

## ORIGINAL

## Perfiles de expresión génica en hombres infértiles que se someten a reproducción asistida<sup>☆</sup>

Sandra García-Herrero\*, Nicolás Garrido Puchalt, Antonio Pellicer Martínez, José Remohí Giménez, José Antonio Martínez Conejero y Marcos Meseguer Escrivá

Instituto Universitario IVI, Valencia, España

Recibido el 5 de enero de 2010; aceptado el 31 de mayo de 2010

### PALABRAS CLAVE

ARN mensajero;  
Inseminación  
Artificial  
homóloga;  
Inyecciones de  
esperma  
intracitoplasmáticas;  
Microarrays;  
Semen

### Resumen

**Introducción:** El espermiograma tiene una capacidad diagnóstica limitada a la hora de predecir una gestación en las técnicas de reproducción asistida. Parámetros moleculares como los ARN mensajeros presentes en el esperma no se evalúan. Nuestro grupo ha realizado listados de genes diferencialmente expresados (GDE) de muestras de semen que lograban un embarazo (E) frente aquellas que no (NE), en pacientes que se sometían a ciclos de IAH o de ICSI. El objetivo era caracterizar los perfiles de expresión, usando la tecnología del microarray, de muestras de semen que logran o no embarazo en ciclos de IAH o ICSI.

**Material y métodos:** 30 muestras de semen (10 lograron embarazo [E=10] y 10 no [NE=10]) se obtenían de pacientes que se sometían a un ciclo de IAH y 10 muestras de semen (E=5, NE=5) que se sometían a uno de ICSI con ovocitos de donantes. Finalmente se realizaron 4 microarrays con las muestras de semen que lograban embarazo frente aquellas que no para ambas técnicas evaluándose los GDE que había entre los grupos E y NE tanto en IAH como en ICSI.

**Resultados:** El número total de genes (NTG) detectados en el microarray de IAH fue de 19.938 y 19.229 en ICSI. El número total de GDE fue de 950 en IAH y 49 en ICSI.

**Conclusiones:** Los datos revelan que los factores moleculares requeridos para lograr embarazo son diferentes según la técnica utilizada.

Estas diferencias pueden ser potencialmente empleadas como marcadores de éxito en ambas técnicas y como futura herramienta terapéutica.

© 2010 AEBM, AEFA y SEQC. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

<sup>☆</sup> Este trabajo corresponde a una comunicación científica presentada y premiada en el III Congreso Nacional del Laboratorio Clínico celebrado en Valencia del 14 al 16 de octubre de 2009.

\*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: sherrero@ivi.es (S. García-Herrero).

**KEYWORDS**

Messenger RNA;  
Intrauterine  
insemination;  
Intracytoplasmic  
sperm injection;  
Microarrays;  
Semen

**Gene expression profiles of infertile men who undergo assisted reproduction****Abstract**

**Introduction:** Basic sperm analysis has insufficient predictive power on pregnancy achievement in assisted reproductive techniques (ARTs). Molecular parameters such as as mRNA present within spermatozoa are not assessed. Our group listed differentially expressed genes (DEG) from sperm samples (SS) from that achieve pregnancy (group P) vs. those that do not (group NP) using microarray technology in couples undergoing homologous IUI and ICSI. The aim is to use microarray technology to characterise the different gene expression profiles (EP) between SS that achieve pregnancy or not in ICSI and IUI cycles.

**Material and methods:** Ten SS (5 that achieved and 5 that did not achieve pregnancy) were obtained from IP undergoing ICSI and 20 (10 that achieved and 10 did not achieve pregnancy) IAH cycles with oocytes from young donors and their healthy female partners respectively. After freezing aliquots of the SS employed for both treatments and their respective mRNA expression profiles were compared. Finally 4 microarrays were performed in duplicate with sperm samples from group P vs. NP from both techniques and those DEG were evaluated at least twice, with statistically significant differences between P and NP SS for each group.

**Results:** Total number of genes (TNG) in IUI microarray was 19938 and 19229 in ICSI. The total number of DEG (950) in the IAH group was much greater than in the ICSI group (49).

**Conclusions:** These data reveal that molecular features required for pregnancy are different in IUI and ICSI procedures.

These differences could be potentially employed to detect ICSI and IUI success markers or to improve pregnancy rates in these procedures.

© 2010 AEBM, AEFA and SEQC. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

**Introducción**

La inseminación intrauterina homóloga (IAH) es la primera técnica de reproducción asistida (TRA) que se emplea con parejas que no logran embarazo tras un mínimo de un año manteniendo relaciones sexuales sin protección y con una anamnesis previa que no desvela patología alguna en cuanto a problemas de fertilidad<sup>1</sup>. La IAH consiste en el depósito de forma artificial de una preparación de semen tras un proceso de selección espermática, en el tracto reproductor femenino, siendo más frecuente su realización en el interior de la cavidad uterina. De esta manera se intenta acortar la distancia que separa óvulo y espermatozoide y facilitar su encuentro<sup>2</sup>.

Para que la inseminación artificial tenga éxito es imprescindible que al menos una de las trompas de Falopio sea permeable. Además, el semen del varón debe cumplir unos parámetros seminales mínimos<sup>2</sup>.

Normalmente la tasa acumulada de embarazo tras 4 ciclos de IAH es de un 20–40%. Un importante porcentaje de las parejas (30–40%), no logran un embarazo tras varios ciclos de IAH, incluso en esos casos en los que ningún miembro de la pareja presenta problemas para concebir<sup>2</sup>.

La inyección intracitoplasmática del espermatozoide (ICSI) es una técnica que se utiliza cuando los parámetros seminales son muy patológicos. Consiste en microinyectar un espermatozoide móvil y morfológicamente normal en un ovocito que previamente ha sido extraído del ovario de la mujer<sup>3</sup>. Tras la microinyección y después de haberse comprobado que ha habido fecundación y que las primeras divisiones embrionarias han sido correctas, se transfiere al

útero de la paciente dentro los siguientes 3–6 días tras la microinyección<sup>4</sup>.

