

ORIGINAL

Análisis de la expresión de 4 micro-ARN en espermatozoides y su implicación en la fertilidad masculina

Albert Salas-Huetos, Joan Blanco, Francesca Vidal y Ester Anton*

Unitat de Biología Cel·lular, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Cerdanyola del Vallès, Barcelona, España

Recibido el 3 de mayo de 2012; aceptado el 25 de mayo de 2012

PALABRAS CLAVE

Infertilidad masculina;
Espermatozoides;
Transcriptoma;
Mi-ARN

Resumen

Introducción: Los micro-ARN (mi-ARN) son moléculas de 22-24 nucleótidos implicadas en la regulación de la expresión génica de numerosos procesos. Recientemente, se han identificado perfiles alterados de expresión de mi-ARN en diferentes casos de infertilidad idiopática, sugiriendo un papel relevante de estas moléculas en la regulación de la fertilidad. **Objetivo:** Caracterizar los patrones de expresión de 4 mi-ARN en ácido ribonucleico espermático procedente de individuos fértiles e infériles.

Material y métodos: Se obtuvo la fracción espermática de 4 muestras de semen de individuos fértiles y 4 muestras de individuos que consultaban por infertilidad. Se aisló el ácido ribonucleico utilizando el método TRIzol® y seguidamente se efectuó un tratamiento con DNasa. La ausencia de ácido desoxirribonucleico en las muestras extraídas se confirmó mediante una reacción en cadena de la polimerasa para el gen de la protamina 1. Seguidamente, con cebadores específicos para los mi-ARN hsa-miR-23a, hsa-miR-744, hsa-let-7f y hsa-miR-1, y el normalizador Mamm-U6, se realizaron reacciones en cadena de la polimerasa a tiempo real mediante tecnología TaqMan. La cuantificación de las diferencias de expresión se realizó mediante el cálculo del estadístico *Fold Change* y la utilización de un intervalo de confianza del 95%.

Resultados: Para cada individuo, se obtuvo una media de $2,6 \times 10^{-5}$ ng de ácido ribonucleico/espermatozoide con una pureza de 1,72 ($\pm 0,05$) y sin trazas de ácido desoxirribonucleico. El análisis TaqMan reveló la presencia de hsa-miR-23a, hsa-miR-744 y hsa-let-7f en los espermatozoides de todos los individuos estudiados. La expresión de hsa-let-7f mostró una reducción significativa en 3 de los 4 individuos problema respecto a los individuos control.

Conclusión: Los espermatozoides humanos contienen los mi-ARN hsa-miR-23a, hsa-miR-744 y hsa-let-7f. Este último muestra una reducción significativa de expresión en 3 de los 4 individuos infériles analizados sugiriendo la implicación de alteraciones en la expresión de mi-ARN como causa subyacente de algunos casos de infertilidad masculina. © 2012 Asociación Española de Andrología, Medicina Sexual y Reproductiva. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

*Autor para correspondencia

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

KEYWORDS
Male infertility;
Spermatozoa;
Transcriptome;
miRNAs**Analysis of the expression of four microRNAs in spermatozoa and their role in male fertility****Abstract**

Introduction: MicroRNAs (miRNAs) are 22-24nt molecules involved in the gene expression regulation of many biological processes. Several authors have recently identified altered miRNA expression profiles in cases of male idiopathic infertility, suggesting its fundamental role in fertility regulation.

Objective: To characterize the expression of four miRNAs in sperm ribonucleic acid from fertile and infertile men.

Material and methods: Four ejaculated samples from fertile donors and four samples from idiopathic infertile patients were obtained. Total RNA was isolated using the *TRIzol* method followed by a DNase treatment. To confirm proper ribonucleic acid purification, a polymerase chain reaction for the Protamine-1 gene (PRM-1) was performed. Afterwards, real-time polymerase chain reaction with specific primers for the miRNAs hsa-miR-23a, hsa-miR-744, hsa-let-7f and hsa-miR-1, together with the normalization control Mamm-U6, were performed. Differences in expression were quantified by the Fold-Change statistic and 95% confidence intervals.

