



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



Estudi de la presència de biomarcadors d'infertilitat masculina

Alba Fernandez Encinas

TESI DOCTORAL 2020

UAB

Universitat Autònoma
de Barcelona

Estudi de la presència de biomarcadors d'infertilitat masculina

Alba Fernandez Encinas

Memòria presentada per optar al Grau de Doctora en Biologia Cel·lular per la Universitat Autònoma de Barcelona

Tesi doctoral inscrita en el Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia,
Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona

Directors:

Dr. Jordi Benet i Català
Dra. Joaquina Navarro i Ferreté
Dr. Agustín García Peiró

Bellaterra 2020

El Dr. **Jordi Benet**, professor Catedràtic del Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia de la Universitat Autònoma de Barcelona,

la Dra. **Joaquima Navarro i Ferreté**, professora Catedràtica del Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia de la Universitat Autònoma de Barcelona,

i el Dr. **Agustín García i Peiró**, fundador i director general del centre d'infertilitat masculina de Barcelona (Cimab),

CERTIFIQUEN

Que **Alba Fernandez Encinas** ha realitzat sota la seva direcció el treball d'investigació que s'exposa en la memòria titulada "**Estudi de la presència de biomarcadors d'infertilitat masculina**" per optar al grau de Doctora per la Universitat Autònoma de Barcelona.

Que aquest treball s'ha dut a terme a la Unitat de Biologia Cel·lular i Genètica Mèdica del Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia de la Universitat Autònoma de Barcelona.

I perquè així consti, signen el present certificat.

Dr. Jordi Benet i Català

Dra. Navarro i Ferreté

Dr. Agustín García Peiró

Alba Fernandez Encinas

Bellaterra, setembre de 2020

La present tesi doctoral s'ha desenvolupat amb el finançament dels projectes:

- Projecte PI14/00119, Instituto de Salud Carlos III
- Projecte 2014SGR0903, Generalitat de Catalunya
- Projecte 2017SGR1796, Generalitat de Catalunya

Alba Fernandez Encinas ha estat beneficiària d'una beca predoctoral per a Personal Investigador en Formació (PIF), concedida per la Universitat Autònoma de Barcelona.

AGRAÏMENTS

Amb la composició de la tesi gairebé enllestida, només em resta escriure els agraïments. La qual cosa no es poca perquè obre una escletxa a conèixer les persones que han participat, d'una manera o altra, en aquest treball. Sou moltes les persones que heu estat presents en aquests anys i per això us vull donar les gràcies.

En primer, lloc vull donar les gràcies als meus directors principals de la tesi, en Jordi Benet i la Joaquina Navarro, per donar-me la oportunitat de viure aquesta experiència en la recerca i per acollir-me com a un membre més de l'equip, ser tan propers i humans, feu molt fàcil la convivència al vostre costat, moltes gràcies. Vull agrair-vos també la vostra passió per a la recerca i també per la docència, especialment a en Jordi Benet per haver-me fet partícip de molts altres aspectes d'aquesta, com són reunions, avaluacions i resolucions de dubtes que sorgeixen durant el procés, m'ha agradat molt viure-ho des de dins. I a l'Agustí García Peiró, també director d'aquesta tesi i a en Jordi Ribas, membre del grup de recerca i company, per transmetre'm el coneixement científic i l'entusiasme que senten cap a la recerca científica. A més, de la direcció científica que han realitzat en aquest treball que m'ha permès millorar en molts aspectes. Espero que continueu treballant tant fort com fins ara, lluitant pels vostres somnis, seguïu essent aventurers, molta sort nois.

També m'agradaria agrair als membres del Laboratori de Proteòmica del CSIC/UAB, per haver-me donat l'oportunitat de treballar amb ells. A la Montse, per tota la formació, consells que ens has aportat i sobretot, gràcies per gaudir de la teva feina i contagiar-nos. A la Edita i al Roberto, per la vostra paciència infinita, per ensenyar-me a realitzar les tècniques de proteòmica aplicades en aquest treball, poder gaudir de la qualitat amb la que treballem i per haver-me fet sentir com a casa la infinitat de dies que he viscut entre vosaltres. Així com, a l'equip de proteòmica de la UB, en especial al Dr. Josep Maria Estanyol pels consells i estar sempre disposat a contestar tots i cadascun dels dubtes que no han estat pocs, gràcies per la paciència.

De la gent que corre per la Unitat, vull dir-vos que sou gent molt gran. En Javi, moltes gràcies per aportar sempre la llum necessària, en forma de consell a qualsevol nivell, saps que ets una part indispensable d'aquesta unitat, sense

tu les neveres no funcionarien, els ordinadors no ens obeirien i les plantes moririen. I junt amb el Keyvan, aquests últims anys hem estat un equip, ens hem ajudat i escoltat, heu fet que la feina del dia a dia sigui més amena i divertida. Moltes altres persones també han contribuït a aportar llum en el dia a dia de feina, com la Gemma, la Laia, la Mariona, la Imma, la M^a Àngels, el Vicenç, la Rosa, en Jordi Camps, l'Àngels, la Rita, el Sergio, moltes gràcies per tot, per les estones de sobretaula, pels somriures, per les complicitats, per l'assessorament, pels cafès, i per tantes altres coses..

Fora del món científic, vull donar les gràcies a les amigues de tota la vida, als amics del Marcel que ja són els meus amics, per haver crescut plegats i compartir la vida. Als pares del Marcel, la Mònica, el Pep, la Gala i l'Ovidi, gràcies per l'interès i el suport rebut, sou una família increïble, us admiro per la força que demostreu al dia a dia. I a la Maria, allà on siguis, gràcies per recordar-me que la investigació és més necessària que mai. Als meus pares, la Nonna, l'Aida, el Bernat, la Martina i el Lluç, us vull donar les gràcies per tot el que compartim, pel vostre amor i suport incondicional. La família no s'escull però jo us hagués triat, sou magnífics.

A en Marcel, gràcies per ser el meu company de viatge, per tot el teu suport en els moments difícils i per tota la felicitat que hem compartit, per l'energia que transmet cada dia que fa que tot sembli més senzill. Pels teus consells que em fan créixer dia a dia i pels teus valors, ets una persona increïble. La millor decisió que he pres mai a la vida. A l'Olau i l'Elna, les persones que han canviat la meua vida 360°, al vostre costat cada dia aprenc a valorar més la vida i a mirar-la amb uns altres ulls. Veure-us créixer és un regal fantàstic.

Marcel, Olau, Elna i pares,
gràcies per estar sempre al meu costat
i animar-me a seguir aquest camí,
us estimo fort i per sempre.

ÍNDEX

RESUM	18
SUMMARY	20
1.INTRODUCCIÓ	23
1.1 L'espermatzoide humà	24
1.1.1 Generalitats	24
1.1.2 Organització de l'ADN espermàtic	27
1.2 Plasma seminal.	29
1.2.1 Generalitats	29
1.2.2 Funcions del plasma seminal	33
1.3 Mètodes de diagnòstic de la infertilitat masculina	34
1.3.1 Història clínica	34
1.3.2 Exàmen físic	34
1.3.3 Seminograma	35
1.3.4 Estudi genètic	36
1.4 Efecte de la fragmentació de l'ADN dels espermatozoides en la infertilitat masculina	37
1.4.1 Causes	38
1.4.2 Tècniques de detecció	42
1.5 Biomarcadors d'infertilitat masculina	44
1.5.1 Definició	44
1.5.2 ADN	45
1.5.3 ARN	45
1.5.4 Proteïnes	46
1.5.5 Metabòlits	47
1.6 Proteòmica clínica	48
1.6.1 Tècniques de proteòmica	49
1.6.2 Proteòmica i reproducció masculina	55
1.6.3 Plasma seminal en proteòmica clínica	56
1.6.4 Espermatozoides en proteòmica clínica	58
2.HIPÒTESI I OBJECTIUS	63

3.MATERIAL I MÈTODES	69
3.1 Mostres biològiques	70
3.1.1 Procedència i comitè d'ètica	70
3.1.2 Grups de pacients i controls	70
3.1.3 Obtenció de les mostres de semen humà i criopreservació	71
3.2 Tècniques d'anàlisi del semen	72
3.2.1 Seminograma	72
3.3 Tècniques d'anàlisi de la integritat de l'ADN espermàtic	73
3.3.1 Assaig Cometa	73
3.3.2 Assaig SCDt (Sperm Chromatin Dispersion test)	75
3.4 Tècnica d'anàlisi de l'activitat nucleasa del líquid seminal amb el mètode SRED	77
3.4.1 Mètode Single Radial Enzyme Diffusion (SRED)	77
3.5 Identificació de biomarcadors en el plasma seminal mitjançant la metodologia 2D-DIGE	78
3.5.1 Quantificació i precipitació de proteïnes	78
3.5.2 Marcatge amb DIGE de les mostres	78
3.5.3 Electroforesi bidimensional, obtenció i anàlisi de les imatges	84
3.5.4 Tinció amb plata de proteïnes en gels de poliacrilamida	84
3.5.5 Anàlisi de proteïnes per espectrofotometria de masses	85
3.6 Identificació de biomarcadors en els espermatozoides mitjançant la metodologia marcatge de TMT	87
3.6.1 Extracció de les proteïnes	87
3.6.2 Marcatge amb TMT	88
3.6.3 Espectrofotometria de masses i anàlisi nanoLC-MS/MS	89
3.7 Anàlisi estadística	90
3.8 Bioinformàtica	91
3.9 Disseny experimental	92
3.9.1 Disseny experimental de l'estudi 1	92
3.9.2 Disseny experimental de l'estudi 2	92
3.9.3 Disseny experimental de l'estudi 3	93

4.RESULTATS	95
4.1 Article 1	96
4.2 Article 2	105
4.3 Article 3	120
5.DISCUSSIÓ	139
5.1 Anàlisi del nivell de fragmentació en l'ADN dels espermatozoides de les mostres analitzades	141
5.1.1 Comet alcalí: valoració els trencaments de cadena senzilla	142
5.1.2 Comet neutre: valoració els trencaments de cadena doble	143
5.1.3 SCD test: valoració dels espermatozoides amb l'ADN completament degradat	144
5.2 Determinació de l'activitat nucleasa en el líquid seminal de les mostres analitzades	145
5.2.1 Posada a punt de la tècnica sred per a determinar l'activitat nucleasa en el líquid seminal	145
5.2.2 Anàlisi de l'activitat nucleasa en el líquid seminal	146
5.2.3 Valoració de les correlacions entre l'activitat nucleasa en el líquid seminal i les variables del seminograma	147
5.2.4 Valoració de l'activitat nucleasa en el líquid seminal com a variable per predir la infertilitat masculina	148
5.3 Anàlisi de l'expressió proteica diferencial en el líquid seminal d'individus infèrtils i fèrtils	148
5.3.1 Selecció de les mostres segons els criteris establerts: seminograma, patologia i fragmentació de l'ADN dels espermatozoides mitjançant diferents tècniques.	149
5.3.2 Anàlisi proteòmica diferencial del líquid seminal mitjançant 2D-DIGE dels grups analitzats	150
5.3.3 Anàlisi bioinformàtica de les proteïnes expressades diferencialment en el líquid seminal dels grups analitzats	153

5.4 Anàlisi de l'expressió proteica diferencial en els espermatozoides d'individus fèrtils i d'avortaments de repetició abans i després del tractament amb antioxidants	154
5.4.1 Selecció de les mostres d'avortaments de repetició i tractament amb antioxidants orals	155
5.4.2 Anàlisi proteòmica diferencial en els espermatozoides mitjançant marcatge TMT en els grups analitzats	155
5.4.3 Anàlisi bioinformàtica de les proteïnes expressades diferencialment en els espermatozoides dels grups analitzats	159
5.5 Perspectiva de futur	160
6.CONCLUSIONS	163
BIBLIOGRAFIA	169
ABREVIACIONS I ACRÒNIMS	204

RESUM

De manera rutinària, la valoració de la qualitat espermàtica durant el diagnòstic inicial de la infertilitat masculina es realitza mitjançant l'estudi macroscòpic i microscòpic de la mostra de semen. Aquests proporcionen informació rellevant sobre el recompte, la mobilitat i la morfologia dels espermatozoides, però no sobre el potencial de fertilització de la mostra, pel que sovint aquests paràmetres tenen un valor pronòstic limitat en processos de fecundació natural i/o artificial. A més, alguns estudis determinen que hi ha casos d'infertilitat masculina que es poden diagnosticar erròniament com a idiopàtics, ja que hi ha certes anomalies a nivell molecular o genètic que no presenten manifestacions detectables en el seminograma. Per abordar aquest problema, és necessari abordar el repte d'obtenir nous biomarcadors que ajudin a entendre millor els mecanismes moleculars implicats en la fecundació. Per a això, en aquest treball s'han utilitzat tècniques proteòmiques d'expressió diferencial tant en mostres de plasma seminal com d'espermatozoides.

En el primer estudi, s'ha demostrat la presència d'activitat nucleasa en el líquid seminal de diferents grups de pacients, inclosos aquells que no presenten espermatozoides, amb azoospermia. A més, s'ha observat un increment de l'activitat nucleasa per espermatozoide en aquells grups que tenen més paràmetres del seminograma alterats, així com una correlació entre l'activitat nucleasa i la fragmentació de l'ADN dels espermatozoides valorada amb Comet alcalí, la morfologia i la mobilitat espermàtica. Per últim, mitjançant la corba ROC s'ha comprovat que l'activitat nucleasa és una bona variable per predir la infertilitat masculina pel que podria millorar el diagnòstic de pacients idiopàtics. En el segon estudi, s'ha comparat el perfil proteic del líquid seminal de controls fèrtils amb pacients seleccionats segons el seminograma, patologia i valors d'integritat de l'ADN dels espermatozoides mitjançant Comet neutre, alcalí i SCD. Les 24 mostres analitzades s'han classificat en 4 grups diferents: controls fèrtils, avortaments de repetició, astenoteratozoospèrmics, astenoteratozoospèrmics amb varicocele. L'anàlisi proteòmica comparativa s'ha realitzat amb el sistema d'electroforesi en gel bidimensional basat en el marcatge fluorescent (2D-DIGE) i ha revelat la presència de 28 proteïnes diferencials. Aquestes estan involucrades en processos metabòlics i cel·lulars, funcions catalítiques

i es troben al component extracel·lular. L'anàlisi de les interaccions entre proteïnes ha mostrat que estan associades entre elles i també amb la Ubiquitina C, indicant que la regulació d'aquestes proteïnes té un paper important en la infertilitat masculina. En el tercer estudi, s'ha comparat el perfil proteic dels espermatozoides de mostres de controls fèrtils amb avortaments de repetició abans i després d'un tractament oral amb antioxidants mitjançant el marcatge isobàric TMT. S'han identificat 34 proteïnes amb expressió diferencial entre els grups d'avortaments de repetició i controls fèrtils, a més algunes proteïnes milloren el seu perfil d'expressió després del tractament amb antioxidants, indicant que són vulnerables a l'estrès oxidatiu. No obstant, no hi ha diferències significatives entre els avortaments de repetició abans i després del tractament amb antioxidant, per tant, la patologia espermàtica produïda en aquests pacients no és deguda principalment a l'estrès oxidatiu. Finalment, l'anàlisi d'interaccions entre les proteïnes diferencials ha mostrat tres vies principals d'afectació: metabolisme, citoesquelet i dany en l'ADN dels espermatozoides.

En conjunt, els resultats obtinguts demostren la utilitat de l'anàlisi proteòmica i la importància de l'estudi de les proteïnes que s'expressen de manera diferencial entre individus fèrtils i infèrtils ja que permet aprofundir en el coneixement dels mecanismes moleculars implicats en la infertilitat masculina i personalitzar el diagnòstic de pacients amb la construcció de nous panells de biomarcadors.

SUMMARY

Routine evaluation of sperm quality during the initial diagnosis of male fertility is performed by macroscopic and microscopic examination of the semen sample. These provide useful information regarding sperm count, sperm motility, sperm morphology but not on the fertilization potential of the sample often have a limited prognostic value in processes of natural and/or artificial fertilization. In addition, some studies determine that there are cases of male infertility that can be misdiagnosed as idiopathic, as there are certain abnormalities at the molecular or genetic level that do not present detectable manifestations with basic semen analysis. To address this problem it is necessary to obtain new biomarkers that help to better understand the molecular mechanisms involved in fertilization. To this end, differential expression proteomic techniques have been used in both seminal plasma and sperm samples in this work.

In the first study, the presence of nuclease activity in the seminal plasma of different groups of patients has been found in all of them, including those that do not have sperm, with azoospermia. In addition, an increase in sperm nuclease activity has been observed in patients with most altered parameters of semen analysis, as well as a correlation between nuclease activity and sperm DNA fragmentation assessed by alkaline Comet, morphology and sperm motility. Finally, the ROC curve has shown that nuclease activity is a good variable for predicting male infertility and could therefore improve the diagnosis of idiopathic patients. In the second study, the protein profile of seminal plasma from fertile donors was compared with patients selected according to their seminogram, pathology, and sperm DNA integrity values using neutral and alkaline Comet, and SCD test. 24 samples analyzed were classified into 4 different groups: fertile donors, recurrent miscarriage, asthenoteratozoospermic and asthenoteratozoospermic with varicocele. Comparative proteomic analysis was performed with the two-dimensional gel electrophoresis system based on fluorescent labeling (2D-DIGE) and revealed the presence of 28 differential proteins that are involved in metabolic and cellular processes, catalytic functions and located in the extracellular component. Analysis of protein interactions has shown that they are associated with each other and also to Ubiquitin C, indicating that the regulation of these proteins plays an important role in male infertility. In the third study,

protein profile of sperm from fertile donor samples was compared with recurrent miscarriage before and after oral treatment with antioxidants using TMT isobaric labeling. 34 proteins with differential expression have been identified between groups of recurrent miscarriage and fertile donors, in addition some proteins ameliorated their expression after treatment with antioxidants, indicating that they are vulnerable to oxidative stress. However, no significant differences between recurrent miscarriages before and after antioxidant treatment have been found, therefore, damage produced in sperm from patients with this pathology is not mainly due to oxidative stress. In addition, analysis of interactions between differential proteins showed three main pathways of involvement: metabolism, cytoskeleton, and sperm DNA damage.