Esta TRA se prescribe en casos (entre otros) de oligoastoteratozoospermia, fallo repetido de fecundación tras la *in vitro* convencional, cuando el semen presenta grandes cantidades de anticuerpos antiespermatozoide, en pacientes de cáncer que crioconservan sus muestras de semen previamente a un tratamiento oncológico, pacientes con daños en la médula ósea, aquellos hombres con problemas de eyaculación o eyaculación retrógrada o pacientes que conservaron muestras de semen antes de realizarse una vasectomía<sup>5–11</sup>. También puede ser usado en casos de diagnóstico genético preimplantacional para enfermedades monogénicas<sup>12</sup> o en hombres con azospermia por ausencia bilateral congénita de vasos deferentes o por obstrucción inguinal de los conductos eyaculadores<sup>13</sup>. Aunque el ICSI se emplea en casos con factor masculino severo, también existen indicaciones femeninas como anomalías en la zona pelúcida<sup>14</sup>.

Cuando una pareja acude a una clínica de reproducción asistida, a cada uno de los miembros se le somete a diferentes exámenes médicos.

La evaluación del potencial fértil de un varón suele basarse en una breve anamnesis y un espermiograma, y si no hay nada realmente patológico no se someten a más pruebas. El espermiograma consiste en un recuento de espermatozoides y valoración de su morfología y movimiento, siguiendo los criterios de la Organización Mundial de la Salud (OMS) establecidos en 1999<sup>15</sup>.

Sin embargo, la experiencia diaria de la clínica nos muestra que hombres sanos con parámetros seminales

dentro de la normalidad según la clasificación de la OMS<sup>15</sup> son incapaces de dejar embarazadas a sus parejas, no presentando estas ningún tipo de patología (permeabilidad de las trompas, no endometriosis ni ovario poliquístico y niveles hormonales normales, por ejemplo) tras someterse a una IAH.

En el caso del ICSI, las tasas de fecundación, a pesar de tratarse de muestras de semen muy patológicas, alcanzan un 70–80%<sup>4</sup>, sin embargo y teniendo en cuenta que con esta técnica estamos forzando a entrar al espermatozoide en el ovocito y que a pesar de eso, entre un 3–5% de los ciclos de ICSI acaban en fallo de fecundación, podemos creer que, al igual que en las IAH hay factores moleculares que influyen en el potencial fértil.

Nuestro grupo planteó una hipótesis por la cual se suponen diferencias a nivel molecular (contenido de ARN mensajeros o perfil de expresión génica) entre las muestras de semen que consiguen un embarazo frente aquellas y que el espermiograma es incapaz de detectar. También planteábamos que los perfiles de expresión génica no solo diferirán entre aquellas muestras que logren embarazo o no, si no que esos perfiles, a su vez también serán diferentes dependiendo del tratamiento de reproducción asistida estemos estudiando, pues suponemos que según los requerimientos moleculares de las muestras, estas serán más aptas para una técnica u otra.

En la última década, conocida como la era posgenómica, las herramientas de análisis genético han sufrido una revolución técnica. La entrada en escena de sistemas que permiten el análisis masivo de genes en un solo experimento vs. aquellos en los que solo permitían el estudio gen por gen (o de un pequeño grupo de ellos) han proporcionado una nueva dimensión en a la hora de plantear y extraer conclusiones de los experimentos. Los microarrays, que es como se conocen estos sistemas, fueron descritos por primera vez por Schenna en 1995<sup>16</sup> y nos permiten estudiar, por ejemplo, qué genes se expresan en un situación biológica concreta y compararla con una patológica y ver en qué se diferencian, qué genes se expresan y en qué proporción, dándonos una visión global de una enfermedad y cuáles son los mecanismos que operan en dicho proceso patológico, además de ser un potencial papel en el diagnóstico de enfermedades.

El objetivo de nuestro trabajo era caracterizar el conjunto de ARNm (o perfil génico) con la ayuda de los microarrays que se generaban en muestras que lograban un embarazo frente aquellas que no tanto con la técnica de IAH como con la de ICSI.

Normalmente los experimentos de microarrays proporcionan una cantidad ingente de información y suelen derivar en largas listas de genes que están diferencialmente expresados en una condición biológica determinada respecto a otra. En un intento de darle un punto de vista funcional a los datos que obtuvimos quisimos saber cuántos de esos genes que nos daban diferencialmente expresados estaban ya descritos previamente en procesos relacionados con la reproducción. Esto se realizó gracias al *Gene Ontology*, una herramienta que permite organizar el conocimiento biológico. Hay que tener en cuenta que un gen por si mismo es difícil que explique una situación de enfermedad vs. salud ya que los genes interaccionan unos con otros formando redes complejas, como las rutas metabólicas, que a su vez

interaccionan con otras, por lo tanto necesitamos un interpretación funcional (en este caso proporcionada por el *Gene Ontology*) de estos listados de genes.

## Material y métodos

### Muestras biológicas humanas

Se utilizaron un total de 30 muestras, 20 procedentes de pacientes que se sometían a su primer ciclo de IAH (10 que lograron embarazo [grupo E] y 10 que no [Grupo NE]) y 10 muestras procedentes de pacientes que se sometían a un ciclo de ICSI con ovocitos de donantes (5 que lograron embarazo [grupo E] y 5 que no [grupo NE]). Todas las muestras proceden de sémenes en fresco.

En el caso de las IAH los criterios de inclusión fueron los siguientes. Los varones debían presentar parámetros seminales normales y con una recuperación de espermatozoides móviles tras la selección espermática superior a 3 millones. Las mujeres eran menores de 36 años, presentaban permeabilidad tubárica y no presentaban, miomas, ovario poliquístico ni endometriosis, a parte de presentar parámetros hormonales normales.

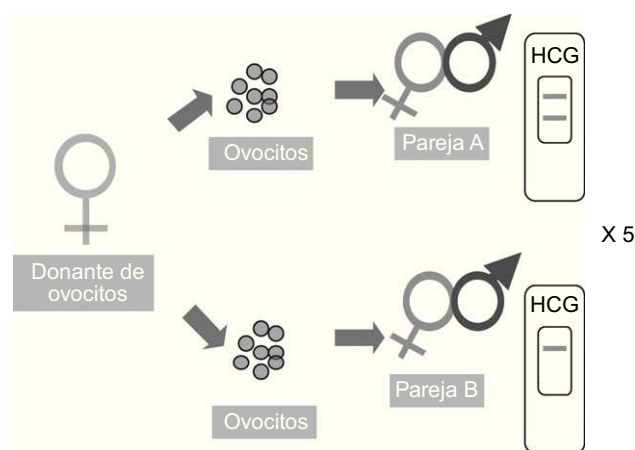
Con ICSI escogimos 5 casos. Cada caso estaba compuesto por 2 parejas que se sometían a un ciclo de ICSI con ovocitos de la misma cohorte donados por la misma donante consiguiendo una de las parejas un embarazo y la otra no (fig. 1). Finalmente se obtuvieron 5 muestras que embarazaban y 5 que no lo lograban.