Results: For each individual, an average of 2.6×10^{-5} ng ribonucleic acid/spermatozoa was obtained, with a purity of 1.72 (± 0.05) and no traces of deoxyribonucleic acid. *TaqMan* analysis confirmed the presence of hsa-miR-23a, hsa-miR-744 y hsa-let-7f in all the samples. The expression of hsa-let-7f was significantly lower in three of the four samples from men with idiopathic infertility.

Conclusion: Human spermatozoa contain the miRNAs hsa-miR-23a, hsa-miR-744 and hsa-let-7f. Hsa-let-7f expression was significantly reduced in three out of four infertile patients, suggesting the involvement of alterations in miRNA expression as the underlying cause of some cases of male infertility.

© 2012 Asociación Española de Andrología, Medicina Sexual y Reproductiva. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

Los micro-ARN (mi-ARN) son moléculas de ácido ribonucleico (ARN) funcionales, formadas por una cadena de 22-24 nucleótidos que forman estructuras semicomplementarias en las regiones 3' no traducidas de los ARN mensajeros a los que regulan^{1,2}.

Los mi-ARN se sintetizan en el núcleo en forma de moléculas precursoras primarias. Éstas son procesadas por grupos catalizadores llamados DGCR8 y DROSHA hasta las moléculas precursoras secundarias, de 60-70 nucleótidos. Éstas son exportadas al citoplasma, vía exportina-5', y procesadas por los complejos TRBP y DICER. Despues del procesamiento, los mi-ARN se unen a proteínas de la familia Argonauta, formando los complejos *miRNA-induced silencing complex*³. Estos complejos regulan la expresión génica, inhibiendo o activando la traducción de determinados ARN mensajeros^{4,5}.

En humanos, se han identificado hasta 1.527 mi-ARN⁶ (miRBase, versión 18.0, <http://microrna.sanger.ac.uk>), muchos de ellos relacionados con la regulación del ciclo celular^{7,8}, el desarrollo embrionario⁹ y la regulación de la gametogénesis, tanto masculina¹⁰ como femenina¹¹.

Por otra parte, alteraciones en los perfiles de expresión de mi-ARN se han vinculado con procesos biológicos anormales como el cáncer^{8,12,13}, afecciones cardíacas¹⁴, trastornos neuronales¹⁵ o alteraciones respiratorias¹⁶, entre otros.

Algunos autores también han identificado perfiles alterados de expresión de mi-ARN en tejido testicular de individuos con infertilidad idiopática^{17,18}, sugiriendo un papel relevante de estas moléculas en la regulación de la fertilidad. Lian et al^{17,18} identificaron pacientes con azoospermia no obstructiva con alteraciones de la expresión de mi-ARN en células de la línea germinal. McCallie et al¹⁸ observaron que blastocitos transferibles obtenidos de parejas con síndrome de ovario poliquístico e infertilidad por factor masculino mostraban una disminución significativa en la expresión de mi-ARN en comparación con los blastocitos de donantes fértiles.

Está descrito que el transcriptoma del espermatozoide humano contiene más de 5.000 ARN mensajeros⁹, más de 35 mi-ARN¹⁹ y unos 1.100 *piwi-interacting RNAs*¹⁹. También se ha demostrado que algunos de estos transcritos son necesarios para el desarrollo del zigoto y el embrión²⁰⁻²⁵, indicando que la presencia de los diferentes tipos de ARN en el espermatozoide maduro no sería el resultado de un proceso estocástico²³.

En este estudio hemos caracterizado los patrones de expresión de 4 mi-ARN en ARN espermático procedente de individuos fértiles e infériles. Este trabajo marca el punto de partida de un proyecto global destinado a determinar si los patrones de mi-ARN presentes en espermatozoides de individuos con infertilidad idiopática son diferentes a los patrones de mi-ARN en espermatozoides de individuos fértiles.