In summary, results obtained demonstrate the usefulness of proteomic analysis and the importance of the study of proteins that are differentially expressed between fertile and infertile individuals as it allows to deepen the knowledge of the molecular mechanisms involved in male infertility and be able to personalize the diagnosis of patients with new biomarker panels.

1. INTRODUCCIÓ

1.1 L'ESPERMATOZOIDE HUMÀ

1.1.1 GENERALITATS

L'espermatozoide o gàmeta masculí, és la cèl·lula sexual masculina encarregada d'aportar la meitat del material genètic al futur zigot. Aquest és una cèl·lula haploide. La formació d'aquestes cèl·lules tan especialitzades s'aconsegueix mitjançant un procés que s'anomena espermatogènesi, que s'inicia a l'interior de les gònades masculines (testicles) i té una durada de 64 dies (Adler, 1996) a 72-74 dies (Amann, 2008, Divya et al, 2014). En humans, aquest procés s'inicia a la pubertat i es perllonga fins al final de la vida de l'individu. Consta de tres fases: la multiplicació dels espermatogonis per mitosi; la meiosi, procés en el que es redueix el nombre de cromosomes, convertint cèl·lules diploides en haploides i per últim, la transformació de les espermatides rodones en la complexa estructura de l'espermatozoide mitjançant el procés que s'anomena, espermiogènesi.

Durant la primera fase, les cèl·lules mare de la gònada o espermatogònies A ($2n$, n = nombre de cromosomes; $2c$, c = nombre de cromàtides) situades a la regió basal de l'epiteli dels túbuls seminífers pateixen diverses divisions mitòtiques. La progènie d'aquestes divisions serviran tant per a mantenir la població d'aquestes, com per a donar lloc a diversos espermatogonies B ($2n$, $2c$) que queden interconnectades. Els espermatogonis B es divideixen també per mitosis per donar lloc als espermatòcits primaris ($2n$, $4c$). Tots els descendents d'un espermatogoni B romanen connectats, formant un sinciti - pel que experimentaran un desenvolupament sincrònic.

A la segona fase té lloc la meiosi, és a dir, la reducció del nombre de cromosomes a la meitat mitjançant dues divisions meiòtiques consecutives. Durant la primera divisió meiòtica, els cromosomes homòlegs dels espermatòcits primaris s'aparellen entre ells i inicien la recombinació genètica. Finalment, té lloc la segregació d'homòlegs a pols oposats prèviament a la formació dels espermatòcits secundaris (n , $2c$), que al seu torn mitjançant una segona divisió meiòtica i la segregació de les cromàtides germanes a pols oposats donarà lloc a les espermatides rodones (n,c).

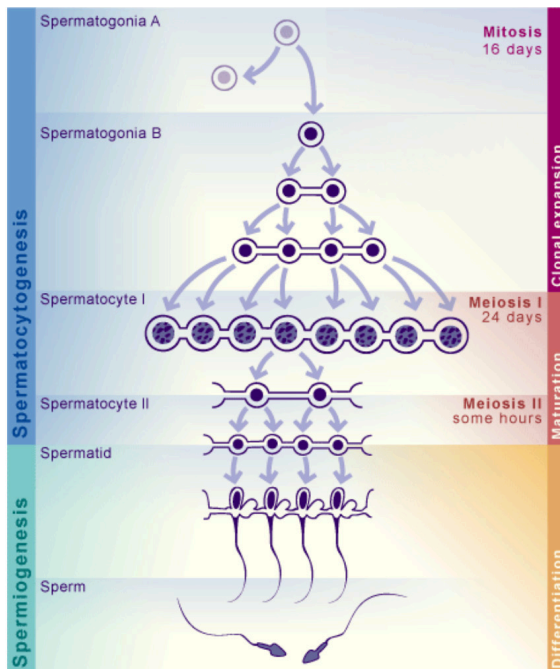


Figura 1. La població de cèl·lules mare es troba a la làmina basal dels túbuls seminífers. Aquestes són espermatogonis A que pateixen divisions per mitosi: una de les cèl·lules filles renova les existències de espermatogonis A, l'altre esdevé una espermatogonia tipus B. Aquestes es divideixen i les seves cèl·lules filles migren cap a la llum. En aproximadament 64 a 72-74 dies es diferencien fins a espermatozoides. Recuperat de <http://embryology.ch/dutch/cgametogen/spermato03.html>

En la tercera i última fase, l'espermioogèsi, les espermatides rodones pateixen canvis morfològics i bioquímics per a transformar-se finalment en espermatozoides madurs. Els canvis més importants són:

- Formació de l'acrosoma, que cobreix la part del cap de l'espermatozoide. L'acrosoma conté enzims hidrolítics que permeten la fusió de l'espermatozoide amb l'òvul en la fertilització.
- Condensació de la cromatina nuclear.
- Desenvolupament del flagel per donar mobilitat, i la pèrdua d'excés de material citoplasmàtic.

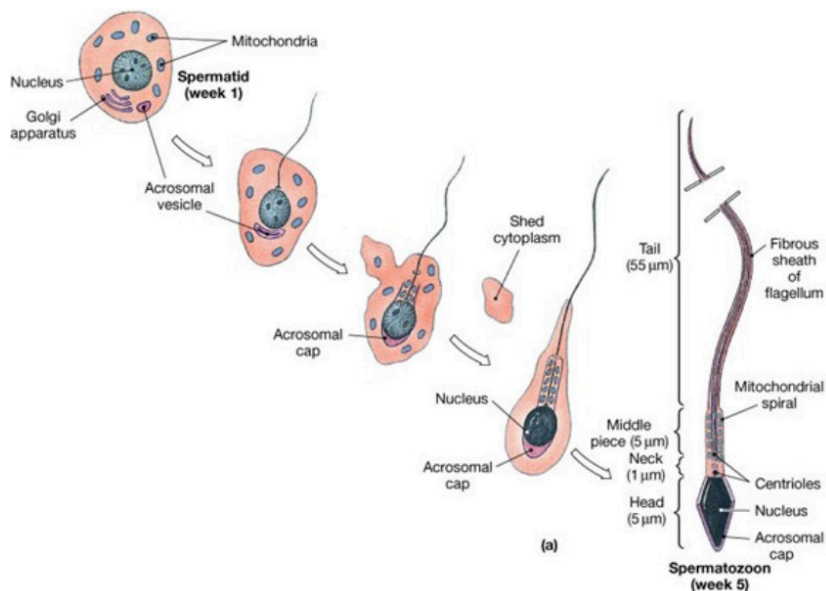


Figura 2. Diferenciació d'espermàtida a espermatozoide mitjançant la espermiogènesi. Recuperat de Fundamentals of Anatomy & Physiology. Frederic, H. (2015). Editorial: Pearson Education, Inc., . Sisena edició.

D'aquest procés d'espermiogènesi en resulta l'espermatozoide, que té una mida de 40-50 μm en allargada i està format per un cap i una cua (Fig. 2). L'espermatozoide quasi bé sense citoplasma, té un cap de forma ovalada i plana de 4,0-5,5 μm en allargada i 2,5-3,5 μm en amplada. El cap, que està rodejat per una membrana composta per lipoproteïnes, conté a dins l'ADN empaquetat, que està envoltat d'una membrana. Quasi bé no té citoplasma. A la part anterior del cap, hi ha l'acrosoma un espai diferenciat que conté tots els enzims hidrolítics com acrosina, hidrolases i hialuronidasa necessaris per a la reacció acrosòmica durant la qual els enzims seran abocats a l'exterior perquè l'espermatozoide pugui penetrar la zona pel·lúcida de l'oòcit i possibilitar la fusió amb l'oòcit (Jansen et al., 2001). La cua, que és la part més llarga de l'espermatozoide, mesura 40-50 μm en allargada, i està formada per fosfolípids, lipoproteïnes i enzims. Aquesta cua l'anomenem flagel i està formada principalment per la proteïna, dineïna, que és l'encarregada, junt al complex dels microtúbuls, del moviment. El flagel es divideix en tres parts: peça mitja, principal i final. La porció mitja, és molt característica perquè conté l'axonema amb els 9+2 microtúbuls i rodejats per mitocondris que aportaran l'energia necessària per moure's.

A la següent figura es pot veure tot el procés de maduració de l'espermatozoide, des de la cèl·lula mare primordial fins al recorregut que fa dins el cervix, fins que es troba amb l'oòcit.

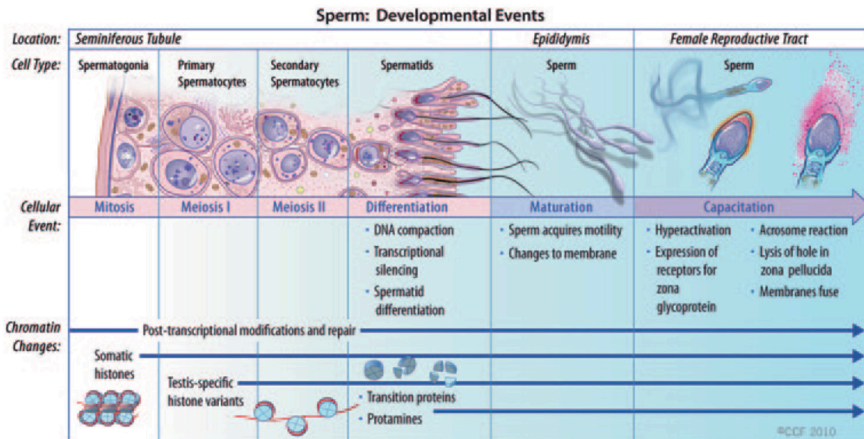


Figura 3. Esdeveniments del desenvolupament dels espermatozoides. Canvis que es produeixen durant el desenvolupament d'una cèl·lula germinal en un espermatozoide que condueix al seu alliberament i posterior maduració i emmagatzematge a l'epidídim, abans del viatge cap al tracte reproductor femení. (Reimpressió amb permís, Centre Clínic d'Art i Fotografia de Cleveland © 2010-2013. Tots els drets reservats.). (Durairajayagam et al., 2015).

1.1.2 ORGANITZACIÓ DE L'ADN ESPERMÀTIC

L'organització de la cromatina nuclear espermàtica difereix molt respecte la cromatina de les cèl·lules somàtiques (Ward i Coffey, 1991). Això és així per a minimitzar el dany dels agents externs durant el trànsit pel tracte genital femení, per tant, la morfogènesi del nucli espermàtic es troba determinada per una sèrie de factors, entre els quals hi ha l'arquitectura de la condensació de la cromatina. Defectes en aquesta condueixen a una fertilitat disminuïda (Meistrich, 1993). Una altra raó important per a l'organització del genoma en el nucli espermàtic és deguda a la necessitat que es puguin transcriure els gens adequats immediatament després de la fertilització. El mecanisme de metilació de certs gens del DNA espermàtic pot ser una de les premisses necessàries per a la regulació del genoma embrionari, i l'accessibilitat immediata d'aquests gens en pot ser una altra (Gawecka et al., 2013)

Així doncs, mentre la cromatina nuclear de les cèl·lules somàtiques està empaquetada mitjançant unes proteïnes bàsiques anomenades histones, la cromatina

nuclear espermàtica està empaquetada principalment per protamines. Les protamines són també proteïnes bàsiques però molt més petites que les histones (Oliva, 2006). Durant l'espermioquèsi, l'estructura nucleosomal de la cromatina es desorganitza, les histones són intercanviades per unes proteïnes de transició, per protamines, que s'uneixen al solc major de la doble hèlix, al llarg de tot el DNA espermàtic (Fig. 4) (Castillo et al., 2011). Així doncs, l'espermatozoide madur humà està compactat en un 85% per protamines, que li confereixen un grau superior de compactació, de l'ordre de 6 vegades més que en els cromosomes mitòtics metafàsics (Fuentes-Mascorro et al., 2000). L'ADN unit a les protamines s'organitza en estructures toroidals. Cada toroide conté aproximadament 50Kb d'ADN, 60-100 nm de diàmetre i uns 20 nm de gruix (Hud et al., 1993). Segons diferents estudis, s'ha hipotetitzat que aquests toroides es troben units entre ells mitjançant una regió de cromatina que s'uneix a la matriu nuclear de l'espermatozoide (Mudrak et al., 2005; Chan et al., 2015). Aquestes regions de cromatina que serveixen d'unió entre els toroides són més sensibles a l'acció de DNases i segons alguns autors aquesta sensibilitat és deguda a que aquesta cromatina està unida a histones en comptes de protamines i per tant, seria més accessible (Ward, 2010).

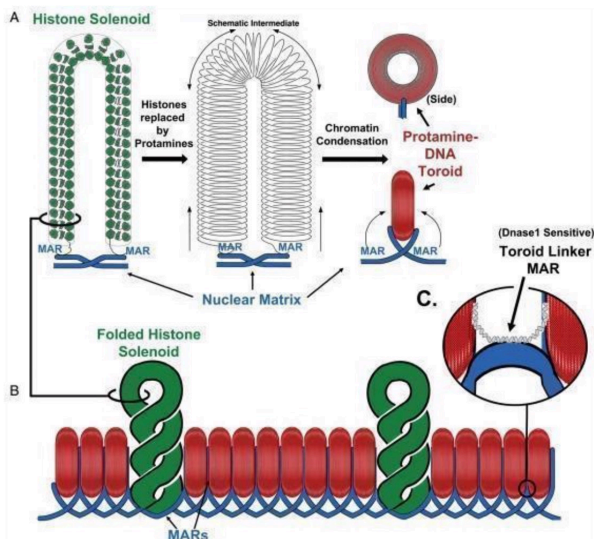


Figura 4. Principals elements estructurals de la cromatina espermàtica. A) durant l'espermioquèsi, les histones es substitueixen per protamines, empaquetant l'ADN en toroides. Cada toroide constituït per protamina és un domini en forma de loop. B) Aquests toroides poden estar organitzats per apilament un al costat de l'altre. L'evidència recent suggereix que algunes grans extensions d'ADN conserven les histones (solenoides verd). C) L'ADN enllaçant els toroides és nucleasa sensible, i pot estar unit a histones també. (Ward, 2010)

Un cop l'espermatozoide ha fecundat l'oòcit, les protamines són substituïdes per histones provinents de l'oòcit, amb l'objectiu d'aconseguir la descompactació del pronucli masculí i obtenir un altre cop un genoma organitzat amb histones a punt per començar a transcriure's, iniciant el desenvolupament embrionari (Fig. 4) (McLay i Clarke, 2003).

El percentatge de DNA espermàtic humà unit a histones es situa al voltant del 15% (Gatewood et al., 1987) i aquestes histones no es situen a l'atzar sinó que es troben associades a seqüències i dominis específics de l'ADN (Wykes i Krawetz, 2003). S'ha descrit que són més freqüents en regions riques en gens importants pel desenvolupament, gens relacionats amb l'expressió de microRNAs i gens HOX (Hammoud et al., 2009).

1.2 PLASMA SEMINAL

1.2.1 GENERALITATS

El plasma seminal, del qual se'n alliberen uns 3,5 ml en cada ejaculació, és el medi líquid en el que es troben els espermatozoides. Té un color blanquinós, una olor distintiva i és molt viscos. El plasma seminal és un fluid complexa, caracteritzat per contenir un alt grau d'aigua, ions, sucres, àcids orgànics, hormones i una gran varietat d'aminoàcids i proteïnes. És un líquid lleugerament alcalí (pH 7,5-8) (Owen i Katz, 2005) que prové de les vesícules seminals, la pròstata i les glàndules bulbouretrals (o de Cowper's) i en menor mesura també contribueixen l'epidídim, els conductes i les glàndules Littre (Taula 1) (Maxwell et al., 2007). Les vesícules seminals fan la major aportació al plasma seminal de totes les glàndules que hi contribueixen, aproximadament el 65-75% del fluid. Entre els components originaris de les vesícules seminals es troben proteïnes, com ara semenogelina I i II (Lilja et al., 1989), la lactoferrina (Wichmann et al., 1989), la fibronectina (Lilja et al., 1987) i la progastresina (Szecsi et al., 1995), i components de baix pes molecular, com la fructosa (aporta energia a l'espermatozoide), prostaglandines (actuen com supressors del sistema immune en el tracte femení) i el citrat (intervé en la capacitat d'amortiment del plasma seminal). La pròstata és el segon major contribuent dels fluids en el plasma seminal, 25- 30% del volum total. De la pròstata provenen ions, com ara el zinc amb propietats estabilitzadores i antibacterianes (Strzerek et al., 1998), el calci que participa en els processos de capacitació i la reacció acrosòmica, el magnesi, i proteïnes, com la fosfatasa àcida prostàtica, la beta-microseminoproteïna, l'antigen específic de la pròstata (PSA) (Lilja et al., 1988), la lactoferrina (Wichmann et al., 1989) i progastresina (Szecsi et al., 1995). La major part dels líquids restants procedeixen de les glàndules bulbouretrals (glàndules Cowper's) i consisteixen en la pre-ejaculació, un líquid alcalí d'aparença mucosa que neutralitza l'acidesa de qualsevol residu de la orina en la uretra i proporciona lubricació. També hi ha una petita contribució des de l'epidídim que conté L-carnitina i alpha-glucosidasatransferrina neutral (Owen i

Katz, 2005). El plasma seminal també conté albúmina (Lindholmer et al., 1974) i immunoglobulines (Rumke, 1974) que són probablement transsudades del fluid intercel·lular. El plasma seminal és una barreja complexa de proteïnes, components de baix pes molecular, ions i sucres. Els principals components s'enumeren a la taula 1. La concentració de proteïnes en el plasma seminal és de 35–55 g/L, molt més elevada que en la sang (Fröhlich et al., 1980) i són molt importants en la fertilització natural ja que participen en la capacització dels espermatozoides, la modulació de la resposta immunitària en l'úter, la formació de la reserva d'espermatozoides i en la interacció entre l'oòcit i l'espermatozoide (Yi et al., 2007).

