



REVISIÓN

RNA espermático: ¿huella de eventos pasados o dote para el embrión?



Celia Corral-Vazquez, Joan Blanco, Francesca Vidal y Ester Anton*

Genetics of Male Fertility Group, Unidad de Biología Celular, Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología, Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, España

Recibido el 20 de febrero de 2017; aceptado el 29 de marzo de 2017

Disponible en Internet el 26 de mayo de 2017

PALABRAS CLAVE

RNA;
Espermatozoides;
Espermatogénesis;
Biomarcador

KEYWORDS

RNA;
Sperm;
Spermatogenesis;
Biomarker

Resumen Los hallazgos acerca de la relevancia biológica de los espermatozoides, más allá de la mera aportación del genoma paterno al embrión, han abierto las puertas al estudio del RNA espermático bajo nuevos enfoques. Lejos de constituir una mera reserva residual, esta fracción ha demostrado ser una población compleja y multifuncional, con una amplia gama de implicaciones en procesos biológicos tanto espermatogénicos como de desarrollo embrionario tras la fecundación del ovocito. Más allá de la población de RNA codificante, el papel ejercido por los RNA no codificantes comienza a desentramarse e integrarse con el funcionamiento celular global, demostrando su relevancia sobre la regulación celular e incluso su influencia epigenética. Los estudios comparativos de expresión a gran escala permiten obtener información global sobre los cambios en el transcriptoma espermático en diferentes poblaciones, lo que aporta al RNA un nuevo valor diagnóstico. En esta revisión se ofrece una visión general sobre la biosíntesis, las funciones y los mecanismos biológicos relacionados con los diferentes subtipos de RNA espermáticos, así como sobre su importancia durante la espermatogénesis, su implicación tras la fecundación y su valor como biomarcadores de fertilidad.

© 2017 Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción y Sociedad Española de Fertilidad. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Sperm RNA: Footprint of past events or a dowry for the embryo?

Abstract The biological relevance of sperm contribution to the embryo has currently been shown to go beyond a mere transmission of the paternal genome. New findings have revealed that spermatozoa carry a complex and multifunctional population of RNA with a wide range of implications in spermatogenesis, fertilisation, and embryogenesis. Accordingly, the consideration of these molecules as a simple residual pool of earlier processes has been left behind. Besides the coding RNAs, the role of non-coding RNAs has started to be untangled and integrated within the global cell processes, demonstrating their relevance in cellular regulation and

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: ester.anton@uab.cat (E. Anton).

epigenetics. Comparative high-throughput expression studies have provided a general impression on the differences in the sperm transcriptome between populations. Hence, a new diagnostic value related to these RNAs has emerged. In this review, an overview of biosynthesis, functions and biological mechanisms of different subtypes of sperm RNAs is presented. The relevance of these molecules during spermatogenesis, their role after fertilisation, and their potential value as fertility biomarkers are also discussed.

© 2017 Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción y Sociedad Española de Fertilidad. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Clasificación de las moléculas de RNA espermático

Los espermatozoides son células altamente diferenciadas cuya función principal consiste en aportar el genoma haploide paterno al ovocito. Hasta hace relativamente poco tiempo, se consideraba que esta aportación genética constituía la única contribución del espermatozoide tras la fecundación; por ello, el descubrimiento de la existencia de una fracción funcional de RNA espermático dio paso a un amplio marco de nuevos estudios y líneas de investigación (Hosken y Hodgson, 2014). De esa forma, se determinó que la compleja población de RNA del espermatozoide suponía una nueva herramienta potencial para la investigación básica y aplicada en el ámbito de la infertilidad masculina (Hamatani, 2012).

La fracción de transcritos presente en un espermatozoide maduro consta tanto de RNA codificantes (RNA mensajero o mRNA) como no codificantes. Estos últimos se dividen en RNA pequeños no codificantes (*small non-coding RNA* o sncRNA) y RNA largos no codificantes (*long non-coding RNA* o lncRNA). A su vez, los sncRNA se clasifican principalmente en microRNA (miRNA), RNA asociados a PIWI (*PIWI-interacting RNA* o piRNA), RNA pequeños de interferencia (*small interfering RNA* o siRNA) y siRNA endógenos (*endogenous siRNA* o endo-siRNA) (Jodar et al., 2013). Se estima que cada espermatozoide contiene aproximadamente unos 50 fg (femtogramos) de lncRNA y mRNA (de tamaños de más de 200 nucleótidos) y 0,3 fg de sncRNA (menos de 200 nucleótidos) (Goodrich et al., 2013). Esto supone una cantidad de RNA 200 veces menor a la de otros tipos celulares (Jodar et al., 2013).

El RNA espermático codificante

Como se ha descrito previamente, los mRNA suponen la fracción codificante del total de moléculas de RNA. Su localización en los espermatozoides se sitúa en la pieza intermedia y en la cabeza espermática, donde se concentran cerca de la envuelta del núcleo y constituyen una parte estructural de la matriz nuclear (Li y Zhou, 2012; Hamatani, 2012). Aunque algunas moléculas de mRNA espermático están intactas, existe una marcada tendencia a una degradación progresiva hacia el extremo 3' (Jodar et al., 2013).

La caracterización de los transcritos presentes en los espermatozoides humanos se ha llevado a cabo

gradualmente en estudios basados en la realización de RT-PCR (*reverse transcription polymerase chain reaction*) (Kumar et al., 1993), *serial analysis of gene expression* (Zhao et al., 2006), *microarrays* (Ostermeier et al., 2002) e hibridación *in situ* (Wykes et al., 1997). El primer mRNA identificado fue el del gen *C-MYC*, el cual está involucrado en la funcionalidad espermática, concretamente en la capacitación y en la reacción acrosomal (Naz et al., 1991). En la actualidad conocemos la presencia de numerosos transcritos correspondientes a factores de transcripción, como *NFjB* (*nuclear factor kappa B*), *HOX2A* (*homeobox protein Hox-2a*) o *ICSBP* (*interferon consensus sequence-binding protein*). De la misma forma, también se han descrito transcritos correspondientes a la proteína cinasa JNK2, del factor de crecimiento HBEGF y de los receptores ERBB3 y RXRB (Garrido et al., 2013; Dadoune et al., 2005). Las mismas técnicas desvelaron la presencia de mRNA codificantes para la ciclina B1 (proteína reguladora del ciclo celular), el modulador de la transcripción STAT4, la familia de genes *DAZL* (*deleted in azoospermia-like*), el gen *SRY* (*sex-determining region Y*) y la proteína PLC- ζ (*phospholipase C-Z*), junto con protaminas, receptores de progesterona y receptores de estrógenos (Dadoune, 2009).

Un *serial analysis of gene expression* permitió clasificar los mRNA espermáticos en 25 grupos funcionales diferentes. El grupo predominante englobaba principalmente genes de proteínas nucleares involucradas en la transcripción. Analizando los 30 transcritos no fragmentados más frecuentes, se observó que la mayoría presentaba funciones relacionadas con la espermatogénesis, la funcionalidad espermática, la fertilidad masculina, la fecundación y el desarrollo embrionario (Zhao et al., 2006). La presencia de estos transcritos y sus funciones asociadas supone un indicativo de la importancia biológica de estas moléculas en la regulación de la fertilidad masculina (Jodar et al., 2013).

El RNA espermático no codificante

Se estima que solamente un 5-10% del genoma de los mamíferos corresponde a zonas codificantes. Aun así, es sabido que la mayoría del genoma se transcribe, sobrepasando el número de secuencias génicas registradas; esto significa que gran parte del transcriptoma de los mamíferos no es codificante (Luk et al., 2014). Aunque inicialmente estos ncRNA (non-coding RNA) fueron asociados a una fracción «basura»

del genoma (*junk RNA*), más recientemente se han descrito numerosas funciones biológicas en las cuales estos transcritos están involucrados. Si bien, en general, los ncRNA (non-coding RNA) tienen un papel regulador de la expresión génica, pueden ejercer o estar involucrados en otros procesos biológicos. Según su tamaño, su proceso de biogénesis y el tipo de proteínas a las que se encuentren asociados, podemos clasificar a los ncRNA en diferentes familias con funciones específicas (Luk et al., 2014).

Los lncRNA

Dentro de la familia de ncRNA, aquellos con una longitud superior a las 200 pb son clasificados como lncRNA. Aunque no son codificantes, gran parte de ellos se originan por transcripción mediante RNA polimerasa II como los mRNA; también pueden producirse a partir del procesamiento de otros tipos de transcritos (Luk et al., 2014).

Al contrario de lo que ocurre con algunos sncRNA, los lncRNA no necesitan asociarse a ningún grupo proteico para ser procesados o ejercer su papel biológico (Luk et al., 2014). Su función principal es intervenir en diversos procesos de regulación; varios de ellos están relacionados con modificaciones epigenéticas que modulan el estado transcripcional de determinados mRNA o incluso de cromosomas completos (Bao et al., 2013). Se han propuesto 3 mecanismos de regulación ejercida por los lncRNA: el mecanismo competidor, el activador/reclutador y el precursor (Luk et al., 2014) (fig. 1). El mecanismo competidor contempla la capacidad de estos RNA para anclarse a ciertas proteínas que se unen específicamente a determinadas regiones del DNA (como los factores de transcripción), e impedir su funcionamiento; también pueden hibridar con secuencias complementarias del DNA e impedir la unión de esas proteínas específicas a dicha región (Kraus et al., 2013; Luk et al., 2014). El mecanismo activador/reclutador consiste en la activación de modificadores epigenéticos, o bien en aproximar y retener a dichos modificadores en lugares específicos del genoma, promoviendo así

la metilación del DNA y la modificación de las histonas (Luk et al., 2014). Por último, el mecanismo precursor contempla la posibilidad de que los lncRNA sean procesados para dar lugar a RNA más cortos que pueden estar implicados en otros procesos de regulación postraduccional (Keniry et al., 2012).