Material y métodos

Se analizaron muestras de semen procedentes de 4 pacientes infériles y 4 individuos fértiles o control. Las muestras control fueron facilitadas por el Laboratorio de Andrología y Banco de Semen del Instituto Valenciano de Infertilidad de Valencia (casos C1-C4). Los individuos que conformaban esta población presentaban: cariotipo normal, fertilidad probada, recuentos superiores a 90×10^6 espermatozoides totales con motilidad progresiva, más del 14% de formas normales (criterios estrictos de Kruger²⁶) y recuentos superiores a 10×10^6 espermatozoides/ml con motilidad progresiva después del test de supervivencia posdescongelación (criterios de la Organización Mundial de la Salud, 2010²⁷). Las muestras de semen de individuos que consultaban por infertilidad procedían de la Unidad de Reproducción Asistida del Centro Médico Teknon de Barcelona, y se les atribuyó un origen idiopático después del examen andrológico rutinario (exploración física, historia reproductiva, perfil hormonal y seminal) (casos P1-P4, tabla 1). Los protocolos utilizados fueron aprobados por los comités de ética de los centros colaboradores.

La fracción espermática fue separada del resto de células del eyaculado mediante la lisis de las células somáticas utilizando una solución de 0,1% dodecilsulfato sódico y 0,5% Tritón X-100 en H₂O miliQ, según el protocolo descrito por Goodrich et al²⁸.

El ARN total de los espermatozoides fue extraído mediante el método TRIzol® (Invitrogen™, LifeTechnologies, EE. UU.), basado en el protocolo de Chomczynski y Sacchi^{29,30}, y seguidamente purificado mediante un tratamiento con DNasa recombinante (Ambion®, LifeTechnologies, EE. UU.). La calidad y cantidad de ARN extraído se determinó utilizando un espectrofotómetro UV/visible (Nanodrop-2000; ThermoScientific Inc., EE. UU.).

Una fracción de cada una de las muestras de ARN obtenidas fue retrotranscrita a cDNA mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) y posteriormente amplificada por PCR con cebadores exón-exón para el gen de la protamina 1 sintetizados por Roche Applied® (tabla 2). Con esta estrategia se puede verificar la integridad de los transcriptos obtenidos y diferenciar los productos resultantes de la amplificación de ARN de los resultantes de la amplificación de ácido desoxirribonucleico (ADN).

Una vez confirmada la ausencia de ADN, se realizaron RT-PCR adicionales utilizando el kit TaqMan MicroRNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, LifeTechnologies, EE. UU.), para los siguientes mi-ARN: hsa-miR-23a, hsa-miR-744, hsa-let-7f y hsa-miR-1, y el gen normalizador Mamm-U6. El cDNA se diluyó con los cebadores correspondientes (TaqMan MicroRNA Assays, Applied Biosystems, LifeTechnologies, EE. UU.), y se realizó la PCR a tiempo real con el kit TaqMan Universal PCR Master MixII (Applied Biosystems, LifeTechnologies, EE. UU.). Se analizaron 3 réplicas para cada muestra mediante la plataforma 7900HT Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems, LifeTechnologies, EE. UU.).

La cuantificación de las diferencias de expresión se determinó mediante el cálculo del estadístico *Fold Change* obtenido a partir de la variable Ct normalizada (ΔCt) por Mamm-U6. El objetivo de la normalización es reducir la variación técnica dentro de un conjunto de datos y, por tanto, permitir una mejor apreciación de la variación de expresión. La variable Ct indica el ciclo de PCR en que los mi-ARN son detectados, siendo un reflejo de sus niveles de expresión. El valor de *Fold Change* se calculó a partir de la relación numérica entre cada uno de los ΔCt obtenidos en individuos problema y la media de los valores ΔCt de los 4 individuos control. Los valores de *Fold Change* < 1 son indicativos de una menor expresión, mientras que valores > 1

Tabla 1 Características de las muestras problema analizadas

Muestras	Concentración (espz./ml) ^a	Motilidad (% PR + % NP) ^a	Morfología (% FN) ^b	
P1	$27,1 \times 10^6$	40	8	Astenoterozoospermia
P2	$120,6 \times 10^6$	50	30	Normozoospermia
P3	$47,2 \times 10^6$	60	10	Teratozoospermia
P4	$41,7 \times 10^6$	45	31	Normozoospermia

^a: criterios de la Organización Mundial de la Salud 2010²⁷; ^b: criterios de Kruger²⁶; espz./ml: espermatozoides por mililitro; FN: formas normales; NP: no progresivos; PR: progresivos.