Taula 1. Contribucions de les diferents glàndules del plasma seminal.

Glàndula	Volum	Contribució
Vesícula seminal	65-75%	Seminogelina I i II, fructosa, prostaglandines, citrat, lactoferrina, fibronectina.
Pròstata	25-30%	Antigen prostàtic específic (PSA), àcid fosfatasa prostàtica (PAP), beta-microseminoproteïnes (MSP), progastriquina, zinc, calci, magnesi, prostasomes, lípids
Glàndula bulbouretral	> 1%	Mucus, glicoproteïnes, galactosa, pre-ejaculat.
Epidídim	> 1%	L-carnitina i alpha-glucosidasatransferrina neutral

El contacte dels espermatozoides amb diferents substàncies que componen el plasma seminal es produeix de manera seqüencial. Els espermatozoides viatgen a través de l'epidídim on adquireixen la capacitat fecundant i la mobilitat. La membrana plasmàtica es remodela, tant a nivell fosfolipídic com proteic, a més es secreten gran nombre de proteïnes que seran integrades en la membrana espermàtica durant el seu trànsit per l'epidídim en unes vesícules anomenades epididimisomes que són capaces de fusionar-se amb la membrana afegint aquests canvis proteics (Gatti et al., 2004).

La degradació de proteïnes que ja no són necessàries i la eliminació dels espermatozoides defectuosos depèn del sistema de degradació/reciclatge dependent d'ubiquitina. En aquest sistema, la ubiquitina, que és una petita proteïna d'uns 8,6 kDa s'uneix als components que s'han de destruir, senyalitzant-los per a la seva

proteòlisi (Toshimori, 2003).

Després en el moment de l'ejaculació, els espermatozoides provinents de l'epidídim entren en contacte amb les diferents secrecions de les glàndules sexuals accessòries (vesícula, pròstata i bulbouretrals).

Variacions en la composició del plasma seminal de diferents individus han estat associades amb alteracions en la fertilitat, per exemple, una hipofunció de les vesícules seminals i de la pròstata (Burden et al., 2006).

Les dues proteïnes del plasma seminal més abundants, la semenogelina i la fibronectina, formen una xarxa reticulada de fibres provocant la gelificació i immobilització dels espermatozoides. Aquest coàgul, dipositat al cèrvix, es va successivament liquant, al cap d'una hora aproximadament després de la relació sexual. Els enzims proteolítics del plasma seminal destrueixen la xarxa de semenogelina i polímers de fibronectina, alliberant gradualment els espermatozoides. Aquesta funció la realitza la proteïna anomenada, antígen específic pròstatic (PSA) (Kratz et al., 2016). Si bé els espermatozoides ja estan al cèrvix, encara no estan preparats ja que s'ha de produir la capacitació: cascada de canvis en la membrana cel·lular que es tradueix en un moviment hiperactiu d'espermatozoides i la obtenció de la capacitat per interactuar amb la zona pel·lúcida de l'oòcit (ZP). Fent que es produeixi la reacció acrosomal, l'activació final del gàmeta masculí acaba amb l'escissió de les glicoproteïnes de la ZP i la fusió amb l'oòcit. Fins fa poc es pensava que l'acció del plasma seminal en el procés de fertilització i la seva regulació, no era massa important perquè aquest no passava a les parts superiors del tracte femení, i per tant, es quedava en el moc cervical.

Actualment, es coneix que els components provinents del plasma seminal són essencials pel procés de maduració dels espermatozoides ja que no es coneix cap cas, ni en animals, en el que un espermatozoide que mai hagi estat en contacte amb el plasma seminal hagi acabat fecundant un oòcit. Sí que es coneixen fecundacions produïdes per espermatozoides provinents de testicle o epidídim però sempre mitjançant tècniques de reproducció assistida com (FIV o ICSI) (Bromfield, 2014). S'han realitzat estudis en els que es confirma que l'addició de plasma seminal en mostres que s'han de crioperservar aquestes, en descongelar, tenen millors paràmetres espermàtics (Rickard et al., 2014).

Després de la líquiefacció dels espermatozoides, el següent punt crucial és la capacitat. Aquesta només es pot adquirir quan els espermatozoides estan de camí a l'úter, per això components del plasma seminal tenen capacitat decapacitadora, evitant una capacitat primària. Es tracta d'unes proteïnes que s'aglutinen temporalment a les membranes dels espermatozoides, comportant un flux de

colesterol, desestabilització de la membrana i remodelació, els primers passos necessaris per a l'activació dels gàmetes masculins (fig. 5a). Aquestes també reconeixerien els glicosaminoglicans (GAGs) com a l'heparina i lipoproteïnes d'alta densitat. Aquests compostos són secretats per les trompes de Fal·lopi i probablement ajuden a l'esperma a navegar cap a l'oòcit (fig. 5b). El control de la capacitat està reconegut per la proteïna Glicodelina. En el plasma seminal només hi ha un tipus, glicodelina-S, mentre que altres isoformes es troben en el tracte genital femení, que també seran necessàries de manera seqüencial. En relació amb l'ejaculació, la Glicodelina-S s'uneix als seus receptors, i en aquesta forma és capaç de travessar el moc cervical. Després a l'entrada de la cavitat uterina, la Glicodelina-S es desenganxa i això és el senyal per a la capacitat: remodelació induïda per l'albúmina de la membrana cel·lular i flux de colesterol (Fig. 5c) (Chiu et al., 2005).

També s'ha estudiat la capacitat del plasma seminal d'evadir la resposta immunològica del tracte reproductor femení. Just després del coit es dona la resposta immunològica postcoital en la que els components del plasma seminal desencadenen un procés que inclou citoquines i altres factors immunomoduladors. Aquests són produïts per les cèl·lules de Sertoli, les de Leydig, els testicles, i també poden ser secretats per l'epidídim, pròstata i vesícules seminals (Politch et al., 2007).

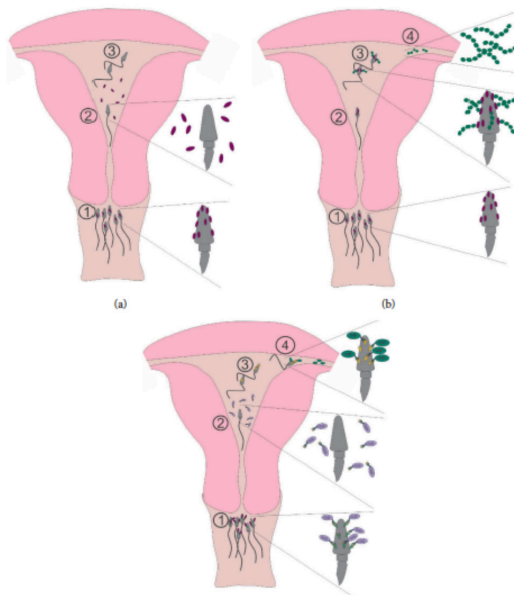


Figura 5. Els conceptes d'implicació de factors plasmàtics seminals en la regulació de la capacitat espermàtica (a): 1: espermatòzoids recoberts amb factors del SP de descapacitació (BSP, aglutinant les proteïnes espermatòzoides); 2: factors de descapacitació ja vessats; 3: espermatòzoids capacitats: moviment hiperactiu (b): 1: espermatòzoids recoberts de factors de descapacitació (BSP); 2: cavitat uterina: BSP encara al cap de l'espermatòzoide; 3: adjunt de GAGs: capacitat; 4: GAG de la unió tubular: quimiotaxi i senyal de capacitat (c): 1: espermatòzoids recoberts de glicodelina SP (Gd-S); 2: Gd-S cobert: capacitat; 3: espermatòzoids capacitats; 4: unió de Gd-F. (Szczykutowicz et al., 2019).

1.2.2 FUNCIONS DEL PLASMA SEMINAL

El plasma seminal és molt important per a la fertilitat. Les secrecions de totes les glàndules són necessàries per a la funció òptima del plasma seminal. El plasma seminal ofereix protecció, nutrició i els components necessaris per a que els espermatozoides puguin madurar i ser capaços de fertilitzar l'òcit.

La capacitat d'amortiment del plasma seminal protegeix els espermatozoides del pH vaginal àcid i les substàncies immunosupressores permeten modular la resposta immune del tracte reproductor femení (Rodríguez-Martínez et al., 2011). La fructosa ofereix nutrició per als espermatozoides i és important per a la seva supervivència (Linholmer, 1974). En els darrers anys també s'ha demostrat que el plasma seminal té un important paper en la regulació de la capacitació, la reacció de l'acrosoma i per tant, la posterior capacitat de fecundació (Caballero et al., 2008). A més, també està implicat en el transport dels espermatozoides pel tracte genital femení (Rodríguez-Martínez et al., 2011), en la formació del reservori spermàtic en l'oviducte (Caballero et al., 2012), així com la interacció entre l'espermatozoide i la zona pel·lúcida, i la fusió de l'espermatozoide amb l'òcit, també estan influenciades pels components del plasma seminal (Primakoff i Myles, 2002; Yi et al., 2007). El plasma seminal també conté components amb capacitat antioxidant, que protegeixen a l'espermatozoide (Koziorowska-Gilun et al., 2011).

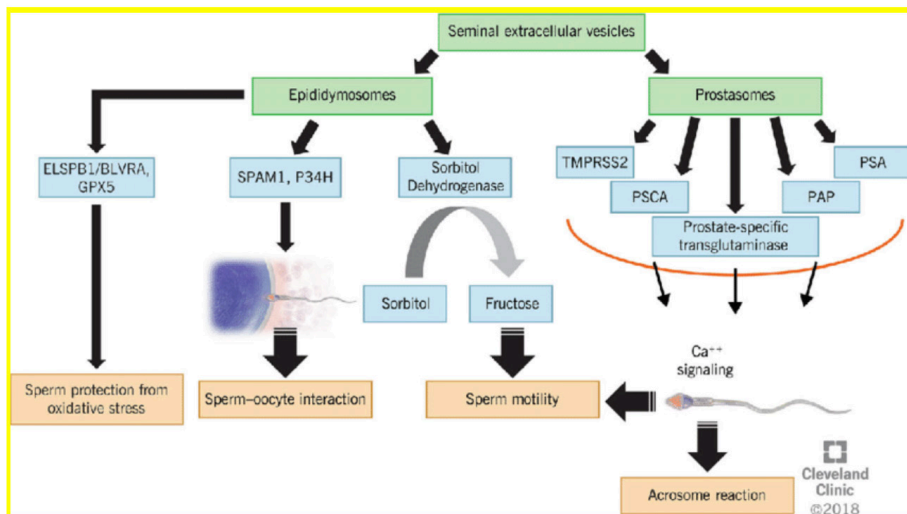


Figura 6. Funció de les vesícules extracel·lulars seminals, dels epididiosomes i dels prostasomes i del seu proteoma en la funció dels espermatozoides. (Samanta et al., 2018).

1.3 MÈTODES DE DIAGNÒSTIC DE LA INFERTILITAT MASCULINA

La incapacitat d'aconseguir l'embaràs clínic després de 12 mesos o més de mantenir relacions sexuals no protegides de manera regular és la definició d'infertilitat segons l'Organització Mundial de la Salut (OMS).

La infertilitat és un problema de salut global i segons l'OMS gairebé 190 milions de persones són infèrtils a tot el món, per tant, es considera una patologia en si mateixa (Inhorn et al., 2015). Aquesta afecta entre el 10 i el 15% de les parelles en edat reproductiva. Es calcula que aproximadament el 50% d'aquests casos tenen un origen femení i un 20-30% masculí. El restant 20-30% dels casos d'infertilitat es deu a una combinació de factors masculins i femenins (Zegers-Hochschild et al., 2009). Els factors, que es coneix, que provoquen infertilitat masculina són: varicocele, disfunció endocrina, malalties inflamatòries, obstrucció del tracte genital, disfuncions de gametogènesi masculina (Tahmasbpour et al., 2014), problemes d'erecció o d'ejaculació, i fins i tot n'hi ha que tenen un origen psicològic o psiquiàtric. A més, els estudis han demostrat que el medi ambient i l'estil de vida també poden afectar. Tot i així, no en tots els casos es pot establir un diagnòstic clar i, gairebé el 40% dels casos, són considerats idiopàtics degut a la complexitat del propi procés (Bracke et al., 2018). L'algoritme per establir les causes de la infertilitat masculina en la clínica s'inicia amb l'avaluació inicial que inclou: història clínica, examen físic i almenys dos anàlisis del seminograma (WHO, 2010) (Fig.7).

1.3.1 HISTÒRIA CLÍNICA

Primer es recopila informació sobre la història de la reproducció com ara la freqüència coital, la fecunditat anterior, informació sobre la fertilitat de la parella i la història sexual, inclosa la de transmissió sexual d'infeccions. A continuació, se'ls pregunta als pacients sobre factors d'estil de vida, com l'índex de massa corporal (IMC), el tabaquisme i l'exposició a substàncies o perills físics, fàrmacs etc.

1.3.2 EXAMEN FÍSIC

Consta d'una exploració del sistema reproductor masculí, incloent l'estudi de desordres hormonals, patologies de l'escrot com varicoceles, grandària dels testicles, i del penis com hipospàdies. En segon lloc, es revisen les característiques sexuals secundàries com la musculatura, distribució del pèl, teixit mamari, etc.

1.3.3 SEMINOGRAMA

L'última part de l'exploració inicial és l'anàlisi del semen, el seminograma. Es pren una mostra d'ejaculat després de 2-7 dies d'abstinència i es mesuren els paràmetres com el pH, volum, el nombre, la mobilitat, la morfologia i la vitalitat dels espermatozoides. La desviació d'algun d'aquests paràmetres respecte els valors normals paramètrics pot proporcionar una idea general del diagnòstic (Taula 3).

La normozoospermia es produeix quan tots els valors paramètrics del seminograma es troben per sobre dels valors de referència. Alternativament, quan els resultats dels paràmetres del seminograma són inferiors als valors de referència com el volum, concentració, motilitat i morfologia. Aquests descriuen la hipospermia, oligozoospermia, astenozoospermia i teratozoospermia, respectivament. Si no hi ha espermatozoides en la mostra però després de centrifugar si n'hi ha descriu la criptozoospermia mentre que l'absència completa s'anomena azoospermia. Un volum petit d'ejaculat també suggereix ejaculació retrògrada, obstrucció d'algun conducte, prostatitis, inflamació de les vesícules seminals o deficiència d'andrògens. D'altra banda, una concentració elevada de glòbuls blancs poden indicar infeccions. També en aquest procés es valora al presència d'anticossos contra els espermatozoides que provoca una aglutinació d'aquests.

Si es detecta una anomalia en el recompte o concentració d'espermatozoides mitjançant avaluació inicial s'ha de confirmar en una segona anàlisi del semen, ja que podria ser d'origen hormonal. La mesura de la concentració total de testosterona i del sèrum FSH pot ajudar a distingir les etiologies pre-testiculars i post-testiculars. Nivells baixos de la testosterona (per sota de 8-12 nmol/l) i els nivells baixos de FSH sèrics associats (<1 mIU/ml) suggereixen hipogonadisme hipogonadotròpic, que es pot tractar amb gonadotropina coriònica humana (hCG) o FSH. Per distingir altres etiologies es recomana una anàlisi genètica (veure apartat següent).

1.3.4 ESTUDI GENÈTIC

En l'estudi del diagnòstic de causes genètiques de la infertilitat es pot determinar des de la presència del gen de la fibrosi quística, microdeleccions en el cromosoma Y, fins a l'anàlisi del cariotip i l'estudi de la meiosi. Els últims anys també s'està implementant l'estudi de la fragmentació de l'ADN dels espermatozoides.

Variacions en el gen CFTR són indicatives, en el 90% dels casos, de l'absència bilateral de vasos deferents congènita. Es pot detectar l'absència dels vasos deferents per l'examen físic, però la genètica permet comprendre la etiologia per poder realitzar un tractament adequat (Okutman et al., 2018).

S'han de realitzar les proves en homes amb azoospermia no obstructiva (NOA) o oligospermia severa per comprovar les deleccions de 0,8-7,7 Mb a la regió del factor azoospermia (AZF) del cromosoma Y (o YCMD), que es troben en un 5-15% d'aquests pacients (Yu et al., 2012). La regió AZF és crítica per a la fertilitat, ja que hi ha diversos gens responsables de l'espermatogènesi, inclosos els DEAD a AZFa, demetilasa 5D específica de lisina (KDM5D) a AZFb, i que està absent en azoospermia (DAZ) a AZFc. Per identificar si hi ha YCMD, actualment, es realitza la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) pels marcadors de la regió i de cada subregió AZF (Krauz et al., 2018). El diagnòstic és crític perquè les opcions de tractament varien segons la supressió, essent necessari el consell genètic.

Finalment, també es realitza el cariotip del pacient, que avalua tant el nombre com l'estructura dels cromosomes. Aquest és recomanable per a tots els homes amb NOA o oligozoospermia severa, ja que el 15% dels homes amb NOA i el 4% dels els homes amb oligospermia moderada a severa presenten anomalies cromosòmiques. El més comú és el diagnòstic de la síndrome Klinefelter (47, XXY i variants com 48, XXXY i 46, XY / 47, XXY) en homes amb NOA, que es troba en el 14% dels seus cariotips (Donker et al., 2017). En la majoria dels casos, el fenotip masculí resulta d'una translocació del gen SRY (regió que determina el sexe en el cromosoma Y) del braç curt del cromosoma Y al braç curt del cromosoma X (Vorona et al., 2007).