Todas las muestras fueron obtenidas tras guardar entre 3–5 días de abstinencia sexual.

Este proyecto fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Instituto Valenciano de Infertilidad.

### Análisis seminal

Los parámetros seminales fueron evaluados tras 10 min de liquefacción a 37 °C y al 5% de concentración de CO<sub>2</sub>. La concentración y movilidad de las muestras fue evaluado en



**Figura 1** Ejemplo de los casos seleccionados para realizar los análisis de microarrays en ICSI (finalmente se escogieron 5 de estos casos).

una cámara Makler<sup>®</sup> (Sefi Laboratories, Tel Aviv, Israel) siguiendo los criterios de la OMS<sup>15</sup>.

### Preparación de las muestras

Se tomó aproximadamente una alícuota de 150 microlitros de las muestras de semen en fresco (antes de la selección espermática por *swim-up*) que posteriormente iban a ser empleadas en la TRA, para el pertinente análisis con microarrays. A continuación las muestras se sometían al proceso de selección espermática antes de usarlas para la TRA.

### Estimulación ovárica para IAH

En los ciclos de IAH se estimuló tanto con FSH (Gonal-F<sup>®</sup>; Serono S.A., Spain or Puregon; Schering-Plough Española, Spain) como con hMG (Lepori<sup>®</sup>; Farma Laboratories, Spain; or Menopur; Ferring, Spain). La estimulación se inició en el día 3 del ciclo con dosis de FSH recombinante de entre 75–150 UI. La foliculometría se monitorizó vía ecografía vaginal y siguiendo los niveles de estradiol. Cuando el tamaño del folículo dominante era de alrededor de 18 milímetros la paciente recibía 10.000 IU de hCG (Profasi<sup>®</sup> 10.000 UI; Serono S.A., Spain) La paciente fue inseminada entre las 12–36 h siguientes tras la inyección de hCG<sup>17</sup>.

### Estimulación ovárica para ICSI

Para los ciclos de ICSI, como son con ovocitos de donante, hemos de contemplar 2 tipos de tratamientos. El de la estimulación ovárica de la donante, que es diferente a la que se somete una paciente en un ciclo de IAH, y el de la preparación del endometrio de la paciente a la hora de transferirle el embrión.

Para la estimulación de las donantes se utilizaron tanto antagonistas como agonistas de la GnRH. Para estos últimos se utilizó el protocolo largo<sup>18</sup>. Este consiste en administrar 0,1 miligramos de leuprolide (Procrin<sup>®</sup>; Abbott S.A., Spain) o triptorelina (Decapeptyl<sup>®</sup>; Ipsen Pharma; Spain) a mitad de fase lútea del ciclo anterior. Una ecografía vía vaginal del ovario y unos niveles de estradiol determinados (niveles de estradiol en plasma <60 picogramos/mililitro (200 picomoles/litro) nos indicarán que el ovario está en reposo. En este momento es cuando se reduce la dosis de análogo a 0,05 miligramos hasta el día de administración de la hCG.

Los antagonistas de la GnRH se usaron siguiendo el protocolo de dosis baja<sup>19</sup>: a partir del día 6 de la estimulación se administró 0,25 miligramos de antagonista Cetrotide (Cetrotrelax<sup>®</sup>; Serono S.A., Spain) hasta el día de la administración de la hCG.

Para la estimulación se usaron tanto la FSH recombinante (Gonal-F<sup>®</sup>; Serono S.A., Spain; or Puregon; Schering-Plough Española, Spain) como hMG (Lepori<sup>®</sup>; Farma Laboratories, Spain; or Menopur; Ferring, Spain).

Las dosis iniciales se determinaron según la edad de las pacientes y los niveles en plasma de FSH y estradiol. En el tercer día de la estimulación se midió el estradiol y la dosis de gonadotropina se ajustó según los resultados de dicha medición. La hCG (Profasi<sup>®</sup> 10.000 UI; Serono S.A., Spain) se administró cuando 3 o más folículos alcanzaron los 18

milímetros de diámetro. La recuperación de los ovocitos se programó 36 h tras la administración de la hCG<sup>11,20</sup>.

### Preparación endometrial de las pacientes

La preparación del endometrio empieza con la desensibilización de la pituitaria con una dosis de 3,75 miligramos de triptorelina (Decapeptyl<sup>®</sup>; Ipsen Pharma, Spain) en la mitad de la fase lútea del ciclo anterior.

Las pacientes tomaron valeriato de E<sub>2</sub> (Progynova<sup>®</sup>; Schering, Spain) desde el día 1 del ciclo, 2 miligramos del día 1 al 8, 4 miligramos del 9 al 11 y 6 miligramos del día 12 en adelante.

En el día 14 del ciclo, se evalúa la receptividad endometrial mediante ecografía vaginal y midiendo los niveles de E<sub>2</sub>. Las dosis de valeriato de E<sub>2</sub> continuarán hasta que la donación sea posible.

El día de la donación, la paciente se aplicará por vía vaginal 800 miligramos/día de progesterona micronizada (Progeffik<sup>®</sup>; Laboratories Effik, Spain)<sup>11,20</sup>.

### Extracción y aislamiento del ARNm

Las alícuotas de las muestras de semen que se usarán posteriormente para hacer el microarray, se lavaron con 3 mililitros de PBS y se centrifugaron 10 min a 400 g. Se descartó el sobrenadante y el *pellet* fue resuspendido en 1 mililitro de Trizol, congelándolo posteriormente por inmersión directa en nitrógeno líquido y almacenándolo en el tanque de nitrógeno hasta su posterior utilización.

El ARN total se extrajo siguiendo el método del Trizol, según el protocolo propuesto por el fabricante (Life Technologies<sup>®</sup>, Inc., Gaithersburg, MD)<sup>21</sup>.