Se han identificado algunos tipos de lncRNA que aparecen especialmente enriquecidos en la fracción de RNA espermáticos: los RNA asociados a cromatina (*chromatin-associated RNA* o CAR) y algunos RNA pequeños nucleares asociados a ILF3/NF30 (*small ILF3/NF90-associated RNA* o snAR). Los CAR podrían ejercer influencia sobre la arquitectura genómica o regular la expresión génica (Jodar et al., 2013). Uno de los snAR más abundantes en espermatozoides es el snAR-G1; se sospecha que su papel funcional en estas células es significativo debido a su alta concentración, mayor que la hallada en células germinales testiculares (las cuales ya presentan una concentración de snAR-G1 aproximadamente 100 veces mayor que en tejidos somáticos) (Jodar et al., 2013).

Los sncRNA

Los sncRNA son moléculas no codificantes de RNA de tamaño menor a 200 nucleótidos. La mayor parte de los sncRNA pertenecen a 3 categorías principales: miRNA, piRNA y endo-siRNA (Röther y Meister, 2011). Estos se caracterizan por que su funcionalidad depende de su asociación con las denominadas proteínas argonautas (AGO). Esta familia de proteínas se subdivide en 2 grupos: la subfamilia AGO y la subfamilia PIWI (específica de la línea germinal). Tanto los miRNA como los endo-siRNA se unen específicamente a proteínas AGO, mientras que los piRNA se asocian con proteínas PIWI (De Mateo y Sassone-corsi, 2014).

Aparte, también se encuentran otras categorías menos frecuentes como los elementos de repetición, los elementos asociados a sitios de inicio de la transcripción o a los promotores, los snRNA (*small nuclear RNA*), los

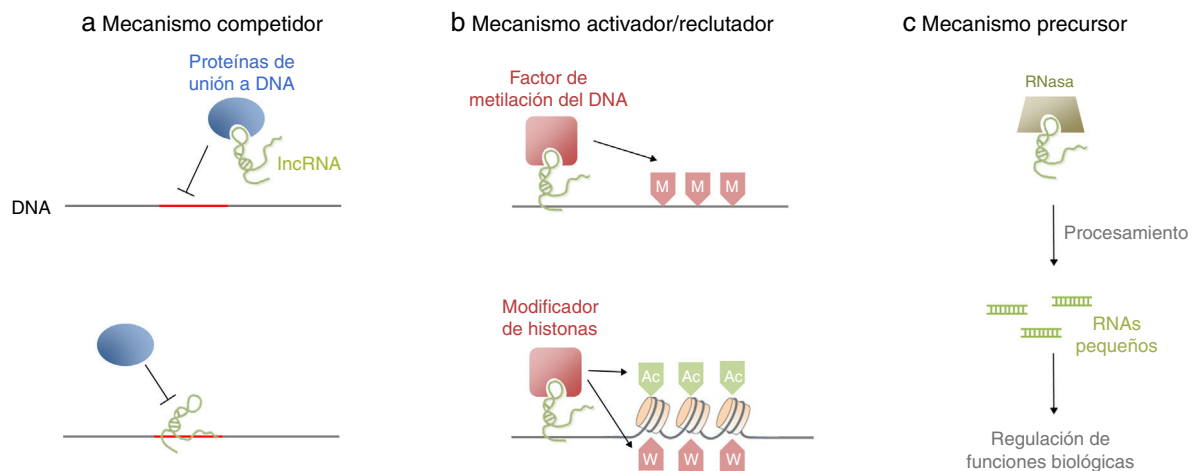


Figura 1 Mecanismos de regulación de la expresión génica ejercida por los lncRNA: a) Mecanismo competidor, en el que el lncRNA inhibe la unión de una proteína a su secuencia complementaria de DNA, ya sea anclándose a la proteína o a la secuencia. b) Mecanismo activador/reclutador, en el que el lncRNA activa modificadores epigenéticos y los retiene en regiones específicas del genoma. c) Mecanismo precursor, en el que el lncRNA puede ser procesado y originar RNA pequeños involucrados en otros procesos de regulación de la expresión génica.

snoRNA (*small nucleolar RNA*), los mse-tsRNA (*mature-sperm-enriched tRNA-derived small RNA*) y los YRNA (RNA asociados a proteínas Ro, que forman un complejo ribonucleoproteico) (Jodar et al., 2013). También existen ciertas moléculas pequeñas de RNA que constituyen fragmentos de transcritos codificantes o no codificantes provenientes de zonas no descritas del genoma, cuya función específica aún no se conoce (Jodar et al., 2013).

Los miRNA

Los miRNA suponen la clase de sncRNA mejor caracterizada hasta la fecha. Se trata de moléculas monocatenarias de RNA de unos 22 nucleótidos de longitud. Su función principal es la de regular la expresión génica, generalmente mediante la unión a la región 3' UTR de sus mRNA diana, provocando principalmente su represión (Luo et al., 2015). Por otro lado, existen estudios que señalan que algunos miRNA se unen específicamente a otras regiones, como a los promotores, y ejercen una función activadora sobre la expresión de dichos genes (Place et al., 2008). Se estima que pueden llegar a regular más del 60% de los genes codificantes de proteínas del genoma; un mismo miRNA puede tener cientos de genes diana, mientras que un gen también puede estar regulado por más de un miRNA (Luo et al., 2015).

El proceso de biosíntesis de los miRNA comienza en el núcleo con la acción de la polimerasa II, la cual produce la transcripción de unos precursores de mayor tamaño, los miRNA primarios (pri-miRNA) (Luo et al., 2015). Aunque la mayoría de las secuencias de miRNA se encuentran distribuidas individualmente por el genoma, existe una

fracción importante de ellas que se agrupa en clústeres que contienen múltiples miRNA, transcritos en un único precursor que es posteriormente procesado en miRNA individuales (Ambros, 2001). Los pri-miRNA son procesados por el complejo denominado «microprocesador», cuyos componentes principales son DROSHA (ribonucleasa III) y DGCR8 (*DiGeorge syndrome critical region 8*). Mediante este mecanismo se da lugar a una forma intermedia (pre-miRNA). Independientemente de la ruta de síntesis, una vez generados estos precursores, son transportados hasta el citoplasma mediante exportina/Ran-GTP para ser procesados por DICER (una RNasa III endonucleasa) hasta su forma madura de miRNA monocatenario (Luo et al., 2015). En general, solamente una de ambas cadenas del dúplex inicial suele permanecer funcional, mientras que la otra es degradada, aunque hay casos en los que ambas cadenas pueden ser funcionales por separado (Schwarz et al., 2003). Los miRNA maduros se incorporan a un complejo ribonucleoproteico denominado miRISC (*miRNA-induced silencing complex*), en el cual también están englobadas las proteínas AGO (Thomas et al., 2010) (fig. 2a).

Se han identificado más de un centenar de moléculas de miRNA en células germinales testiculares; aproximadamente el 40% de ellas se expresa de forma diferencial en el tejido testicular respecto a los tejidos somáticos (Luo et al., 2015). Diversos estudios se han centrado en caracterizar los miRNA presentes en espermatozoides y en determinar cuáles de ellos son más abundantes (algunos ejemplos son los miRNA hsa-miR-34b-3p, hsa-miR-375 y hsa-miR-191-5p) (Ostermeier et al., 2005; Salas-Huetos et al., 2014). Entre ellos, se ha hallado un grupo de 221 miRNA expresado

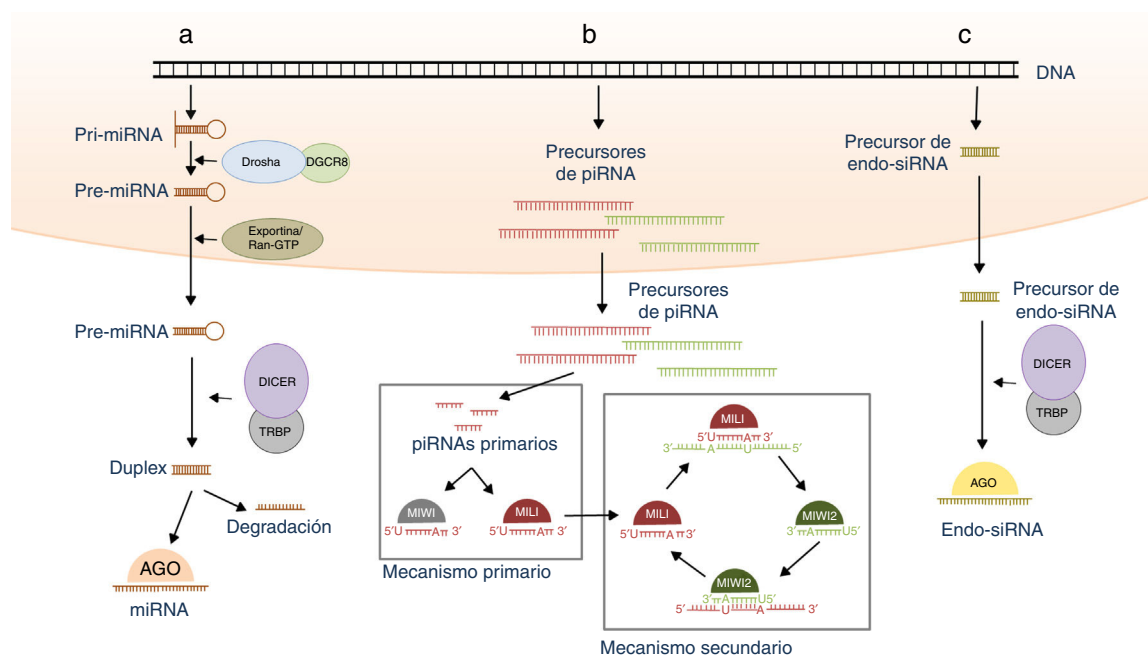


Figura 2 Proceso de biosíntesis en humanos de los RNA pequeños no codificantes (sncRNA). a) Las moléculas de miRNA primario (pri-miRNA) dan lugar a los precursores pre-miRNA, que son procesados en el citoplasma para dar lugar a los miRNA funcionales. b) Las moléculas precursoras de piRNA se transcriben a partir de diferentes clústeres y son procesadas en el citoplasma mediante el mecanismo primario de biosíntesis o el mecanismo secundario o de amplificación «ping-pong». c) Los endo-siRNA son generados de forma independiente a la acción de la maquinaria DROSHA/DGCR8, por lo cual sus moléculas precursoras son directamente transportadas al citoplasma y procesadas para generar los endo-siRNA maduros.

constitutivamente en todos los individuos fértiles estudiados, de forma independiente a factores como la edad o los parámetros seminales básicos (volumen, morfología, concentración y movilidad). Estos miRNA están involucrados en la regulación de una serie de genes asociados a procesos biológicos que intervienen en la espermatogénesis y la embriogénesis (Salas-Huetos et al., 2014). En otro estudio de caracterización se detectaron 35 miRNA espermáticos que ejercían una función reguladora sobre mRNA, mayoritariamente relacionados con procesos de desarrollo embrionario y crecimiento celular (Krawetz et al., 2011).