Les aberracions cromosòmiques equilibrades, que tenen un desordre cromosòmic sense cap guany o pèrdua de material genètic, es troben en cinc fins a deu vegades més freqüentment en homes infèrtils que en la població general (Massart et al., 2012). Els poden classificar en: translocacions Robertsonianes, translocacions recíproques que impliquen els cromosomes sexuals, translocacions recíproques en autosomes, insercions i inversions. D'aquests tipus, les translocacions

recíproques que impliquen cromosomes sexual, sovint resulten tenir una major incidència en homes azoospermics que en homes oligospermàtics (Van Aschee et al., 1996). En altres tipus d'aberracions cromosòmiques els resultats són més variables, des de l'azoospermia fins a paràmetres normals de semen. Els individus amb aberracions cromosòmiques produeixen gàmetes desequilibrats com a producte de la meiosi i es creu que aquests es seleccionen negativament durant l'espermatogènesi donant lloc a un menor recompte d'espermatozoides i infertilitat posterior però no sempre la fertilitat disminueix (Macleod et al., 1951). El que si s'ha comprovat és l'augment de la fragmentació de l'ADN d'aquestes mostres i també del risc de avortaments de repetició (Kavalier et al., 2005).

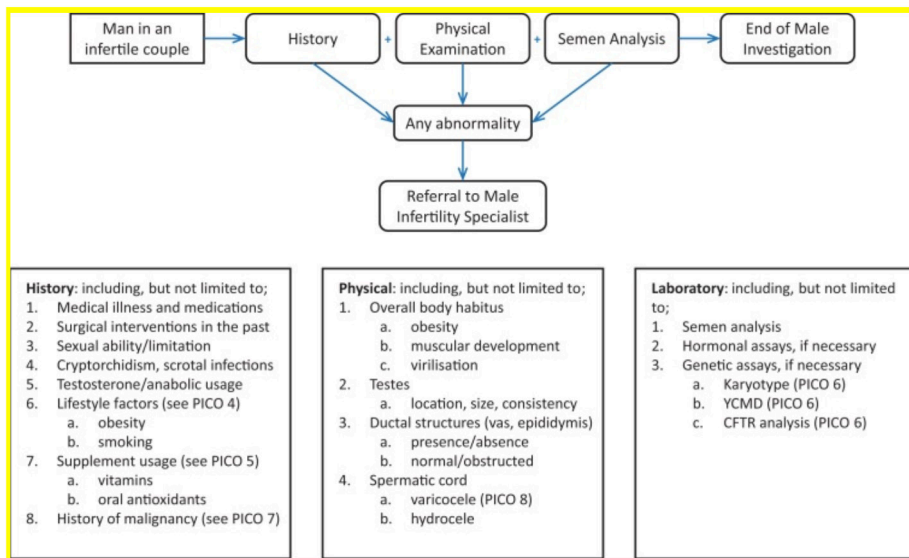


Figura 7. Diagrama de flux resum de l'algoritme per al diagnòstic d'infertilitat masculina. Ha d'incloure l'examen físic, la història i l'anàlisi del semen. Anormalitats en aquests condueixen a més investigacions. YCMD, microdeleció de cromosomes Y; Regulador de conductància transmembrana CFTR, CF. (Barratt et al., 2017)

1.4 EFECTE DE LA FRAGMENTACIÓ DE L'ADN DELS ESPERMATOZOIDES EN LA INFERTILITAT MASCULINA

En els éssers humans, és evident que la població d'espermatozoides en una ejaculació pot ser molt heterogènia. Desafortunadament, nombrosos estudis han demostrat que el dany en l'ADN dels espermatozoides està associat a valors baixos dels paràmetres del seminograma, baixes taxes de fertilització, alteracions en el desenvolupament preimplantacional, un augment dels avortaments i una elevada incidència de malalties en la descendència, incloent el càncer infantil

(Rima et al., 2016).

La fragmentació de l'ADN de l'espermatozoide es pot manifestar de diverses maneres: principalment trencaments d'una de les cadenes, trencaments de cadena simple de l'ADN (SSB) o trencaments en les dues cadenes, trencaments de cadena doble de l'ADN (DSB), així com alteracions que impliquin modificacions de bases nitrogenades, formació d'adductes, o unions covalents entre cadenes d'ADN o entre ADN i proteïnes que poden induir la formació de nous trencaments en l'ADN (Barrat et al., 2010).

Nivells alts de dany en l'ADN dels espermatozoides s'han associat a individus amb valors baixos en els paràmetres del seminograma, però també s'han descrit en individus amb valors normals en els paràmetres del seminograma (Lopes et al., 1998; Saleh et al., 2002). A més, diferents estudis indiquen que aquest dany influeix de manera directa en la probabilitat d'embaràs natural (Evenson et al., 2002) i de que l'embaràs arribi a terme (Ribas-Maynou et al., 2012). És per això, que la fragmentació de l'ADN dels espermatozoides ha despertat molt d'interès en els últims anys com a biomarcador predictiu de la qualitat espermàtica en els laboratoris d'andrologia, sobretot en relació a les tècniques de reproducció assistida. En aquest sentit, un meta-anàlisi recent (Cho i Agarwal, 2017) conclou que hi ha una relació entre una elevada fragmentació de l'ADN dels espermatozoides i una baixa capacitat per obtenir un embaràs natural o mitjançant inseminació intrauterina; no s'ha trobat relació amb l'èxit de les tècniques de reproducció assistida ni amb les conseqüències genètiques en l'embrió. Només, hi ha una alta relació amb el risc de pèrdua de l'embaràs.

Tal inconsistència reflecteix la complexitat inherent al procés reproductiu, grans variacions en la grandària de les mostres, les diferències en la selecció de pacients, disseny inadequat de l'estudi, diferències interindividuais en el tipus de dany en l'ADN que es detecten i l'eficàcia dels mecanismes de reparació en l'òocit. A més, no existeix unanimitat respecte a les tècniques de detecció del dany de l'ADN dels espermatozoides, ni en la validació d'un valor llindar a partir del qual es consideri patològica una mostra (Sakkas et al., 2015).

Les causes d'aquest dany en l'ADN dels espermatozoides encara es segueixen investigant, tot i així les principals candidates són explicades en el següent punt 1.4.1.

1.4.1 CAUSES

Ara que ja es coneix que el dany en l'ADN dels espermatozoides és una amenaça per a la reproducció humana i el correcte desenvolupament de l'embrió i se sap que està causat per l'estil de vida i els hàbits, malalties, drogues, envelliment, infeccions i l'exposició a contaminants. Manca conèixer les causes que es produeixen a nivell cel·lular, que tot i que es segueixen investigant, la comunitat científica està d'acord que existeixen uns candidats principals (Fig. 8): el deteriorament de la maduració de la cromatina espermàtica, l'estrès oxidatiu i l'apoptosi (Muratori et al., 2019).

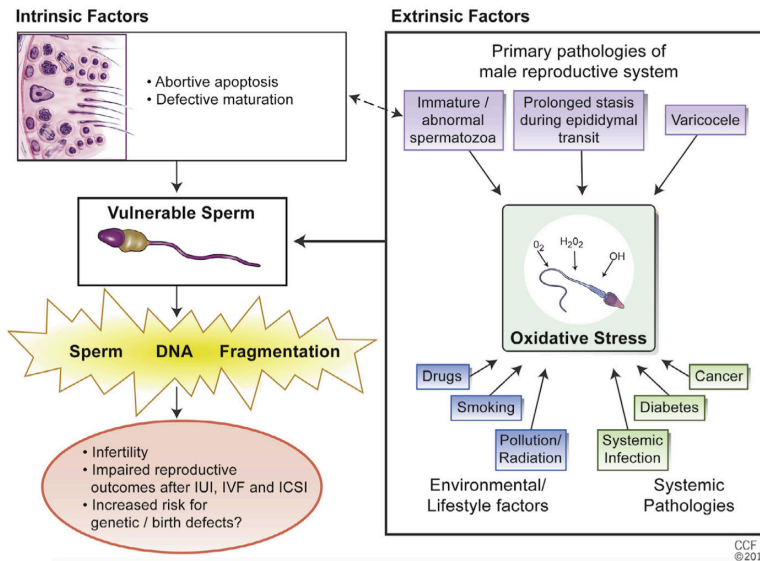


Figura 8. Causes de la fragmentació de l'ADN dels espermatozoides. Imatge recuperada de Cleveland Clinic Center for Medical Art & Photography 2017. All Rights Reserved. (Choi i Agarwal, 2017).

Pel que fa al deteriorament de la maduració de la cromatina espermàtica, ja s'ha vist anteriorment que l'ADN dels espermatozoides està molt més empaquetat que el de les cèl·lules somàtiques. Es produeix gràcies a l'intercanvi de les histones per les protamines. Però si aquest procés de remodelació de la cromatina espermàtica no es repara completament a causa d'un deteriorament del procés de maduració de l'espermatozoide, l'ADN resultant tindrà trencaments (Sakkas et al., 1995). És coneguda l'acció de la topoisomerasa II en aquest procés, disminuint la torsió produïda i ajudant a la reordenació de la cromatina durant el desplaçament d'histones per part de les protamines (McPherson et al., 1993).

El mecanisme àmpliament reconegut, és l'estrès oxidatiu, els radicals lliures de l'oxigen (ROS) es produeixen tant a nivell testicular com post-testicular. Actuen en l'ADN: trencant les cadenes tant de cadena simple com doble, produint llocs lliures de bases, delecions, canvis de lectura, creuaments d'ADN i reordenaments cromosòmics (Duru et al., 2000) o bé, de manera indirecta, durant l'apoptosi que acaben en l'activació de les caspases i de les nucleases apoptòtiques, com succeeix en les cèl·lules somàtiques (Sinha et al., 2013).

En els estudis es reflexa una elevada correlació entre els nivells de ROS amb la fragmentació de l'ADN observada en els espermatozoides de pacients infèrtils (Aitken et al., 2001).

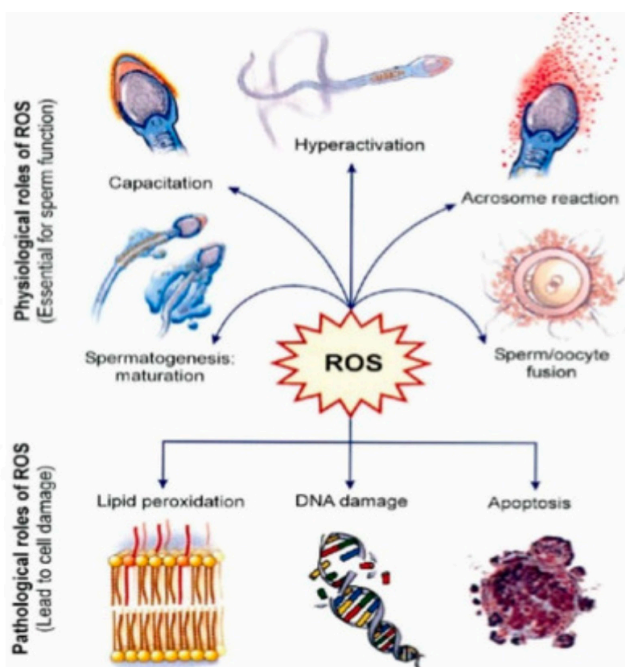
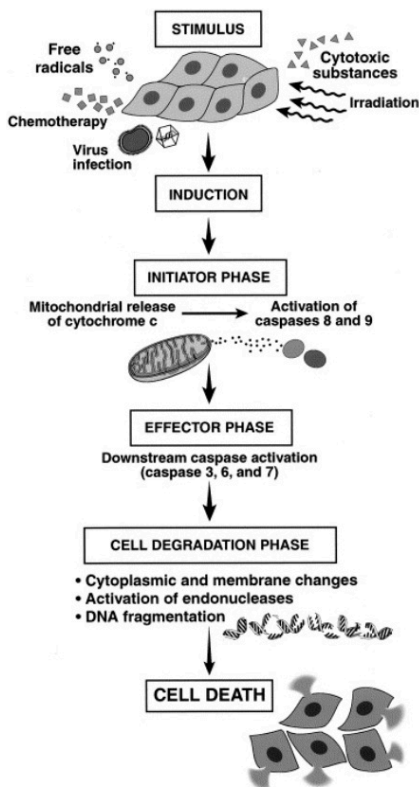


Figura 9. Mecanismes d'acció de les espècies reactives d'oxigen sobre els espermatozoides. Imatge recuperada de Karande Vishvanath, 2017. <http://www.inviafertility.com/blog/blog/infertility/drvkarande/anti-oxidants-and-male-fertility>.

En els nivells fisiològics normals, les ROS regulen cascades de senyalització intracel·lular, mitjançant així mecanismes fisiològics essencials com la maduració de l'espermatozoide, la hiperactivació, la capacitació, la reacció acrosòmica, així com la fecundació (Thompson et al., 2013). No obstant això, quan la concentració de ROS supera el límit fisiològic, es produeixen alteracions, produint un estat d'estrès oxidatiu (Halliwell et al., 1994). Aquest desequilibri en el potencial redox comporta efectes negatius significatius sobre diversos components cel·lulars com ara: hidrats de carboni, àcids nucleics, proteïnes i lípids (Agarwal et al., 2003).

L'últim mecanisme que s'ha mencionat, la apoptosi, es el procés pel que les cèl·lules es moren de manera programada, és a dir, les cèl·lules es suïciden alternant la seva fisiologia mitjançant canvis en la composició bioquímica. La finalitat d'aquesta mort programada és controlar el creixement i el desenvolupament, i sobretot la degradació controlada de les cèl·lules danyades. Esta produïda per la pròpia cèl·lula i en les cèl·lules somàtiques es coneix molt bé (Vaux et al., 2000). En canvi, en els espermatozoides es creu que tot i compartir alguns mecanismes pot diferir, i resulta difícil dissenyar models in vitro capaços de detectar les vies de senyalització. Estudis en animals suggereixen que l'apoptosi és un regulador clau de l'espermatogènesi en estats normals i en els patològics. S'ha identificat l'apoptosi de cèl·lules germinals en espermatogònies, espermatòcits i espermàtides dels testicles d'homes normals i en pacients amb azoospermia no obstructiva (Franca-vila et al., 2002; Collodel et al., 2020). S'ha demostrat també activitat apoptòtica en els espermatozoides ejaculats (Jurisicova et al., 1999; Gandini, et al., 2000). Així doncs, el trencament en l'ADN dels espermatozoides podria ser causat per



l'acció de nucleases, posteriorment seria interrompuda quan aquests arriben al testicle (és a dir, apoptosi abortiva) (Sakkas et al., 1999) o després de l'espermació (Taylor et al., 2004)

Ja s'ha comentat que la fragmentació de l'ADN també pot estar causada per l'exposició a tòxics, infeccions i inflamacions (Lemkecher et al., 2005).

Figura 10. Esdeveniments d'apoptosi en cèl·lules humanes. (Agarwal et al., 2003).

1.4.2 TÈCNiques DE DETECCIÓ

En la pràctica clínica les tècniques de detecció i quantificació del dany en l'ADN espermàtic més utilitzades són les següents:

Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA)

És una de les primeres tècniques que es van posar a punt (Evenson et al. 1980). Consisteix en avaluar la susceptibilitat de l'ADN nuclear a la inducció de la desnaturalització in situ, exposant-lo als espermatozoides a condicions àcides. Després, es tenyeix la mostra amb taronja d'acridina (fluorocrom metacromàtic que emet llum verda, quan s'intercala en les cadenes d'ADN doble, o vermell, quan s'intercala en cadenes simples, quan ADN esta desnaturalitzat) i s'il·lumina a través d'un raig làser. Amb l'ajut de la citometria, s'analitzen les cèl·lules. La principal limitació és que quantifica el dany de manera indirecta.

Tdt-mediated-dUTP Nick-End Labelling (TUNEL)

És una tècnica que es basa en el marcatge enzimàtic dels trencaments de les cadenes de l'ADN de manera directa. Quantifica la incorporació de desoxiuridina trifosfat (dUTP) marcada amb fluorescència en els trencaments 3'-OH de cadena simple o doble en una reacció catalitzada per un enzim transferasa terminal (TdT). Així, s'obtindrà una intensitat major de fluorescència quan més gran sigui el nombre de trencaments de l'ADN. La fluorescència emesa es valora per microscòpia de fluorescència o per citometria de flux (Gorczyca et al., 1993). Els resultats es comparen amb un control negatiu (sense transferasa terminal) i un control positiu (mostres amb trencaments en l'ADN degut al tractament amb AD-Nasa I).

La principal avantatge de l'ús d'aquesta tècnica són que mesura el fragmentació real de manera objectiva i la limitació és que està preparada per mesurar trencaments en l'ADN de cèl·lules somàtiques, aquest es troba menys compactat i, per tant el protocol s'ha d'adaptar.

Assaig Cometa









L'assaig cometa o Single Cell Gel Electrophoresis es basa en la resistència diferencial que ofereixen les molècules d'ADN de diferents mides quan es mouen a través d'un gel si són sotmeses a un camp elèctric.

Consisteix en submergir els espermatozoides en una capa fina d'agarosa i pro-

vocar la seva lisi cel·lular, per posteriorment sotmetre-les a l'electroforesi. Quan es realitza l'electroforesi sota condicions alcalines, la migració de les cadenes d'ADN

de doble cadena cap l'ànode formen, sota el microscopi, una imatge similar a la cua dels cometes i la seva llargada i intensitat és proporcional al nombre de trencaments d'ADN de cadena simple, trencaments de cadena doble i llocs làbils alcalins (Singh et al., 1989). Si, per contra, es realitza sota condicions neutres, abans i durant la electroforesi, es detecten majoritàriament trencaments de cadena doble (Ribas-Maynou et al., 2012). Aquesta tècnica també, es pot fer de manera seqüencial sobre el mateix portaobjectes, en dues dimensions (Fernández et al., 2001). Es tracta d'una tècnica molt sensible (Ribas-Maynou et al., 2013), però el mètode és laboriós fet que dificulta l'estandardització interlaboratoris (Valverde et al., 2009; Agarwal et al., 2016).

Taula 2. Taula resum on s'hi recullen les diferents tècniques per avaluar la fragmentació de l'ADN de l'espermatozoide (Cho et al., 2017).