### Microarrays

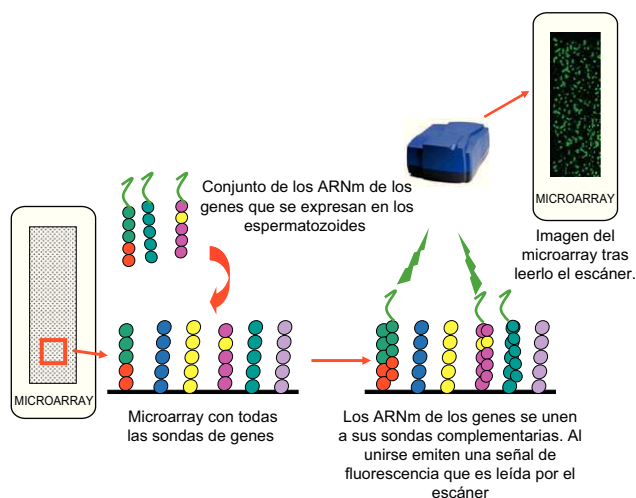
Los microarrays nos permiten evaluar la expresión de miles de genes en un único experimento. Básicamente se trata de una plataforma sólida en la que hay miles de sondas de genes que conocemos. Lo que hacemos es exponer estas sondas a nuestro ARNm problema (en este caso procedente de los espermatozoides que lograban embarazo o no, con cada una de las técnicas (IAH o ICSI) que previamente habíamos marcado con un fluorocromo. Los ARNm se unirán a sus sondas complementarias en el microarray emitiendo una señal de fluorescencia que será leída por un escáner y cuya imagen será posteriormente procesada (fig. 2).

Las muestras se hibridaron en microarrays de genoma humano completo de Agilent (*WholeHuman Genome Oligo Microarray<sup>®</sup> de Agilent technologies*, Madrid, Spain). Los protocolos de preparación e hibridación de las muestras se sacaron del Manual Técnico de Agilent.

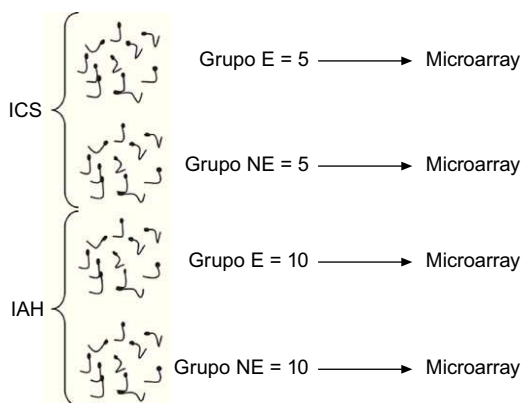
Antes de realizar los microarrays, se procedió a agrupar las muestras en 4 grupos, las muestras que lograban embarazo (grupo E) y las que no (grupo NE) para cada una de las técnicas (IAH o ICSI). Todas las muestras que constituyen los grupos, contribuyen con la misma cantidad de ARNm<sup>22</sup>.

Finalmente se realizaron 4 microarrays (uno con cada grupo de muestras) comparando las muestras E frente NE para cada una de las técnicas (IAH o ICSI) y por último se





**Figura 2** Esquema del funcionamiento general de los microarrays.



**Figura 3** Microarrays realizados para el estudio.

compararon los perfiles de expresión génica entre ambas técnicas (fig. 3).

## Análisis de los datos

El análisis de los datos se hizo con el soporte informático GenePix 6.0, que se encarga de medir la intensidad de fluorescencia que emiten las hibridaciones de nuestro ARNm problema al hibridar con las sondas del microarray.

## Expresión diferencial

El perfil de expresión diferencial se determinó mediante la comparación del grupo E y NE usando *test* no paramétricos con dos criterios para definir los genes que presentaban una cantidad de ARNm para un transcrito determinado alterada en un grupo respecto del otro: un cambio absoluto de 2 o más veces (esto es que la expresión de un gen sea el doble o más en un grupo que en el otro) y un *p-valor* menor de 0,05.

Estos genes que presenten un cambio igual o mayor de 2 veces con un *p-valor* < 0,05 serán definidos como genes diferencialmente expresados (GDE).

## Genes descritos en funciones reproductivas entre aquellos que están diferencialmente expresados entre los grupos E y NE para ambas técnicas

Nuestro grupo buscó de manera sistemática aquellos procesos biológicos que podrían tener cierta relación con la fertilidad masculina y confeccionó una lista de genes con la ayuda del *Gene Ontology* (GO). Posteriormente comprobamos si alguno de nuestro GDE de cualquiera de los 4 grupos (Grupo E, NE para IAH y Grupo E y NE para ICSI) estaba descrito en alguno de esos procesos.

Los procesos con los que confeccionamos esta lista fueron los siguientes:

Acrosoma (GO:0001669), reacción del acrosoma (GO:0007340), unión del espermatozoide a la zona pelúcida (GO:0007339), proceso reproductivo (GO:0022414), generación de gametos masculinos (GO:0048449), cópula (GO:0007620), implantación embrionaria (GO:0007566), desarrollo embrionario (GO:0009790), embarazo (GO:0007565), fecundación (GO:0009566), desarrollo de los genitales (GO:0048806), desarrollo para las células germinales (GO:0007281), desarrollo de las gónadas (GO:0008406), inseminación (GO:0007320), desarrollo de la placenta (GO:0001890), reproducción (GO:0000003), reproducción Sexual (GO:0019953), movilidad espermática (GO:0030317), desarrollo de las espermátidas (GO:0007286) y espermatogénesis (GO:0007283).

## Resultados

### Análisis de semen

Todas las muestras de semen incluidas en el estudio en el caso de las IAH presentaban parámetros similares normales y sin diferencias estadísticamente significativas entre ellos, tanto antes como después de la separación espermática por la técnica de *swim-up* (tabla 1).

En el caso de los ICSI, las muestras eran mucho más patológicas y ninguna de ellas cumplía con los criterios de normalidad establecidos por la OMS, en este apartado solo vamos a resaltar las indicaciones por las que estas parejas se sometía a ICSI.

La donación de ovocitos se indicó a sus respectivas parejas femeninas, en el grupo E, por edad ( $n=3$ ), baja respuesta ( $n=1$ ) y fallo ovárico precoz ( $n=1$ ). En el grupo NE las indicaciones fueron similares: edad avanzada ( $n=2$ ) y fallo ovárico precoz ( $n=3$ ). La media de edad de las mujeres en el grupo E era de  $42,4 \pm 5,8$  y en el grupo NE  $39 \pm 5$  años.

La indicación masculina para ICSI fue en el grupo E, astenoteratozoospermia ( $n=3$ ), oligastenoteratozoospermia ( $n=1$ ) y teratozoospermia severa ( $n=1$ ).

En el grupo NE: oligastenoteratozoospermia ( $n=2$ ), oligoteratozoospermia ( $n=1$ ) y astenozoospermia ( $n=2$ ). Tanto las indicaciones para el grupo E como en el NE para ICSI suponen un factor masculino moderado o severo.