Los piRNA

Los piRNA son moléculas monocatenarias de 26-31 nucleótidos con una fuerte tendencia a la presencia de uridinas en el extremo 5'. Estas moléculas se caracterizan por estar asociadas a proteínas PIWI y, por tanto, están presentes exclusivamente en la línea germinal (Röther y Meister, 2011). En ratón se han descrito 3 proteínas PIWI expresadas principalmente en células germinales masculinas: PIWIL1 o MIWI, PIWIL2 o MILI y PIWIL4 o MIWI2 (Chuma y Nakano, 2013). Se ha detectado que los piRNA son el tipo de sncRNA más abundante en los espermatozoides humanos (Pantano et al., 2015).

La función principal de estas moléculas es la de silenciar a los retrotransposones mediante control transcripcional y postranscripcional. Este papel silenciador está íntimamente relacionado con el desarrollo de las células germinales: se trata de un mecanismo de protección del genoma frente a las modificaciones producidas por los elementos retrotransponibles (Chuma y Nakano, 2013). El retrotransposón *LINE1* (*long interspersed nuclear elements 1*) constituye la diana más abundante de los piRNA espermáticos (Pantano et al., 2015). Además de este mecanismo de silenciamiento, hay indicios de que los piRNA juegan un papel en el control de la regulación epigenética, concretamente en la metilación *de novo* en embriones y en proespermatogonias (células germinales masculinas prenatales), aunque su mecanismo aún no está completamente caracterizado (Chuma y Nakano, 2013).

Los piRNA se originan a partir de diferentes clústeres localizados en distintas regiones cromosómicas y cuyo tamaño puede variar desde las pocas unidades hasta cientos de kilobases (Girard et al., 2006). Cada clúster contiene varias secuencias de piRNA que no se solapan entre ellas; la mayoría de estas secuencias pertenecen únicamente a una de las cadenas de cada clúster. A partir de esta información, se han propuesto 2 mecanismos paralelos de biosíntesis de los piRNA: la ruta de procesamiento primario y el mecanismo secundario o también llamado amplificación *ping-pong* (fig. 2b) (Chuma y Nakano, 2013).

Tomando el ratón como modelo de estudio, según el mecanismo primario, se ha señalado que los RNA transcritos a partir de los clústeres son precursores de piRNA, carentes de estructuras *hairpin* que requieran un procesamiento mediante DICER (como sí sucede con los miRNA). El precursor es procesado por nucleasas que producen un extremo 5' con un grupo fosfato (el que se unirá a la proteína PIWI) y un extremo 3' con un grupo OH y una metilación 2'-OH. El tamaño final de ese piRNA primario vendrá determinado por el tamaño de hendidura del tipo de proteína PIWI en

cuestión, que es de unos 26 nucleótidos en el caso de MILI, de 28 para MIWI2 y de 29-30 para MIWI (Chuma y Nakano, 2013).

El mecanismo secundario de amplificación *ping-pong* es un ciclo que genera nuevos piRNA a partir de transcritos con una secuencia complementaria a la de los piRNA primarios. Esta ruta está directamente relacionada con la regulación de los retrotransposones. Una fracción considerable de los piRNA existentes contiene una zona de solapamiento de 10 pb de tamaño, presente en todos ellos (ya sea en la dirección *sentido* o *antisentido*), con un uracilo en el extremo 5' y una adenina situada en la posición número 10; esto sucede como causa y también como motivo del mencionado mecanismo secundario. Los piRNA primarios hibridan con las secuencias complementarias de sus transcritos diana (en su mayoría elementos de repetición o retrotransposones) y la proteína PIWI actúa cortando el transcrito diana a la altura de la adenina situada en el décimo nucleótido del piRNA primario; de esta forma se genera un precursor de piRNA secundario con un uracilo en su extremo 5', complementario a la adenina. El extremo 3' del precursor es procesado a través de un mecanismo similar al de los piRNA primarios, y se produce el piRNA secundario maduro al unirse a MIWI2. A través de este ciclo se produce un silenciamiento general de los niveles retrotransposones existentes (Chuma y Nakano, 2013). Es probable que los mecanismos de biosíntesis descritos en ratones también estén presentes en humanos (Röther y Meister, 2011).

Los endo-siRNA

Los endo-siRNA tienen un tamaño de unos 22 nucleótidos (Luo et al., 2015). Su función biológica de regulación es muy similar a la de los miRNA: sobre todo, difieren de estos sncRNA en su proceso de biosíntesis. Generalmente, sus moléculas precursoras son fragmentos grandes de RNA de doble cadena generados de forma espontánea: puede tratarse de 2 fragmentos procedentes de diferentes *loci* (denominados *trans-nat-dsRNA*) o de una transcripción bidireccional del mismo *locus* (los llamados *cis-nat-dsRNA*) (Song et al., 2011). Este precursor es transportado al citoplasma desde el núcleo, donde es procesado por DICER de forma independiente a la maquinaria DROSHA-DGCR8. De esta forma, una de las cadenas del precursor se asocia a proteínas AGO: forman un complejo ribonucleoproteico denominado RISC (*RNA-induced silencing complex*) y constituyen el endo-siRNA maduro y funcional (fig. 2c). Principalmente, los endo-siRNA regulan la expresión génica postranscripcional mediante su unión específica a los mRNA diana, mayoritariamente a su región 3' UTR (Song et al., 2011). De esta forma, pueden inducir su silenciamiento o, si la complementariedad de su secuencia con la del transcrito diana es perfecta, su degradación mediante el complejo RISC (Luo et al., 2015).

En un principio fueron identificados en levaduras, plantas y *C. elegans*, aunque en la actualidad se han descrito también en mamíferos (Song et al., 2011). Su expresión se produce en todos los tejidos (Luo et al., 2015), aunque en ratones se ha hallado una expresión especialmente alta en células germinales masculinas. Concretamente, se han hallado 73 endo-siRNA por secuenciación de RNA procedente de células testiculares, con dianas principalmente en mRNA (92%), pero también en ncRNA (4%), pseudogenes (3%) y retrotransposones (1%) (Song et al., 2011).

En relación con su función de control postranscripcional, los endo-siRNA intervienen en la regulación de la espermatogénesis (Luo et al., 2015). En células germinales masculinas, se señala que podrían tener dianas en cientos de transcritos expresados a lo largo de todas las fases de este proceso y ejercer un posible papel en el control de la expresión durante esta espermatogénesis. Aparte, se ha descubierto que pueden tener un rol regulador transcripcional al actuar como moléculas guía para dirigir la acción de factores epigenéticos (como son las metiltransferasas o las histonas metiltransferasas) con el objetivo de modificar la conformación de la cromatina, de modo que también intervienen en la actividad transcripcional (Song et al., 2011). En la posfecundación, hay indicios de que los endo-siRNA son necesarios para que se produzca correctamente el desarrollo embrionario preimplantacional (Suh et al., 2010).

Funciones del RNA en la espermatogénesis

La espermatogénesis es el proceso de biogénesis de los espermatozoides a partir de las espermatogonias y se puede dividir en 3 fases principales: la mitótica, la meiótica y la posmeiótica o espermiogénesis (para una revisión, véase Hamatani, 2012). Los cambios más significativos en términos de diferenciación celular se producen durante esta última etapa, que engloba la transformación de las espermátidas redondas en espermatozoides. Estas modificaciones tienen lugar principalmente en la estructura: se elimina gran parte del citoplasma junto con sus componentes ribonucleicos para ser fagocitado por las células de Sertoli y se produce la formación del acrosoma y el flagelo (Dadoune, 2009; Cappallo-Obermann et al., 2011). Por otro lado, también se producen una serie de eventos de transformación nuclear, en los que la mayoría de las histonas son sustituidas por protaminas. Como consecuencia, el DNA sufre un empaquetamiento altamente compacto y el núcleo adopta una estructura muy condensada (Cappallo-Obermann et al., 2011).

Durante la espermatogénesis, la actividad transcripcional es continua desde los primeros estadios hasta la generación de las espermátidas redondas (Jodar et al., 2013). No obstante, aumenta considerablemente en 2 periodos: el periodo premeiótico (espermatogonias) y el periodo comprendido entre la fase paquítenica de la primera división meiótica y las espermátidas redondas. Durante estas «olas transcripcionales», altamente reguladas, se producen gran cantidad de transcritos de diferentes clases. Esta síntesis es específica para cada estadio celular en función de los RNA requeridos para continuar con el desarrollo espermático en cada etapa (De Mateo y Sassone-corsi, 2014). Los transcritos sintetizados durante estos periodos pertenecen a diversos tipos de RNA tanto codificante (mRNA) como no codificante (miRNA, siRNA, piRNA y lncRNA) (Jodar et al., 2013).

Finalmente, durante la fase acrosómica de la espermiogénesis, se produce una detención de la actividad transcripcional, coincidiendo con la reorganización de la cromatina (Miller et al., 2005). Los procesos de traducción también sufren una detención: una de las causas es la ausencia de RNA ribosómico (rRNA) intacto y funcional en el citoplasma del espermatozoide (Dadoune, 2009). Se ha propuesto que esta ausencia de rRNA funcional puede suponer un mecanismo para evitar la traducción de transcritos no

deseados después de la fecundación, que puedan comprometer el desarrollo del embrión (Cappallo-Obermann et al., 2011). En la mitocondria, sin embargo, la transcripción y traducción siguen produciéndose (Dadoune, 2009).