Tabla 2 Cebadores y tamaños de los productos resultantes en la detección de protamina 1 mediante PCR convencional

Gen (n.º acceso GenBank)	Secuencias cebador (dirección 5'-3')	Posición secuencias cebador	Tamaño amplicón cADN	Tamaño amplicón ADN
PRM-1 (NM_002761.2)	For. CAGAGTTCCACCTGCTCACA Rev. AGAACTTTACGGTGGTAGG	14-34 415-435	331pb	422 pb (Chr16:11,374,707- 11,375,129)

ADN: ácido desoxirribonucleico; PCR: reacción en cadena de la polimerasa; PRM-1: protamina 1.

Tabla 3 Cantidad y pureza del ácido ribonucleico recuperado en las muestras control (C1-C4) y problema (P1-P4)

	Muestras	ARN/espz. (ng)	Pureza
Controles	C1	$1,52 \times 10^{-5}$	1,67
	C2	$1,88 \times 10^{-5}$	1,72
	C3	$2,26 \times 10^{-5}$	1,75
	C4	$1,19 \times 10^{-5}$	1,73
Problemas	P1	$3,63 \times 10^{-5}$	1,71
	P2	$2,65 \times 10^{-5}$	1,63
	P3	$3,04 \times 10^{-5}$	1,77
	P4	$4,07 \times 10^{-5}$	1,81
Total	media (\pm DE)	$2,6 \times 10^{-5}$ ($\pm 2,5 \times 10^{-5}$)	1,72 ($\pm 0,05$)

ARN/ espz.: cantidad de ARN por espermatozoide; DE: desviación estándar.

indican un incremento de expresión. Se consideraron significativas las diferencias de expresión cuando el valor de ΔCt se situaba fuera del intervalo de confianza del 95% de ΔCt en las muestras control.

Resultados

Las extracciones de ARN total realizadas en espermatozoides mediante la utilización del método TRIzol® permitieron obtener una media de $2,6 \times 10^{-5}$ ng de ARN (equivalente a 26 fg por espermatozoide). El grado medio (\pm DE) de pureza de la muestras fue de 1,72 ($\pm 0,05$) (tabla 3).

Los resultados de las PCR para el gen de protamina 1 confirmaron la presencia de este transcripto en las muestras analizadas y descartaron contaminaciones de ADN genómico, ya que solamente aparecieron amplificados los productos con medidas correspondientes a cADN (fig. 1).

Los resultados del ensayo TaqMan para los 4 mi-ARN identificaron la presencia de 3 de ellos tanto en las muestras problema como control (fig. 2): hsa-miR-23a, hsa-miR-744 y hsa-let-7f. En cambio, ninguna de las muestras mostró resultados de Ct para miR-1 compatibles con la presencia de esta molécula en espermatozoides humanos. Dos de los 3 mi-ARN identificados, hsa-miR-23a y hsa-miR-744, mostraron niveles de expresión equivalentes en muestras control y problema, mientras que hsa-let-7f presentó una reducción significativa de expresión en 3 de los 4 individuos problema. La reducción de expresión resultó significativa en los individuos P1 (astenoteratozoospérmico), P3 (teratozoospérmico) y P4 (normozoospérmico), no siendo significativa en el individuo P2 (normozoospérmico).

Discusión

El método de extracción de ARN utilizado ha permitido la obtención de muestras de ARN espermático con una media de 26 fg de ARN por espermatozoide, coincidentes con las descritas en la bibliografía (entre 20 y 50 fg de ARN)^{23,31}. Los valores de pureza de ARN obtenidos se consideran adecuados, teniendo en cuenta la alta proporción de TRIzol® utilizado y la reducida cantidad de ARN presente en los esper-