### Análisis de los microarrays

#### Expresión diferencial

El número total de genes que se expresaban en el caso de las IAH (esto es que daban una señal positiva en el microarray)

**Tabla 1** Parámetros seminales de los grupos E y NE en el caso de las IAH

	Antes de la selección espermática*		Después de la selección espermática	
	Grupo E	Grupo NE	Grupo E	Grupo NE
Volumen (ml)	3,26 (DE=1,33)	2,6 (DE=0,80)	0,5	0,5
Concentración (millones/ml)	40,25 (DE=24,78)	50,40 (DE=30,86)	22 (DE=13,08)	22,8 (DE=17,21)
A+B Movilidad (%)	45,7 (DE=10,39)	42,6 (DE=10,39)	71 (DE=11,14)	72,8 (DE=10,65)
Edad hombre (años)	31,3 (DE=4,21)	35,3 (DE=4,92)		

E: embarazo; IAH: inseminación intrauterina homóloga; NE: no embarazo.

\*La técnica de separación de espermatozoides utilizada es la denominada como *swim-up*.

era de 19.938, de estos 18.221 eran comunes tanto el grupo E como en el NE. De todos los genes que se expresaban en ambos grupo 756, estaban sobreexpresados en el grupo E y 194 en el grupo NE (un total de 950 GDE).

En los microarrays de ICSI el número total de genes que se expresaban era de 19.229, de los cuales 16.035 se expresaban tanto en el grupo E como el NE. De estos comunes, 44 se sobreexpresaban en el grupo E y 5 en el NE.

El 70% del número total de genes que se expresaban tanto en los microarrays de IAH como en los de ICSI, eran los mismos genes y casi el 50% de los GDE del grupo que embarazaba (Grupo E) con el ICSI, también estaban sobreexpresados en el grupo que embarazaba con las IAH.

### Genes descritos en funciones reproductivas entre aquellos que están diferencialmente expresados entre los grupos E y NE para ambas técnicas

Examinamos de manera sistemática nuestros GDE en la lista de genes descritos en procesos relacionados con la reproducción siguiendo las indicaciones descritas en la sección de material y métodos. Tras buscar los GDE en el caso de las IAH, encontramos que 34 genes, de un total de 750 GDE que teníamos en el grupo E, estaban descritos previamente en alguno de esos procesos. En el grupo NE de este mismo TRA solo había 9. En el caso de ICSI, 3 de los GDE del grupo E y 1 del NE estaban descritos en alguno de estos procesos (tabla 2).

### Discusión

Los datos revelan que el conjunto de ARNm presentes en los espermatozoides de las muestras de semen de pacientes difiere si estos han logrado un embarazo o no y también son diferentes según del tipo de TRA al que se han sometido.

La diferencias se encuentran pues a un nivel molecular, a nivel de los ARN mensajeros presentes en el escaso citoplasma del espermatozoide y que son depositados en el ovocito tras la fecundación y que parece que están implicados en el proceso de fecundación y en las primeras divisiones embrionarias<sup>23,23-27</sup>.

Asimismo se planteó que los requerimientos moleculares de las muestras de semen capaces de lograr un embarazo no son los mismos para todas las TRA, siendo más cuánto menos invasivas son, por ejemplo en una IAH, frente a las que más, como es el caso de ICSI. Suponemos que un espermatozoide que es capaz de embarazarse a una IAH debe cumplir más

«requisitos» que uno que logre un embarazo en ICSI. Este último, por ejemplo, no debe recorrer parte del tracto reproductivo, ni unirse ni atravesar la zona pelúcida del ovocito como en el caso de una IAH ya que aquí se introduce forzosamente el espermatozoide dentro del ovocito.

Además los resultados nos dejan entrever el desconocimiento que hay sobre el proceso reproductivo, ya que de un total de 999 GDE (756 grupo E IAH+194 grupo NE IAH+44 grupo E ICSI+5 grupo NE ICSI), solo 47 estaban descritos previamente en procesos biológicos relacionados con la reproducción. Cabría esperar que de esos genes diferencialmente expresados en espermatozoides tanto de muestras que han logrado o no un embarazo hubiera un mayor número descrito en funciones reproductivas.

Estas diferencias que hemos hallado a nivel molecular entre muestras que embarazan y no que no pueden ser detectadas por el espermiograma pueden ser potenciales marcadores de fertilidad en las diferentes técnicas de reproducción asistida<sup>28,29</sup>.

Por lo demás los datos revelan aspectos muy interesantes como es la coincidencia de un 70% de los genes entre pacientes que tienen una producción espermática aparentemente normal y otros que la tienen seriamente afectada, lo que nos deja ver la gran cantidad de genes expresados cuya función es desconocida en el espermatozoide y que probablemente no tienen ninguna relación con el proceso reproductivo incluidas las primeras etapas del desarrollo embrionario. Estas similitudes génicas también hablan a favor de la tecnología de los microarrays por su fiabilidad y reproducibilidad, a pesar de analizar más de 19.000 variables (genes). Esto las hace candidatas al salto desde la investigación básica al diagnóstico clínico aplicado<sup>30</sup>.

Puntualizar que nosotros hacemos el análisis con pequeñas alícuotas de muestras de semen en fresco. Consideramos que esa pequeña fracción de semen que separamos es representativa del resto de la muestra que se empleará para realizar la IAH o el ICSI. Posteriormente, el resto de la muestra es preparada mediante un proceso de lavado e incubación que elimina el plasma seminal y las células no espermáticas y selecciona espermatozoides móviles y de buena morfología y se emplea en el correspondiente TRA. Lo hacemos en fresco y no con los espermatozoides seleccionados, por que el objetivo es analizar la muestra de semen lo más «en bruto» que se pueda para poder buscar algún marcador que resulte de utilidad diagnóstica, al igual que se hace con un espermiograma. Además en esta fase inicial de nuestro estudio, lo importante era demostrar que existían diferencias entre los diferentes grupos<sup>31,32</sup>.

**Tabla 2** Listados de los genes diferencialmente expresados que estaban descritos previamente en procesos relacionados con la reproducción tanto en el grupo que logra embarazo (E) como el que no (NE) para ambas técnicas (IAH e ICSI). Columna 1: grupo en el que GDE está expresado. Columna 2: número de acceso del gen y descripción del gen. Columna 3: procesos relacionados con la reproducción en los que el gen está descrito.

