por reacción de ddPCR puede triplicar al de la qPCR²⁰⁶. Asimismo, el tiempo total requerido para completar un ensayo de ddPCR es considerablemente mayor, ya que incluye etapas adicionales que prolongan el proceso analítico. Si bien la ddPCR representa una herramienta valiosa para estudios de investigación y validación de biomarcadores, su implementación como reemplazo directo de la qPCR en el ámbito clínico no se perfila actualmente como una alternativa superadora.

Dado que la angiogenina es la principal ribonucleasa implicada en la generación de fragmentos derivados de ARNt bajo estrés celular¹⁴⁷, se evaluó su expresión en plasma seminal y su posible relación con los niveles de tRFs. Como proteína secretada con actividad extracelular, ANG podría contribuir a la generación local de tRFs en este fluido mediante su acción sobre ARNt liberados por células del tracto reproductor masculino. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en los niveles de ANG entre los grupos estudiados, ni correlaciones consistentes entre la concentración de esta enzima y los distintos tRFs analizados en PS. Estos resultados sugieren que las alteraciones observadas en el perfil de estos fragmentos no estarían determinadas por cambios en la abundancia total de la enzima. En consecuencia, la biogénesis de los tRFs en plasma seminal podría depender de mecanismos regulatorios más complejos, como la modulación de la actividad enzimática, la contribución diferencial de distintos tipos celulares del tracto reproductor masculino o la influencia del entorno inflamatorio y endocrino. En este sentido, las correlaciones observadas entre angiogenina y hormonas esteroideas sugieren una posible interacción entre estos mediadores en el microambiente seminal.

Finalmente, el análisis de correlaciones reveló asociaciones específicas entre los niveles de tRFs en plasma seminal y parámetros seminales, inmunológicos y endocrinos, particularmente al analizar subgrupos de pacientes. Si bien los coeficientes de correlación fueron en general bajos, estas asociaciones sugieren que los tRFs podrían integrarse en redes complejas que vinculan inflamación, estado hormonal y función espermática. La presencia de correlaciones diferenciales entre los grupos ICSI (+) e ICSI (-), especialmente en individuos con múltiples fallas (≥ 2 Fallas), refuerza la noción de que los tRFs del plasma seminal podrían reflejar cambios en el microambiente seminal asociados al desenlace reproductivo.

En suma, los resultados de este capítulo demuestran que los fragmentos derivados de ARNt constituyen la principal población de ARNs pequeños en el plasma seminal humano y que su perfil se encuentra alterado en pacientes con fallas en la ICSI. Estos hallazgos sugieren que los tRFs podrían constituir biomarcadores informativos del

microambiente reproductivo masculino y de procesos asociados al éxito reproductivo en contextos de reproducción asistida.

6. Capítulo 3

Los macrófagos constituyen la población inmunitaria más abundante del epitelio epididimario, donde conforman una red densa tanto en el epitelio como en el intersticio^{207,208}. Entre sus funciones se destaca la regulación del microambiente inmunitario y de la integridad epitelial, así como la producción de citocinas y factores de crecimiento que permiten equilibrar mecanismos de defensa y tolerancia^{19,22,209,210}. Debido a esta localización y a su rol regulador, los macrófagos epididimarios emergen como posibles fuentes de pequeños ARNs no codificantes, como los fragmentos 5'-tRF, contribuyendo al contenido molecular del plasma seminal. En este contexto, con el objetivo de explorar de manera preliminar los mecanismos que podrían regular su producción y secreción, se realizaron estudios in vitro utilizando la línea celular monocítica THP-1 como modelo experimental simplificado, evaluándose el efecto de mediadores endocrinos sobre la producción y liberación de 5'-tRF. Asimismo, se examinó el impacto del plasma seminal sobre la respuesta macrofágica, como aproximación funcional para estudiar cómo señales solubles del microambiente seminal podrían influir en células inmunes. Este abordaje no pretende reproducir la complejidad del entorno in vivo, sino aportar evidencia preliminar sobre posibles interacciones entre el plasma seminal y el sistema inmune en el contexto reproductivo.

6.1. Resultados

6.1.1. Acción glucocorticoide sobre la contribución de 5'-tRF mediada por macrófagos

La línea celular THP-1 fue diferenciada a macrofago con PMA y tratada con dexametasona (Dex), un glucocorticoide sintético derivado del cortisol, para emular una respuesta sistémica al estrés y se coestimuló con LPS, para desarrollar un perfil proinflamatorio.

En primer lugar, se evaluó la viabilidad celular frente a la concentración más alta de Dex (10^{-6} M) y de las distintas concentraciones de Dex en presencia de coestimulación con LPS (100 ng/mL) ya que la combinación de estos factores puede inducir apoptosis. Tal

como se observa en la Figura 28, el tratamiento con Dex 10^{-6} + LPS 100 ng/ml produjo una disminución estadísticamente significativa en la viabilidad celular respecto al control, por lo que dicha condición fue descartada en los experimentos posteriores.

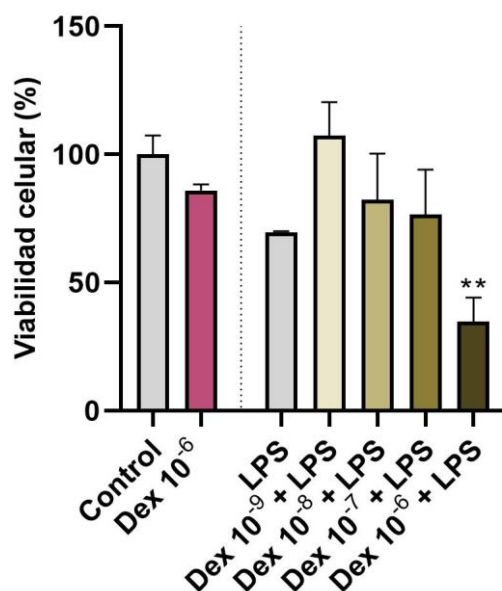


Figura 28. Viabilidad celular de macrófagos THP1 tratados con Dex y Dex + LPS. Se evaluó la viabilidad celular tras 24 hs de incubación con distintas concentraciones de Dex y LPS. Los resultados se expresan como media $\pm$ SEM (n=3). **p < 0.01, Test ANOVA unidireccional seguido del post test de Dunnett.

Para evaluar el modelo, se cuantificaron los niveles de la citoquina proinflamatoria IL-6 en los sobrenadantes de cultivo mediante ensayos ELISA. Se emplearon dos esquemas de tratamiento: (1) una condición control y tres condiciones con Dex a concentraciones finales de 10^{-7} , 10^{-8} y 10^{-9} M, y (2) una condición con LPS (100 ng/ml) y tres condiciones con LPS (100 ng/ml) y Dex a las mismas concentraciones mencionadas. En la Figura 29-A se observa que, en condiciones basales, los niveles de IL-6 fueron despreciables, independientemente de la concentración de Dex utilizada. En contraste, la exposición a LPS produjo un aumento robusto en la secreción de IL-6 (Figura 29-B), indicando la adquisición de un fenotipo M1 por parte de los macrófagos. La coincubación con Dex disminuyó la producción de IL-6 de manera dosis-dependiente, observándose diferencias estadísticamente significativas en la concentración más alta del glucocorticoide. En conjunto, estos resultados confirman la adecuada activación del

modelo inflamatorio y la capacidad de la dexametasona para modular dicha respuesta, validando el sistema experimental empleado.

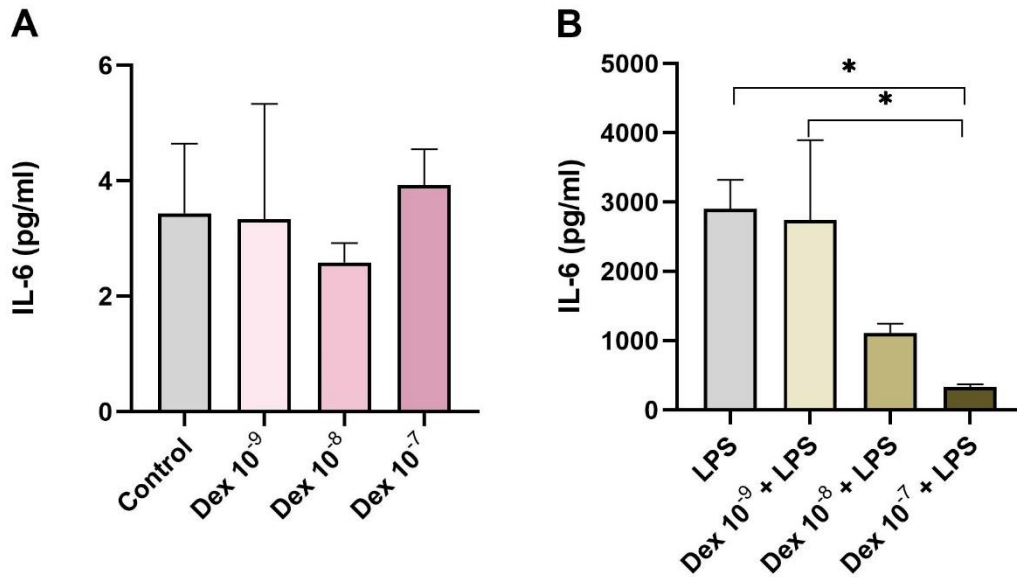


Figura 29. Niveles de IL-6 en el SN de cultivo de macrófagos THP-1 expuestos Dex y Dex con LPS. Se cuantificaron los niveles de IL-6 tras 24 hs de incubación con (A) distintas concentraciones de Dex y (B) distintas concentraciones de Dex + LPS. Los resultados se presentan como media $\pm$ SEM (n=3). *p < 0.05, ANOVA unidireccional seguido del prueba post test de Tukey.

Luego se evaluaron los niveles de 5'tRF tanto en los sobrenadantes como en las células tras los tratamientos con Dex. En los SN, los niveles de 5'tRF-Gly presentaron un aumento estadísticamente significativo en las concentraciones 10^{-8} y 10^{-7} respecto al control (Figura 30-A), observándose un comportamiento similar para 5'tRF-Glu (Figura 30-C). De igual manera, 5'tRF-Lys mostró la misma tendencia, aunque con diferencias estadísticamente significativas únicamente para la concentración 10^{-7} (Figura 30-B). En conjunto, estos resultados sugieren una regulación dosis-dependiente de los 5'tRF en el medio extracelular tras la exposición a Dex. En contraste, 5'tRF-Val no mostró variaciones en los SN a ninguna de las concentraciones de Dex, manteniéndose en valores cercanos al límite de detección. A nivel intracelular, solo se observó un aumento significativo del 5'tRF-Gly cuando las células fueron tratadas con la concentración de 10^{-7} (Figura 30-E), mientras que los niveles intracelulares de los demás 5'tRFs no

mostraron diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las concentraciones analizadas (Figura 30, panel inferior gris oscuro).