Test	Principle	Advantage	Disadvantage
 1	AO test Metachromatic shift in fluorescence of Acridine orange when bound to ss DNA. Uses fluorescent microscopy	Rapid, simple and inexpensive	Inter-laboratory variations and lack of reproducibility
 2	AB staining Increased affinity of AB dye to loose chromatin of sperm nucleus. Uses optical microscopy	Rapid, simple and inexpensive	Inter-laboratory variations and lack of reproducibility
 3	CMA3 staining CMA3 competitively binds to DNA indirectly visualizing protamine deficient DNA. Uses fluorescent microscopy	Yields reliable results as it is strongly correlated with other assays	Inter-observer variability
 4	TB staining Increased affinity of TB to sperm DNA phosphate residues. Uses optical microscopy	Rapid, simple and inexpensive	Inter-observer variability
 5	TUNEL Quantifies the enzymatic incorporation of dUTP into DNA breaks. Can be done using both optical microscopy or fluorescent microscopy. Uses optical microscopy, fluorescent microscopy and flow cytometry	Sensitive, reliable with minimal interobserver variability. Can be performed on few sperm	Requires standardization between laboratories
 6	SCSA Measures the susceptibility of sperm DNA to denaturation. The cytometric version of AO test. Uses flow cytometry	Reliable estimate of the percentage of DNA-damaged sperm	Requires the presence of expensive instrumentation (flow cytometer) and highly skilled technicians
 7	SCD or Halo test Assess dispersion of DNA fragments after denaturation. Uses optical or fluorescent microscopy	Simple test	Inter-observer variability
 8	SCGE or comet assay Electrophoretic assessment of DNA fragments of lysed DNA. Uses fluorescent microscopy	Can be done in very low sperm count. It is sensitive and reproducible	Requires an experienced observer. Inter-observer variability

1, Acridine orange (AO) stains normal DNA fluoresces green; whereas denaturated DNA fluoresces orange-red; 2, aniline blue (AB) staining showing sperm with fragmented DNA and normal sperm; 3, chromomycin A3 (CMA3) staining; protamine deficient spermatozoa appear bright yellow, spermatozoa with normal protamine appear yellowish green; 4, toluidine blue (TB) staining; normal sperm appear light blue and sperm with DNA fragmentation appear violet; 5, terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated fluorescein-deoxyuridine triphosphate-nick end labeling (TUNEL) assay fluorescent activated cell sorting histogram showing percentage of sperm DNA fragmentation; 6, sperm chromatin structure assay (SCSA); flow cytometric version of AO staining; 7, sperm chromatin dispersion (SCD) test; spermatozoa with different patterns of DNA dispersion; large-sized halo; medium-sized halo [2]; very small-sized halo; 8, comet images showing various levels of DNA damage.

SCD test (Sperm Chromatin Dispersion test)

L'assaig SCD es basa en la capacitat de l'ADN intacte d'expandir-se un cop li s'extreuen les proteïnes que li donen estructura (Fernández et al., 2005). Primer, es submergeixen els espermatozoides en una matriu d'agarosa i s'exposen a solucions de lisis i es tenyeixen. Els espermatozoides amb l'ADN fragmentat no poden formar l'halo que s'observa al microscopi. Es poden classificar segons la presència o no i del tamany del halo.

Les avantatges del mètode són que té un cost econòmic baix i és ràpid. Tot i que, pot haver subjectivitat al realitzar les valoracions de mida de l'halo.

1.5 BIOMARCADORS D'INFERTILITAT MASCULINA

1.5.1 DEFINICIÓ

Un biomarcador es defineix com a “Una característica que es mesura i s'avalua objectivament com a indicador de la normalitat de processos biològics normals, processos patògens o de respostes farmacològiques a una intervenció terapèutica ” (Grup de treball de definicions de biomarcadors, 2016). S'utilitzen per al diagnòstic precoç d'una malaltia, la identificació d'individus per a la prevenció de malalties o com a possible diana farmacològica (Bonassi et al., 2001; McMichael i Hall, 1997), també es poden utilitzar biomarcadors per predir o detectar la recurrència o progressió d'una malaltia. Tanmateix, els biomarcadors perden interès si només detecten malalties en etapes tardanes ja que en aquest moment de la malaltia ja es poden identificar mitjançant un examen i altres proves clíniques. Les proves de biomarcadors es poden basar en: la morfologia, les tecnologies d'imatge o bé, genètiques i marcadors o entitats moleculars com proteïnes i RNAs. Els biomarcadors moleculars han de ser omnipresents, incloure un assaig que pot produir resultats ràpids i relacionar-se amb un procés de malaltia per al qual la detecció no invasiva o precoç tingui un benefici clínic. En medicina reproductiva es poden utilitzar biomarcadors per millorar l'avaluació a l'exposició, identificar subgrups susceptibles de tractament, predir el resultat i/o diferenciar subgrups amb etiologies de malaltia potencialment diferents. La recerca d'aquests marcadors s'ha intensificat en moltes àrees terapèutiques. A mesura que el nombre de marcadors candidats a la medicina reproductiva augmenta, també augmenten les proves, les validacions i els ajustos, que han de ser implementats abans d'establir el biomarcador com a eficàcia clínica per tal d'explotar el seu potencial (Palmer i Barnhart, 2013).

1.5.2 ADN

El paisatge genètic de la infertilitat masculina és altament complex, ja que els fenotips histològics del semen i dels testicles són extremadament heterogenis i almenys 2.000 gens estan implicats en l'espermatogènesi. Els factors genètics implicats en la infertilitat masculina es manifesten com trastorns cromosòmics, mutacions en l'ADN mitocondrial (ADNm), trastorns monogènics, trastorns multifactorials i trastorns endocrins d'origen genètic (Poongothai et al., 2009).

La infertilitat produïda per l'absència de l'espermatozoides, azoospermia, és la que es coneix que té més implicacions de factors genètics. Però el nombre d'anomalies genètiques identificades en altres tipologies de mostres i categories etiològiques està en constant creixement. El cribratge genètic és rellevant per al seu valor diagnòstic, la presa de decisions clíniques i l'assessorament genètic adequat. Les anomalies dels cromosomes sexuals tenen un paper important en el deteriorament espermatogènic, especialment les microdeleccions del cromosoma Y (Foresta et al., 2001). Les mutacions genètiques vinculades als autosomes estan implicades principalment en l'hipogonadisme central, la teratozoospermia monomorfa o astenospermosia, la azoospermia obstructiva congènita i casos familiars de perturbacions espermatogèniques quantitatives (Bobadilla et al., 2002). Els resultats dels estudis sobre variacions en el nombre de còpies (CNV) demostren una càrrega de CNV considerablement més gran en pacients infèrtils que en homes normozoospermàtics (Aston et al., 2009), mentre que l'anàlisi d'exoma complet s'ha demostrat ser una eina de diagnòstic d'èxit en casos familiars d'infertilitat masculina. Malgrat aquests esforços, l'etiologia de la infertilitat continua essent desconeguda en aproximadament el 40% dels pacients, i el descobriment de nous factors genètics en la infertilitat idiopàtica és un repte important per al camp de l'androgenètica (Krausz et al., 2018).

Altres factors com la integritat del genoma dels espermatozoides és discutida en l'apartat 1.4.

1.5.3 ARN

Els microRNAs (miARNs) són molècules d'ARN monocatenari de 22 a 24 nucleòtids de longitud. La seva funció principal és regular l'expressió gènica mitjançant la formació d'estructures semi-complementàries a la regió no traduïda (3' UTR) del seu ARN missatger (ARNm) (Ambros, 2001; Boyd, 2008). S'ha demostrat que

tenen una funció important en molts processos biològics relacionats amb el cicle cel·lular (Bueno i Malumbres, 2011), la diferenciació cel·lular (Lakshmiathy et al., 2007), el metabolisme (Chen et al., 2012), la proliferació cel·lular i l'apoptosi (Hwang i Mendell, 2006), en la gametogènesi i el desenvolupament embrionari (Alvarez-Garcia i Miska, 2005; Galliano i Pellicer, 2014).

En els últims anys, alguns articles descriuen la presència de miRNAs en tots els teixits humans, inclòs el sistema reproductor (Barad et al., 2004; Liang et al., 2007). La presència de miRNAs en testicles, epidídim, espermatozoides, plasma seminal i vesícules extracel·lulars com, exosomes i microvesícules, i les funcions conegudes associades a aquestes molècules suggereixen que una desregulació de la seva expressió pot produir alteracions en l'espermatogènesi i l'embriogènesi (Salas-Huetos et al., 2020). Aquestes pertorbacions podrien tenir el potencial de donar lloc a diverses formes d'infertilitat.

1.5.4 PROTEÏNES

La proteòmica és un camp de la ciència que els últims anys, gràcies als avenços en la seva tecnologia, ha aportat molta informació sobre les proteïnes que intervenen en els processos biològics de la fertilització. Donat que l'espermatozoide és l'única cèl·lula que no té capacitat de transcripció ni traducció, analitzar el seu ventall de proteïnes ajuda a identificar aquelles proteïnes que tenen un paper important en la producció, maduració o funció dels espermatozoides (Amaral et al., 2014).

Al 1970 es coneixien no més de 100 proteïnes que formaven part del proteoma dels espermatozoides. Al 2005, en canvi, gràcies a l'estudi de Johnston i col·laboradors, mitjançant la tècnica 1D SDS-PAGE acoblada a l'espectrometria de masses va detallar 1760 proteïnes que formen el proteoma de l'espermatozoide humà. Martínez-Heredia i col·laboradors, (2006), van realitzar l'estudi del proteoma de l'espermatozoide mitjançant un gel en dues dimensions (2DE) i la posterior identificació de les taques del gel per MALDI-TOF, van trobar 98 proteïnes diferencials i les van classificar segons les seves funcions majoritàries, essent aquestes: la producció d'energia i el transport de proteïnes.

Actualment, els estudis del proteoma dels espermatozoides estan més centrats en identificar proteïnes de parts aïllades dels espermatozoides com la cua, la peça mitjana, el nucli, etc. (com l'estudi conduït per Amaral et al., 2013,) en el que van identificar 1049 proteïnes i van concloure que estan involucrades en funcions

com l'energètica, estructura i moviment, el cicle cel·lular, etc. També s'han realitzat estudis del proteoma en el plasma seminal. L'any 1940 va ser el primer en el que es van identificar 4 proteïnes diferents (Gray et al., 1942). Més darrerament s'han arribat a identificar 923 proteïnes. En el punt 1.6.1 es desenvolupa aquesta informació.

1.5.5 METABÒLITS

La metabolòmica és l'avaluació (identificació i quantificació) dels metabòlits originats a les cèl·lules, teixits o fluids biològics. Els metabòlits són els productes finals dels processos cel·lulars (com intermediaris metabòlics, hormones o altres molècules de senyalització) i es poden considerar com les darreres reaccions dels processos biològics que alteren l'ecologia del medi. Les seqüències de metabòlits creades per una organització biològica comprenen el seu "metaboloma" (Goodacre, 2007). L'avaluació del nivell de metabòlits com a marcador diagnòstic per a diverses malalties s'ha considerat que és crucial. Durant els darrers vint anys, des que s'ha definit el primer terme del metaboloma, s'han recomanat diferents termes associats a la quantificació del metabòlit i al mesurament de la qualitat ja que és considerat molt dinàmic i que pot canviar a cada segon per la rapidesa de totes reaccions que es duen a terme.

El plasma seminal humà es considera una font important per estudiar la infertilitat masculina. Un dels primers estudis que van utilitzar plasma seminal humà per a la identificació de biomarcadors metabolòmics va ser realitzat per Hamamah et al., 1993, utilitzant tecnologia RMN (ressonància magnètica nuclear) i van veure canvis en els nivells de glicerilfosforilcolina, citrat i lactat en diferents tipus de mostres. Zhang et al., (2017), va realitzar un perfil metabolòmic de sèrum en pacients amb azoospermia no-obstructiva (NOA). Van identificar 24 metabòlits potencials implicats en l'apoptosi cel·lular, l'estrès oxidatiu i la producció d'energia. L'estudi actual de la metabolòmica del plasma seminal mostra que es troben menys de 40 metabòlits del plasma seminal humà (Mehrparavar et al., 2019). Tot i que l'aplicació de l'abordatge de la metabolòmica és nova en el camp de la infertilitat masculina. Aquestes aproximacions experimentals encara no ha estat aplicades a treballs clínics ni al diagnòstic d'homes infèrtils pel que és prompte per tenir biomarcadors i profunditzar en la seva etiologia. El treball cooperatiu entre experts en metabolòmica i en reproducció humana és necessari per avançar en aquest camp.

1.6 PROTEÒMICA CLÍNICA

El “proteoma” es pot definir com el contingut proteic global d’una cèl·lula que es caracteritza per la seva localització, interaccions, modificacions post-traduccionals i recanvis, en un moment determinat. El terme “proteòmica” va ser utilitzat per Marc Wilkins el 1996 per denominar el “complement proteic d’un genoma”. La proteòmica es defineix com l’estudi del contingut proteic global d’un teixit o cèl·lula, és a dir, la identificació i quantificació de les proteïnes presents en aquests (James, 1997) així com, la seva caracterització: localització, interaccions, modificacions post-traduccionals i la seva regulació, en un moment determinat. Ha esdevingut una eina important per entendre els mecanismes dels sistemes biològics, ja que les pròpies proteïnes són efectors postgenòmics dels esdeveniments cel·lulars i moleculars. A més, les proteïnes i els pèptids també actuen com a missatgers o controlant l’expressió gènica o regulant la funció cel·lular i l’ambient extracel·lular (Zhang et al., 2013). En front de mostres complexes, en les que hi ha una interacció entre diferents tipus de cèl·lules i l’entorn, com el cas del sistema reproductor, entendre el rol d’aquestes proteïnes esdevé crucial, així com conèixer possibles reguladors de les seves funcions (Del Giudice et al., 2013).

Els experiments en proteòmica poden adreçar-se a fer identificacions de proteïnes o bé per confirmar la seva presència. Quan s’identifiquen les proteïnes, els pèptids es digereixen i es mapegen per aconseguir identificar i quantificar el major nombre de proteïnes. Aquest procés, es pot realitzar mitjançant el marcatge de les proteïnes i els pèptids per poder diferenciar entre diferents grups o bé, sense marcar. També, es pot usar una tècnica semblant que permet realitzar l’anàlisi de les proteïnes amb modificacions post-transcripcionals com la fosforilació, la ubiquitinació, la glicosilació, l’oxidació, etc (Olsen i Mann, 2013). En canvi, per confirmar la seva presència, es poden usar tècniques immunològiques com Western Blot o la ELISA (Ambekar et al., 2015) o bé, espectrometria de masses (Lange et al., 2008).

Les descobertes recents en les tècniques d’espectrometria de masses (MS) tant en la pròpia separació i identificació de pèptids com la reproductibilitat dels experiments (Bantscheff et al., 2012) unit als avenços en les anàlisis in silico de les dades, ha suposat un impacte en la clínica, comportant que l’adaptació de la medicina a cada individu està més a prop (Hood i Flores, 2012).

1.6.1 TÈCNiques DE PROTEÒMICA

Durant l'última dècada, s'han establert les eines per analitzar les proteïnes (Reinders et al., 2004). Els últims esdeveniments en proteòmica han estat capaços d'identificar més de mil proteïnes en un períodes de temps molt curt i amb poca quantitat de mostra. En general, les tècniques de proteòmica es poden dividir en tècniques de separació i d'identificació, poden estar basades en gel o no, o també segons si són convencionals, avançades, de quantificació, d'alt rendiment i l'anàlisi informàtica (Figura 11).

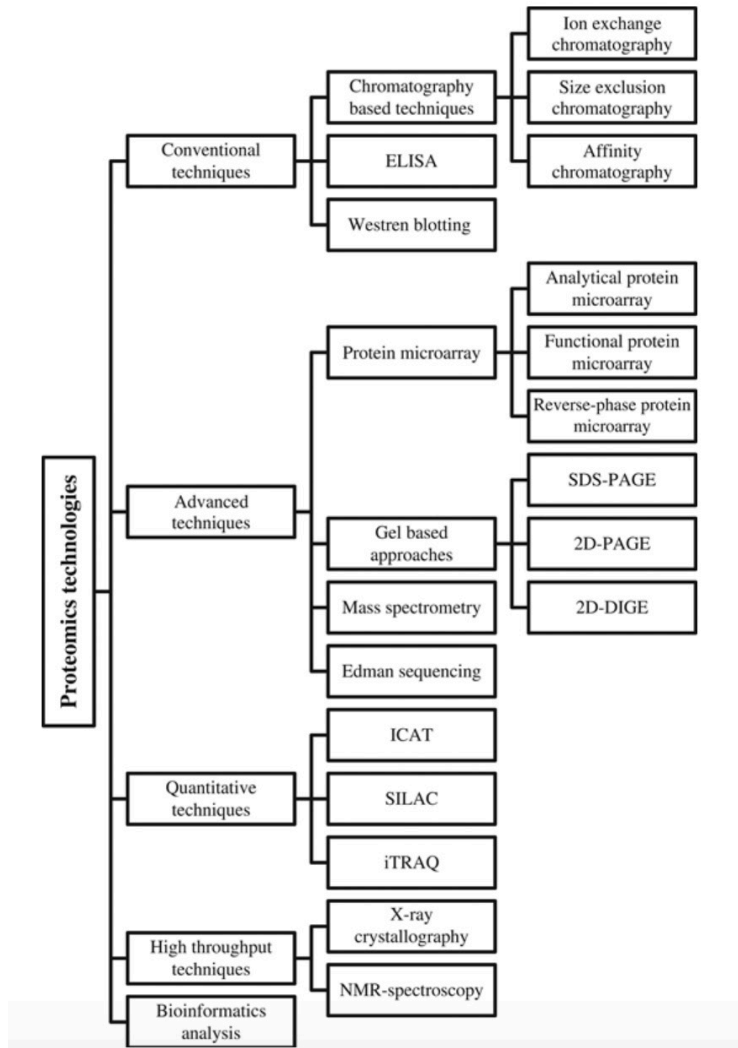


Figura 11. Visió general de les tècniques de proteòmica. (Aslam et al., 2017)

Proteòmica d'expressió basada en immunologia

Entre les tècniques convencionals de proteòmica, el Western Blot és una de les més utilitzades, permet la detecció de proteïnes seleccionades. Primer es separen les proteïnes mitjançant electroforesi, es transfereixen a una membrana de nitrocel·lulosa i es detecta de manera precisa la proteïna diana per anticossos conjugats amb enzims. No obstant això, està limitada tant per l'accés, el cost d'anticossos monoclonals i que només es poden analitzar unes poques proteïnes en un experiment. Tot i així, s'ha convertit en una tècnica estàndard per confirmar la presència de proteïnes. La tècnica ELISA resol el fet de poder analitzar una proteïna en moltes mostres diferents a la vegada. És un immunoassaig altament sensible i s'utilitza amb fins diagnòstics. L'assaig utilitza antigen o anticossos a la superfície sòlida i addició d'anticossos conjugats amb enzims per mesurar les fluctuacions de l'activitat enzimàtica, aquesta és proporcional a la concentració d'anticossos i antigens en la mostra biològica. Una limitació d'aquestes dues tècniques, Western Blot i ELISA, és que amb aquests experiments només es poden trobar (o no trobar) el que estan dissenyats per cercar, les proteïnes en qüestió i no els efectes en diferents compartiments cel·lulars o processos cel·lulars implicats. Un altra mètode basat en la tècnica de Western Blot és el microarray de proteïnes, que a més de detectar, caracteritzar i quantificar proteïnes permeten estudiar la seva funció (Stoevesandt et al., 2005).