IAH grupo E	<p>Peptidase inhibitor 3, skin-derived (SKALP) (PI3), mRNA [NM_002638]</p> <p>Interleukin 8 (IL8), mRNA [NM_000584]</p> <p>Chemokine (C-C motif) ligand 4 (CCL4), transcript variant 1, mRNA [NM_002984]</p> <p>Chemokine (C-C motif) ligand 3 (CCL3), mRNA [NM_002983]</p> <p>v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog (FOS), mRNA [NM_005252]</p> <p>Vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP), transcript variant 1, mRNA [NM_003370]</p> <p>mRNA for FLJ00028 protein, partial cds. [AK024438]</p> <p>Thrombomodulin (THBD), mRNA [NM_000361]</p> <p>Regulator of G-protein signalling 2, 24kDa (RGS2), mRNA [NM_002923]</p> <p>B-cell CLL/lymphoma 6 (zinc finger protein 51) (BCL6), transcript variant 2, mRNA [NM_138931]</p> <p>LFNG O-fucosylpeptide 3-beta-N-acetylglucosaminyltransferase (LFNG), transcript variant 1, mRNA [NM_001040167]</p> <p>v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B (avian) (MAFB), mRNA [NM_005461]</p> <p>Insulin-like growth factor binding protein 7 (IGFBP7), mRNA [NM_001553]</p> <p>Notch homolog 2 (Drosophila) (NOTCH2), mRNA [NM_024408]</p> <p>Adenosine deaminase (ADA), mRNA [NM_000022]</p> <p>Prokineticin 2 (PROK2), mRNA [NM_021935]</p> <p>mRNA; cDNA DKFZp686N17231 (from clone DKFZp686N17231). [BX648857]</p> <p>Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3 (NR4A3), transcript variant 2, mRNA [NM_173198]</p> <p>Granulin (GRN), mRNA [NM_002087]</p> <p>Quaking homolog, KH domain RNA binding (mouse) (QKI), transcript variant 4, mRNA [NM_206855]</p>	<p>Copulación (GO:0007620) Apareamiento (GO:0007618) Reproducción (GO:0000003) Proceso reproductivo (GO:0022414)</p> <p>Proceso reproductivo (GO:0022414)</p> <p>Reproducción (GO:0000003) Reproducción (GO:0000003)</p> <p>Proceso reproductivo (GO:0022414) Reproducción (GO:0000003)</p> <p>Embarazo (GO:0007565) Reproducción (GO:0000003)</p> <p>Proceso reproductivo (GO:0022414)</p> <p>Desarrollo embrionario (GO:0009790)</p> <p>Proceso reproductivo (GO:0022414) Reproducción sexual (GO:0019953) Espermatogénesis (GO:0007283)</p> <p>Generación de gametos masculinos (GO:0048449)</p> <p>Desarrollo embrionario (GO:0009790) Embarazo (GO:0007565) Reproducción (GO:0000003) Proceso reproductivo (GO:0022414)</p> <p>Reproducción (GO:0000003) Proceso reproductivo (GO:0022414) Reproducción sexual (GO:0019953)</p> <p>Espermatogénesis (GO:0007283) Generación de gametos masculinos (GO:0048449)</p> <p>Reproducción (GO:0000003) Proceso reproductivo (GO:0022414) Reproducción sexual (GO:0019953)</p> <p>Espermatogénesis (GO:0007283) Generación de gametos masculinos (GO:0048449)</p> <p>Desarrollo de las gónadas (GO:0008406) Reproducción (GO:0000003) Proceso reproductivo (GO:0022414)</p> <p>Desarrollo embrionario (GO:0009790)</p> <p>Implantación embrionaria (GO:0007566) Embarazo (GO:0007565) Reproducción (GO:0000003) Proceso reproductivo (GO:0022414)</p> <p>Desarrollo embrionario (GO:0009790)</p> <p>Copulación (GO:0007620) Desarrollo embrionario (GO:0009790)</p> <p>Proceso reproductivo (GO:0022414) Reproducción Sexual (GO:0019953) Espermatogénesis (GO:0007283)</p> <p>Generación de gametos masculinos (GO:0048449)</p> <p>Desarrollo embrionario (GO:0009790) Embarazo (GO:0007565) placenta development (GO:0001890)</p> <p>Reproducción (GO:0000003) Proceso reproductivo (GO:0022414)</p> <p>Desarrollo embrionario (GO:0009790)</p> <p>Implantación embrionaria (GO:0007566) Desarrollo embrionario (GO:0009790) Embarazo (GO:0007565)</p> <p>Reproducción (GO:0000003) Proceso reproductivo (GO:0022414)</p> <p>Reproducción (GO:0000003) Proceso reproductivo (GO:0022414) Reproducción Sexual (GO:0019953)</p> <p>Espermatogénesis (GO:0007283) Generación de gametos masculinos (GO:0048449)</p>
-------------	--	---

Tabla 2. (continuación)