El RNA codificante en la espermatogénesis

Haciendo uso de bases de datos de ontología génica, se han descrito 760 genes implicados en la espermatogénesis humana (Carbon et al., 2009). Como ya se ha mencionado previamente, durante las 2 «olas transcripcionales» que se producen en la espermatogénesis se generan una serie de transcritos específicos para cada etapa del proceso. De esta forma, las células mitóticas expresan transcritos necesarios tanto para mantener la pluripotencialidad de las espermatogonias de tipo A como para diferenciar las de tipo B hasta su estadio de espermatoцитos (Kotaja, 2014). Por otro lado, los espermatoцитos expresan el RNA necesario para llevar a cabo la meiosis mientras que las espermátidas contienen transcritos involucrados en la regulación de la espermiogénesis, producidos previamente a la detención de la transcripción, entre los que se incluyen los que codifican protaminas (Dadoune, 2009; Kotaja, 2014). Tanto estos transcritos como parte de los previamente sintetizados se almacenan en el citoplasma en forma de ribonucleoproteínas (Jodar et al., 2013), se mantienen protegidos y sirven como una fuente de transcritos necesarios tras la detención de la transcripción (Dadoune, 2009; Miller et al., 2005).

En humanos, se ha descrito que la acción conjunta de los factores de transcripción NFAT (*nuclear factor of activated T-cells protein family*) y JUN (*ju-nana*, «diecisiete» en japonés por corresponderse al oncogén homólogo al virus del sarcoma aviar 17) es necesaria para los procesos de regulación producidos en las espermatogonias. NFAT tiene un importante papel en la respuesta inmune y la expresión anormal del oncogén *JUN* suele asociarse a la generación de tumores. Dada su sobreexpresión en espermatogonias, se ha propuesto su gran importancia en la regulación del mantenimiento de la indiferenciación celular (Zhu et al., 2016).

Durante la fase meiótica de la espermatogénesis, se ha revelado la importancia de los genes *HOX* en la regulación de la organización cromosómica. Por otro lado, el factor de transcripción SP1 (*specificity protein 1*) es especialmente importante para el proceso de remodelación de la cromatina durante esta etapa, además de intervenir en la regulación de otros eventos como el crecimiento y la diferenciación celular, la apoptosis, las respuestas inmunes y la respuesta al daño del DNA (Zhu et al., 2016).

Respecto a las espermátidas, es importante la acción del factor de transcripción TCF3 (*transcriptin factor 3*) en el proceso de espermiogénesis, ya que está directamente involucrado en la regulación de la vía de señalización Wnt (*wingless-related integration site*), vital para el control de la etapa de elongación de las espermátidas (Zhu et al., 2016).

Además de la expresión de estos genes necesarios para la diferenciación de las espermatogonias, también se ha propuesto otro mecanismo por el cual los mRNA espermáticos ejercen un control sobre la espermatogénesis. Se ha sugerido que el mRNA espermático podría actuar durante el proceso de empaquetamiento del DNA, ejerciendo un papel

pasivo en la reorganización de la cromatina y, a su vez, una función más activa al determinar las secuencias de DNA que serán empaquetadas con histonas y no por protaminas (Miller et al., 2005). Estudios de ontología génica indican que la cromatina espermática histónica no está distribuida aleatoriamente, sino que se encuentra primordialmente en *loci* que contienen genes implicados en el desarrollo embrionario, incluyendo factores de transcripción embrionarios y proteínas que intervienen en rutas de señalización (Hammoud et al., 2009). Por tanto, se contempla que los mRNA espermáticos pueden promover el empaquetamiento nucleosómico selectivo de secuencias que son importantes a nivel embrionario, de forma que puedan ser transcritas con más facilidad (Hamatani, 2012).

El miRNA en la espermatogénesis

A lo largo de los años, la caracterización de los distintos miRNA que intervienen en la regulación de la espermatogénesis humana se ha ido detallando. Aunque la expresión de miRNA es abundante a lo largo de toda la espermatogénesis, se conoce que en las espermatogonias se produce una ola de síntesis de miRNA cuya acción se ha relacionado con el mantenimiento de la indiferenciación celular y, por tanto, del nicho de espermatogonias. Algunos ejemplos de miRNA de ratones involucrados en esta función son miR-20, miR-21, miR-34c, miR-106a, miR-135a, miR-146a, miR-182, miR-183, el clúster miR-17-92 y los miRNA miR-221 y miR-222 ligados al cromosoma X (De Mateo y Sassone-corsi, 2014; Kotaja, 2014). Por el contrario, se ha descrito que la función ejercida por la familia let-7 promueve la diferenciación de las espermatogonias a espermatoцитos (Tong et al., 2011). El miR-383 actúa en los primeros estadios de la espermatogénesis regulando la proliferación y la muerte celular (De Mateo y Sassone-corsi, 2014). Posteriormente, durante la segunda ola de transcripción (paquiteno-espermátidas redondas), participan miRNA relacionados con diversas funciones. Por ejemplo, el clúster miR-449 y los miR-34b/c están involucrados en regular y evitar la apoptosis masiva. Los miR-18 y miR-214 se relacionan con la interacción con factores de transcripción de choque térmico implicados en la correcta reorganización de la cromatina y en la maduración espermática. Además, otros miRNA intervienen en la regulación de la expresión de protaminas y proteínas de transición (TPs); 2 ejemplos de ello son el miR-469 (que tiene por dianas a los genes de la protamina *PRM2* y de *TP2*) y el miR-122a (también específico del gen *TP2*) (De Mateo y Sassone-corsi, 2014; Kotaja, 2014).

El piRNA en la espermatogénesis

El control sobre los retrotransposones de los piRNA en las células germinales es un mecanismo crítico para el desarrollo de la espermatogénesis. En ratones, la interrupción de la ruta biosintética de los piRNA da lugar a individuos estériles sin espermatozoides funcionales (Pillai y Chuma, 2012).

Los piRNA y sus proteínas asociadas actúan dependiendo de la etapa en la que se produzca su síntesis; se clasifican principalmente en prepaquiténicos y paquiténicos (Pillai y Chuma, 2012). Los piRNA prepaquiténicos se sintetizan en las espermatogonias desde el periodo fetal, bien mediante

mecanismo primario de biosíntesis o bien a través del mecanismo *ping-pong* (De Mateo y Sassone-corsi, 2014), y se asocian específicamente a MIWI2 y MILI (Yadav y Kotaja, 2014). Se ha comprobado que la ausencia de estas proteínas desemboca en la activación e hipometilación de elementos transponibles como *IAP* (*intracisternal A-particle*) y *LINE1*. Por ello, se ha señalado que su acción puede provocar una represión de estos elementos tanto transcripcional (mediante el impulso de la metilación de sus promotores) como postranscripcional (a través de su degradación mediante piRNA). A nivel postranscripcional, la proteína MIWI2 mantiene un repositorio de piRNA antisentido para las secuencias de los transposones que se encuentren activos en el genoma, con un funcionamiento comparable al del sistema inmunitario (Pillai y Chuma, 2012).

Por otro lado, los piRNA paquiténicos se sintetizan únicamente mediante el mecanismo de biogénesis primario (De Mateo y Sassone-corsi, 2014). Estos piRNA se unen específicamente a proteínas MIWI2 y silencian elementos transponibles únicamente a nivel postranscripcional. Al contrario de lo que ocurre con los piRNA prepaquiténicos, no provocan alteraciones en los patrones de metilación (Pillai y Chuma, 2012).

El lncRNA en la espermatogénesis

Se han identificado lncRNA que pueden estar potencialmente involucrados en el desarrollo de las células germinales masculinas, aunque solo algunos de ellos han sido caracterizados en espermatozoides (Luk et al., 2014). Entre ellos, se ha propuesto que el lncRNA *DMR* (*DMRT1 related gene*), expresado en espermatogonias, contribuye a controlar la diferenciación de estas células a espermatoцитos primarios, pues su gen diana es *DMRT1*, que codifica para un factor de transcripción esencial en el desarrollo germinal. También en las espermatogonias se expresan los denominados *Spg-lncRNA1* y 2, que podrían ser importantes en el mantenimiento de la pluripotencialidad de las espermatogonias. Por otro lado, entre los lncRNA expresados en los espermatoцитos paquiténicos destaca *TSX* (*testis-specific X-linked*), que podría estar involucrado en la regulación de la meiosis, y *MRHL* (*meiotic recombination hot spot locus*), cuya función dentro del proceso de la espermatogénesis aún está por caracterizar (Luk et al., 2014).

Funciones del RNA espermático en el desarrollo embrionario temprano

Cuando se produce la fecundación, además del genoma paterno, el espermatozoide libera otros componentes al interior del ovocito. Entre ellos destacan el centriolo, PLC-Z y otras proteínas perinucleares de la teca, incluyendo moléculas de señalización de rutas de cinasas, factores de transcripción y proteínas estructurales. La aportación de todos estos componentes intervendrá en los procesos de activación y desarrollo embrionario temprano (Boerke et al., 2007).

La liberación del RNA espermático al citoplasma del ovocito y su funcionalidad fue cuestionada durante mucho tiempo. Tras su descubrimiento, se postuló que estas moléculas constituían una fracción de RNA reminiscente

sintetizado durante la última fase de la expresión en espermátidas y sin ninguna función posterior (Cummins, 2001). Esto estaba respaldado por el hecho de que la fracción de RNA espermático liberado era muy pequeña (10-20 fg en humanos) (Krawetz, 2005) en comparación con la del ovocito (alrededor de 330.000 fg en humanos) (Kocabas et al., 2006), por lo que su trascendencia en el embrión se ponía en entredicho. Sin embargo, cada vez surgieron más datos que indicaban que el RNA espermático tiene una funcionalidad en el cigoto.

Los mRNA espermáticos liberados al cigoto pueden dividirse en 3 grupos principales según su procedencia y función. El primer grupo englobaría los transcritos expresados específicamente en las espermátidas sin una función potencial dentro del embrión que se haya predicho o descubierto hasta el momento. Estas moléculas podrían suponer un mero *pool* que ha ido permaneciendo de forma residual en las células resultantes, sin función en el embrión, para el que incluso pueden resultar perjudiciales, por lo que deben ser degradadas durante el desarrollo embrionario (Boerke et al., 2007). El ejemplo más importante de este grupo lo constituirían los transcritos de *PRM2*, expresados específicamente para la condensación de la cromatina espermática. Su expresión resulta potencialmente dañina para el embrión, por lo que son degradados con rapidez (Ziyyat y Lefèvre, 2001). Otro ejemplo de transcrito englobado en esta categoría es el de la proteína fusogénica GA17, uno de los mRNA más abundantes en espermatozoides maduros. Este transcrito se expresa durante el estadio de espermátida y está involucrado en la interacción espermatozoide-ovocito; su función tras la fecundación se desconoce (Miller y Ostermeier, 2006).