Proteòmica d'expressió basada en gel

Inicialment, les proteïnes s'extreuen del teixit i es separen mitjançant l'electroforesi en una dimensió (1D) o dues (2D). En l'electroforesi d'una dimensió (1D) les proteïnes es separen només segons el pes molecular en un gel de SDS-PAGE. Així les diferents proteïnes migren amb diferents velocitats segons la relació entre la seva càrrega i la seva massa. No obstant això, l'addició de sulfat de dodecil sòdic desnatura les proteïnes, per tant les separa només segons el pes molecular. A la electroforesi en dues dimensions (2D), en canvi, les proteïnes es separen segons les dues característiques: el punt isoelèctric (pI) i el pes molecular. En aquest mètode de separació, les proteïnes extremes s'enfoquen segons el punt isoelèctric (IEF) en la primera dimensió seguida de la segona dimensió pel qual es separen per pes molecular en els gels de SDS-PAGE. Es tenyeix el gel i es visualitzen les taques, cada spot consisteix en una proteïna individual. Així, es pot veure tot el perfil proteic de la mostra de manera que es pot caracteritzar i fins i tot, comparar-lo amb altres mostres. Les limitacions d'aquesta tècnica són la baixa reproductibilitat i el baix rang dinàmic. Per això, es va desenvolupar la tèc-

nica en 2D d'electroforèsi diferencial (2D-DIGE, differential gel electrophoresis) que s'usa per demostrar l'expressió diferencial de les proteïnes en el mateix gel de fins a tres mostres o grups diferents. Les mostres es tenyeixen amb tres fluorocroms de cianina diferents com el Cy2, Cy3 i el Cy5 que marquen els grups amino de les lisines de manera específica i covalent. Al utilitzar tres fluorocroms que s'exciten a longituds d'ona diferents es permet analitzar fins a tres mostres/grups diferents en un sol gel. A més, es pot afegir un mateix estàndard intern (pool de totes les mostres a analitzar) a cada gel, així totes les proteïnes estan representades i s'evita la variació entre gels i es pot normalitzar la quantificació de manera més acurada. Les imatges resultants són després analitzades per un programari com el De-Cyber, dissenyat específicament per a l'anàlisi 2D-DIGE (Marouga et al., 2005), la intensitat dels senyals analitzats amb aquest s'usen per quantificar l'expressió de les proteïnes. Els principals avantatges del 2D-DIGE són l'elevada sensibilitat i linealitat dels seus fluorocroms, així com la seva significativa reducció de la variabilitat intergel, augmentant la possibilitat d'identificar de forma inequívoca la variabilitat biològica i reduint el biaix de la variació experimental (Alban et al., 2003). També es poden identificar modificacions post-traduccionals de les proteïnes, proteïnes mutades i vies metabòliques alterades. No obstant això, té algunes limitacions com que no és prou sensible per detectar proteïnes de baixa abundància o proteïnes amb molt elevat o baix pes molecular (Mathy i Sluse, 2008).

Així el processament de les mostres inclou, la disminució de la complexitat mitjançant la electroforesi, seguit de la digestió del gel amb tripsina d'aquells spots que es volen identificar. Després s'identifiquen per espectrometria de masses. També es pot fer una cromatografia líquida (HPLC) abans de la identificació que permet millorar la identificació de les proteïnes. Amb aquestes tècniques s'aconsegueix la caracterització de milers de pèptids i proteïnes en un període de temps curt (Burnum et al., 2008). Un cop es disposa del llistat d'identificacions, mitjançant un software com MASCOT o SEQUEST es comparen amb unes bases de dades globals que consisteixen en els espectres de identificacions prèvies.

El llistat de proteïnes diferencials identificades s'analitzen amb eines bioinformàtiques per conèixer en quins processos fisiològics estan implicats o quines vies metabòliques, llocs on es troben, etc; com la GO Ontology (GO) o STRING que ajuda a entendre les interaccions que es donen entre les proteïnes analitzades o amb altres (Snel et al., 2000; Lan et al., 2003).

Proteòmica d'expressió no basada en gel

Els últims anys, s'han desenvolupat altres tècniques de proteòmica que no es basen en la realització d'un gel com en les anteriors. Estan essent considerats els millors mètodes per comparar quantitativament els nivells de proteïnes entre proteomes biològics, ja que són més sensibles i reproduïbles que els mètodes basats en gel. Aquests nous mètodes experimentals combinen tècniques de marcatge isotòpic, o no, amb la cromatografia líquida i l'espectrometria de masses per a l'anàlisi quantitativa de diferents mostres/grups.

La proteòmica quantitativa amb marcatge isotòpic es basa en l'etiquetatge de determinats aminoàcids amb isòtops estables. Els pèptids marcats amb els diferents isòtops tenen propietats químiques idèntiques, però com que tenen masses diferents es poden distingir usant un espectròmetre de masses. Hi ha dos tipus de marcatges isotòpics, els isobàrics i els no isobàrics.

El marcatge isotòpic isobàric, permet marcar cada mostra o grup a analitzar amb una etiqueta isotòpica diferent que reaccionarà amb els aminoàcids específics de les proteïnes o els pèptids. Les mostres ja marcades, es barregen i s'analitzen per LC-MS. Al analitzar-se a la vegada, el mateix pèptid en cada una de les mostres s'observa com a una única massa, però quan es fragmenta es formen dos tipus de ions: els específics, amb els que s'identifica la proteïna o pèptid, i els reporters, de baix pes molecular, amb els que correspon la etiqueta amb la que s'ha marcat. D'aquests se'n coneixen dos tipus segons el marcatge: el marcatge isobàric amb etiquetes per a la quantificació relativa i absoluta (iTRAQ) i el marcatge amb etiquetes en tàndem (TMT).

El marcatge isotòpic no isobàric, es basa en marcar les proteïnes/pèptids amb una etiqueta isotòpica que modifiquen la seva massa. Les mostres marcades es combinen i separen primer per cromatografia líquida on es separen les proteïnes/pèptids segons l'etiqueta que portaven i després s'analitzen per LC-MS. Entre aquests es troben, el d'etiqueta isotòpica codificada d'afinitat (iCAT), el d'etiquetatge isotòpic codificat de proteïna (ICPL), el d'etiquetatge amb isòtops estables d'aminoàcids en cultius cel·lulars (SILAC).

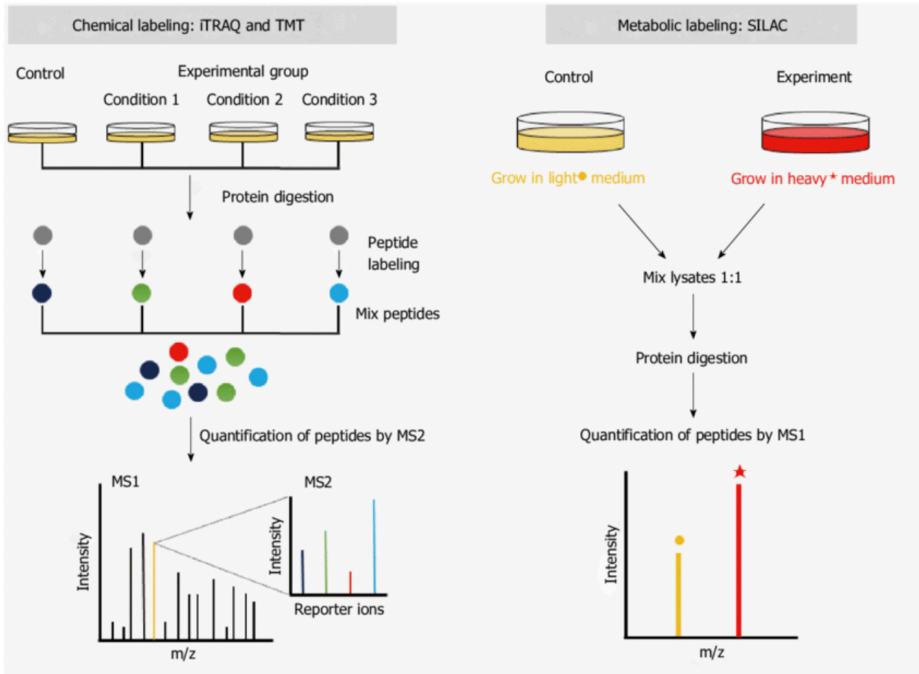


Figura 12. Visió general esquemàtica de les estratègies d'etiquetatge emprades en proteòmica quantitativa. L'etiquetatge químic utilitza les etiquetes isòbares per a la quantificació relativa i absoluta (ITRAQ) i les etiquetes de massa en tàndem (TMT). L'etiquetatge metabòlic representat per l'etiquetatge isòtop estable amb aminoàcids en cultius cel·lulars (SILAC), aprofita la incorporació metabòlica d'aminoàcids pesats a proteïnes madures. (Kang et al., 2016)

Proteòmica d'expressió basada en espectrometria de masses

Entre les tècniques avançades també es troben, l'espectrometria de masses (MS) que és una tècnica que es basa en la identificació de proteïnes o pèptids. En aquest cas es comparen les mostres a gran escala mitjançant LC-MS per separat cada mostra, per tant, incrementa el risc que es produeixin variacions experimentals.

Aquestes estratègies són ideals per a anàlisis de mostres grans en cribatge clínic o experiments de descobriment de biomarcadors.

A diferència d'altres mètodes de quantificació, les mostres lliures d'etiquetes es recullen, preparen i s'analitzen per separat per LC-MS o LC-MS / MS. L'anàlisi de proteïnes per aquest mètode consta de tres passos: primer, les proteïnes es transformen en ions en fase gasosa. En segon lloc, es separen els ions a partir de la seva relació massa-càrrega (m/z) en presència de camps elèctrics o magnètics en un compartiment conegut com a analitzador de massa. Finalment, es mesuren els ions separats i la quantitat de cada espècie amb un valor m/z particular (Mann

et al., 2001). Hi ha tres fonts principals d'ionització: la desorció/ionització per làser assistida per matriu (MALDI), desorció i ionització làser millorada (SELDI) i la ionització electrosprai (ESI) i quatre principals analitzadors de masses, que són el temps de vol (TOF), la trampa iònica, el quadrupol i el ciclotró iònic de transformació de Fourier (Yates, 2011).

La quantificació de proteïnes es realitza utilitzant tant la intensitat del pic d'ions com el recompte espectral. La quantificació relativa per intensitat del pic del ió depèn només de LC-MS. Es detecten els valors d'espectrometria de masses (m/z) directes de tots els ions i es registren les seves intensitats de senyal en un moment determinat. La intensitat del senyal procedent de la ionització per electrosprai es correlaciona amb la concentració iònica i, per tant, els nivells de pèptids relatius entre mostres es poden determinar directament a partir d'aquestes intensitats punta. A causa de la gran quantitat de dades recollides d'aquests experiments, calen algorismes informàtics sensibles per a la comparació i alineació del pic de ions automatitzat.

La quantificació per recompte espectral, comporta comparar si la suma dels espectres MS/MS d'un pèptid donat a través de múltiples mostres es correlaciona directament amb l'abundància de proteïnes. A diferència de la quantificació per intensitat màxima, el recompte espectral no requereix algorismes especials ni altres eines, tot i que és necessària una normalització significativa.

Anàlisi bioinformàtica

La bioinformàtica és una disciplina que es troba entre dues ciències: la biologia i la computació. Utilitza la tecnologia de la informació per organitzar, analitzar i distribuir informació biològica amb la finalitat de respondre preguntes complexes en biologia.

Les dades primàries obtingudes de les tècniques MALDI-TOF i LC-MS/MS es sotmeten a anàlisis bioinformàtiques per destil·lar la quantitat enorme de dades generades durant estudis proteòmics en forma de resultats més comprensibles (Lan et al., 2003). Cada programari d'anàlisi de proteïnes treballa en algorismes específics i, a més, es fa una llista de proteïnes. Inicialment, els espectres de dissociació induïts per col·lisions MS/MS són analitzats mitjançant eines de cerca de dades, com Mascot, SEQUEST i X!Tandem. Les proteïnes i els pèptids que són llavors seleccionades com a proteïnes d'expressió diferencial en base als seus

espectres i la seva abundància relativa s'analitzen amb altres eines bioinformàtiques per entendre la seva funció molecular, fisiològica i les vies on estan implicades, així com la seva patogenicitat. L'anàlisi mitjançant Gene ontology (GO) dona informació addicional com la seva funció, distribució, localització, estructura, funció biològica en les vies cel·lulars, etc. És important conèixer en quines vies participen les proteïnes perquè exerceixen un efecte biològic particular; en aquest sentit, hi ha disponibles diversos recursos i bases de dades com el KEGG i Reactome, són bases de dades que inclouen dades completes sobre metabolisme, senyalització i interaccions. A més d'aquestes bases de dades, s'han desenvolupat bases de dades específiques per a vies de transducció de senyal com ara GenMAP o PANTHER (Mi et al., 2007).

Les proteïnes no actuen de forma independent en la majoria dels casos formen complexos transitoris o estables amb altres proteïnes i és imprescindible estudiar-los per a comprendre el sistema biològic. Les bases de dades com BioGRID, IntAct i MINT contenen la informació sobre les interaccions de proteïnes en complexos (Schmidt et al., 2014). STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins) és una base de dades utilitzada per a conèixer també les interaccions entre les proteïnes, elaborant xarxes de proteïnes a partir de la llista de gens proporcionats i de les interaccions disponibles (Agarwal et al., 2014).

1.6.2 PROTEÒMICA I REPRODUCCIÓ MASCULINA

El declivi de la fertilitat masculina és continu des de fa dècades, afecta al 20% dels casos d'infertilitat i se sap que està provocada tant per causes congènites com per adquirides (veure apartat 1.3). Tot i així, els mecanismes i factors exactes que afecten a la capacitat reproductiva masculina encara està per aclarir, com per exemple els casos d'infertilitat idiopàtica (Agarwal et al., 2020).

Anteriorment, ja s'ha explicat les diferents tècniques que es realitzen al laboratori de manera rutinària per diagnosticar la infertilitat masculina, com el seminograma, la aglutinació, viabilitat, etc; totes elles basades en les guies que ofereix la WHO (2010). El valor predictiu d'aquests procediments és limitat, per exemple, hi ha casos de pacients amb seminogrames normals que presenten infertilitat. Per tant, fan falta mètodes per poder diagnosticar i conèixer l'origen dels mecanismes moleculars de molts casos d'infertilitat masculina (Agarwal et al., 2016). Els últims anys, el camp de la proteòmica ha evolucionat molt i s'obre una finestra per utilitzar tècniques molt avançades per a investigar la infertilitat. El coneixe-

ment de les diferents proteïnes i vies cel·lulars implicades en les diferents patologies poden contribuir a conèixer la fisiologia de l'espermatozoide i el líquid seminal, diagnosticar mitjançant biomarcadors nous o bé, dianes terapèutiques i que a més no siguin invasives. L'objectiu d'aquestes investigacions és tenir un impacte clínic, com beneficiar a les parelles no fèrtils amb un tractament personalitzat que es realitzi mitjançant un cribratge de biomarcadors en aquests pacients. En el següent apartat s'explica l'estat fins a dia d'avui de la proteòmica del plasma seminal.

1.6.3 PLASMA SEMINAL EN PROTEÒMICA CLÍNICA

El proteoma del semen inclou tant els espermatozoides com el líquid a través del qual viatgen, el líquid seminal. Aquest és molt ric en proteïnes i tal com hem revisat al apartat 1.2, està compost per les diferents secrecions de les glàndules accessòries i té funcions molt importants, no només transporta els espermatozoides sinó també, participa en aspectes com la maduració i la protecció de l'espermatozoide, per tant, exerceix un paper clau en el potencial de fertilització de l'espermatozoide. La primera electroforesi en el plasma seminal humà va ser publicada a la dècada del 1940 (Ross et al., 1942) i els primers estudis que es van realitzar van ser per estudiar biomarcadors, es van trobar 4 proteïnes procedents del líquid seminal (Gray et al., 1942). Al 1980, amb el desenvolupament de l'electroforesi en 2D, es van poder detectar més de 200 pèptids en el plasma seminal d'homes fèrtils normals mentre que els seus homòlegs vasectomitzats mancaven d'una sèrie de glicoproteïnes (Edwards et al., 1981). La primera caracterització detallada de les proteïnes en el plasma seminal humà de pacients infèrtils va ser conduïda per Starita-Geribaldi i col·laboradors (2001) comparant els perfils d'electroforesi en gel de 2D de plasma seminal d'homes fèrtils amb el d'homes vasectomitzats o azoospermics. Al 2003, el mateix grup d'investigació, va identificar canvis en l'expressió de proteïnes en pacients amb azoospermia i pacients amb alteració de l'espermatogènesi.