	Zinc finger, MIZ-type containing 1 (ZMIZ1), mRNA [NM_020338]	Desarrollo embrionario (GO:0009790) Reproducción (GO:0000003) Proceso reproductivo (GO:0022414) Reproducción sexual (GO:0019953)
	mRNA for CUGBP1 variant protein, partial cds, clone: fk00577 [AB210019]	Desarrollo embrionario (GO:0009790) Germ cell development (GO:0007281) Proceso reproductivo (GO:0022414) Reproducción sexual (GO:0019953)
	Transcription factor EB (TFEB), mRNA [NM_007162]	Desarrollo embrionario (GO:0009790) placenta development (GO:0001890)
	Nuclear autoantigen mRNA, partial cds; alternatively spliced. [L79989]	Reproducción (GO:0000003) Proceso reproductivo (GO:0022414)
	Zinc transporter 1 (ZnT-1) (Solute carrier family 30 member 1). [Source:Uniprot/SWISSPROT;Acc:Q9Y6M5] [ENST00000367001]	Desarrollo embrionario (GO:0009790)
	Muscleblind-like (Drosophila) (MBNL1), transcript variant 1, mRNA [NM_021038]	Desarrollo embrionario (GO:0009790)
	ADAM metalloproteinase domain 10 (ADAM10), mRNA [NM_001110]	Desarrollo embrionario (GO:0009790)
	Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (NFE2L2), mRNA [NM_006164]	Desarrollo embrionario (GO:0009790)
	Carbohydrate (chondroitin 4) sulfotransferase 11 (CHST11), mRNA [NM_018413]	Desarrollo embrionario (GO:0009790)
	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4- galactosyltransferase, polypeptide 1 (B4GALT1), mRNA [NM_001497]	Reacción del acrosoma (GO:0007340) Unión del espermatozoide a la zona pelúcida (GO:0007339) Fecundación (GO:0009566) Reproducción (GO:0000003) Proceso reproductivo (GO:0022414) Reproducción sexual (GO:0019953) Desarrollo embrionario (GO:0009790)
	Ski oncogene (C-ski). [Source:Uniprot/SWISSPROT;Acc:P12755] [ENST00000378536]	Embarazo (GO:0007565) Reproducción (GO:0000003) Proceso reproductivo (GO:0022414)
	Fc fragment of IgG, receptor, transporter, alpha (FCGRT), mRNA [NM_004107]	Proceso reproductivo (GO:0022414) Reproducción Sexual(GO:0019953) Espermatogénesis (GO:0007283)
	Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 14, mRNA (cDNA clone MGC:71510 IMAGE:5297510), complete cds. [BC060766]	Generación de gametos masculinos (GO:0048449) Desarrollo embrionario (GO:0009790)
IAH grupo NE	Lymphocyte antigen 6 complex, locus E (LY6E), mRNA [NM_002346]	
	Cripto, FRL-1, cryptic family 1 (CFC1), mRNA [NM_032545]	Desarrollo embrionario (GO:0009790)
	Cysteine dioxygenase, type I (CDO1), mRNA [NM_001801]	Proceso reproductivo (GO:0022414)
	Aldehyde dehydrogenase 1 family, member A3 (ALDH1A3), mRNA [NM_000693]	Desarrollo embrionario (GO:0009790)
	Homeobox B6 (HOXB6), mRNA [NM_018952]	Desarrollo embrionario (GO:0009790)
	Arachidonate 15-lipoxygenase, type B (ALOX15B), transcript variant d, mRNA [NM_001141]	Reproducción (GO:0000003) Proceso reproductivo (GO:0022414)
	Cylicin, basic protein of sperm head cytoskeleton 2 (CYLC2), mRNA [NM_001340]	Proceso reproductivo (GO:0022414) Reproducción Sexual(GO:0019953) Espermatogénesis (GO:0007283) Generación de gametos masculinos (GO:0048449)
	Isocitrate dehydrogenase 1 (NADP+), soluble (IDH1), mRNA [NM_005896]	Desarrollo de las gónadas (GO:0008406) Reproducción (GO:0000003) Proceso reproductivo (GO:0022414)
	Shroom family member 3 (SHROOM3), mRNA [NM_020859]	Desarrollo embrionario (GO:0009790)
	CHK1 checkpoint homolog (S. pombe) (CHEK1), mRNA [NM_001274]	Proceso reproductivo (GO:0022414) Reproducción Sexual(GO:0019953)
ICSI GDE E	Granulin (GRN), mRNA [NM_002087]	Implantación embrionaria(GO:0007566) Desarrollo embrionario (GO:0009790) Embarazo (GO:0007565) Reproducción (GO:0000003) Proceso reproductivo (GO:0022414)
	Secreted phosphoprotein 1 (osteopontin, bone sialoprotein I, early T-lymphocyte activation 1) (SPP1), transcript variant 1, mRNA [NM_001040058]	Implantación embrionaria(GO:0007566) Embarazo (GO:0007565) placenta development (GO:0001890)



Tabla 2. (continuación)

ICSI GDE NE	Chemokine (C-X-C motif) receptor 4 (CXCR4), transcript variant 1, mRNA [NM_001008540]	Reproducción (GO:0000003) Proceso reproductivo (GO:0022414)
	Ankyrin repeat domain 7 (ANKRD7), transcript variant 1, mRNA [NM_001077708]	Reproducción (GO:0000003) Proceso reproductivo (GO:0022414)
GDE: gen diferencialmente expresado; E: embarazo; GO: Gene Ontology; IAH: inseminación intrauterina homóloga; ICSI: inyección intracitoplásmica; mRNA: ácido ribonucleico mensajero; NE: no embarazo.		Desarrollo de las gónadas (GO:0008406) Reproducción (GO:0000003) Proceso reproductivo (GO:0022414)

También nos gustaría destacar las ventajas que tiene el estudio en pacientes sometidos a donación de ovocitos. Con el modelo de la ovodonación usado en el ICSI conseguimos estandarizar al máximo el factor femenino, dejando más en evidencia el masculino, estudiando pacientes muy excepcionales en las que una misma donante es capaz de ceder sus óvulos a más de una receptora, con lo que se fecunda la misma cohorte ovocitaria mediante ICSI con semen de sus parejas, logrando una de ellas gestación y la otra no. Teniendo en cuenta que los ovocitos usados en ambas parejas son equiparables y que una logra embarazarse y otra no, deducimos que el peso del factor masculino debe ser más claro en estos casos.

El siguiente paso es realizar este tipo de análisis de manera individualizada, es decir, concretar los análisis reduciendo el número de genes a aquellos que hemos visto están directamente implicados en la fertilidad y el éxito reproductivo. Con ello aceleramos y abaratamos los análisis a fin de poder ofrecer a los pacientes una herramienta diagnóstica/clasificadora basada en la tecnología del microarray como se hace ya con otras patologías en otros campos<sup>33</sup>. Esta complementaría al clásico espermiograma (muy útil en los casos más patológicos) a la hora de evaluar el potencial fértil de una muestra de semen de pacientes que se vayan a someter a un tipo determinado de TRA.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

## Agradecimientos

Los autores quieren agradecer la colaboración de todos los técnicos de los laboratorios de Andrología y Semen FIV de Instituto Valenciano de Infertilidad de Valencia.