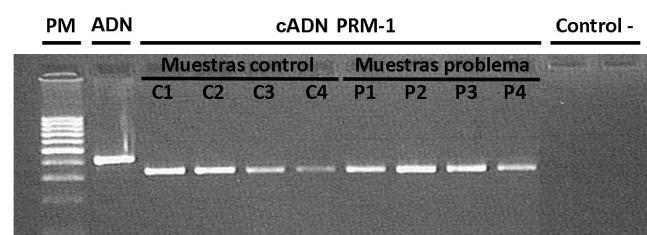


Figura 1 Análisis electroforético al 2% de los productos de la PCR de protamina 1 (PRM-1). Carril 1: peso molecular (PM) de 100 a 1.000pb. Carril 2: control positivo de ADM (422pb). Carriles 3-10: cADN procedentes de espermatozoides de los individuos estudiados (331pb); la falta de intrones (91pb) permite ver la diferencia respecto el control positivo (ADN). Carriles 11 y 12: controles negativos.

matozoides^{31,32}. Esta alta proporción de TRIzol® desplaza la curva de absorbancia hacia 270 nm, situación que provoca una disminución de la ratio 260/280³³. Además, el elevado grado de empaquetamiento del ADN espermático dificulta la recuperación del ARN e influye negativamente en las puras obtenidas³⁴.

Por otro lado, los resultados de las PCR de protamina 1 han confirmado que la extracción de ARN seguida por el tratamiento con DNase recombinante permite la obtención de un ARN íntegro y libre de contaminaciones de ADN. Esta estrategia con cebadores exón-exón fue descrita previamente por varios autores^{28,35,36} y su aplicabilidad en este tipo de estudio está extensamente aceptada.

Los 4 mi-ARN analizados (hsa-miR-23a, hsa-miR-744, hsa-let-7f y hsa-miR-1) se han descrito con anterioridad en diferentes tejidos humanos^{17,37}, pero solamente hsa-miR-23a lo ha sido en espermatozoides¹⁹. Nuestro estudio, además de confirmar la presencia del hsa-miR-23a en espermatozoides humanos, constata, por primera vez, la presencia del hsa-miR-744 y hsa-let-7f en estas células.

El presente estudio ha puesto de manifiesto una disminución significativa de la expresión del mi-ARN hsa-let-7f en 3 de los 4 individuos infériles (individuos P1, P3 y P4). De estos 3 individuos, 2 de ellos (P1 y P3) presentaban altera-

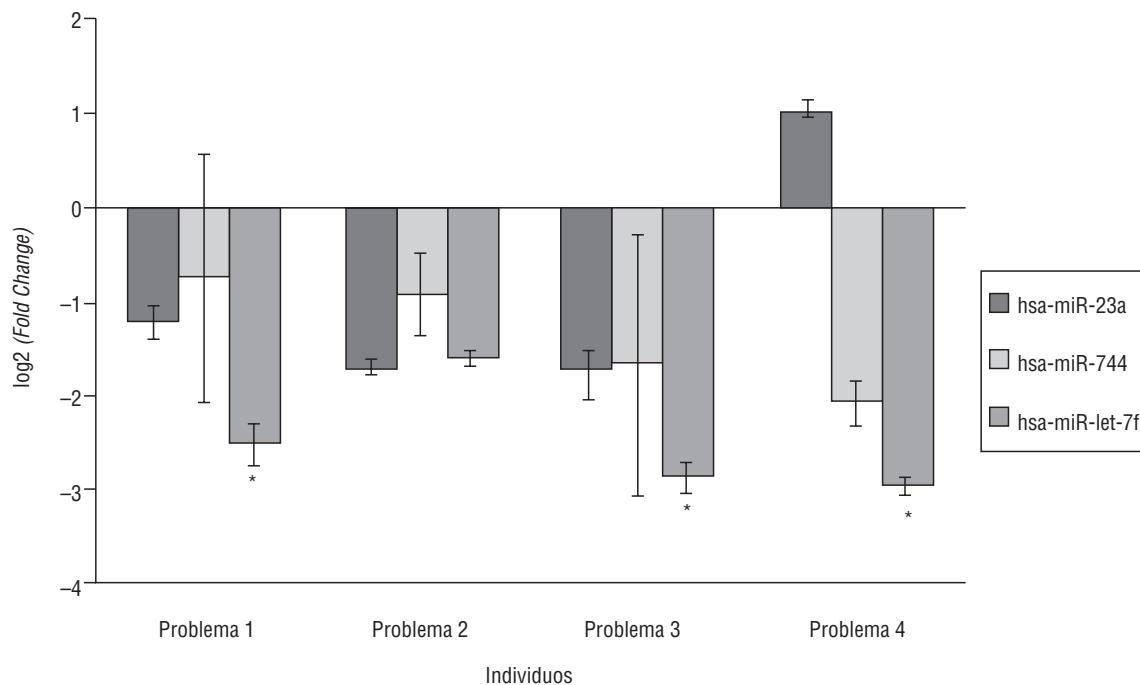


Figura 2 Diferencia de expresión de los 3 mi-ARN detectados en los individuos problema respecto a la media de los individuos control.