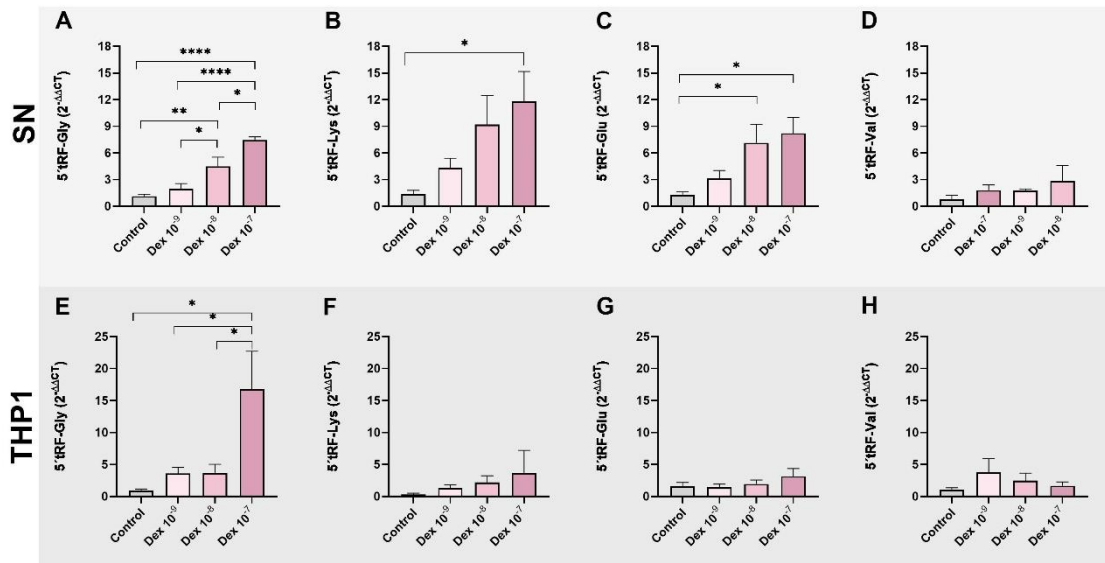


Figura 30. Niveles de 5'tRF en SN y en el compartimiento intracelular luego del tratamiento con Dex. Se determinaron los niveles de los ARNs pequeños (A) 5'tRF-Gly, (B) 5'tRF-Lys (C) 5'tRF-Glu y (D) 5'tRF-Val en SN (Panel superior gris claro) y (E) 5'tRF-Gly, (F) 5'tRF-Lys (G) 5'tRF-Glu y (H) 5'tRF-Val en células (Panel inferior gris oscuro), tras el tratamiento con Dex en las concentraciones 10^{-9} , 10^{-8} y 10^{-7} . Los resultados se presentan como media $\pm$ SEM (n=3). * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$. Test ANOVA unidireccional seguido de prueba post test de Tukey

Finalmente, se determinaron los niveles de 5'tRF en SN y células tras los tratamientos combinados con Dex + LPS. En los SN, los niveles de 5'tRF-Gly (Figura 31-A), 5'tRF-Glu (Figura 31-C) y 5'tRF-Val (Figura 31-D) permanecieron estables independientemente de las concentraciones de Dex + LPS evaluadas, mientras que 5'tRF-Lys exhibió un incremento pero este no alcanzó significancia estadística (Figura 31-B). En línea con los resultados de los tratamientos exclusivos con Dex, los niveles intracelulares de estos 5'tRF no mostraron variaciones estadísticamente significativas para ninguna concentración analizada (Figura 31, panel inferior en gris oscuro).

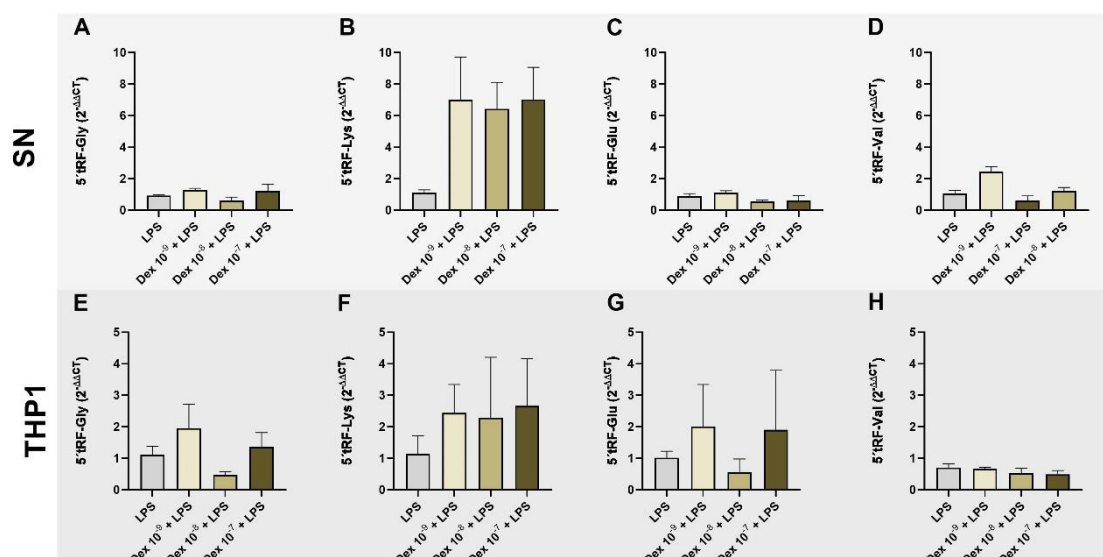


Figura 31. Niveles de 5'tRF en SN y en el compartimiento intracelular luego del tratamiento con Dex en un modelo inflamatorio (M1). Se determinaron los niveles de los ARNs pequeños (A) 5'tRF-Gly, (B) 5'tRF-Lys (C) 5'tRF-Glu y (D) 5'tRF-Val en SN (Panel superior gris claro) y (E) 5'tRF-Gly, (F) 5'tRF-Lys (G) 5'tRF-Glu y (H) 5'tRF-Val en células (Panel inferior gris oscuro), tras el tratamiento con LPS + Dex en las concentraciones 10^{-9} , 10^{-8} y 10^{-7} . Los resultados se presentan como media $\pm$ SEM (n=3). Test ANOVA unidireccional.

6.1.2. Acción androgénica sobre la contribución de 5'tRF mediada por macrófagos

Los macrófagos THP-1 fueron tratados con testosterona (T), una hormona esteroidea androgénica de origen gonadal, con el fin de emular señales del microambiente reproductivo masculino. Asimismo, las células fueron coestimuladas con LPS para inducir un perfil proinflamatorio y evaluar el efecto modulador de la T sobre macrófagos M1.

Con el objetivo de determinar las concentraciones adecuadas de trabajo, se realizó un ensayo de viabilidad celular mediante MTT utilizando distintas concentraciones de T y su coestimulación con LPS (50 ng/ml), esta concentración fue seleccionada para generar un estímulo inflamatorio moderado que permitiera evaluar posibles efectos moduladores de la testosterona. Como se observa en la Figura 32-A, las concentraciones de T no afectaron la viabilidad celular respecto del control. En contraste, cuando se aplicó la coestimulación con LPS, el tratamiento con T 20 nM + LPS 50 ng/ml produjo una

disminución significativa de la viabilidad (Figura 32-B). A partir de estos resultados, se seleccionaron las concentraciones de testosterona 1 y 10 nM para los experimentos posteriores.

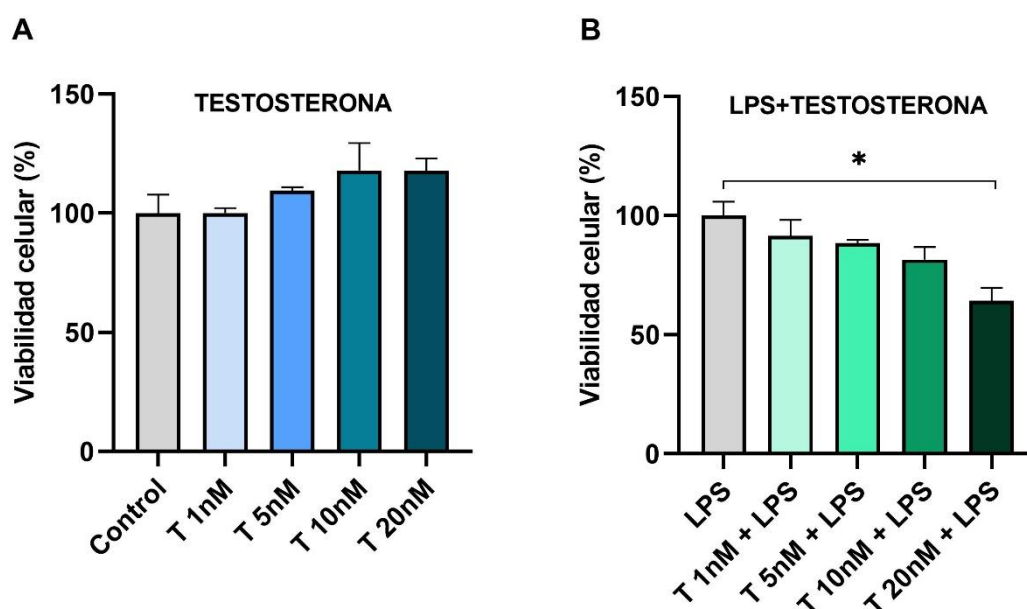


Figura 32. Viabilidad celular de macrófagos THP1 tratados con Testosterona y LPS. Se evaluó la viabilidad celular tras 24 hs de incubación con distintas concentraciones de (A) Testosterona y (B) Testosterona con LPS. Los resultados se expresan como media $\pm$ SEM (n=3). * $p \leq 0.05$, Test ANOVA unidireccional seguido de prueba post hoc de Dunnett.

Para evaluar el impacto de T sobre el fenotipo de los macrófagos y su potencial acción moduladora frente a un estímulo proinflamatorio, se cuantificaron los niveles de las citoquinas IL-10 e IL-6 en los sobrenadantes de cultivo mediante ensayos ELISA. Se cuantificaron los niveles de IL-10 en los tratamientos con T, dada la documentada acción antiinflamatoria de esta hormona en macrófagos²¹¹, mientras que IL-6 se cuantificó en condiciones de coestimulación con LPS, como marcador de la modulación del perfil proinflamatorio inducido por LPS. Para ello se empleó un diseño experimental que incluyó: (1) una condición control y dos condiciones tratadas con T (1 y 10 nM) para la

cuantificación de IL-10, y (2) una condición control estimulada con LPS (50 ng/ml) y dos condiciones con LPS en combinación con T (1 y 10 nM) para la cuantificación de IL-6.

Tal como se observa en la Figura 33, la estimulación con T 10 nM indujo un incremento significativo en la secreción de IL-10 respecto de la condición control (Figura 33-A), mientras que en los macrófagos expuestos a LPS, la coestimulación con T 10 nM disminuyó de manera significativa los niveles de IL-6 en comparación con la condición tratada únicamente con LPS (Figura 33-B). En línea con lo reportado en la bibliografía, estos resultados indican que la señalización inducida por T es capaz de modular la respuesta inflamatoria en estas células, potenciando perfiles asociados a la resolución o atenuación de procesos inflamatorios²¹¹⁻²¹³.