En el segundo grupo estarían incluidos los mRNA sintetizados de forma específica en las espermátidas y que sí muestran una función potencial dentro del desarrollo del cigoto. Esta población de mRNA se mantiene estable al menos hasta la activación del genoma embrionario y codifica proteínas involucradas en procesos de respuesta al estrés, embriogénesis, morfogénesis e implantación, aunque sus implicaciones aún necesitan demostrarse experimentalmente con más detalle (Boerke et al., 2007). El mRNA *AKAP-4* (*A-kinase anchoring protein 4*) sería un ejemplo de este grupo: esta proteína de anclaje es necesaria durante la diferenciación de las espermátidas, para la formación del flagelo y su movilidad, pero también está involucrada en diversas cascadas de señalización y es importante para la activación inicial del ovocito después de la fecundación (Appert-collin et al., 2006; Boerke et al., 2007). PLC- ζ , cuyo mensajero también es específico de las espermátidas, ejerce un papel en la embriogénesis temprana al desencadenar un incremento de la concentración de Ca^{2+} en el ovocito fecundado, lo que causa que complete la meiosis y se produzca la activación del cigoto (Saunders et al., 2007). Igualmente, dentro de este grupo también cabe mencionar a los mRNA de *FOXG1B* (*forkhead box G1*, importante en el desarrollo embrionario temprano), a la molécula de señalización *WNT5A* (involucrada en la diferenciación celular asociada al desarrollo morfológico), a la proteína de choque térmico *HSBP-1*, al factor de transcripción *STAT 4* (posible modulador de la transcripción del pronúcleo masculino) y a la ciclina *B1* (promueve el avance de la fase G2 a la M en el ciclo celular) (Boerke et al., 2007).

El tercer grupo abarca los mRNA que no son sintetizados dentro de las células espermáticas en sus distintos estadios, sino que son incorporados al interior del espermatozoide (Boerke et al., 2007). El plasma seminal contiene una alta concentración de RNA extracelular proveniente de distintos tejidos y tipos celulares, en comparación con otros fluidos corporales. En su mayoría, este RNA se encuentra almacenado en vesículas extracelulares, ya sean exosomas (originadas de forma endosomal y liberadas al exterior) o microvesículas (originadas por evaginación, por lo que están cubiertas por parte de su membrana plasmática) (Raposo y Stoorvogel, 2013). En el plasma seminal, la mayoría del RNA extracelular permanece en microvesículas de menos de 1 μm de tamaño, divididas principalmente en epididimosomas (provenientes del epidídimo) y prostasomas (procedentes de la próstata) (Li et al., 2012). Hay hipótesis que sostienen que tanto las microvesículas como los exosomas intervienen en la transmisión de transcritos extracelulares al interior del espermatozoide (Valadi et al., 2007). El ejemplo más conocido de entre estos transcritos es el de la clusterina o *SGP2*, expresada sobre todo en el epidídimo y la próstata, que está involucrada con la maduración espermática. En el contexto de su incorporación al ovocito, cabe resaltar su importancia en la interacción entre el espermatozoide y la zona pelúcida, y en otros procesos relacionados con el desarrollo embrionario (Boerke et al., 2007).

Además del conjunto de mRNA transmitidos del espermatozoide al ovocito, diversos estudios indican que los miRNA, los endo-siRNA y los piRNA provenientes del espermatozoide llevan a cabo una regulación de la expresión génica durante el desarrollo del cigoto. Se cree que los miRNA y endo-siRNA espermáticos, al igual que los mRNA, son liberados en el ovocito y permanecen intactos hasta el comienzo de la activación del genoma embrionario (Boerke et al., 2007). Por ejemplo, se ha descubierto que, en ovocitos de ratones en metafase II, se expresan diversos mRNA diana de miRNA presentes exclusivamente en espermatozoides maduros (Amanai et al., 2006). De hecho, la influencia epigenética ejercida por los miRNA es un foco de creciente interés científico. Uno de estos mecanismos mejor descritos de modificación epigenética en embriones por parte de los miRNA es la introducción de paramutaciones. Estas siguen una herencia no mendeliana y se producen como consecuencia de una alteración epigenética de un alelo (denominado «paramutagénico») que se transfiere a otro alelo (denominado «paramutable») y modifican su expresión génica. El alelo paramutable mantiene las alteraciones epigenéticas en las siguientes generaciones, aun cuando el alelo paramutagénico ya no está presente (Pilu, 2011).

El RNA espermático como biomarcador de fertilidad

La infertilidad es un problema que afecta aproximadamente a un 15% de las parejas en edad reproductiva. Dentro de la población infértil, aproximadamente el 50% de los casos de infertilidad son debidos a factores masculinos. A pesar de los avances experimentados en la última década en el desarrollo e implementación de técnicas diagnósticas, un porcentaje significativo de individuos presentan infertilidad de origen idiopático (Dohle et al., 2005).

Para desenmascarar estos casos, diversos autores han optado por el análisis del transcriptoma de los espermatozoides. La necesidad de identificar biomarcadores de infertilidad dentro del transcriptoma espermático constituye, por tanto, un campo de creciente interés dado que supone una buena oportunidad de investigación y diagnóstico más allá de la comprobación de los parámetros seminales observables (recuento espermático, movilidad, o morfología), cuyo valor pronóstico no siempre es fiable (Anton y Krawetz, 2012).

Ciertos RNA espermáticos han demostrado presentar una expresión diferencial y específica en poblaciones de individuos infértiles, por lo que su posible rol como biomarcadores supone el foco de atención dentro de esta área de investigación (Anton y Krawetz, 2012). Los transcritos de las protaminas 1 y 2 (*PRM1* y *PRM2*) han sido los más estudiados hasta el momento y la mayoría de los resultados han revelado alteraciones en su expresión con una clara asociación con la infertilidad (Aoki et al., 2006; Rogenhofer et al., 2013; Steger et al., 2008). Además de las protaminas, otros transcritos como el del regulador de la apoptosis *BCL2* (*B cell lymphoma 2*) también han mostrado una expresión diferencial (sobrexpresión) en individuos infértiles (Steger et al., 2008), mientras que los de la glicoproteína *PSG1* (*pregnancy-specific b-1-glycoprotein 1*) y el *HLA-E* (*human leukocyte antigen-E*) muestran una expresión diferencial menor a la normal (Avendaño et al., 2009). Lo mismo sucede con el mRNA de la proteína de choque térmico *HSPA2* (*heat-shock protein A2*) (Motiei et al., 2013) (tabla 1).

Otras líneas de investigación persiguen la identificación de biomarcadores de alteraciones seminales específicas. Por ejemplo, en poblaciones de individuos con oligozoospermia se ha hallado una expresión alterada de los mRNA de, entre otros, *HSPA2* (Cedenho et al., 2006), del receptor tirosina cinasa *TRKA* (Li et al., 2010) o de la familia de genes *VASA* (Guo et al., 2007) (tabla 1).

Respecto a los biomarcadores de teratozoospermia, los principales candidatos hallados han sido los mRNA de *PRM1* y *PRM2* (Savadi-Shiraz et al., 2015), *PLC-Z1*, de las proteínas acrosomales *ACRV1* (*acrosomal vesicle protein 1*) y *SPAM1* (*sperm adhesion molecule 1*), del componente de la cola del espermatozoide *ODF1-4* (*outer dense fiber of sperm tails 1-4*) (Platts et al., 2007) y de *TP2* (Savadi-Shiraz et al., 2015) (tabla 1).

Contemplando la astenozoospermia, se ha descrito que la mayoría de los mRNA expresados de forma diferencial en individuos con movilidad espermática reducida codifican proteínas involucradas en diferentes procesos del desarrollo o de la funcionalidad de los espermatozoides. Por ejemplo, los mRNA de la anexina *A2* (*ANXA2*), el regulador transcripcional *BRD2* (*bromodomain-containing protein 2*) o la enzima *OAZ3* (*ornithine decarboxylase antizyme 3*) han sido propuestos como biomarcadores en estos casos (Jodar et al., 2012). Una vez más, también se ha hallado una relación directa entre los niveles de expresión de *PRM1* y *PRM2* y la movilidad espermática (Kempisty et al., 2007; Lambard et al., 2004). Otros ejemplos son los transcritos codificantes de *HILS1*, proteína específica de espermatozoides, o de las proteínas *TP1* y *TP2*, vitales durante la espermatogénesis (Jedrejczak et al., 2007). Aparte de estos biomarcadores, otros estudios han hallado una expresión alterada de otros genes relacionada con alteraciones de la movilidad, como

TPX-1 (*testis-specific protein*), *LDHC* (*lactate dehydrogenase C*), *eNOS* (*endothelial nitric oxide synthase*) y *nNOS* (*neuronal nitric oxide synthase*) (Lambard et al., 2004; Wang et al., 2004) (tabla 1).

Los estudios de expresión en espermatozoides y células germinales recuperados de tejido testicular de individuos azoospermicos han desvelado también una mayor expresión de los mRNA de *PRM1* y *PRM2* en dichas células (Haraguchi et al., 2009; Song et al., 2000). Otros ejemplos de biomarcadores detectados en biopsias testiculares o en muestras de fluido seminal en casos de azoospermia no obstructiva han sido los transcritos de los homeobox *ESX1* (*extraembryonic, spermatogenesis, homeobox 1 homolog*) y *TGIFLX* (*X-linked TGIF-like protein*) (Aarabi et al., 2008; Pansa et al., 2014), así como los mRNA de los genes *DAZ* (*deleted in azoospermia*) (Aslani et al., 2011; Kuo et al., 2004). Otros estudios se han centrado en hallar transcritos con valor pronóstico para una buena recuperación de espermatozoides a partir de biopsia testicular en pacientes azoospermicos, como son los de las ciclinas *A1*, *B1* y *B2* (Haraguchi et al., 2009), los mRNA de los genes *CDY1* (*chromodomain Y1*) y *BOULE* (perteneciente a la familia de genes *DAZ*) (Kleiman et al., 2011) y el mRNA de *HSFY* (*heat shock factor Y chromosome*) (Stahl et al., 2011) (tabla 1).