* Diferencia de expresión significativa (la media se sitúa fuera del intervalo de confianza de la expresión normalizada en las muestras control).

ciones del seminograma. Aunque la función del mi-ARN hsa-let-7f todavía es desconocida en humanos, en distintas especies animales se ha descrito que la familia let-7 está estrechamente relacionada con las funciones de desarrollo embrionario^{38,39}. En conjunto, nuestros resultados indican que diferencias en el patrón de expresión de ciertos mi-ARN podrían ser la causa subyacente de algunos casos de infertilidad masculina.

Conclusiones

Los espermatozoides humanos contienen los mi-ARN hsa-miR-23, hsa-miR-744 y hsa-let-7f. Este último muestra una reducción significativa de expresión en 3 de los 4 individuos infériles, sugiriendo la implicación de alteraciones en la expresión de mi-ARN como la causa subyacente de algunos casos de infertilidad masculina.

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 han seguido los protocolos de su centro de trabajo sobre la publicación de datos de pacientes y que todos los pacientes incluidos en el estudio han recibido información suficiente

y han dado su consentimiento informado por escrito para participar en dicho estudio.

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

Financiación

El trabajo se ha desarrollado mediante la financiación de los proyectos FIS PS-09-00330, 2009/SGR00282 y Ayudas Merk Serono 2011FE16. Albert Salas-Huetos es el beneficiario de una beca predoctoral PIF de la UAB 456-01-1/E2010.

Conflictos de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido posible gracias a la aportación de muestras del Instituto Valenciano de Infertilidad de Valencia y la Unidad de Reproducción Asistida del Centro Médico Teknon de Barcelona. Los autores agradecen la colaboración del Dr. Nicolás Garrido del Instituto Valenciano de Infertilidad de Valencia y del Dr. Mark Grossmann, la Dra. Carme Pons y el Dr. Javier Nadal de la Unidad de

Reproducción Asistida del Centro Médico Teknon de Barcelona.