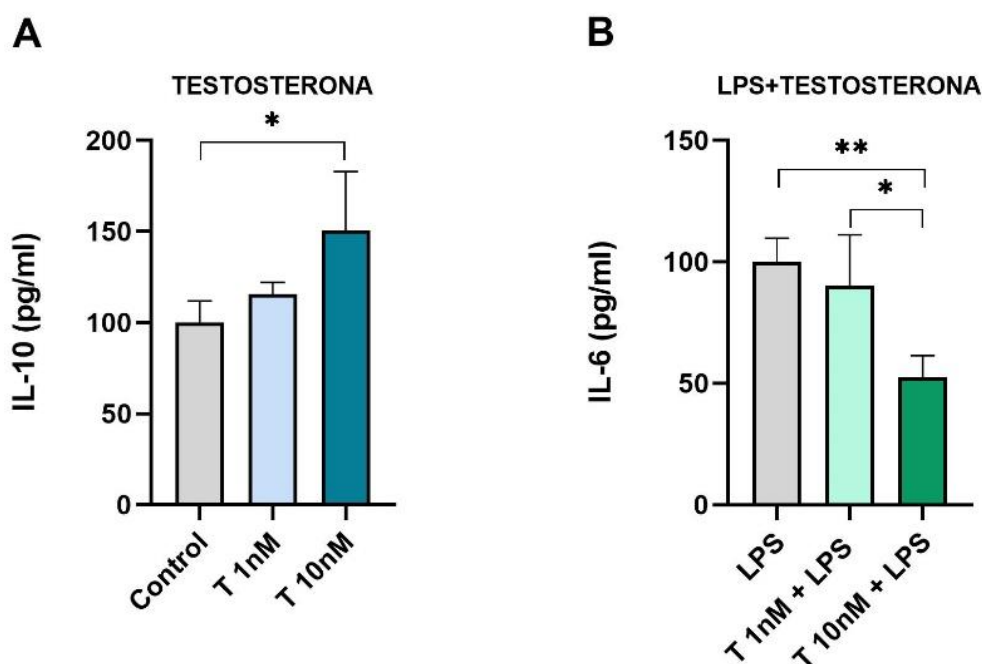


Figura 33. Niveles de citoquinas en el SN de cultivo de macrófagos THP-1 expuestos a T y T+LPS. Se determinaron los niveles de (A) IL-10 tras 24 hs de incubación con T y (B) IL-6 tras 24 hs de incubación con T+LPS. Los resultados se expresan como media $\pm$ SEM (n=3). * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, Test ANOVA unidireccional seguido de prueba post test de Tukey.

Con el objetivo de evaluar si la estimulación con T, sola o en combinación con LPS, modula la producción y liberación de fragmentos derivados de ARNt, se cuantificaron los niveles de 5'tRF en las fracciones intra- y extracelulares de macrófagos THP-1.

En SN, la estimulación con T se asoció con un incremento significativo de la concentración de 5'tRF-Gly en la condición T 10 nM (Figura 34-A). Este efecto no se observó con T 1 nM ni en el resto de los 5'tRF analizados (Figura 34-B,C,D), cuyos niveles no mostraron diferencias respecto de la condición basal, sugiriendo un efecto selectivo de la T sobre la liberación de 5'tRF-Gly.

En el compartimiento intracelular se observó un patrón diferencial. La estimulación con T 1 nM produjo un aumento no significativo de 5'tRF-Gly y 5'tRF-Lys respecto del control (Figura 34-E,F), mientras que la condición con T 10 nM resultó en niveles estadísticamente reducidos de ambos fragmentos en comparación con T 1 nM. Por su parte, los fragmentos 5'tRF-Glu y 5'tRF-Val mostraron una tendencia al aumento con T 1 nM y a la disminución con T 10 nM, aunque sin alcanzar significancia estadística (Figura 34-G,H).

En conjunto, estos resultados evidencian que la testosterona regula de manera diferencial los niveles de 5'tRF en macrófagos THP-1.

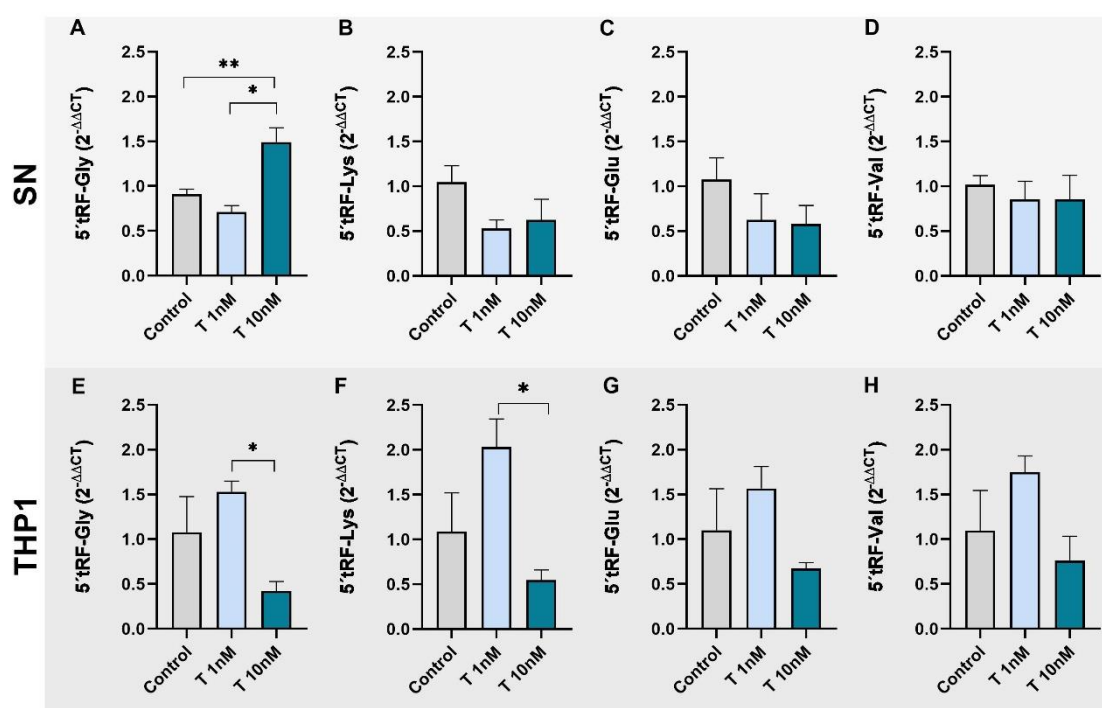


Figura 34. Niveles de 5'tRF en SN y en el compartimiento intracelular luego del tratamiento con T. Se determinaron los niveles de los ARNs pequeños (A) 5'tRF-Gly, (B) 5'tRF-Lys (C) 5'tRF-Glu y (D) 5'tRF-Val

en SN (Panel superior gris claro) y (E) 5'tRF-Gly, (F) 5'tRF-Lys (G) 5'tRF-Glu y (H) 5'tRF-Val en células (Panel inferior gris oscuro), tras el tratamiento con T en las concentraciones 1nM y 10nM. Los resultados se presentan como media $\pm$ SEM (n=3). *p $\leq$ 0.05, **p $\leq$ 0.01. Test ANOVA unidireccional seguido de prueba post test de Tukey.

Para evaluar el impacto de la testosterona en la producción y secreción de 5'tRF por macrófagos en un contexto proinflamatorio, se cuantificaron los niveles de 5'tRF en las fracciones intra- y extracelulares de células THP-1 coestimulados con LPS. En el SN, los niveles de 5'tRF-Gly, 5'tRF-Lys, 5'tRF-Glu y 5'tRF-Val no mostraron diferencias significativas frente a la condición control, observándose incluso una tendencia a la reducción para 5'tRF-Glu y 5'tRF-Val (Figura 35-A,D), la cual no alcanza significado estadístico (p=0,06). Estos resultados sugieren que la testosterona no favorece la liberación de estos fragmentos bajo un contexto inflamatorio.

En contraste, en la fracción intracelular la coestimulación de T con LPS produjo un aumento significativo de 5'tRF-Gly, 5'tRF-Lys, 5'tRF-Glu y 5'tRF-Val en comparación con LPS (Figura 35-E,H). Los resultados obtenidos para 5'tRF-Gly y 5'tRF-Glu sugieren un patrón dosis-dependiente, aunque las diferencias significativas solo se registraron en la concentración máxima. En conjunto, los datos obtenidos indican que, bajo condiciones inflamatorias, la testosterona promueve la acumulación intracelular de 5'tRF sin estimular su liberación al medio extracelular.

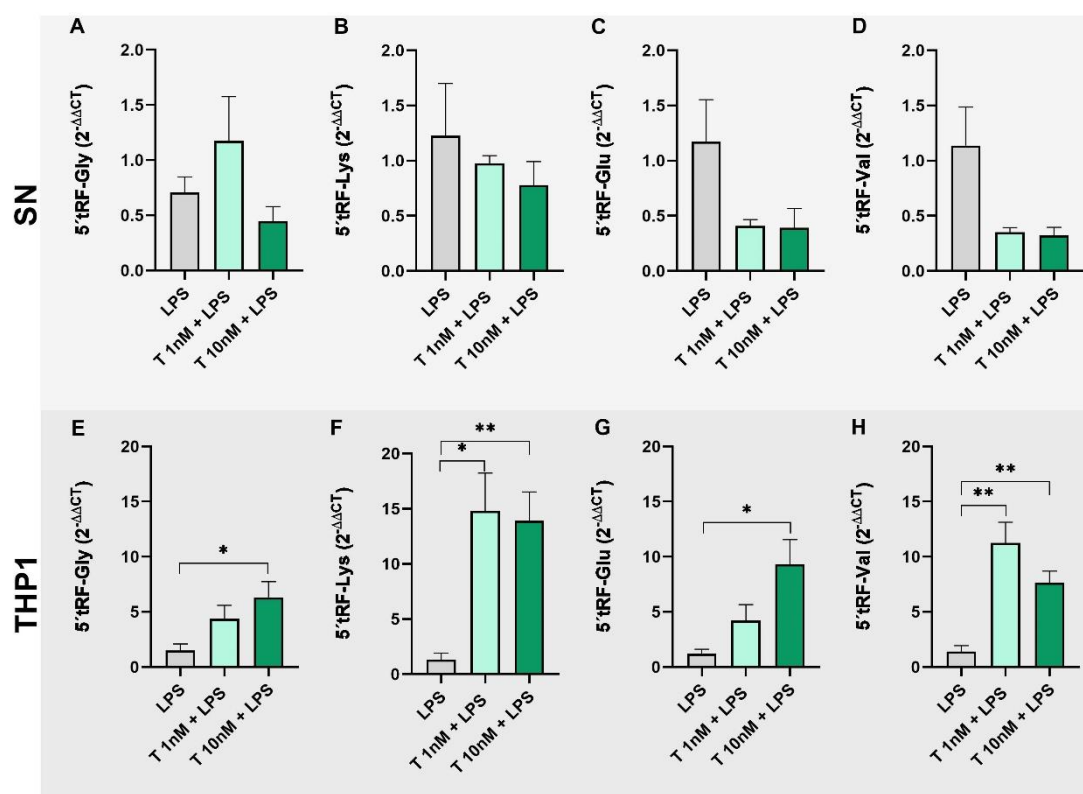


Figura 35. Niveles de 5'tRF en SN y en el compartimiento intracelular luego del tratamiento con T en un modelo inflamatorio. Se determinaron los niveles de los ARNs pequeños (A) 5'tRF-Gly, (B) 5'tRF-Lys (C) 5'tRF-Glu y (D) 5'tRF-Val en SN (Panel superior gris claro) y (E) 5'tRF-Gly, (F) 5'tRF-Lys (G) 5'tRF-Glu y (H) 5'tRF-Val en células (Panel inferior gris oscuro), tras el tratamiento con LPS + T en las concentraciones 1nM y 10nM. Los resultados se presentan como media $\pm$ SEM (n=3). * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$. Test ANOVA unidireccional seguido de prueba post test de Tukey.