Por otro lado, aunque de forma menos exhaustiva, también se han descrito algunos candidatos a biomarcadores en los casos de infertilidad idiopática en individuos normozoospermicos, como son los mRNA de la tripsina *TRY1*, la variante 3 del transcrito de la glutamiltransferasa *GGT1* y el mRNA de la proteína *CAB39L* (*calcium binding protein 39 like*) (Garrido et al., 2009) (tabla 1).

Englobando otro tipo de enfermedades relacionadas con la infertilidad, también se han logrado identificar diversos biomarcadores de criptorquidismo (Nguyen et al., 2009) o de varicocele (Del Giudice et al., 2010; Ferlin et al., 2010; Ji et al., 2014; Ni et al., 2014). Aparte de estas alteraciones, otros estudios de expresión se han centrado en identificar biomarcadores específicos de otros parámetros como son el éxito obtenido en los tratamientos de reproducción asistida (Depa-Martynów et al., 2007; Garcia-Herrero et al., 2011) (tabla 1).

Por otro lado, y aunque aún de forma mucho más incipiente, algunos autores también han propuesto la evaluación de los miRNA espermáticos como una nueva fuente de posibles biomarcadores. Este planteamiento se basa en la gran importancia que poseen dichos sncRNA dentro del proceso de regulación de la estabilidad de los mRNA. Abu-Halima et al. realizaron un análisis comparativo mediante *microarrays* entre controles fértiles e individuos astenozoospermicos y oligoastenozoospermicos; como resultado, se encontraron una serie de miRNA sobreexpresados (50 en astenozoospermicos y 42 en oligoastenozoospermicos) y otros con expresión reducida (27 en astenozoospermicos y 44 en oligoastenozoospermicos) (Abu-Halima et al., 2013). Posteriormente, se realizó la validación de 5 miRNA concretos (miR-34b*, miR-34b, miR-34c-5p, miR-429 y miR-122) mediante qRT-PCR, se confirmó su expresión diferencial en individuos infértiles y se proponen como posibles biomarcadores de las alteraciones diagnosticadas (Abu-Halima et al., 2014). Zhou et al. se centraron en la astenozoospermia, y proponen el miR-27b como biomarcador al regular directamente al mRNA de *CRISP2* (*cysteine-rich secretory protein*

Tabla 1 Relación de los mRNA espermáticos humanos descritos hasta la fecha como posibles biomarcadores de diferentes alteraciones relacionadas con la infertilidad

		Infertilidad y subfertilidad					
<i>BCL2</i>	<i>HLA-E</i>	<i>HSPA2</i>	<i>PRM1</i>	<i>PRM2</i>	<i>PSG1</i>		
		Oligozoospermia					
<i>CREM</i>	<i>HSF2</i>	<i>HSPA4</i>	<i>NIPBL</i>	<i>PRM2</i>	<i>UBE2B</i>		
<i>DDX3X</i>	<i>HSP90</i>	<i>JMJD1A</i>	<i>PARK7</i>	<i>SPATA4</i>	<i>VASA</i>		
<i>HSF1</i>	<i>HSPA2</i>	<i>MEA1</i>	<i>PRM1</i>	<i>SPZ-1</i>			
		Teratozoospermia					
<i>ACRV1</i>	<i>ODF1-4</i>	<i>PLCZ1</i>	<i>PRM1</i>	<i>PRM2</i>	<i>SPAM1</i>	<i>TNP2</i>	
		Astenozoospermia					
<i>ANXA2</i>	<i>CRISP2</i>	<i>HILS1</i>	<i>nNOS</i>	<i>OAZ3</i>	<i>PRM2</i>	<i>TNP2</i>	
<i>BRD2</i>	<i>eNOS</i>	<i>LDHC</i>	<i>NRF2</i>	<i>PRM1</i>	<i>TNP1</i>	<i>TPX1</i>	
		Oligoastenozoospermia					
<i>BDNF</i>	<i>NRF2</i>	<i>TRKA</i>					
		Azoospermia no obstructiva					
<i>ADCY10</i>	<i>CCNA1</i>	<i>DAZ</i>	<i>GGN</i>	<i>PRM1</i>	<i>SPATS1</i>	<i>UBQLN3</i>	
<i>AKAP4</i>	<i>CCNB1</i>	<i>ESX1</i>	<i>GSG1</i>	<i>PRM2</i>	<i>RBMY1</i>	<i>WBSCR28</i>	
<i>BOULE</i>	<i>CCNB2</i>	<i>FAM71F1</i>	<i>GTSF1L</i>	<i>SPACA4</i>	<i>TGIFL</i>		
<i>CAPN11</i>	<i>CDY1</i>	<i>FSCN3</i>	<i>HSFY</i>	<i>SPATA3</i>	<i>TMEM225</i>		
		Normozoospermia infértil					
<i>CAB39L</i>	<i>GGT1 transcript variant 3</i>	<i>TRY1</i>					
		Criptorquidismo					
<i>AGP-1</i>	<i>EIF4G2</i>	<i>HNRPA1</i>	<i>PMS1</i>	<i>RPL9</i>	<i>SRP54</i>	<i>TR-α</i>	
<i>ATF2</i>	<i>FKBP3</i>	<i>HSPCD35</i>	<i>PPGB</i>	<i>RPS10</i>	<i>SUI1</i>	<i>UBE2D2</i>	
<i>CD47</i>	<i>GNAS</i>	<i>KPNA2</i>	<i>PPP2R2B</i>	<i>RPS3A</i>	<i>TAF10</i>	<i>UBN1</i>	
<i>CDC27</i>	<i>GSTM3</i>	<i>MCSP</i>	<i>PRM1</i>	<i>SCAMP2</i>	<i>TCP11</i>	<i>USP25</i>	
<i>CUL3</i>	<i>GUCA1A</i>	<i>NUP155</i>	<i>RANBP9</i>	<i>SKP1</i>	<i>TNPAIP3</i>		
<i>EEF1A1</i>	<i>GYG</i>	<i>ODF1</i>	<i>RPL7</i>	<i>SRP14</i>	<i>TPX1</i>	<i>VDAC3</i>	
		Varicocele					
<i>FasL</i>	<i>HSF1</i>	<i>HSF2</i>	<i>HSPA1B</i>	<i>HSPA4</i>			
		Alteración de resultados en tratamientos de reproducción asistida					
<i>A2M</i>	<i>C1QB</i>	<i>CFD</i>	<i>DDIT4</i>	<i>LGALS1</i>	<i>MT1B</i>	<i>S100A6</i>	
<i>ADAM2</i>	<i>CAPG</i>	<i>COX7B2</i>	<i>FTHL12</i>	<i>LGALS3</i>	<i>MT1F</i>	<i>SPP1</i>	
<i>ANGPTL4</i>	<i>CCL18</i>	<i>CTSB</i>	<i>FTL</i>	<i>LOC645745</i>	<i>MT1G</i>	<i>TGFB1</i>	
<i>ANKRD7</i>	<i>CD163</i>	<i>CTSH</i>	<i>GPX1</i>	<i>MARCO</i>	<i>MT1X</i>	<i>TMSL3</i>	
<i>APOC1</i>	<i>CD63</i>	<i>CTSL</i>	<i>GRN</i>	<i>METRNL</i>	<i>NPC2</i>	<i>TYROBP</i>	
<i>APOE</i>	<i>CD68</i>	<i>CTS2</i>	<i>HMOX1</i>	<i>MPP1</i>	<i>PRM1</i>	<i>VIM</i>	
<i>C19orf36</i>	<i>CDKN2D</i>	<i>CXCR4</i>	<i>IFI30</i>	<i>MT1A</i>	<i>PRM2</i>	<i>VSIG4</i>	

2), poco expresado en individuos astenozoospermicos (Zhou et al., 2015). Salas-Huetos et al. por otro lado, compararon los perfiles de individuos fértiles normozoospermicos (Salas-Huetos et al., 2014) con los de pacientes con diferentes anomalías seminales puras, e identificaron variaciones en la expresión de miRNA en individuos astenozoospermicos, teratozoospermicos, oligozoospermicos (Salas-Huetos et al., 2015) y normozoospermicos infértiles (Salas-Huetos et al., 2016). Además, Ji et al. identificaron una expresión diferencial del miR-15a en pacientes con varicocele (Ji et al., 2014).

Consideraciones finales

Durante el transcurso de las investigaciones acerca del RNA espermático, la idea de que el espermatozoide es un mero vehículo del genoma paterno ha sido sustituida por una

visión más profunda y detallada del funcionamiento y papel biológico de su transcriptoma. Se ha demostrado que su función no está limitada únicamente a transmitir la fracción codificante, sino que existe un complejo sector de ncRNA que participa en importantes mecanismos de regulación y procesos celulares. El RNA espermático no solo supone una huella residual del transcriptoma involucrado en la espermatogénesis, sino que también permite prever las características de la futura aportación transcriptómica al cigoto y anticipar en parte cómo este factor paterno afectará al desarrollo embrionario. Esta aportación extragenómica supone un foco de atención para investigaciones futuras: tal vez, haya que hacer especial hincapié en la huella epigenética mediada por RNA que conlleva la incorporación de ciertos transcritos espermáticos al embrión. Las investigaciones en este campo podrían llegar a aplicarse para mejorar el pronóstico de la calidad embrionaria durante tratamientos de reproducción asistida. Por otro

lado, los avances en las tecnologías de estudio de la expresión transcriptómica a gran escala están abriendo las puertas a nuevos frentes en el ámbito de los biomarcadores de fertilidad y están permitiendo ahondar en su aplicación de forma más detallada. Los hallazgos en esta área dejan paso a potenciales aplicaciones futuras en el ámbito clínico, para el diagnóstico molecular de la infertilidad masculina. Como visión general, se estima que la investigación en un campo tan complejo como es el RNA espermático generará nuevos descubrimientos teóricos y mejoras en sus posibles aplicaciones prácticas.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Conflicto de intereses

Todos los autores declaran no tener ningún tipo de conflicto de intereses.