Bibliografía

1. Ambros V. microRNAs: tiny regulators with great potential. *Cell.* 2001;107:823-6.
2. Boyd SD. Everything you wanted to know about small RNA but were afraid to ask. *Lab Invest.* 2008;88:569-78.
3. Inui M, Martello G, Piccolo S. MicroRNA control of signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010;11:252-63.
4. Doench JG, Sharp PA. Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev.* 2004;18:504-11.
5. Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science.* 2007;318:1931-4.
6. miRBase.org [Internet]. University of Manchester [actualizado 3 Nov 2011; citado 26 Abr 2012]. Disponible en: <http://www.mirbase.org>
7. Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res.* 2005;65:6029-33.
8. Lu J, Getz G, Miska EA, Álvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature.* 2005;435:834-8.
9. Boerke A, Dieleman SJ, Gadella BM. A possible role for sperm RNA in early embryo development. *Theriogenology.* 2007;68 Suppl 1:S147-55.
10. He Z, Kokkinaki M, Pant D, Gallicano GI, Dym M. Small RNA molecules in the regulation of spermatogenesis. *Reproduction.* 2009;137:901-11.
11. Toloubehdokhti T, Bukulmez O, Chegini N. Potential regulatory functions of microRNAs in the ovary. *Semin Reprod Med.* 2008;26:469-78.
12. Hwang HW, Mendell JT. MicroRNAs in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis. *Br J Cancer.* 2006;94:776-80.
13. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2006;6:259-69.
14. Van Rooij E, Olson EN. MicroRNAs: powerful new regulators of heart disease and provocative therapeutic targets. *J Clin Invest.* 2007;117:2369-76.
15. Fiore R, Siegel G, Schrott G. MicroRNA function in neuronal development, plasticity and disease. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1779:471-8.
16. Tan Z, Randall G, Fan J, Camoretti-Mercado B, Brockman-Schneider R, Pan L, et al. Allele-specific targeting of microRNAs to HLA-G and risk of asthma. *Am J Hum Genet.* 2007;81:829-34.
17. Lian J, Zhang X, Tian H, Liang N, Wang Y, Liang C, et al. Altered microRNA expression in patients with non-obstructive azoospermia. *Reprod Biol Endocrinol.* 2009;7:13.
18. McCallie B, Schoolcraft WB, Katz-Jaffe MG. Aberration of blastocyst microRNA expression is associated with human infertility. *Fertil Steril.* 2010;93:2374-82.
19. Krawetz SA, Kruger A, Lalancette C, Tagett R, Antón E, Draghici S, et al. A survey of small RNAs in human sperm. *Hum Reprod.* 2011;26:3401-12.
20. Wykes SM, Visscher DW, Krawetz SA. Haploid transcripts persist in mature human spermatozoa. *Mol Hum Reprod.* 1997;3:15-19.
21. Kramer JA, Krawetz SA. RNA in spermatozoa: implications for the alternative haploid genome. *Mol Hum Reprod.* 1997;3:473-8.
22. Miller D. RNA in the ejaculate spermatozoon: a window into molecular events in spermatogenesis and a record of the unusual requirements of haploid gene expression and post-meiotic equilibration. *Mol Hum Reprod.* 1997;3:669-76.
23. Krawetz SA. Paternal contribution: new insights and future challenges. *Nat Rev Genet.* 2005;6:633-42.
24. Lalancette C, Miller D, Li Y, Krawetz SA. Paternal contributions: new functional insights for spermatozoal RNA. *J Cell Biochem.* 2008;104:1570-9.
25. Liu WM, Pang RT, Chiu PC, Wong BP, Lao K, Lee KF, et al. Sperm-borne microRNA-34c is required for the first cleavage division in mouse. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012;109:490-4.
26. Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, Swanson RJ, Matta JF, Oehninger S. Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 1988;49:112-7.
27. Organización Mundial de la Salud. WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. 5.ª ed. Cambridge: University Press; 2010.
28. Goodrich R, Johnson G, Krawetz SA. The preparation of human spermatozoal RNA for clinical analysis. *Arch Androl.* 2007;53: 161-7.
29. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987;162:156-9.
30. Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc.* 2006;1:1581-5.
31. Dadoune JP. Spermatozoal RNAs: what about their functions? *Microsc Res Tech.* 2009;72:536-51.
32. Linschooten JO, Van Schooten FJ, Baumgartner A, Cemeli E, Van Delft J, Anderson D, et al. Use of spermatozoal mRNA profiles to study gene-environment interactions in human germ cells. *Mutat Res.* 2009;667:70-6.
33. Krebs S, Fischaleck M, Blum H. A simple and loss-free method to remove TRIZol contaminations from minute RNA samples. *Anal Biochem.* 2009;387:136-8.
34. Oliva R. Protamines and male infertility. *Hum Reprod Update.* 2006;12:417-35.
35. Ostermeier GC, Miller D, Huntriss JD, Diamond MP, Krawetz SA. Reproductive biology: Delivering spermatozoan RNA to the oocyte. *Nature.* 2004;429:154.
36. Kempisty B, Depa-Martynow M, Lianeri M, Jedrzejczak P, Darul-Wasowicz A, Jagodzinski PP. Evaluation of protamines 1 and 2 transcript contents in spermatozoa from asthenozoospermic men. *Folia Histochem Cytopiol.* 2007;45 Suppl 1:S109-13.
37. Berezikov E, Thuemmler F, Van Laake LW, Kondova I, Bontrop R, Cuppen E, et al. Diversity of microRNAs in human and chimpanzee brain. *Nat Genet.* 2006;38:1375-7.
38. Teneissen JM, Thummel CS. Developmental timing: let-7 function conserved through evolution. *Curr Biol.* 2008;18:R707-8.
39. Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, et al. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature.* 2000;408:86-9.