6.1.2. Efecto del plasma seminal sobre la respuesta macrofágica in vitro

El plasma seminal contiene diversos mediadores solubles con potencial capacidad de interactuar con células del sistema inmune. Con el objetivo de explorar preliminarmente el efecto de estos componentes sobre macrófagos, se realizó un experimento exploratorio utilizando un modelo in vitro basado en la línea monocítica humana THP-1.

En primer lugar, se realizaron ensayos de MTT con el objetivo de evaluar la posible citotoxicidad del plasma seminal sobre los macrófagos THP-1. Tal como se muestra en la Figura 36, las distintas concentraciones de plasma seminal ensayadas no afectaron la

viabilidad celular. A partir de estos resultados se seleccionó una dilución final de 1:100 en el medio de cultivo para la preparación de los medios condicionados utilizados en los experimentos posteriores. Se evaluaron dos condiciones experimentales: plasma seminal proveniente de pacientes ICSI (+) y plasma seminal de pacientes con ≥ 2 Fallas reproductivas (ICSI (-)). En ambos casos se utilizaron pools de al menos tres muestras de plasma seminal para cada condición.

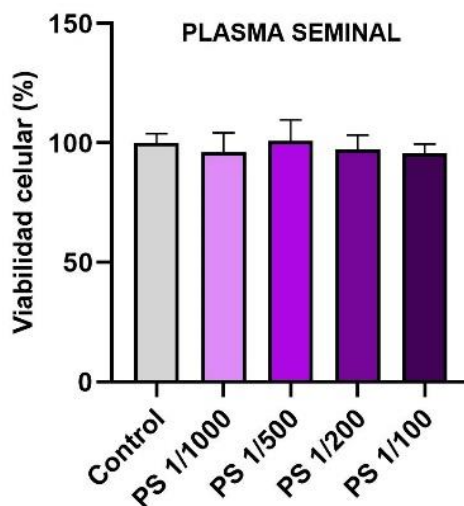


Figura 36. Viabilidad celular de macrófagos THP1 tratados con PS. Se evaluó la viabilidad celular tras 24 hs de incubación con distintas diluciones de PS. Los resultados se expresan como media $\pm$ SEM (n=3). Test ANOVA unidireccional.

En los SN de los cultivos celulares se cuantificaron las citoquinas IL-1 β , IL-6, IL-8 e IL-10 mediante ensayos ELISA. Dado que el plasma seminal contiene citoquinas en su composición, se determinaron sus niveles basales con el fin de controlar su posible contribución al estímulo. Los niveles basales detectados en el plasma seminal fueron aproximadamente dos órdenes de magnitud inferiores a los observados tras la estimulación. Estos valores se restaron de las mediciones finales para evitar la sobreestimación de la respuesta inducida en los macrófagos.

En la Figura 37 se observa que los macrófagos estimulados con el pool ICSI (+) presentaron niveles significativamente mayores de IL-10 en comparación con aquellos

estimulados con el pool ≥ 2 Fallas (Figura 37-A). De manera inversa, los macrófagos expuestos al pool ≥ 2 Fallas mostraron una mayor producción de IL-8 respecto de los estimulados con el pool ICSI (+) (Figura 37-C).

En relación con IL-1 β , no se observaron diferencias significativas entre las dos muestras evaluadas. Sin embargo, ambas presentaron un aumento en los niveles respecto del control. Este incremento alcanzó significancia estadística únicamente en el pool ICSI (+) (Figura 37-B). Finalmente, para IL-6 se observaron únicamente niveles basales, sin cambios detectables entre grupos ni frente a la condición de control (Figura 37-D).

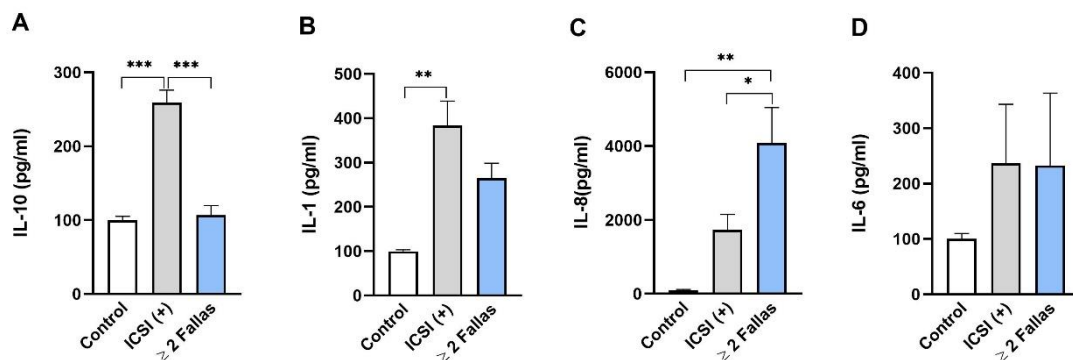


Figura 37. Niveles de citoquinas en el SN de cultivo de macrófagos THP-1 expuestos a PS. Se cuantificaron (A) IL-10, (B) IL-1 β , (C) IL-8 y (D) IL-6 en los sobrenadantes de cultivo tras 24 h de incubación con PS de individuos ICSI (+) (n=6) y ≥ 2 Fallas (n=3). Los resultados se expresan como media $\pm$ SEM (n=3). *p $\leq$ 0.05, **p $\leq$ 0.01, ***p $\leq$ 0.001, Test ANOVA unidireccional seguido de prueba post test de Tukey.

7.2. Discusiones

El epidídimo posee un rol clave en la modulación del repertorio de los sARNs en espermatozoides durante su maduración¹¹. Este órgano alberga diversas células del sistema inmune, principalmente fagocitos mononucleares, que participan en mecanismos de inmunotolerancia. Entre ellas, los macrófagos tisulares integran señales metabólicas e inmunorreguladoras que contribuyen al mantenimiento de la homeostasis del órgano^{19,23}. De manera notable, algunos macrófagos intraepiteliales extienden prolongaciones citoplasmáticas hacia el lumen epididimario²¹⁴, lo que sugiere un posible rol en la comunicación entre los compartimentos tisular y luminal. En este contexto, y con el objetivo de explorar de manera preliminar los mecanismos que podrían regular la producción y secreción de tRF, se desarrollaron estudios *in vitro* utilizando la línea monocítica THP-1 como modelo experimental simplificado. Los resultados obtenidos sugieren que los macrófagos podrían contribuir activamente al perfil de 5'-tRFs presente en el plasma seminal, a través de mecanismos regulados por señales endocrinas.

En lo que respecta a la modulación hormonal, un aporte distintivo de este trabajo es la demostración de que tanto glucocorticoides como andrógenos pueden modular la producción y secreción de 5'-tRFs en macrófagos. Los macrófagos THP-1 tratados con dexametasona, mostraron un incremento dosis-dependiente en los niveles de 5'-tRFs extracelulares. Este patrón resulta consistente con estudios previos que indican que, en condiciones de estrés, se induce la escisión de ARNt y la generación de tRFs que se secretan al medio extracelular^{146,205}.

En nuestro modelo experimental, la estimulación con LPS indujo un aumento robusto en la secreción de IL-6, confirmando la adquisición de un fenotipo proinflamatorio tipo M1. La coincubación con Dex redujo la producción de IL-6 de manera dosis-dependiente, validando la acción antiinflamatoria clásica de los glucocorticoides²¹⁵. Por su parte, el tratamiento con LPS abolió la secreción basal de 5'-tRFs. Notablemente, aunque la Dex logró revertir parcialmente la secreción de IL-6, no restableció la liberación de 5'-tRFs en

el contexto inflamatorio. El análisis de los tratamientos combinados Dex + LPS mostró que los niveles extracelulares de 5'tRF-Gly, 5'tRF-Glu y 5'tRF-Val permanecieron estables en todas las concentraciones evaluadas, mientras que 5'tRF-Lys mostró solo una tendencia no significativa al incremento. Estos resultados indican que la regulación de los 5'-tRFs no responde linealmente al eje inflamación-resolución mediado por glucocorticoides. No obstante, es importante considerar que la inmunofisiología del epidídimo se caracteriza por una baja reactividad inflamatoria y un elevado estado de tolerancia inmunológica, lo que indica que las condiciones proinflamatorias inducidas por LPS representarían un escenario no fisiológico en individuos normozoospermicos sanos.

En lo que respecta a los andrógenos, nuestros resultados demuestran que la testosterona ejerce un efecto inmunomodulador en macrófagos THP-1, caracterizado por un incremento significativo de IL-10 en condiciones basales y una reducción de IL-6 en células coestimuladas con LPS. Estos hallazgos son consistentes con evidencia previa que describe a los andrógenos como moduladores negativos de la respuesta inflamatoria^{216,217}.

En este contexto, se observó un aumento selectivo de 5'-tRF-Gly en los sobrenadantes de macrófagos expuestos a concentraciones elevadas de testosterona, lo que sugiere que la señalización androgénica no solo modula citoquinas, sino también podría modular de manera específica la biogénesis y/o liberación de determinados fragmentos derivados de ARNt. En línea con esta observación, se ha descrito que diversos tRFs se expresan de manera dependiente de hormonas sexuales en líneas celulares de cáncer de mama y próstata²¹⁸, lo que respalda la existencia de una regulación hormonal de estos pequeños ARN.

Asimismo, en la coestimulación de LPS y testosterona, se evidenció una acumulación intracelular de tRFs. Este fenómeno podría estar asociado a procesos de regulación postranscripcional inducidos durante la respuesta inflamatoria, considerando que múltiples tRFs han sido involucradas en una variedad de procesos celulares^{131,144-146}.

Por último, se examinó el impacto del plasma seminal sobre la línea celular THP 1 para estudiar cómo señales solubles del microambiente seminal podrían influir en células inmunes. Si bien este sistema no reproduce la complejidad del microambiente del tracto reproductor femenino, constituye una aproximación funcional preliminar para evaluar cómo este podría influir en eventos tempranos posteriores a la eyaculación. Lejos de constituir un mero vehículo para el transporte espermático, el PS actúa como un modulador inmunológico activo capaz de inducir tolerancia en el tracto reproductivo femenino y contiene múltiples moléculas regulatorias con potencial impacto sobre la fertilidad²¹⁹.

Nuestros resultados muestran que el SN de los macrófagos estimulados con PS proveniente de individuos que lograron el embarazo (ICSI (+)) presentaron niveles significativamente mayores de IL-10 en comparación con aquellos estimulados con PS de pacientes con fallas reproductivas repetidas. Dado que IL-10 constituye una citocina característica del fenotipo M2 y un mediador central en la inducción de tolerancia inmunológica, estos datos indican que el PS asociado a un desenlace reproductivo favorable posee una mayor capacidad para contener la respuesta inflamatoria. En línea con estos resultados, se ha demostrado que los exosomas derivados del PS pueden ser fagocitados por monocitos y por células tipo THP-1, promoviendo su polarización hacia macrófagos con fenotipo M2 y aumentando la expresión de marcadores asociados a este perfil^{220,221}.