## Bibliografía

- Abdelkader AM, Yeh J. The potential use of intrauterine insemination as a basic option for infertility: a review for technology-limited medical settings. *Obstet Gynecol Int.* 2009;2009:584837.
- Remohi J, Cano F, Gallardo E, Gutiérrez A, Amorochó B, Zuzuarregui JL, et al. Inseminación artificial con semen homólogo. In: Anonymous Reproducción Humana. 1.<sup>a</sup> ed. España: McGraw-Hill, 1996. p. 306–27.
- Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet.* 1992;340:17–8.
- Dhont M, Dozortsev D, De Sutter P. Inyección Intracitoplásmica de espermatozoides. In: Anonymous Reproducción Humana. España: McGraw-Hill, 1996. p. 386.
- Lahteenmaki A, Reima I, Hovatta O. Treatment of severe male immunological infertility by intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 1995;10:2824–8.
- Nagy ZP, Verheyen G, Liu J, Joris H, Janssenswillen C, Wisanto A, et al. Results of 55 intracytoplasmic sperm injection cycles in the treatment of male-immunological infertility. *Hum Reprod.* 1995;10:1775–80.
- Benadiva CA, Nulsen J, Siano L, Jennings J, Givargis HB, Maier D. Intracytoplasmic sperm injection overcomes previous fertilization failure with conventional in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 1999;72:1041–4.
- Gil-Salom M, Romero J, Rubio C, Ruiz A, Remohi J, Pellicer A. Intracytoplasmic sperm injection with cryopreserved testicular spermatozoa. *Mol Cell Endocrinol.* 2000;169:15–9.
- Nikolietos N, Al-Hasani S, Baukloh V, Schopper B, Demirel LC, Baban N, et al. The outcome of intracytoplasmic sperm injection in patients with retrograde ejaculation. *Hum Reprod.* 1999;14:2293–6.
- Schatte EC, Orejuela FJ, Lipshultz LI, Kim ED, Lamb DJ. Treatment of infertility due to anejaculation in the male with electroejaculation and intracytoplasmic sperm injection. *J Urol.* 2000;163:1717–20.
- Meseguer M, Garrido N, Remohi J, Pellicer A, Simon C, Martínez-Jabaloyas JM, et al. Testicular sperm extraction (TESE) and ICSI in patients with permanent azoospermia after chemotherapy. *Hum Reprod.* 2003;18:1281–5.
- Liebaers I, Sermon K, Staessen C, Joris H, Lissens W, Van Assche E, et al. Clinical experience with preimplantation genetic diagnosis and intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 1998;13(Suppl 1):186–95.
- Tournaye H, Devroey P, Liu J, Nagy Z, Lissens W, Van Steirteghem A. Microsurgical epididymal sperm aspiration and intracytoplasmic sperm injection: a new effective approach to infertility as a result of congenital bilateral absence of the vas deferens. *Fertil Steril.* 1994;61:1045–51.
- Mandelbaum J, Antoine JM, Plachot M, Belaisch-Allart J, Salat-Baroux J. Are there indications for intra-cytoplasmic sperm injection in female infertility? *Contracept Fertil Sex.* 1997;25:607–10.
- World Health Organization. Laboratory manual of the WHO for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. *Ann Ist Super Sanita.* 1999.
- Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science.* 1995;270:467–70.
- Garrido N, Melo M, Simon C, Remohi J, Pellicer A, Meseguer M. Ovarian stimulation length, number of follicles higher than

- 17 mm and estradiol on the day of human chorionic gonadotropin administration are the risk factors for multiple pregnancy in intrauterine insemination. *RMB*. 2007;6:19–26.
18. Diaz I, Navarro J, Blasco L, Simon C, Pellicer A, Remohi J. Impact of stage III-IV endometriosis on recipients of sibling oocytes: matched case-control study. *Fertil Steril*. 2000;74:31–4.
19. Bosch E, Valencia I, Escudero E, Crespo J, Simon C, Remohi J, et al. Premature luteinization during gonadotropin-releasing hormone antagonist cycles and its relationship with in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril*. 2003;80:1444–9.
20. Garrido N, Meseguer M, Bellver J, Remohi J, Simon C, Pellicer A. Report of the results of a 2 year programme of sperm wash and ICSI treatment for human immunodeficiency virus and hepatitis C virus serodiscordant couples. *Hum Reprod*. 2004;19:2581–6.
21. Meseguer M, de los Santos MJ, Simon C, Pellicer A, Remohi J, Garrido N. Effect of sperm glutathione peroxidases 1 and 4 on embryo asymmetry and blastocyst quality in oocyte donation cycles. *Fertil Steril*. 2006;86:1376–85.
22. Peng X, Wood CL, Blalock EM, Chen KC, Landfield PW, Stromberg AJ. Statistical implications of pooling RNA samples for microarray experiments. *BMC Bioinformatics*. 2003;4:26.
23. Ostermeier GC, Goodrich RJ, Diamond MP, Dix DJ, Krawetz SA. Toward using stable spermatozoal RNAs for prognostic assessment of male factor fertility. *Fertil Steril*. 2005;83:1687–94.
24. Ostermeier GC, Miller D, Huntriss JD, Diamond MP, Krawetz SA. Reproductive biology: delivering spermatozoan RNA to the oocyte. *Nature*. 2004;429:154.
25. Miller D, Ostermeier GC. Towards a better understanding of RNA carriage by ejaculate spermatozoa. *Hum Reprod Update*. 2006;12:757–67.
26. Miller D, Ostermeier GC. Spermatozoal RNA. Why is it there and what does it do? *Gynecol Obstet Fertil*. 2006;34:840–6.
27. Miller D, Ostermeier GC, Krawetz SA. The controversy, potential and roles of spermatozoal RNA. *Trends Mol Med*. 2005;11:156–63.
28. Lalancette C, Miller D, Li Y, Krawetz SA. Paternal contributions: New functional insights for spermatozoal RNA. *J Cell Biochem*. 2008.
29. Lalancette C, Platts AE, Johnson GD, Emery BR, Carrell DT, Krawetz SA. Identification of human sperm transcripts as candidate markers of male fertility. *J Mol Med*. 2009;87:735–48.
30. Ostermeier GC, Goodrich RJ, Diamond MP, Dix DJ, Krawetz SA. Toward using stable spermatozoal RNAs for prognostic assessment of male factor fertility. *Fertil Steril*. 2005;83:1687–94.
31. García-Herrero S, Meseguer M, Martínez-Conejero JA, Remohi J, Pellicer A, Garrido N. The transcriptome of spermatozoa used in homologous intrauterine insemination varies considerably between samples that achieve pregnancy and those that do not. *Fertil Steril*. 2009 [Epub ahead of print].
32. García-Herrero S, Garrido N, Martínez-Conejero JA, Remohi J, Pellicer A, Meseguer M. Ontological evaluation of transcriptional differences between sperm of infertile males and fertile donors using microarray analysis. *J Assist Reprod Genet*. 2010 Feb;27(2–3):67–8.
33. Chu T, Burke B, Bunce K, Surti U, Allen Hogge W, Peters DG. A microarray-based approach for the identification of epigenetic biomarkers for the noninvasive diagnosis of fetal disease. *Prenat Diagn*. 2009;29:1020–30.