Després del desenvolupament de les tecnologies proteòmiques, com la tecnologia basada en l'espectrometria de masses; al 2006, Pilch i Mann van identificar en una mostra de líquid seminal, 923 proteïnes mitjançant l'acoblació de la cromatografia líquida i l'espectrometria de masses en tàndem, LC-MS/MS. Un altre estudi va revelar 639 proteïnes que estaven presents tant en espermatozoide com en el líquid seminal, mentre que 284 eren específiques del líquid seminal (Jodar et

al., 2016). Bartruch et al., (2011) van identificar més de 2300 proteïnes seminals en grups d'homes infèrtils i fèrtils mitjançant tècniques modernes d'espectrometria de masses. Les principals proteïnes caracteritzades en el proteoma del líquid seminal van ser: les segregades per les glàndules accessòries com l'antigen específic de la pròstata (PSA), fosfatasa àcida prostàtica (PAP), lactoferrina, albúmina, i proteïnes de la matriu extracel·lular (semenogelines, fibronectina, laminina); proteïnes contingudes en el prostasoma; i proteïnes derivades de l'epiteli, que presumptament resulten del vessament de cèl·lules dels òrgans accessoris, així com dels túbuls ductals (Utleig et al., 2003; Fung et al., 2004).

Amb l'objectiu de trobar nous biomarcadors indicadors d'infertilitat i l'ús de les diferents tecnologies, diversos estudis van comparar el proteoma del plasma seminal d'individus fèrtils amb individus infèrtils de diferents etiologies com per exemple, azoospermia obstructiva i no obstructiva (Drabovich et al., 2014), astenozoospermia (Wang et al., 2009), prostatitis (Kagedan et al., 2012), infèrtils amb nivells elevats d'espècies reactives de l'oxigen (Agarwal et al., 2015), varicocele (del Giudice et al., 2016) i càncer prostàtic (Yang et al., 2011). En aquest sentit, Yamakawa i col·laboradors (2007) va identificar fins a 501 taques en un gel 2D-DIGE de mostres de plasma seminal d'homes fèrtils i azoospermics, per caracteritzar les diferències d'expressió proteica. Wang i col·laboradors (2009) van descriure l'augment d'expressió de 45 proteïnes i la disminució de 56 en el grup de pacients amb astenozoospermia, moltes estaven implicades en la regulació de l'estrès oxidatiu. Un altra estudi comparatiu amb 2D-DIGE (Dalieva et al., 2012) va demostrar la sobreexpressió de 8 proteïnes: fibronectina, fosfatasa àcida prostàtica (PAP), proteïna inductible per la prolactina (PIP), beta-2-microglobulina (B2M), subunitat proteasoma alfa tipus 3 (PSMA3), citosòlica inespecífica dipeptidasa (CNDP2) i la proteïna que uneix galectina-3 (LGALS3BP) al plasma seminal d'homes azoospermics en comparació amb almenys un dels altres grups estudiats (normozoospermic, astenozoospermic i oligozoospermia). Batruch i col·laboradors (2012), van comparar el proteoma de pacients amb azoospermia no obstructiva (NOA) amb els proteomes publicats anteriorment de controls fèrtils. Van identificar diferents proteïnes expressades de manera diferencial i van concloure que la majoria estan relacionades amb la fertilitat. Algunes d'aquestes poden usar-se com a biomarcadors no invasius, discriminant els casos d'azoospermia no obstructiva dels casos d'azoospermia obstructiva, són: LDHC, ELSBP1, CES7, A2M, OVCH2, PTGDS, GPR64 i ALDH1A1. Cadavid i col·laboradors (2014) van observar un augment de la concentració de proteïnes en el plasma seminal procedent d'homes infèrtils versus fèrtils i, tot i que no van finalitzar la

identificació de les proteïnes, el grup va suggerir que diverses d'elles participen en la via d'ubiquitinació. Milardi i col·laboradors (2012), van realitzar la primera identificació d'un patró comú de proteïnes seminals en la fertilitat masculina, amb l'objectiu de trobar proteïnes necessàries per la fertilització. Entre aquestes, semenogelina I, la semenogelina II, el receptor olfatiu 5R1, la lactoferrina, la hCAP18, la spindlin i la clusterina.

Les taxes d'embaràs de les tècniques de reproducció assistida (ART) poden veure's afectades pel proteoma del plasma seminal tal i com demostren els estudis de Zhu et al., (2013) els quals van comparar el proteoma seminal d'homes que van concebre amb tècniques de reproducció assistida i sis que no. D'un total de 2045 proteïnes identificades, 21 van resultar tenir una expressió diferencial entre els grups, es va demostrar també per altres mètodes que tres proteïnes (A2LD1, ATP1B3 i FBXO2) eren expressades de manera significativa. Azpiazu i col·laboradors (2014) van analitzar el proteoma seminal en 31 homes subdividits en funció de l'èxit de FIV i van observar l'expressió diferencial de 66 proteïnes amb confirmació per Western blot de la proteïna quinasa SRSF 1.

1.6.4 ESPERMATOZOIDES EN PROTEÒMICA CLÍNICA

L'espermatozoide madur és una cèl·lula inactiva pel que fa a la transcripció, traducció i síntesi de proteïnes. A mesura que els espermatozoides arriben al final del túbul epididimal adquireixen la seva capacitat fertilitzant. Aquests canvis moleculars que es produeixen a nivell post-testicular fan referència a modificacions quantitatives i post-traduccionals de les proteïnes que s'associen principalment al procés de mobilitat, capacitació, reacció acrosòmica, unió i penetració a l'òocit (du Plessis et al., 2011). L'estudi del proteoma de l'espermatozoide ha permès identificar nombroses proteïnes específiques i ha proporcionat una comprensió addicional de la funció i regulació dels mecanismes moleculars de l'espermatozoide respecte a la infertilitat masculina (Cui et al., 2008; Xu et al., 2012; Amarat et al., 2014).

El primer estudi sobre proteïnes de l'espermatozoide va ser publicat per Friedrich Miescher al 1874 en el que va identificar el component bàsic de l'espermatozoide en el salmó, les protamines, que s'uneixen amb l'ADN per compactar-lo. Naaby-Hansen et al., (1997), va ser el primer grup en publicar el proteoma de l'espermatozoide, una primera base de dades de proteïnes de 1400 spots realitzada mitjançant una electroforesi en 2D. Van analitzar en més profunditat aquelles

proteïnes que provenen de la superfície de l'espermatozoide. Més tard, Martínez-Heredia et al., (2006) mitjançant la tècnica electroforètica en 2D acoblada a MALDI-TOF, va analitzar el proteoma d'individus normozoospermics identificant 98 proteïnes involucrades en la regulació de l'energia del metabolisme, síntesi de proteïnes, cicle cel·lular, apoptosi, moviment cel·lular i estrès oxidatiu. S'han realitzat treballs dirigits a estudiar diferents parts de l'espermatozoide mitjançant la centrifugació diferencial s'ha aconseguit aïllar i estudiar: el component proteic del nucli amb la fracció de protamines (Mateo et al., 2007; García-Peiró et al., 2011), la peça mitja i el flagel que estan enriquits amb proteïnes relacionades amb el metabolisme glucolític i lipídic per generar l'energia necessària pel moviment de l'espermatozoide (Amaral et al., 2013; Kim et al., 2007); així com la superfície de l'espermatozoide on s'han trobat 124 proteïnes que estan implicades en la unió a la zona pel·lúcida i en la fusió entre les membranes de l'espermatozoide i l'oòcit mitjançant la tècnica de nano-LC/MS/MS (Nixon et al., 2011). També s'han dirigit a estudiar diferents fraccions com espermatozoides madurs vs inmadurs (Baker et al., 2005; Cui, Sharma i Agarwal, 2016) on es van observar diferències proteiques implicades en la síntesi de proteïnes, transport, ubiquitinació i estrès oxidatiu; o l'estudi de mostres d'espermatozoides de pacients fèrtils vs infèrtils (Cao et al., 2018; Dias et al., 2019) o també de mostres fresques vs criopreservades on es van poder observar canvis en el proteoma durant el procés de criopreservació (Bogle et al., 2017).

La caracterització del proteoma de l'espermatozoide ha estat estudiada per a diferents condicions d'infertilitat com varicocele, avortaments recurrents, infertilitat idiopàtica o fallades en cicles de tècniques de reproducció assistida, així com per a diferents anomalies en el seminograma de l'espermatozoide (Agarwal et al., 2020). L'anàlisi proteòmica de pacients infèrtils que mostraven un perfil de seminograma normal va identificar diferents diferències d'expressió en proteïnes involucrades en el desenvolupament/funcions dels espermatozoides com: CRISP2, NME5, TSSK2, MYCBP, NDRG3, SPATA24, ROPN1L (McReynolds et al., 2014). També s'ha demostrat que la sobreexpressió de proteïnes com HSPA2, HSPA5, STIP1, CLU està relacionat amb un desenvolupament embrionari de pitjor qualitat i una taxa d'implantació més baixa (McReynolds et al., 2014). Més recentment, Panner Selvam et al., (2019) han identificat una expressió diferencial en proteïnes implicades en el potencial de fertilització d'aquests pacients com ANXA2, SPA17 i la SERPINA5 que actuen en la reacció acrosòmica i la fusió de l'espermatozoide i l'oòcit. El mateix grup també ha estudiat l'efecte del trac-

tament amb antioxidants en aquests pacients i han comprovat que millora l'expressió de proteïnes com NDUFS1, CCT3, PRKAR1A i la SPA17 que poden usar-se com a biomarcadors per monitoritzar l'efecte dels antioxidants (Agarwal et al., 2019). Altres pacients infèrtils que també presenten paràmetres normals del seminograma són els avortaments de repetició sense factor femení, en aquest grup, s'ha comparat el proteoma amb homes fèrtils i les proteïnes diferencials indiquen que hi ha alteració en la regulació biològica, processos cel·lulars i diferents enzims implicats en el metabolisme dels lípids i la glucosa (Xue et al., 2019).

Pacients que presenten anomalies en els paràmetres del seminograma també s'han estudiat a nivell de proteoma comparant-los amb donants fèrtils. Aquells que tenen compromesa la mobilitat, astenozoospèrmics, s'ha demostrat que les proteïnes diferencials que expressen estan associades a processos cel·lulars com la mobilitat, l'energia, metabolisme, estructura i estrès (Martinez-Heredia et al., 2008; Hashemitabar et al., 2015). Els pacients amb baix nombre d'espermatozoides i amb mobilitat i morfologia alterades, oligoastenoteratozoospèrmics, presenten diferències en proteïnes implicades en el metabolisme i la inflamació, així com la resposta a l'estrès i altres proteïnes associades al transport o la immunitat (Giacomini et al., 2015; Liu et al., 2018). Aquest últim estudi va identificar les proteïnes: KLK3, LTF, SERPINA1 i GAPDH, com a biomarcadores per a aquesta condició.

Com s'ha vist, les recents investigacions obtenen resultats propicis per al desenvolupament de nous biomarcadors de fertilitat masculina, explorant diverses biomolècules i panells de biomarcadors prometedors per ajudar a l'avaluació del potencial de fertilitat dels homes, a aprofundir en el coneixement i diagnòstic de les diferents etiologies i a predir l'èxit dels tractaments en reproducció assistida. D'altra banda, la investigació en el camp dels biomarcadors de fertilitat masculina ha donat lloc a l'acumulació de dades i en aquest sentit, seria interessant integrar les dades per avançar i definir millor els biomarcadors de la fertilitat masculina (Jodar et al., 2016).

2. HIPÒTESI I OBJECTIUS

2.1 HIPÒTESI

La identificació dels individus que presenten infertilitat masculina serà més eficient si a més del diagnòstic en base al seminograma, patologia i grau d'alteració en la fragmentació de l'ADN dels seus espermatozoides es disposa d'un patró de biomarcadors obtingut a partir del perfil proteòmic del líquid seminal i dels espermatozoides. A fi d'identificar i distingir entre pacients infèrtils i controls, de manera més eficient, a més de clarificar-ne la etiologia.

2.2 OBJECTIUS

2.2.1 OBJECTIU GENERAL 1: CARACTERITZACIÓ DE L'ACTIVITAT NUCLEASA EN EL LÍQUID SEMINAL

Determinar si hi ha activitat nucleasa en el líquid seminal d'individus fèrtils i de diferents grups de pacients infèrtils (SMN, ASZ, TZ, ATZ, AZ). Observar si hi ha diferències en la seva concentració, així com correlacionar-la amb el percentatge de dany en l'ADN dels espermatozoides i amb els diferents paràmetres del seminograma. Per últim, avaluar aquesta variable com a biomarcador d'infertilitat masculina.

Objectius específics:

1. Recollir mostres i caracteritzar els perfils de fragmentació de l'ADN dels espermatozoides de les mostres recollides mitjançant la tècnica, assaig Cometa, que permet diferenciar entre trencaments de cadena simple envers trencaments de cadena doble (mitjançant un tractament alcalí o mitjançant un tractament neutre respectivament).
2. Posar a punt de la tècnica de Single Radial Enzyme Diffusion (Nadno et al., 1993) per determinar l'activitat nucleasa en el líquid seminal.
3. Correlacionar l'activitat nucleasa determinada en el líquid seminal amb el percentatge de dany en l'ADN dels espermatozoides i amb els diferents paràmetres del seminograma.
4. Valorar si l'activitat nucleasa present en el líquid seminal permet predir la infertilitat masculina mitjançant l'anàlisi estadística.

2.2.2 OBJECTIU GENERAL 2: ANÀLISI PROTEÒMIC DIFERENCIAL DE LÍQUID SEMINAL MITJANÇANT 2D-DIGE DE MOSTRES SEGONS EL SEMINOGRAMA, PATOLOGIA I GRAU DE FRAGMENTACIÓ DE L'ADN DELS ESPERMATOZOIDES

Estudiar el perfil proteic del líquid seminal d'individus amb fertilitat provada i els canvis observats, en el seu cas, en diferents grups de pacients infèrtils caracteritzats segons el seu seminograma, patologia d'infertilitat i grau de fragmentació de l'ADN dels espermatozoides (ATZ, ATZ-VAR, AR). S'usarà la tècnica proteòmica, 2D-DIGE, per tal de trobar proteïnes diferencials i caracteritzar-les entre els diferents grups d'individus infèrtils envers els fèrtils.

Objectius específics:

1. Recollir i seleccionar les mostres segons els criteris determinats. Així com caracteritzar els perfils de fragmentació de l'ADN dels espermatozoides de les mostres seleccionades mitjançant les tècniques: assaig Cometa, tant neutre com alcalí i Halosperm, SCD (Sperm Chromatin Dispersion) per determinar l'índex d'espermatozoides amb l'ADN completament degradat.
2. Posar a punt la tècnica de proteòmica diferencial, 2D-DIGE, en el líquid seminal, per tal de detectar proteïnes diferencials i caracteritzar-les entre diferents grups d'individus infèrtils envers fèrtils.
3. Analitzar les diferents proteïnes diferencials trobades en l'estudi mitjançant eines bioinformàtiques com Uniprot, PANTHER, STRING, etc, per tal de poder valorar la seva localització, les vies que es veuen afectades, etc.

2.2.3 OBJECTIU GENERAL 3: ANÀLISI PROTEÒMIC DIFERENCIAL DELS ESPERMATOZOIDES MITJANÇANT MARCATGE AMB TMT DE MOSTRES DE CONTROLS FÈRTILS VERS AVORTAMENTS DE REPETICIÓ ABANS I DESPRÉS DEL TRACTAMENT ORAL AMB ANTIOXIDANTS

Estudiar el perfil proteic dels espermatozoides d'individus amb fertilitat provada i els canvis observats, en el seu cas, en diferents grups de pacients infèrtils que presenten avortaments de repetició abans i després del tractament amb antioxidants oral durant tres mesos. S'utilitza la tècnica proteòmica de marcatge isobàric TMT, per tal de trobar proteïnes diferencials i caracteritzar-les entre els diferents grups d'individus amb avortaments abans i després del tractament envers els fèrtils.

Objectius específics:

1. Recollir i seleccionar les mostres segons els criteris determinats. Així com caracteritzar els perfils de fragmentació de l'ADN dels espermatozoides de les mostres seleccionades mitjançant la tècnica de l'assaig Cometa, tant neutre com alcalí, per determinar l'índex d'espermatozoides amb l'ADN completament degradat.
2. Aplicar la tècnica de marcatge isobàric TMT en els espermatozoides de les mostres, per tal de detectar proteïnes diferencials i caracteritzar-les entre diferents grups d'individus amb avortaments envers fèrtils.
3. Analitzar les diferents proteïnes diferencials trobades en l'estudi mitjançant eines bioinformàtiques com Uniprot, PANTHER, STRING, etc, per tal de poder valorar la seva localització, les vies que es veuen afectades, etc.

3. MATERIAL I MÈTODES

3.1 MOSTRES BIOLÒGIQUES

3.1.1 PROCEDÈNCIA I COMITÈ D'ÈTICA

Per al desenvolupament dels objectius plantejats s'han analitzat mostres de semen humanes, la majoria obtingudes de pacients infèrtils prèviament seleccionats en el departament d'Urologia de l'Hospital Universitari Parc Taulí de Sabadell i en el laboratori d'immunologia del UDIAT (Parc Taulí) . D'altra banda, les mostres de semen de parelles amb avortaments de repetició sense factor femení conegut s'han obtingut a través de col·laboracions tant amb el Departament de Ginecologia de l'Hospital Universitari Mútua de Terrassa, com amb Cimab, del Parc de Recerca de la UAB. Per últim, les mostres obtingudes d'individus amb fertilitat provada s'han obtingut a través del banc de semen CEFER, de donants recollits a la pròpia UAB i del Centre de Reproducció Assistida de la Fundació Puigvert).

En tots els casos, els individus han signat un consentiment informat segons el qual accepten donar part de la seva mostra per a la recerca. A més, els procediments duts a terme amb les mostres han estat aprovats per la normativa de la Comissió d'Ètica del corresponent Centre sanitari col·laborador.