De manera complementaria, los macrófagos expuestos a PS de pacientes con fallas repetidas mostraron un mayor nivel de IL-8 en SN, quimiocina vinculada al reclutamiento de neutrófilos y a la amplificación de respuestas inflamatorias. Estos hallazgos son consistentes con lo reportado por Jena et al., quienes demostraron que alteraciones en los niveles de citocinas presentes en los componentes seminales pueden contribuir a una modulación inmunológica deteriorada y a un desarrollo placentario inadecuado, constituyendo un posible factor paterno en la pérdida recurrente del embarazo²²². Estos resultados respaldan la hipótesis de que el PS proveniente de individuos con fallas reproductivas recurrentes podría presentar una capacidad reducida

para modular apropiadamente la tolerancia inmunológica femenina. Asimismo, el hecho de que los exosomas seminales sean internalizados por monocitos y pueda reprogramar su perfil funcional refuerza la noción de que el plasma seminal transporta señales moleculares capaces de reflejar el estado funcional del espermatozoide y del tracto reproductor masculino, consolidando su papel como mediador activo en la comunicación inmunoreproductiva.

7. Conclusiones

- Los parámetros espermáticos resultaron insuficientes para discriminar entre pacientes con éxito o fracaso reproductivo, confirmando la necesidad de incorporar biomarcadores moleculares complementarios para la evaluación de la fertilidad masculina.
- Se observaron variaciones en los niveles hormonales y de mediadores inflamatorios entre los grupos analizados; sin embargo, estas diferencias no evidenciaron asociaciones robustas con el desenlace reproductivo.
- Se identificaron y cuantificaron fragmentos derivados de ARN de transferencia (5'-tRFs) tanto en plasma seminal como en espermatozoides, demostrando su presencia estable y su potencial utilidad como marcadores biológicos en muestras seminales
- Se observaron aumentos significativos en la abundancia de los tRFs: 5'tRF-Glu, 5'tRF-Lys, 5'tRF-Gly y 5'tRF-Val en plasma seminal en el grupo que no logró el embarazo, mientras que a nivel espermático solo se detectó un incremento específico de 5'tRF-Lys, lo que sugiere perfiles moleculares diferenciales asociados al desenlace reproductivo.
- La optimización de la cuantificación de 5'tRF-Gly mediante droplet digital PCR permitió mejorar la sensibilidad, precisión y reproducibilidad en la detección de 5'-tRFs. Sin embargo, su mayor costo, requerimientos de infraestructura y complejidad operativa limitan su implementación en análisis clínicos de rutina.
- Los ensayos in vitro con macrófagos derivados de la línea THP-1 demostraron que la estimulación hormonal modula la producción y secreción de tRFs, sugiriendo que estos mediadores podrían participar en los mecanismos que regulan su acumulación en el plasma seminal.
- Los ensayos in vitro de interacción entre plasma seminal y macrófagos mostraron que el PS de pacientes con fallas reproductivas presentó una capacidad reducida para promover respuestas tipo tolerogénicas, relevantes

para los eventos tempranos posteriores a la eyaculación en el tracto reproductor femenino.

8. Bibliografía

1. Carneiro, J. & Junqueira, L. C. U. *Histología Básica: Texto y Atlas*. (Médica Panamericana, Mexico, D.F., 2015).
2. Ross, M. & Pawlina, W. *Histología*. (Médica Panamericana, 2007).
3. Hammer, G. D. & McPhee, S. J. *Fisiopatología de La Enfermedad: Una Introducción a La Medicina Clínica*. (McGraw-Hill Interamericana, 2015).
4. Urbina, M. T. & Lerner Bieber, J. *Fertilidad y reproducción asistida*. (Médica Panamericana, 2009).
5. Arteaga Martínez, M. & García Peláez, I. *Embriología humana y biología del desarrollo*. (Médica Panamericana, 2025).
6. Gilbert, S. F. *Biología Del Desarrollo*. (Médica Panamericana, 2005).
7. Pawlowski, M. *Gametogénesis y genoma humano*. (Cambridge Stanford Books, 2019).
8. Carlson, B. M. *Human Embryology and Developmental Biology*. (Elsevier, 2019).
9. Nätt, D. & Öst, A. Male reproductive health and intergenerational metabolic responses from a small RNA perspective. *J. Intern. Med.* **288**, 305–320 (2020).
10. Georgiadis, A. P. *et al.* High quality RNA in semen and sperm: isolation, analysis and potential application in clinical testing. *J. Urol.* **193**, 352–359 (2015).
11. Sharma, U. *et al.* Biogenesis and function of tRNA fragments during sperm maturation and fertilization in mammals. *Science* **351**, 391–396 (2016).
12. Chen, Q., Yan, W. & Duan, E. Epigenetic inheritance of acquired traits through sperm RNAs and sperm RNA modifications. *Nat. Rev. Genet.* **17**, 733–743 (2016).

13. Conine, C. C., Sun, F., Song, L., Rivera-Pérez, J. A. & Rando, O. J. Small RNAs Gained during Epididymal Transit of Sperm Are Essential for Embryonic Development in Mice. *Dev. Cell* **46**, 470-480.e3 (2018).
14. Weigel Muñoz, M., Carvajal, G., Curci, L., Gonzalez, S. N. & Cuasnicu, P. S. Relevance of CRISP proteins for epididymal physiology, fertilization, and fertility. *Andrology* **7**, 610–617 (2019).
15. Trigg, N. A. & Conine, C. C. Epididymal acquired sperm microRNAs modify post-fertilization embryonic gene expression. *Cell Rep.* **43**, 114698 (2024).
16. Jodar, M. Sperm and seminal plasma RNAs: what roles do they play beyond fertilization? *Reproduction* **158**, R113–R123 (2019).
17. Chen, Q. *et al.* Sperm tsRNAs contribute to intergenerational inheritance of an acquired metabolic disorder. *Science* **351**, 397–400 (2016).
18. Sullivan, R., Légaré, C., Lamontagne-Proulx, J., Breton, S. & Soulet, D. Revisiting structure/functions of the human epididymis. *Andrology* **7**, 748–757 (2019).
19. Wijayarathna, R. & Hedger, M. P. Activins, follistatin and immunoregulation in the epididymis. *Andrology* **7**, 703–711 (2019).
20. Gervasi, M. G. & Visconti, P. E. Molecular changes and signaling events occurring in sperm during epididymal maturation. *Andrology* **5**, 204–218 (2017).
21. Hua, M. *et al.* Identification of small non-coding RNAs as sperm quality biomarkers for in vitro fertilization. *Cell Discov.* **5**, 20 (2019).
22. Da Silva, N. & Barton, C. R. Macrophages and dendritic cells in the post-testicular environment. *Cell Tissue Res.* **363**, 97–104 (2016).
23. Glass, C. K. & Natoli, G. Molecular control of activation and priming in macrophages. *Nat. Immunol.* **17**, 26–33 (2016).

24. Xie, Q. *et al.* The Role of Kisspeptin in the Control of the Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Axis and Reproduction. *Front. Endocrinol.* **13**, 925206 (2022).
25. Silverthorn, D. U. *Fisiología humana: un enfoque integrado*. (Ed. Médica Panamericana, 1982).
26. Vashisht, A. & Gahlay, G. K. Understanding seminal plasma in male infertility: emerging markers and their implications. *Andrology* **12**, 1058–1077 (2024).
27. Samanta, L., Parida, R., Dias, T. R. & Agarwal, A. The enigmatic seminal plasma: a proteomics insight from ejaculation to fertilization. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **16**, 41 (2018).
28. Patton, K. T. & Thibodeau, G. A. *Anatomía y fisiología*. (Elsevier España, 2013).
29. Šterzl, I., Hampl, R., Hill, M., Hrdá, P. & Matucha, P. Immunomodulatory cytokines in human seminal plasma correlate with immunomodulatory steroids. *Steroids* **68**, 725–731 (2003).
30. Wolff, H. The biologic significance of white blood cells in semen. *Fertil. Steril.* **63**, 1143–1157 (1995).
31. Witkin, S. S. Mechanisms of active suppression of the immune response to spermatozoa. *Am. J. Reprod. Immunol. Microbiol. AJRIM* **17**, 61–64 (1988).
32. Denny, T. N. *et al.* Evaluation of T-lymphocyte subsets present in semen and peripheral blood of healthy donors: a report from the heterosexual transmission study. *Cytometry* **20**, 349–355 (1995).
33. Dousset, B. *et al.* Seminal cytokine concentrations (IL-1beta, IL-2, IL-6, sR IL-2, sR IL-6), semen parameters and blood hormonal status in male infertility. *Hum. Reprod.* **12**, 1476–1479 (1997).
34. Hampl, R., Vitku, J., Heracek, J., Sobotka, V. & Stárka, L. Hormones and endocrine disruptors in human seminal plasma. *Endocr. Regul.* **47**, 149–58 (2013).

35. *Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen*. (World Health Organization, Geneva, 2010).
36. Balhorn, R. The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome Biol.* **8**, 227 (2007).
37. Oliva, R. Protamines and male infertility. *Hum. Reprod. Update* **12**, 417–435 (2006).
38. Teves, M. E. & Roldan, E. R. S. Sperm bauplan and function and underlying processes of sperm formation and selection. *Physiol. Rev.* **102**, 7–60 (2022).
39. Fawcett, D. W. The mammalian spermatozoon. *Dev. Biol.* **44**, 394–436 (1975).
40. Inaba, K. Molecular Architecture of the Sperm Flagella: Molecules for Motility and Signaling. *Zoolog. Sci.* **20**, 1043–1056 (2003).
41. Turner, R. M. Moving to the beat: a review of mammalian sperm motility regulation. *Reprod. Fertil. Dev.* **18**, 25–38 (2005).
42. Gameiro, S. & Finnigan, A. Long-term adjustment to unmet parenthood goals following ART: a systematic review and meta-analysis. *Hum. Reprod. Update* **23**, 322–337 (2017).
43. Ostermeier, G. C., Dix, D. J., Miller, D., Khatri, P. & Krawetz, S. A. Spermatozoal RNA profiles of normal fertile men. *The Lancet* **360**, 772–777 (2002).
44. Sharma, U. Paternal Contributions to Offspring Health: Role of Sperm Small RNAs in Intergenerational Transmission of Epigenetic Information. *Front. Cell Dev. Biol.* **7**, (2019).
45. Miller, D., Ostermeier, G. C. & Krawetz, S. A. The controversy, potential and roles of spermatozoal RNA. *Trends Mol. Med.* **11**, 156–163 (2005).
46. Cannarella, R. *et al.* Human sperm RNA in male infertility. *Nat. Rev. Urol.* **22**, 92–115 (2025).