Bibliografía

- Aarabi, M., Ousati-Ashtiani, Z., Nazarian, A., Modarresi, M., Heidari, M., 2008. Association of TGIFLX/Y mRNA expression with azoospermia in infertile men. *Molecular Reproduction and Development* 75, 1761–1766.
- Abu-Halima, M., Hammadeh, M., Backes, C., Fischer, U., Leidinger, P., Lubbad, A.M., et al., 2014. Panel of five microRNAs as potential biomarkers for the diagnosis and assessment of male infertility. *Fertility and Sterility* 102, 989–997.
- Abu-Halima, M., Hammadeh, M., Schmitt, J., Leidinger, P., Keller, A., Meese, E., et al., 2013. Altered microRNA expression profiles of human spermatozoa in patients with different spermatogenic impairments. *Fertility and Sterility*, 99.
- Amanai, M., Brahmajosyula, M., Perry, A., 2006. A restricted role for sperm-borne microRNAs in mammalian fertilization. *Biology of Reproduction* 75, 877–884.
- Ambros, V., 2001. MicroRNAs: Tiny regulators with great potential. *Cell* 107, 823–826.
- Anton, E., Krawetz, S., 2012. Spermatozoa as biomarkers for the assessment of human male infertility and genotoxicity. *Systems Biology in Reproductive Medicine* 58, 41–50.
- Aoki, V., Liu, L., Carrell, D., 2006. A novel mechanism of protamine expression deregulation highlighted by abnormal protamine transcript retention in infertile human males with sperm protamine deficiency. *Molecular Human Reproduction* 12, 41–50.
- Appert-collin, A., Baisamy, L., Diviani, D., 2006. Regulation of G protein-coupled receptor signaling by a-kinase anchoring proteins. *Journal of Receptor and Signal Transduction Research* 26, 631–646.
- Aslani, F., Modarresi, M.H., Soltanghorae, H., Akhondi, M.M., Shabani, A., Lakpour, N., et al., 2011. Seminal molecular markers as a non-invasive diagnostic tool for the evaluation of spermatogenesis in non-obstructive azoospermia. *Systems Biology in Reproductive Medicine* 57, 190–196.
- Avendaño, C., Franchi, A., Jones, E., Oehninger, S., 2009. Pregnancy-specific β -1-glycoprotein 1 and human leukocyte antigen-E mRNA in human sperm Differential expression in fertile and infertile men and evidence of a possible functional role during early development. *Human Reproduction* 24, 270–277.
- Bao, J., Wu, J., Schuster, A.S., Hennig, G.W., Yan, W., 2013. Expression profiling reveals developmentally regulated lncRNA repertoire in the mouse male germline. *Biology of Reproduction* 89, 107.
- Boerke, A., Dieleman, S., Gadella, B., 2007. A possible role for sperm RNA in early embryo development. *Theriogenology* 68, 147–155.
- Cappallo-Obermann, H., Schulze, W., Jastrow, H., Baukloh, V., Spiess, A., 2011. Highly purified spermatozoal RNA obtained by a novel method indicates an unusual 28S/18S rRNA ratio and suggests impaired ribosome assembly. *Molecular Human Reproduction* 17, 669–678.
- Carbon, S., Ireland, A., Mungall, C.J., Shu, S., Marshall, B., Lewis, S., et al., 2009. AmiGO: Online access to ontology and annotation data. *Bioinformatics* 25, 288–289.
- Cedenho, A., Lima, S., Cenedeze, M., Spaine, D., Ortiz, V., Oehninger, S., 2006. Oligozoospermia and heat-shock protein expression in ejaculated spermatozoa. *Human Reproduction* 21, 1791–1794.
- Chuma, S., Nakano, T., 2013. piRNA and spermatogenesis in mice. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 368, 20110338.
- Cummins, J., 2001. Cytoplasmic inheritance and its implications for animal biotechnology. *Theriogenology* 55, 1381–1399.
- Dadoue, J., 2009. Spermatozoal RNAs: What about their functions? *Microscopy Research and Technique* 72, 536–551.
- Dadoue, J., Pawlak, A., Alfonsi, M., Siffroi, J., 2005. Identification of transcripts by macroarrays RT-PCR and in situ hybridization in human ejaculate spermatozoa. *Molecular Human Reproduction* 11, 133–140.
- De Mateo, S., Sassone-corsi, P., 2014. Regulation of spermatogenesis by small non-coding RNAs: Role of the Germ granule. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 29, 84–92.
- Del Giudice, P.T., Lima, S.B., Cenedeze, M.A., Pacheco-Silva, A., Bertolla, R.P., Cedenho, A.P., 2010. Expression of the Fas-ligand gene in ejaculated sperm from adolescents with and without varicocele. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 27, 103–109.
- Depa-Martynów, M., Kempisty, B., Lianeri, M., Jagodziński, P., Jedrzejczak, P., 2007. Association between fertilin beta, protamines 1 and 2 and spermatid-specific linker histone H1-like protein mRNA levels fertilization ability of human spermatozoa, and quality of preimplantation embryos. *Folia Histochemica et Cyto-biologica* 45, 79–85.
- Dohle, G., Colpi, G., Hargreave, T., Papp, G., Jungwirth, A., Weidner, W., 2005. EAU guidelines on male infertility. *European Urology* 48, 703–711.
- Ferlin, A., Speltra, E., Patassini, C., Pati, M., Garolla, A., Caretta, N., et al., 2010. Heat shock protein and heat shock factor expression in sperm: Relation to oligozoospermia and varicocele. *Journal of Urology* 183, 1248–1252.
- García-Herrero, S., Garrido, N., Martínez-Conejero, J.A., Remohí, J., Pellicer, A., Meseguer, M., 2011. Differential transcriptomic profile in spermatozoa achieving pregnancy or not via ICSI. *Reproductive BioMedicine Online* 22, 25–36.
- Garrido, N., García-Herrero, S., Meseguer, M., 2013. Assessment of sperm using mRNA microarray technology. *Fertility and Sterility* 99, 1008–1022.
- Garrido, N., Martínez-Conejero, J.A., Jauregui, J., Horcajadas, J.A., Simón, C., Remohí, J., et al., 2009. Microarray analysis in sperm from fertile and infertile men without basic sperm