47. Maegawa, M. *et al.* A repertoire of cytokines in human seminal plasma. *J. Reprod. Immunol.* **54**, 33–42 (2002).
48. Politch, J. A., Tucker, L., Bowman, F. P. & Anderson, D. J. Concentrations and significance of cytokines and other immunologic factors in semen of healthy fertile men. *Hum. Reprod.* **22**, 2928–2935 (2007).
49. Fraczek, M. & Kurpisz, M. Cytokines in the male reproductive tract and their role in infertility disorders. *J. Reprod. Immunol.* **108**, 98–104 (2015).
50. J, S., A, K., M, K.-N. & M, F.-S. The Potential Role of Seminal Plasma in the Fertilization Outcomes. *BioMed Res. Int.* **2019**, (2019).
51. Álvarez-Rodríguez, M. & Martínez-Pastor, F. Molecular Determinants of Seminal Plasma on Sperm Biology and Fertility. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 3555 (2021).
52. Wiweko, B. *et al.* Ten years of in vitro fertilization in Indonesia: Access to infertility care in a developing country. *Int. J. Gynaecol. Obstet. Off. Organ Int. Fed. Gynaecol. Obstet.* **165**, 1144–1150 (2024).
53. Rochdi, C. *et al.* Epidemiology and occupational risk factors of male infertility based on 3,025 patients in Eastern Morocco during 2021-2023: a cohort study. *Obstet. Gynecol. Sci.* **68**, 198–209 (2025).
54. Lotti, F. *et al.* The European Academy of Andrology (EAA) ultrasound study on healthy, fertile men: clinical, seminal and biochemical characteristics. *Andrology* **8**, 1005–1020 (2020).
55. Kovac, J. R., Pastuszak, A. W. & Lamb, D. J. The use of genomics, proteomics, and metabolomics in identifying biomarkers of male infertility. *Fertil. Steril.* **99**, 998–1007 (2013).
56. Tüttelmann, F., Ruckert, C. & Röpke, A. Disorders of spermatogenesis. *Med. Genet.* **30**, 12–20 (2018).

57. Bhattacharya, I., Sharma, S. S. & Majumdar, S. S. Etiology of Male Infertility: an Update. *Reprod. Sci.* **31**, 942–965 (2024).
58. Sun, H. *et al.* Global, regional, and national prevalence and disability-adjusted life-years for infertility in 195 countries and territories, 1990–2017: results from a global burden of disease study, 2017. *Aging* **11**, 10952–10991 (2019).
59. Winters, B. R. & Walsh, T. J. The Epidemiology of Male Infertility. *Urol. Clin. North Am.* **41**, 195–204 (2014).
60. Barrett, K. E., Barman, S. M., Brooks, H. L. & Yuan, J. X.-J. *Ganong Fisiología Médica*. (McGraw Hill Medical, 2020).
61. Rocco, L., Saleh, R., Mahmutoglu, A. M., Shah, R. & Agarwal, A. Obesity and male infertility - a tenuous relationship: Facts discerned for the busy clinicians. *Arab J. Urol. Int. J.* **23**, 169–176.
62. Prusak, M., Brylka, K. & Derwich, K. Male infertility as a late side effect of oncological treatment of Hodgkin lymphoma in childhood and adolescents and the possible prevention. *Front. Oncol.* **15**, (2025).
63. Jungwirth, A. *et al.* European Association of Urology guidelines on Male Infertility: the 2012 update. *Eur. Urol.* **62**, 324–332 (2012).
64. Assidi, M. Infertility in Men: Advances towards a Comprehensive and Integrative Strategy for Precision Theranostics. *Cells* **11**, 1711 (2022).
65. Chao, H.-H., Zhang, Y., Dong, P.-Y., Gurunathan, S. & Zhang, X.-F. Comprehensive review on the positive and negative effects of various important regulators on male spermatogenesis and fertility. *Front. Nutr.* **9**, 1063510 (2023).
66. Ares, R. *et al.* Evaluación de parámetros seminales y factores de riesgo asociados a infertilidad en hombres, Misiones, Argentina, 2019-2022. *Rev. Soc. Argent. Endocrinol. Ginecológica Reprod.* **32**, 9–18 (2025).

67. Gül, M. *et al.* Male Infertility: New Developments, Current Challenges, and Future Directions. *World J. Mens Health* **42**, 502–517 (2024).
68. Turner, K. A. *et al.* Male Infertility is a Women's Health Issue—Research and Clinical Evaluation of Male Infertility Is Needed. *Cells* **9**, 990 (2020).
69. Aitken, R. J. The Male Is Significantly Implicated as the Cause of Unexplained Infertility. *Semin. Reprod. Med.* **38**, 3–20 (2020).
70. Templeton, A. A. & Penney, G. C. The incidence, characteristics, and prognosis of patients whose infertility is unexplained. *Fertil. Steril.* **37**, 175–182 (1982).
71. Hamada, A., Esteves, S. C., Nizza, M. & Agarwal, A. Unexplained male infertility: diagnosis and management. *Int. Braz J Urol Off. J. Braz. Soc. Urol.* **38**, 576–594 (2012).
72. Tesarik, J. Lifestyle and Environmental Factors Affecting Male Fertility, Individual Predisposition, Prevention, and Intervention. *Int. J. Mol. Sci.* **26**, (2025).
73. Levine, H. *et al.* Temporal trends in sperm count: a systematic review and meta-regression analysis of samples collected globally in the 20th and 21st centuries. *Hum. Reprod. Update* **29**, 157–176 (2023).
74. Gaskins, A. J., Colaci, D. S., Mendiola, J., Swan, S. H. & Chavarro, J. E. Dietary patterns and semen quality in young men. *Hum. Reprod.* **27**, 2899–2907 (2012).
75. Leisegang, K. & Dutta, S. Do lifestyle practices impede male fertility? *Andrologia* **53**, e13595 (2021).
76. Anderson, K., Nisenblatt, V. & Norman, R. Lifestyle factors in people seeking infertility treatment - A review. *Aust. N. Z. J. Obstet. Gynaecol.* **50**, 8–20 (2010).
77. Bhongade, M. B. *et al.* Effect of psychological stress on fertility hormones and seminal quality in male partners of infertile couples. *Andrologia* **47**, 336–342 (2015).

78. Liberman, A. C., Druker, J., Garcia, F. A., Holsboer, F. & Arzt, E. Intracellular Molecular Signaling. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1153**, 6–13 (2009).
79. Oakley, R. H. & Cidlowski, J. A. The Biology of the Glucocorticoid Receptor: New Signaling Mechanisms in Health and Disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* **132**, 1033–1044 (2013).
80. Oakley, R. H. & Cidlowski, J. A. Cellular Processing of the Glucocorticoid Receptor Gene and Protein: New Mechanisms for Generating Tissue-specific Actions of Glucocorticoids*. *J. Biol. Chem.* **286**, 3177–3184 (2011).
81. G, C. *et al.* Testosterone supplementation and body composition: results from a meta-analysis of observational studies. *J. Endocrinol. Invest.* **39**, (2016).
82. Gollenberg, A. L. *et al.* Semen quality in fertile men in relation to psychosocial stress. *Fertil. Steril.* **93**, 1104–1111 (2010).
83. Maeda, N. *et al.* Assessment of testicular corticosterone biosynthesis in adult male rats. *PloS One* **10**, e0117795 (2015).
84. Hazra, R. *et al.* In Vivo Actions of the Sertoli Cell Glucocorticoid Receptor. *Endocrinology* **155**, 1120–1130 (2014).
85. Yazawa, H. & Nakada, T. Apoptosis of testicular germ cells induced by exogenous glucocorticoid in rats. *Hum. Reprod.* **15**, 1917–1920 (2000).
86. Chen, Y., Wang, Q., Wang, F.-F., Gao, H.-B. & Zhang, P. Stress induces glucocorticoid-mediated apoptosis of rat Leydig cells in vivo. *Stress* **15**, 74–84 (2012).
87. Ragni, G. & Caccamo, A. Negative effect of stress of in vitro fertilization program on quality of semen. *Acta Eur Fertil* **23**, 1–23 (1992).
88. Enríquez-Reyes, R. Obesidad: epidemia del siglo XXI y su relación con la fertilidad. *Rev. Médica Clínica Las Condes* **32**, 161–165 (2021).

89. Steffen, K. J. *et al.* Sexual functioning of men and women with severe obesity before bariatric surgery. *Surg. Obes. Relat. Dis.* **13**, 334–343 (2017).
90. Ameratunga, D., Gebeh, A. & Amoako, A. Obesity and male infertility. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* **90**, 102393 (2023).
91. Dupont, C. *et al.* Obesity leads to higher risk of sperm DNA damage in infertile patients. *Asian J. Androl.* **15**, 622–625 (2013).
92. Donkin, I. *et al.* Obesity and Bariatric Surgery Drive Epigenetic Variation of Spermatozoa in Humans. *Cell Metab.* **23**, 369–378 (2016).
93. Bakos, H. W., Henshaw, R. C., Mitchell, M. & Lane, M. Paternal body mass index is associated with decreased blastocyst development and reduced live birth rates following assisted reproductive technology. *Fertil. Steril.* **95**, 1700–1704 (2011).
94. Mundt, L. A. & Shanahan, K. *Graff: análisis de orina y de los líquidos corporales*. (Editorial Médica Panamericana, 2011).
95. Paffoni, A., Somigliana, E., Boeri, L. & Viganò, P. The statistical foundation of the reference population for semen analysis included in the sixth edition of the WHO manual: a critical reappraisal of the evidence. *Hum. Reprod.* **37**, 2237–2245 (2022).
96. Lewis, S. E. M. Is sperm evaluation useful in predicting human fertility? *Reproduction* **134**, 31–40 (2007).
97. Jodar, M. *et al.* Absence of sperm RNA elements correlates with idiopathic male infertility. *Sci. Transl. Med.* **7**, 295re6 (2015).
98. Esteves, S. C. *et al.* Sperm DNA fragmentation testing: Summary evidence and clinical practice recommendations. *Andrologia* **53**, e13874 (2021).
99. Evenson, D. P., Djira, G., Kasperson, K. & Christianson, J. Relationships between the age of 25,445 men attending infertility clinics and sperm chromatin structure assay

- (SCSA®) defined sperm DNA and chromatin integrity. *Fertil. Steril.* **114**, 311–320 (2020).
100. Ni, W. *et al.* Effect of Sperm DNA Fragmentation on Clinical Outcome of Frozen-Thawed Embryo Transfer and on Blastocyst Formation. *PLOS ONE* **9**, e94956 (2014).
 101. Baskaran, S. *et al.* Tracking research trends and hotspots in sperm DNA fragmentation testing for the evaluation of male infertility: a scientometric analysis. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **17**, 110 (2019).
 102. Fernández, J. L. *et al.* The Sperm Chromatin Dispersion Test: A Simple Method for the Determination of Sperm DNA Fragmentation. *J. Androl.* **24**, 59–66 (2003).
 103. Agarwal, A. *et al.* Clinical utility of sperm DNA fragmentation testing: practice recommendations based on clinical scenarios. *Transl. Androl. Urol.* **5**, 935–950 (2016).
 104. Agarwal, A., Cho, C.-L., Esteves, S. C. & Majzoub, A. Sperm DNA fragmentation testing is on the right track. *Transl. Androl. Urol.* **6**, S389–S391 (2017).
 105. Sergerie, M., Laforest, G., Bujan, L., Bissonnette, F. & Bleau, G. Sperm DNA fragmentation: threshold value in male fertility. *Hum. Reprod.* **20**, 3446–3451 (2005).
 106. Cissen, M. *et al.* Measuring Sperm DNA Fragmentation and Clinical Outcomes of Medically Assisted Reproduction: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS ONE* **11**, e0165125 (2016).
 107. Zini, A. & Sigman, M. Are Tests of Sperm DNA Damage Clinically Useful? Pros and Cons. *J. Androl.* **30**, 219–229 (2009).
 108. Kushner-Dávalos, L. La fertilización in vitro: beneficios, riesgos y futuro. *Rev. Científica Cienc. Médica* **13**, 77–80 (2010).

109. Grenaud, É., Dechaud, H., Aligier, N. & Hedon, B. Fecundación in vitro e inyección intracitoplásmica de espermatozoides (ICSI). *EMC - Ginecol.-Obstet.* **40**, 1–19 (2004).
110. Neri, Q. V., Lee, B., Rosenwaks, Z., Machaca, K. & Palermo, G. D. Understanding fertilization through intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Cell Calcium* **55**, 24–37 (2014).
111. Adamson, G. D. *et al.* International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology: world report on assisted reproductive technology, 2011. *Fertil. Steril.* **110**, 1067–1080 (2018).
112. Fertility, A. R. C. IVF Success Rates and Age: Understanding the Key Factors. *ARC Fertility* <https://www.arcfertility.com/ivf-success-rates-and-age-understanding-the-key-factors/> (2023).
113. Palmer, S. S. & Barnhart, K. T. Biomarkers in reproductive medicine: the promise, and can it be fulfilled? *Fertil. Steril.* **99**, 954–962 (2013).
114. Qiao, S. *et al.* Seminal plasma metabolomics approach for the diagnosis of unexplained male infertility. *PLoS ONE* **12**, e0181115 (2017).
115. Wu, Y. *et al.* Quantitative Proteomic Analysis of Human Seminal Plasma from Normozoospermic and Asthenozoospermic Individuals. *BioMed Res. Int.* **2019**, 2735038 (2019).
116. Krzastek, S. C., Smith, R. P. & Kovac, J. R. Future diagnostics in male infertility: genomics, epigenetics, metabolomics and proteomics. *Transl. Androl. Urol.* **9**, S195–S205 (2020).
117. Fung, K. Y. C., Glode, L. M., Green, S. & Duncan, M. W. A comprehensive characterization of the peptide and protein constituents of human seminal fluid. *The Prostate* **61**, 171–181 (2004).

118. Sharma, R. *et al.* Functional proteomic analysis of seminal plasma proteins in men with various semen parameters. *Reprod. Biol. Endocrinol. RBE* **11**, 38 (2013).
119. Liu, X., Wang, X. & Liu, F. Decreased expression of heat shock protein A4L in spermatozoa is positively related to poor human sperm quality. *Mol. Reprod. Dev.* **86**, 379–386 (2019).
120. Wagner, A. O., Turk, A. & Kunej, T. Towards a Multi-Omics of Male Infertility. *World J. Mens Health* **41**, 272–288 (2023).
121. Zakaria, A., Diawara, I., Bouziyane, A. & Louanjli, N. Exploring Human Sperm Metabolism and Male Infertility: A Systematic Review of Genomics, Proteomics, Metabolomics, and Imaging Techniques. *Int. J. Mol. Sci.* **26**, 7544 (2025).
122. Hulstaert, E. *et al.* Charting Extracellular Transcriptomes in The Human Biofluid RNA Atlas. *Cell Rep.* **33**, (2020).
123. Godoy, P. M. *et al.* Large Differences in Small RNA Composition Between Human Biofluids. *Cell Rep.* **25**, 1346–1358 (2018).
124. Abu-Halima, M. *et al.* Altered micro-ribonucleic acid expression profiles of extracellular microvesicles in the seminal plasma of patients with oligoasthenozoospermia. *Fertil. Steril.* **106**, 1061-1069.e3 (2016).
125. Hong, Y. *et al.* Systematic characterization of seminal plasma piRNAs as molecular biomarkers for male infertility. *Sci. Rep.* **6**, 24229 (2016).
126. Lawrie, C. H. *MicroRNAs in Medicine*. (Wiley Blackwell, 2013).
127. Ivanov, P., Emara, M. M., Villen, J., Gygi, S. P. & Anderson, P. Angiogenin-Induced tRNA Fragments Inhibit Translation Initiation. *Mol. Cell* **43**, 613–623 (2011).
128. Vojtech, L. *et al.* Exosomes in human semen carry a distinctive repertoire of small non-coding RNAs with potential regulatory functions. *Nucleic Acids Res.* **42**, 7290–7304 (2014).

129. Yeri, A. *et al.* Total Extracellular Small RNA Profiles from Plasma, Saliva, and Urine of Healthy Subjects. *Sci. Rep.* **7**, 44061 (2017).
130. 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.* **47**, 967–972 (2014).
131. Muthukumar, S., Li, C.-T., Liu, R.-J. & Bellodi, C. Roles and regulation of tRNA-derived small RNAs in animals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **25**, 359–378 (2024).
132. Han, X. *et al.* Seminal plasma extracellular vesicles tRF-Val-AAC-010 can serve as a predictive factor of successful microdissection testicular sperm extraction in patients with non-obstructive azoospermia. *Reprod. Biol. Endocrinol. RBE* **20**, 106 (2022).
133. Hekim, N., Gunes, S., Ayas, B. & Alkan, E. N. Seminal 5'tRF-Glu-CTC as a Biomarker for Oligozoospermia and ART Outcome Prediction. *Basic Clin. Androl.* **35**, 33 (2025).
134. Bartel, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116**, 281–297 (2004).
135. Lewis, B. P., Shih, I. -hung, Jones-Rhoades, M. W., Bartel, D. P. & Burge, C. B. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* **115**, 787–798 (2003).
136. Lin, S. & Gregory, R. I. MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **15**, 321–333 (2015).
137. O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y. & Peng, C. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front. Endocrinol.* **9**, 402 (2018).
138. Belleannée, C. *et al.* Role of microRNAs in controlling gene expression in different segments of the human epididymis. *PloS One* **7**, e34996 (2012).
139. Liu, Y. *et al.* The emerging role of the piRNA/piwi complex in cancer. *Mol. Cancer* **18**, 123 (2019).

140. Kumar, K., Trzybulska, D., Tsatsanis, C., Giwercman, A. & Almstrup, K. Identification of circulating small non-coding RNAs in relation to male subfertility and reproductive hormones. *Mol. Cell. Endocrinol.* **492**, 110443 (2019).
141. Weick, E.-M. & Miska, E. A. piRNAs: from biogenesis to function. *Development* **141**, 3458–3471 (2014).
142. Tosar, J. P., Rovira, C. & Cayota, A. Non-coding RNA fragments account for the majority of annotated piRNAs expressed in somatic non-gonadal tissues. *Commun. Biol.* **1**, 2 (2018).
143. Li, S., Xu, Z. & Sheng, J. tRNA-Derived Small RNA: A Novel Regulatory Small Non-Coding RNA. *Genes* **9**, (2018).
144. Rashad, S., Niizuma, K. & Tominaga, T. tRNA cleavage: a new insight. *Neural Regen. Res.* **15**, 47–52 (2019).
145. Sun, C. *et al.* Roles of tRNA-derived fragments in human cancers. *Cancer Lett.* **414**, 16–25 (2018).
146. Kumar, P., Kuscu, C. & Dutta, A. Biogenesis and Function of Transfer RNA-Related Fragments (tRFs). *Trends Biochem. Sci.* **41**, 679–689 (2016).
147. Yamasaki, S., Ivanov, P., Hu, G. & Anderson, P. Angiogenin cleaves tRNA and promotes stress-induced translational repression. *J. Cell Biol.* **185**, 35–42 (2009).
148. Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting†. *Hum. Reprod.* **26**, 1270–1283 (2011).
149. Thrash, A., Arick, M. & Peterson, D. G. Quack: A quality assurance tool for high throughput sequence data. *Anal. Biochem.* **548**, 38–43 (2018).
150. Langmead, B. & Salzberg, S. L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods* **9**, 357–359 (2012).

151. Chan, P. P. & Lowe, T. M. GtRNAdb 2.0: an expanded database of transfer RNA genes identified in complete and draft genomes. *Nucleic Acids Res.* **44**, D184–D189 (2016).
152. Kalvari, I. *et al.* Rfam 14: expanded coverage of metagenomic, viral and microRNA families. *Nucleic Acids Res.* **49**, D192–D200 (2021).
153. Kozomara, A., Birgaoanu, M. & Griffiths-Jones, S. miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Res.* **47**, D155–D162 (2019).
154. Kim, D., Paggi, J. M., Park, C., Bennett, C. & Salzberg, S. L. Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype. *Nat. Biotechnol.* **37**, 907–915 (2019).
155. Chen, C. *et al.* Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **33**, e179 (2005).
156. Bellver, J. *et al.* Obesity and poor reproductive outcome: the potential role of the endometrium. *Fertil. Steril.* **88**, 446–451 (2007).
157. Bellver, J. *et al.* Female obesity impairs in vitro fertilization outcome without affecting embryo quality. *Fertil. Steril.* **93**, 447–454 (2010).
158. Fabozzi, G. *et al.* Association between oocyte donors' or recipients' body mass index and clinical outcomes after first single blastocyst transfers—the uterus is the most affected. *Fertil. Steril.* **121**, 281–290 (2024).
159. Hogan, R. G. *et al.* Oocyte donor age has a significant impact on oocyte recipients' cumulative live-birth rate: a population-based cohort study. *Fertil. Steril.* **112**, 724–730 (2019).
160. Ilacqua, A., Izzo, G., Emerenziani, G. P., Baldari, C. & Aversa, A. Lifestyle and fertility: the influence of stress and quality of life on male fertility. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **16**, 115 (2018).

161. Stone, B. A., Alex, A., Werlin, L. B. & Marrs, R. P. Age thresholds for changes in semen parameters in men. *Fertil. Steril.* **100**, 952–958 (2013).
162. Kidd, S. A., Eskenazi, B. & Wyrobek, A. J. Effects of male age on semen quality and fertility: a review of the literature. *Fertil. Steril.* **75**, 237–248 (2001).
163. Colaci, D. S. *et al.* MEN'S BODY MASS INDEX IN RELATION TO EMBRYO QUALITY AND CLINICAL OUTCOMES IN COUPLES UNDERGOING IN VITRO FERTILIZATION. *Fertil. Steril.* **98**, 1193-1199.e1 (2012).
164. Auger, J., Eustache, F., Chevrier, C. & Jégou, B. Spatiotemporal trends in human semen quality. *Nat. Rev. Urol.* **19**, 597–626 (2022).
165. Punjani, N. *et al.* The effect of ethnicity on semen analysis and hormones in the infertile patient. *Can. Urol. Assoc. J.* **14**, 31–35 (2020).
166. Abdollahi, E., Tavasolian, F., Ghasemi, N., Vakili, M. & Amini, A. The effect of parental ABO blood group on fetal surveillance. *Iran. J. Pediatr. Hematol. Oncol.* **3**, 154–158 (2013).
167. Khan, M. S. *et al.* Relationship between blood groups and male infertility. *J. Ayub Med. Coll. Abbottabad JAMC* **22**, 154–156 (2010).
168. Moretti, E., Signorini, C., Noto, D., Corsaro, R. & Collodel, G. The relevance of sperm morphology in male infertility. *Front. Reprod. Health* **4**, (2022).
169. Pelzman, D. L. & Sandlow, J. I. Sperm morphology: Evaluating its clinical relevance in contemporary fertility practice. *Reprod. Med. Biol.* **23**, e12594 (2024).
170. Zufferey, F. *et al.* Steroid profiles in both blood serum and seminal plasma are not correlated and do not reflect sperm quality: Study on the male reproductive health of fifty young Swiss men. *Clin. Biochem.* **62**, 39–46 (2018).
171. Hechter, O., Grossman, A. & Chatterton, R. T. Relationship of dehydroepiandrosterone and cortisol in disease. *Med. Hypotheses* **49**, 85–91 (1997).