- analysis abnormalities reveals a significantly different transcriptome. *Fertility and Sterility*. 91, 1307–1310.
- Girard, A., Sachidanandam, R., Hannon, G.J., Carmell, M.A., 2006. A germline-specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins. *Nature* 442, 199–202.
- Goodrich, R., Anton, E., Krawetz, S., 2013. Isolating mRNA and small noncoding RNAs from human sperm. *Methods in Molecular Biology*. 927, 385–396.
- Guo, X., Gui, Y.T., Tang, A.F., Lu, L.H., Gao, X., Cai, Z.M., 2007. Differential expression of VASA gene in ejaculated spermatozoa from normozoospermic men and patients with oligozoospermia. *Asian Journal of Andrology*. 9, 339–344.
- Hamatani, T., 2012. Human spermatozoal RNAs. *Fertility and Sterility*. 97, 275–281.
- Hammoud, S.S., Nix, D.A., Zhang, H., Purwar, J., Carrell, D.T., Cairns, B.R., 2009. Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development. *Nature* 460, 473–478.
- Haraguchi, T., Ishikawa, T., Yamaguchi, K., Fujisawa, M., 2009. Cyclin and protamine as prognostic molecular marker for testicular sperm extraction in patients with azoospermia. *Fertility and Sterility*. 91, 1424–1426.
- Hosken, D.J., Hodgson, D.J., 2014. Why do sperm carry RNA? Relatedness, conflict, and control. *Trends in Ecology & Evolution*. 29, 451–455.
- Jedrzejczak, P., Kempisty, B., Bryja, A., Mostowska, M., Depa-Martynow, M., Pawelczyk, L., et al., 2007. Quantitative assessment of transition proteins 1 & 2 spermatid-specific linker histone H1-like protein transcripts in spermatozoa from normozoospermic and asthenozoospermic men. *Archives of Andrology*. 53, 199–205.
- Ji, Z., Lu, R., Mou, L., Duan, Y.G., Zhang, Q., Wang, Y., et al., 2014. Expressions of miR-15a and its target gene HSPA1B in the spermatozoa of patients with varicocele. *Reproduction* 147, 693–701.
- Jodar, M., Kalko, S., Castillo, J., Ballescà, J.L., Oliva, R., 2012. Differential RNAs in the sperm cells of asthenozoospermic patients. *Human Reproduction*. 27, 1431–1438.
- Jodar, M., Selvaraju, S., Sandler, E., Diamond, M.P., Krawetz, S.A., 2013. The presence, role and clinical use of spermatozoal RNAs. *Human Reproduction Update* 19, 604–624.
- Kempisty, B., Depa-Martynow, M., Lianeri, M., Jedrzejczak, P., Darul-Wasowicz, A., Jagodzinski, P., 2007. Evaluation of protamines 1 and 2 transcript contents in spermatozoa from asthenozoospermic men. *Folia Histochemica et Cytobiologica* 45, 109–113.
- Keniry, A., Oxley, D., Monnier, P., Kyba, M., Dandolo, L., Smits, G., et al., 2012. The H19 lincRNA is a developmental reservoir of miR-675 that suppresses growth and Igf1r. *Nature Cell Biology* 14, 659–665.
- Kleiman, S.E., Lehani, O., Hauser, R., Botchan, A., Paz, G., Yavetz, H., et al., 2011. CDY1 and BOULE transcripts assessed in the same biopsy as predictive markers for successful testicular sperm retrieval. *Fertility and Sterility*. 95, 2297–2302. e1.
- Kocbas, A.M., Crosby, J., Ross, P.J., Otu, H.H., Beyhan, Z., Can, H., et al., 2006. The transcriptome of human oocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 14027–14032.
- Kotaja, N., 2014. MicroRNAs and spermatogenesis. *Fertility and Sterility*. 101, 1552–1562.
- Kraus, P., Sivakamasundari, V., Lim, S.L., Xing, X., Lipovich, L., Lufkin, T., 2013. Making sense of Dlx1 antisense RNA. *Developmental Biology* 376, 224–235.
- Krawetz, S., 2005. Paternal contribution: New insights and future challenges. *Nature Reviews Genetics* 6, 633–642.
- Krawetz, S.A., Kruger, A., Lalancette, C., Tagett, R., Anton, E., Draghici, S., et al., 2011. A survey of small RNAs in human sperm. *Human Reproduction*. 26, 3401–3412.
- Kumar, G., Patel, D., Naz, R., 1993. c-MYC mRNA is present in human sperm cells. *Cellular & Molecular Biology Research* 39, 111–117.
- Kuo, P.L., Lin, Y.H., Teng, Y.N., Hsu, C.C., Lin, J.S., Lin, Y.M., 2004. Transcriptional levels of four Y chromosome-linked AZF genes in azoospermic men and their association with successful sperm retrieval. *Urology* 63, 131–136.
- Lambard, S., Galeraud-Denis, I., Martin, G., Levy, R., Chocat, A., Carreau, S., 2004. Analysis and significance of mRNA in human ejaculated sperm from normozoospermic donors. Relationship to sperm motility and capacitation. *Molecular Human Reproduction* 10, 535–541.
- Li, C., Zheng, L., Wang, C., Zhou, X., 2010. Absence of nerve growth factor and comparison of tyrosine kinase receptor A levels in mature spermatozoa from oligoasthenozoospermic, asthenozoospermic and fertile men. *Clinica Chimica Acta* 411, 1482–1486.
- Li, C., Zhou, X., 2012. Gene transcripts in spermatozoa: Markers of male infertility. *Clinica Chimica Acta* 413, 1035–1038.
- Li, H., Huang, S., Guo, C., Guan, H., Xiong, C., 2012. Cell-free seminal mRNA and microRNA exist in different forms. *PLoS One*, 7.
- Luk, A.C.S., Chan, W.Y., Rennert, O.M., Lee, T.L., 2014. Long noncoding RNAs in spermatogenesis: Insights from recent high-throughput transcriptome studies. *Reproduction*, 147.
- Luo, L.-F., Hou, C.-C., Yang, W.-X., 2015. Small non-coding RNAs and their associated proteins in spermatogenesis. *Gene* 578, 141–157.
- Miller, D., Ostermeier, G.C., 2006. Towards a better understanding of RNA carriage by ejaculate spermatozoa. *Human Reproduction Update* 12, 757–767.
- Miller, D., Ostermeier, G.C., Krawetz, S.A., 2005. The controversy potential and roles of spermatozoal RNA. *Trends in Molecular Medicine* 11, 156–163.
- Motiei, M., Tavalaei, M., Rabiei, F., Hajhosseini, R., Nasr-Esfahani, M.H., 2013. Evaluation of HSPA2 in fertile and infertile individuals. *Andrologia* 45, 66–72.
- Naz, R., Ahmad, K., Kumar, G., 1991. Presence and role of c-myc proto-oncogene product in mammalian sperm cell function. *Biology of Reproduction* 44, 842–850.
- Nguyen, M.T., Delaney, D.P., Kolon, T.F., 2009. Gene expression alterations in cryptorchid males using spermatozoal microarray analysis. *Fertility and Sterility* 92, 182–187.
- Ni, K., Steger, K., Yang, H., Wang, H., Hu, K., Chen, B., 2014. Sperm protamine mRNA ratio and DNA fragmentation index represent reliable clinical biomarkers for men with varicocele after microsurgical varicocele ligation. *Journal of Urology*. 192, 170–176.
- Ostermeier, G.C., Dix, D.J., Miller, D., Khatri, P., Krawetz, S.A., 2002. Spermatozoal RNA profiles of normal fertile men. *Lancet* 360, 772–777.
- Ostermeier, G.C., Goodrich, R.J., Diamond, M.P., Dix, D.J., Krawetz, S.A., 2005. Toward using stable spermatozoal RNAs for prognostic assessment of male factor fertility. *Fertility and Sterility*. 83, 1687–1694.
- Pansa, A., Sirchia, S.M., Melis, S., Giacchetta, D., Castiglioni, M., Colapietro, P., et al., 2014. ESX1 mRNA expression in seminal fluid is an indicator of residual spermatogenesis in non-obstructive azoospermic men. *Human Reproduction* 29, 2620–2627.
- Pantano, L., Jodar, M., Bak, M., Ballescà, J.L., Tommerup, N., Oliva, R., et al., 2015. The small RNA content of human sperm reveals pseudogene-derived piRNAs complementary to protein-coding genes. *RNA* 21, 1085–1095.
- Pillai, R.S., Chuma, S., 2012. piRNAs and their involvement in male germline development in mice. *Development, Growth & Differentiation* 54, 78–92.
- Pilu, R., 2011. Paramutation: Just a curiosity or fine tuning of gene expression in the next generation? *Current Genomics* 12, 298–306.
- Place, R., Li, L., Pookot, D., Noonan, E., Dahiya, R., 2008. MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary

- promoter sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 1608–1613.
- Platts, A.E., Dix, D.J., Chemes, H.E., Thompson, K.E., Goodrich, R., Rockett, J.C., et al., 2007. Success and failure in human spermatogenesis as revealed by teratozoospermic RNAs. *Human Molecular Genetics* 16, 763–773.
- Raposo, G., Stoorvogel, W., 2013. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *The Journal of Cell Biology* 200, 373–383.
- Rogenhofer, N., Dansranjav, T., Schorsch, M., Spiess, A., Wang, H., von Schönfeldt, V., et al., 2013. The sperm protamine mRNA ratio as a clinical parameter to estimate the fertilizing potential of men taking part in an ART programme. *Human Reproduction* 28, 969–978.
- Röther, S., Meister, G., 2011. Small RNAs derived from longer non-coding RNAs. *Biochimie* 93, 1905–1915.
- Salas-Huetos, A., Blanco, J., Vidal, F., Godo, A., Grossmann, M., Pons, M.C., et al., 2015. Spermatozoa from patients with seminal alterations exhibit a differential micro-ribonucleic acid profile. *Fertility and Sterility* 104, 591–601.
- Salas-Huetos, A., Blanco, J., Vidal, F., Grossmann, M., Pons, M.C., Garrido, N., et al., 2016. Sperm from normozoospermic fertile and infertile individuals convey a distinct miRNA cargo. *Andrology*.
- Salas-Huetos, A., Blanco, J., Vidal, F., Mercader, J.M., Garrido, N., Anton, E., 2014. New insights into the expression profile and function of micro-ribonucleic acid in human spermatozoa. *Fertility and Sterility* 102, 213–222.
- Saunders, C., Swann, K., Lai, F., 2007. PLCzeta a sperm-specific PLC and its potential role in fertilization. *Biochemical Society Symposia* 74, 23–36.
- Savadi-Shiraz, E., Edalatkhah, H., Talebi, S., Heidari-Vala, H., Zandemami, M., Pahlavan, S., et al., 2015. Quantification of sperm specific mRNA transcripts (PRM1, PRM2, and TNP2) in teratozoospermia and normozoospermia New correlations between mRNA content and morphology of sperm. *Molecular Reproduction and Development* 82, 26–35.
- Schwarz, D.S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N., Zamore, P.D., 2003. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 115, 199–208.
- Song, G.J., Lee, H.S., Park, Y.S., Lee, H.J., Lee, Y.S., Seo, J.T., et al., 2000. Expression pattern of germ cell-specific genes in the testis of patients with nonobstructive azoospermia. Usefulness as a molecular marker to predict the presence of testicular sperm. *Fertility and Sterility* 73, 1104–1108.
- Song, R., Hennig, G.W., Wu, Q., Jose, C., Zheng, H., Yan, W., 2011. Male germ cells express abundant endogenous siRNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 13159–13164.
- Stahl, P.J., Mielnik, A., Schlegel, P.N., Paduch, D.A., 2011. Heat shock factor y chromosome (HSFY) mRNA level predicts the presence of retrievable testicular sperm in men with nonobstructive azoospermia. *Fertility and Sterility* 96, 303–308.
- Steger, K., Wilhelm, J., Konrad, L., Stalf, T., Greb, R., Diemer, T., et al., 2008. Both protamine-1 to protamine-2 mRNA ratio and Bcl2 mRNA content in testicular spermatids and ejaculated spermatozoa discriminate between fertile and infertile men. *Human Reproduction* 23, 11–16.
- Suh, N., Baehner, L., Moltzahn, F., Melton, C., Chen, J., Billewicz, R., 2010. MicroRNA function is globally suppressed in mouse oocytes and early embryos. *Current Biology* 20, 271–277.
- Thomas, M., Lieberman, J., Lal, A., 2010. Desperately seeking microRNA targets. *Nature Structural & Molecular Biology* 17, 1169–1174.
- Tong, M.-H., Mitchell, D., Evanoff, R., Griswold, M.D., 2011. Expression of Mirlet7 family microRNAs in response to retinoic acid-induced spermatogonial differentiation in mice. *Biology of Reproduction* 85, 189–197.
- Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J.J., Lötvall, J.O., 2007. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature Cell Biology* 9, 654–659.
- Wang, H., Zhou, Z., Xu, M., Li, J., Xiao, J., Xu, Z.Y., et al., 2004. A spermatogenesis-related gene expression profile in human spermatozoa and its potential clinical applications. *Journal of Molecular Medicine* 82, 317–324.
- Wykes, S., Visscher, D., Krawetz, S., 1997. Haploid transcripts persist in mature human spermatozoa. *Molecular Human Reproduction* 3, 15–19.
- Yadav, R.P., Kotaja, N., 2014. Small RNAs in spermatogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology* 382, 498–508.
- Zhao, Y., Li, Q., Yao, C., Wang, Z., Zhou, Y., Wang, Y., et al., 2006. Characterization and quantification of mRNA transcripts in ejaculated spermatozoa of fertile men by serial analysis of gene expression. *Human Reproduction* 21, 1583–1590.
- Zhou, J.-H., Zhou, Q.Z., Lyu, X.-M., Zhu, T., Chen, Z.-J., Chen, M.-K., et al., 2015. The expression of cysteine-rich secretory protein 2 (CRISP2) and its specific regulator miR-27b in the spermatozoa of patients with asthenozoospermia. *Biology of Reproduction* 92, 28.
- Zhu, Z., Li, C., Yang, S., Tian, R., Wang, J., Yuan, Q., et al., 2016. Dynamics of the transcriptome during human spermatogenesis: Predicting the potential key genes regulating male gametes generation. *Scientific Reports* 6, 19069.
- Ziyyat, A., Lefèvre, A., 2001. Differential gene expression in pre-implantation embryos from mouse oocytes injected with round spermatids or spermatozoa. *Human Reproduction* 16, 1449–1456.