172. Kalimi, M., Shafagoj, Y., Loria, R., Padgett, D. & Regelson, W. Anti-glucocorticoid effects of dehydroepiandrosterone (DHEA). *Mol. Cell. Biochem.* **131**, 99–104 (1994).
173. Morgan, C. A. *et al.* Relationships among plasma dehydroepiandrosterone sulfate and cortisol levels, symptoms of dissociation, and objective performance in humans exposed to acute stress. *Arch. Gen. Psychiatry* **61**, 819–825 (2004).
174. Mihalca, R. & Fica, S. The impact of obesity on the male reproductive axis. *J. Med. Life* **7**, 296–300 (2014).
175. Oztekin, U. *et al.* The impact of body mass index on reproductive hormones, testosterone/estradiol ratio and semen parameters. *Cent. Eur. J. Urol.* **73**, 226–230 (2020).
176. Havrylyuk, A., Chopyak, V., Boyko, Y., Kril, I. & Kurpysz, M. Cytokines in the blood and semen of infertile patients. *Cent.-Eur. J. Immunol.* **40**, 337–344 (2015).
177. Lyons, H. E., Arman, B. M., Robertson, S. A. & Sharkey, D. J. Immune regulatory cytokines in seminal plasma of healthy men: A scoping review and analysis of variance. *Andrology* **11**, 1245–1266 (2023).
178. Li, H., Shang, X. & Huang, Y. [The effects of interleukin-10 and -8 in chronic prostatitis]. *Zhonghua Nan Ke Xue Natl. J. Androl.* **10**, 486–487, 490 (2004).
179. Zhang, J. & Gao, J. [Determination of IL-1beta, IL-4 and IL-10 contents in the seminal plasma of infertile patients and its clinical value]. *Zhonghua Nan Ke Xue Natl. J. Androl.* **10**, 851–854 (2004).
180. Camejo, M. I. Relation between immunosuppressive PGE(2) and IL-10 to pro-inflammatory IL-6 in seminal plasma of infertile and fertile men. *Arch. Androl.* **49**, 111–116 (2003).

181. Hasan, H. & Melconian, S. The association of some cytokines, ceruloplasmin oxidase activity and copper concentration in male infertile patients *J. Pharm. Sci. & Res.* Vol. 10(12), 2018, 3321-3329. *J. Pharm. Sci. Res.* **10**, (2018).
182. Sanocka, D., Jędrzejczak, P., Szumała-Kaękol, A., Frączek, M. & Kurpisz, M. Male Genital Tract Inflammation: The Role of Selected Interleukins in Regulation of Pro-Oxidant and Antioxidant Enzymatic Substances in Seminal Plasma. *J. Androl.* **24**, 448–455 (2003).
183. Shimoya, K. *et al.* Detection of interleukin-8 (IL-8) in seminal plasma and elevated IL-8 in seminal plasma of infertile patients with leukospermia. *Fertil. Steril.* **59**, 885–888 (1993).
184. Moreno-escallon, B., Ridley, A. J., Wu, Ch. H. & Blasco, L. Hormones in Seminal Plasma. *Arch. Androl.* **9**, 127–134 (1982).
185. Osadchuk, L. V., Kleshchev, M. A. & Osadchuk, A. V. Steroid Hormones in Seminal Plasma: the Relationship with Sperm Quality. *Bull. Exp. Biol. Med.* **174**, 318–321 (2023).
186. Hampl, R., Kubátová, J., Sobotka, V. & Heráček, J. Steroids in semen, their role in spermatogenesis, and the possible impact of endocrine disruptors. *Horm. Mol. Biol. Clin. Investig.* **13**, 1–5 (2013).
187. Osadchuk, L., Shantanova, L., Troev, I., Kleshchev, M. & Osadchuk, A. Regional and ethnic differences in semen quality and reproductive hormones in Russia: A Siberian population-based cohort study of young men. *Andrology* **9**, 1512–1525 (2021).
188. Ismael, Z. K., Al-Anbari, L. & Mossa, H. Relationship of FSH, LH, DHEA and Testosterone Levels in Serum with Sperm Function Parameters in Infertile Men. in (2017).

189. Bauer, M. E. Stress, glucocorticoids and ageing of the immune system. *Stress* **8**, 69–83 (2005).
190. Pasquali, R., Vicennati, V., Cacciari, M. & Pagotto, U. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in obesity and the metabolic syndrome. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1083**, 111–128 (2006).
191. Anagnostis, P., Athyros, V. G., Tziomalos, K., Karagiannis, A. & Mikhailidis, D. P. Clinical review: The pathogenetic role of cortisol in the metabolic syndrome: a hypothesis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **94**, 2692–2701 (2009).
192. Rago, V., Vivacqua, A. & Aquila, S. Glucocorticoids improve sperm performance in physiological and pathological conditions: their role in sperm fight/flight response. *Anat. Cell Biol.* **57**, 119–128 (2024).
193. Nikolaeva, M. *et al.* Male Stress Is Associated with Ovarian and Endometrial Responses in ICSI Cycles: Is Seminal Plasma the Linchpin? *Int. J. Mol. Sci.* **27**, 534 (2026).
194. Huleihel, M. *et al.* Expression of IL-12, IL-10, PGE2, sIL-2R and sIL-6R in seminal plasma of fertile and infertile men. *Andrologia* **31**, 283–288 (1999).
195. Wu, W. *et al.* Seminal plasma microRNAs: potential biomarkers for spermatogenesis status. *Mol. Hum. Reprod.* **18**, 489–497 (2012).
196. Wang, C. *et al.* Altered profile of seminal plasma microRNAs in the molecular diagnosis of male infertility. *Clin. Chem.* **57**, 1722–1731 (2011).
197. Salas-Huetos, A. *et al.* The role of miRNAs in male human reproduction: a systematic review. *Andrology* **8**, 7–26 (2020).
198. Wu, W. *et al.* Genome-wide microRNA expression profiling in idiopathic non-obstructive azoospermia: significant up-regulation of miR-141, miR-429 and miR-7-1-3p. *Hum. Reprod.* **28**, 1827–1836 (2013).

199. Iwasaki, Y. W., Siomi, M. C. & Siomi, H. PIWI-Interacting RNA: Its Biogenesis and Functions. *Annu. Rev. Biochem.* **84**, 405–433 (2015).
200. Phizicky, E. M. & Hopper, A. K. tRNA biology charges to the front. *Genes Dev.* **24**, 1832–1860 (2010).
201. Motorin, Y. & Helm, M. RNA nucleotide methylation. *WIREs RNA* **2**, 611–631 (2011).
202. Baettig, C. G., Zirngibl, M., Smith, K. F., Lear, G. & Tremblay, L. A. Comparison between droplet digital PCR and reverse transcription-quantitative PCR methods to measure ecotoxicology biomarkers. *Mar. Pollut. Bull.* **190**, 114829 (2023).
203. Lyons, S. M., Fay, M. M. & Ivanov, P. The role of RNA modifications in the regulation of tRNA cleavage. *FEBS Lett.* **592**, 2828–2844 (2018).
204. Gupta, S. K., Haigh, B. J., Griffin, F. J. & Wheeler, T. T. The mammalian secreted RNases: Mechanisms of action in host defence. *Innate Immun.* **19**, 86–97 (2013).
205. Lyons, S. M., Fay, M. M., Akiyama, Y., Anderson, P. J. & Ivanov, P. RNA biology of angiogenin: Current state and perspectives. *RNA Biol.* **14**, 171–178 (2017).
206. Te, S. H., Chen, E. Y. & Gin, K. Y.-H. Comparison of Quantitative PCR and Droplet Digital PCR Multiplex Assays for Two Genera of Bloom-Forming Cyanobacteria, *Cylindrospermopsis* and *Microcystis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**, 5203–5211 (2015).
207. Battistone, M. A. *et al.* Region-specific transcriptomic and functional signatures of mononuclear phagocytes in the epididymis. *Mol. Hum. Reprod.* **26**, 14–29 (2020).
208. Voisin, A. *et al.* Comprehensive overview of murine epididymal mononuclear phagocytes and lymphocytes: Unexpected populations arise. *J. Reprod. Immunol.* **126**, 11–17 (2018).

209. Martinez, M. S. & Motrich, R. D. Macrophages in the male genital tract. *Biomed. J.* 100910 (2025) doi:10.1016/j.bj.2025.100910.
210. Smith, T. B. *et al.* Mononuclear phagocytes rapidly clear apoptotic epithelial cells in the proximal epididymis. *Andrology* **2**, 755–762 (2014).
211. Kuo, T.-M. *et al.* ALPK1 affects testosterone mediated regulation of proinflammatory cytokines production. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **154**, 150–158 (2015).
212. Vodo, S., Bechi, N., Petroni, A., Muscoli, C. & Aloisi, A. M. Testosterone-Induced Effects on Lipids and Inflammation. *Mediators Inflamm.* **2013**, 183041 (2013).
213. Corrales, J. J. *et al.* Androgen-replacement therapy depresses the ex vivo production of inflammatory cytokines by circulating antigen-presenting cells in aging type-2 diabetic men with partial androgen deficiency. *J. Endocrinol.* **189**, 595–604 (2006).
214. Da Silva, N. *et al.* A dense network of dendritic cells populates the murine epididymis. *Reproduction* **141**, 653–663 (2011).
215. Cain, D. W. & Cidlowski, J. A. Immune regulation by glucocorticoids. *Nat. Rev. Immunol.* **17**, 233–247 (2017).
216. Trigunaite, A., Dimo, J. & Jørgensen, T. N. Suppressive effects of androgens on the immune system. *Cell. Immunol.* **294**, 87–94 (2015).
217. Smith, L. C., Ramar, M., Riley, G. L., Mathias, C. B. & Lee, J.-Y. Steroid hormone regulation of immunometabolism and inflammation. *Front. Immunol.* **16**, 1654034 (2025).
218. Honda, S. *et al.* Sex hormone-dependent tRNA halves enhance cell proliferation in breast and prostate cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, E3816–E3825 (2015).

219. Robertson, S. A. Seminal plasma and male factor signalling in the female reproductive tract. *Cell Tissue Res.* **322**, 43–52 (2005).
220. Zhang, Y. *et al.* Seminal plasma exosome derived miR-26-5p can regulate decidual macrophage polarization via PTEN / PI3K / AKT signaling pathway. *Sci. Rep.* **15**, 9192 (2025).
221. Schjenken, J. E., Glynn, D. J., Sharkey, D. J. & Robertson, S. A. TLR4 Signaling Is a Major Mediator of the Female Tract Response to Seminal Fluid in Mice. *Biol. Reprod.* **93**, 68 (2015).
222. Jena, S. R. *et al.* Paternal contributors in recurrent pregnancy loss: Cues from comparative proteome profiling of seminal extracellular vesicles. *Mol. Reprod. Dev.* **88**, 96–112 (2021).