3.1.2 GRUPS DE PACIENTS I CONTROLS

Les mostres d'ejaculat analitzades han estat prèviament caracteritzades mitjançant el seminograma, utilitzant com a referència els criteris referits al manual de l'OMS de l'any 2010 (Taula 3). Així doncs, en aquest treball s'han estudiat mostres de semen de:

- Individus amb fertilitat provada (CF, control fèril) que presenten un seminograma normal; concentració, mobilitat i morfologia espermàtica amb resultats dins dels valors de referència establerts (n= 27).

- Pacients infèrtils que presenten un seminograma normal (SMN); concentració, mobilitat i morfologia espermàtica amb resultats dins dels valors de referència establerts (n= 17).

-Parelles amb avortaments de repetició (AR): S'han seleccionat pacients que tot i presentar un seminograma normal i haver descartat tots els factors de risc d'origen femení, la història clínica mostra més de dos avortaments de primer trimestre (n=11) i d'aquests, 5 individus també van tornar a ser analitzats després del tractament durant 3 mesos amb antioxidants orals.

Un total de 78 pacients infèrtils que presenten el seminograma alterat:

-Pacients amb seminograma astenozoospermic (ASZ), alteració de la mobilitat espermàtica, però no la concentració ni la morfologia (n= 16).

-Pacients amb seminograma teratozoospermic (TZ), alteració de la morfologia espermàtica, però no la concentració ni la mobilitat (n= 19).

-Pacients amb seminograma astenoteratozoospermic (ATZ), alteració de la mobilitat i la morfologia espermàtica, però no la concentració (n= 27).

-Pacients amb seminograma astenoteratozoospermic i que presenten varicocele clínic (ATZ-VAR) prèviament diagnosticat a la consulta d'urologia, alteració de la mobilitat i la morfologia espermàtica, però no la concentració (n= 6).

-Pacients amb azoospermia (AZ), no presenten espermatozoides en l'ejaculat (n= 10).

3.1.3 OBTENCIÓ DE LES MOSTRES DE SEMEN I CRIOPRESERVACIÓ

Totes les mostres de semen analitzades van ser obtingudes per masturbació en flascons estèrils després de 3 a 7 dies d'abstinència. La recollida s'ha realitzat en els diferents hospitals i centres amb qui s'ha col·laborat o a la pròpia UAB.

Després de la recepció de les mostres es realitza el seminograma (veure 3.2.1). A continuació es procedeix a la criopreservació estàndard de les mostres de semen, es mesclen en proporció 1:1 amb medi de criopreservació (14% glicerol, 30% rovell d'ou, 1,98% glucosa, 1,72% citrat de sodi), s'homogeneïtza la mescla, es distribueix en criotubs resistents al fred i es mantenen a -80°C durant 6-12 hores.

Passat aquest temps es submergeixen en un tanc de nitrogen líquid a -195°C . Per a la descongelació de la mostra, s'introdueix el vial, 30 segons, en un bany a 37°C i es procedeix al rentat de la mostra.

Per a preparar el medi de criopreservació, es separen les clares del rovell de l'ou, fins a obtenir 30 ml de rovell d'ou, s'homogeneïtzen en un vas de precipitats i s'afegeix 1,98 g de glucosa, 1,72 g de citrat sòdic, 56 ml d'aigua mili-Q i 14 ml de glicerol. Un cop homogeneïtzada la mescla anterior, s'incuba a 56°C durant 30 minuts per inactivar les proteïnes que conté el rovell de l'ou. Es deixa temperar a temperatura ambient, s'afegeix 2 g glicina i s'ajusta el pH a 7,2-7,4. El medi obtingut, que té una caducitat de 6 mesos, es guarda a -20°C en alíquotes.

Per a l'obtenció del plasma seminal de les mostres es reserven 400 μl de la mostra de semen abans de criopreservar-la. Es centrifuguen a 13300 g (microL 17R centrifuge, Thermo Científic) dues vegades durant 30 minuts a 4°C . Es distribueix el plasma sobrenedant en alíquotes i es preserven al congelador a -80°C fins al moment del seu ús.

3.2 TÈCNiques D'ANÀLISI DEL SEMEN

3.2.1 SEMINOGRAMA

Rutinariament en els laboratoris d'andrologia les mostres de semen s'analitzen mitjançant el seminograma. Aquesta tècnica permet identificar i classificar les mostres segons les seves característiques macroscòpiques i microscòpiques. Les propietats macroscòpiques són el volum de la mostra, la líquüefacció (completa o incompleta), l'aspecte (opac, translúcid o transparent), el color (blanc, blanc-groc) i el pH. Les propietats microscòpiques s'analitzen amb el programa Sperm Class Analyzer (SCA) (Microptic; Barcelona, Espanya) que avalua aspectes com la concentració d'espermatozoides, la mobilitat, i la morfologia espermàtica, aquesta última seguint el criteri estricte de Kruger (Kruger et al., 1987).

L'OMS estableix uns valors líndar de normalitat per a totes aquestes característiques del semen (Taula 3), Manual for Semen Analysis (WHO, 2010):

Taula 3. Valors llindar de normalitat segons l'Organització Mundial de la Salut (WHO, 2010)

Paràmetre	Valor de referència
Volum (ml)	1,5
pH	≥ 7,2
Concentració d'espermatozoides	15 x 10 ⁶ espermatozoides/ml
Nombre total d'espermatozoides	39 x 10 ⁶ espermatozoides
Mobilitat total (a+b) %	32%
Morfologia (% Formes normals)	4%
Vitalitat %	58%

3.3 TÈCNiques D'ANÀLISI DE LA INTEGRITAT DE L'ADN ESPERMÀTIC

3.3.1 ASSAIG COMETA

BREU DESCRIPCIÓ:

L'assaig Cometa o SCGE (Single Cell Gel Electrophoresis) (Singh et al., 2003) es basa en la migració, en un camp elèctric, dels fragments del DNA cap a l'ànode. Pot realitzar-se sense desnaturalització (neutre) o amb desnaturalització prèvia (alcalí), la qual cosa permet diferenciar entre trencaments majoritàriament de cadena doble o de cadena simple respectivament. L'assaig Cometa d'aquest treball s'ha basat en una adaptació d'Enciso et al., (2009) per a poder realitzar-lo en espermatozoides i en un espai de temps curt.

PROCEDIMENT:

La preparació de la mostra és idèntica per als dos tipus de Cometa, neutre i alcalí i es pot realitzar de manera simultània. Es descongela la mostra en un bany a 37°C per immersió durant 30 segons i es renta amb PBS sense Ca²⁺ ni Mg²⁺ en una proporció 1:3, centrifugant a 400 g durant 4 minuts, descartant el sobrenedant, i es repeteix el mateix dues vegades més. S'ajusta la concentració a aproximadament 10x10⁶ espermatozoides/ml perquè posteriorment no es superposin les cues, per això s'observa a l'objectiu de 40X on s'han de veure uns 10 espermatozoides per camp.

Material i mètodes

Després es liqua 50 µl de Low Melting Point Agarose 1% (Sigma-Aldrich, Madrid), fosa prèviament en un bany a 90°C durant 5 minuts i equilibrant-la en aigua a 37°C durant 5 minuts més, es mescla la part d'agarosa Low Melting Point Agarose 1% amb 25 µl de la mostra de semen que prèviament ja s'ha preparat i es posen 15 µl de la mescla sobre un portaobjectes tractat amb agarosa 1% sobre el que es col·loca un cobreobjectes de 20x20 (aquest pas cal realitzar-lo ràpidament i sobre una placa a 37°C perquè no gelifiqui). Es trasllada el portaobjectes sobre una placa de metall a 4°C durant 5 minuts per a gelificar i es retira el cobreobjectes per lliscament.

En acabar, s'incuba el portaobjectes que hem preparat horitzontalment, primer amb solució de lisi 1 (0,4 M Tris-HCl, 0,8M DTT, 1% SDS ajustada a pH 7,5) i després amb solució de lisi 2 (0,4 M Tris-HCl, 0,4 M DTT, 2M NaCl, 50 mM EDTA ajustada a pH 7,5) durant 30 minuts cada una i es renta amb TBE 1X (0,445 M Tris-HCl, 0,445 M àcid bòric, 0,01 M EDTA).

La segona etapa difereix en les dues variants de Cometa. Pel Cometa neutre, es col·loca el portaobjectes en la cubeta d'electroforesi amb un tampó TBE 1X i es realitza la electroforesi a 20 V durant 12,5 minuts. Després es fa un rentat amb NaCl 0,9% durant 2 minuts. Pel Cometa alcalí, en canvi, primer es fa una incubació amb solució alcalina (0,03 M NaOH, 1 M NaCl) que es troba a 4°C i després es realitza l'electroforesi col·locant el portaobjectes a la cubeta amb el tampó 0,03 M NaOH a 20 V durant 4 minuts. L'última etapa, també és comuna per al Cometa

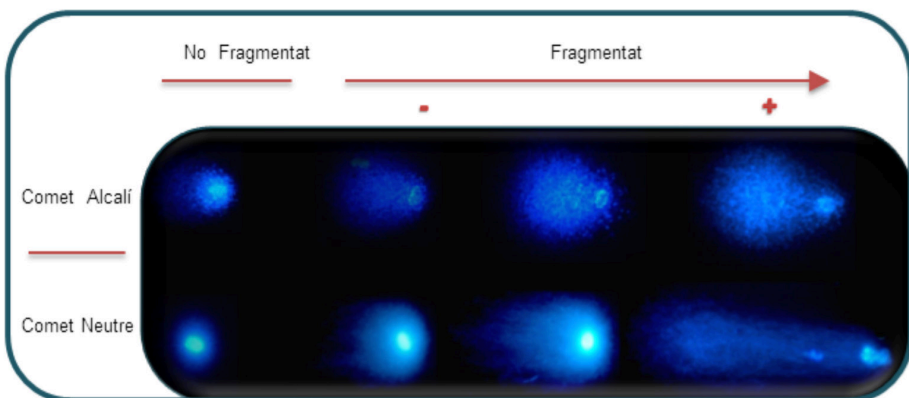


Figura 13. Classificació dels cometes. Nucli normal (-) i s'observa l'augment gradual de la longitud de la cua del cometa, evolucionant paral·lelament amb una disminució del contingut d'ADN nuclear. Cometes alcalins que reflecteixen danys globals en l'ADN (cadena simple i doble) (part superior), i assaig cometa neutre que reflecteix principalment trencaments de cadena doble (panell inferior).

neutre i l'alcalí. S'incuba el portaobjectes en la solució de neutralització (0,4 M Tris-HCl, pH 7,5) 5 minuts, es renta en TBE 1X durant 2 minuts, es realitza una sèrie d'etanols: 70%, 90% i 100%, 2 minuts cada un i es deixa assecar horitzontalment. Finalment, s'observa al microscopi de fluorescència Olympus AX70 prèvia tinció del DNA dels espermatozoides amb DAPI SlowFade® Gold antifade (Invitrogen, Barcelona) per tal de comptar 500 espermatozoides per mostra, classificant-los en fragmentats i no fragmentats seguint el criteri del nostre laboratori (Ribas-Maynou et al., 2012). El percentatge d'espermatozoides amb el DNA fragmentat s'indica com a SDF.

3.3.2 ASSAIG SCD

BREU DESCRIPCIÓ:

Aquest mètode SCD (Sperm Chromatin Dispersion test) (Fernández et al, 2003) avalua la susceptibilitat de l'ADN a desnaturalitzar-se. Els espermatozoides seran sotmesos a una desnaturalització a pH àcid i una desproteïnitització controlada, si tenen el ADN intacte produiran un halo de dispersió que correspon a la cromatina alliberada de proteïnes i en forma de loops. En contraposició, els espermatozoides amb el DNA fragmentat no produiran aquest halo (Fig. 14). I aquestes diferències poden ser fàcilment analitzades per microscòpia òptica de fluorescència o bé, per microscòpia de camp clar.

PROCEDIMENT:

La mostra de semen es descongela i s'ajusta la concentració d'espermatozoides a aproximadament 10×10^6 espermatozoides/ml, igual que amb l'assaig cometa (veure 3.3.1).

Un cop la mostra està preparada, es barregen 25 µl de la mostra amb 50 µl l'agarosa de baix punt de fusió Low Melting Point Agarose 1% (Sigma-Aldrich, Madrid), fosa prèviament en un bany a 90°C durant 5 minuts i equilibrant-la en aigua a 37°C durant 5 minuts més, i es col·loca 15 µl de la mescla anterior sobre un portaobjectes tractat amb agarosa 1% i es col·loca un cobreobjectes de 20x20 (aquest pas cal realitzar-lo ràpidament i sobre una placa a 37°C perquè no gelifiqui). Es trasllada el portaobjectes sobre una placa de metall a 4°C durant 5 minuts per a gelificar i es retira el cobreobjectes per lliscament.

Un cop preparat el portaobjectes amb la mostra, la tècnica es realitza mitjançant

el kit Halosperm (Halotech DNA SL; Madrid) que consta d'un tractament desnaturalitzant, incubant el portaobjectes durant 7 minuts en una solució àcida desnaturalitzant que conté HCl, seguit d'un tractament de lisi i extracció de proteïnes del nucli dels espermatozoides per tal de descompactar-lo, incubant durant 25 minuts en una solució de lisi (agents reductors i DTT). Després, es fa un rentat amb aigua destil·lada durant 5 minuts i es deshidrata el portaobjectes en una sèrie d'etanols al 70%, 90% i 100% durant 2 minuts cadascun, per tal de fixar els espermatozoides. Es deixa assecar a l'aire i es tenyeix el ADN dels espermatozoides de la mostra amb DAPI (2 µg/ml) (RocheDiagnostics; Barcelona, Spain) en Vectashield (Vector Laboratories; Burlingame, CA).

En un microscopi de fluorescència (Olympus AX70), s'analitzen 300-400 espermatozoides, classificant-los com a fragmentats, no fragmentats i degradats (Fig. 14). El percentatge d'espermatozoides amb el DNA fragmentat s'indica com a SDF. A més, dins de la classificació d'espermatozoides amb el DNA fragmentat també identifiquem l'índex d'espermatozoides amb el DNA totalment degradat (DDSi), aquests a més de no presentar halos, es caracteritzen per la presència d'un nucli de cromatina feble i/o no tenyit de forma uniforme (Fig. 14). DDSi es calcula com la proporció d'espermatozoides amb el DNA degradat respecte a la població identificada amb el DNA fragmentat (Gosálvez et al., 2015).

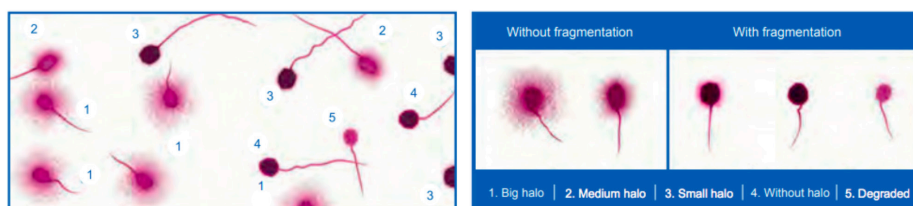


Figura 14. Classificació dels espermatozoides després del tractament amb el Kit Halosperm, de menys fragmentat a més fragmentat, sense halo. Imatge extreta de les instruccions del kit Halosperm de halotech DNA, SL.

3.4 ANÀLISI DE L'ACTIVITAT NUCLEASA DEL LÍQUID SEMINAL AMB EL MÈTODE SRED (SINGLE RADIAL ENZYME DIFFUSION)

3.4.1 MÈTODE SINGLE RADIAL ENZYME DIFFUSION (SRED)

BREU DESCRIPCIÓ:

El mètode aplicat és una adaptació del procediment descrit per Nadano et al., (1993) que es basa en la formació d'un halo degut a l'acció enzimàtica de la mostra que va difonen per la matriu que conté agarosa, DNA i bromur d'etidi, i van degradant el substrat (ADN) de forma radial, la mesura del halo format permet calcular la concentració enzimàtica.

PROCEDIMENT:

Es prepara un gel d'agarosa a l'1% en 10ml de tampó (20 mM Tris, 5 mM CaCl₂, 5mM MgCl₂, pH 7,3), que conté 2,5 ml de DNA de testicle de Salmó (2 mg/ml) (Sigma-Aldrich , Madrid) i 3 ml de bromur d'etidi (10 mg/ml). S'aboquen 3ml de la mescla anterior sobre un portaobjectes i es deixa gelificar a temperatura ambient. Després, es fa una incisió circular de 0,3mm en el gel on es carreguen 5 µl de la mostra de líquid seminal. S'incuba a 37°C en una cambra humida durant 24 hores. Finalment, es col·loca al transil·luminador amb una llum de 312 nm i es realitza la fotografia. La mesura del diàmetre de l'halo es realitza mitjançant l'anàlisi de la fotografia amb el programari ImageJ versió 1.34n. Es mesuren 6 eixos de l'halo que passen pel centre i es fa la mitjana de les 6 mesures, realitzant com a mínim dues rèpliques de la mateixa mostra i, finalment s'obté la mitjana de 12 mesures per reduir l'error. Cal una recta de calibratge, aquesta es realitza amb ADNasa I pancreàtica bovina (Sigma-Aldrich, Madrid) per poder extrapolar mitjançant el diàmetre de l'halo de les mostres de líquid seminal el seu equivalent a activitat de DNasa I pancreàtica bovina.

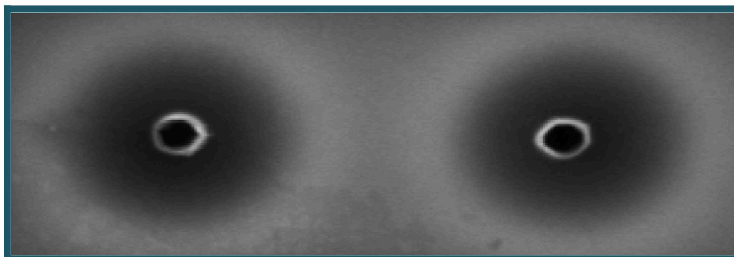


Figura 14. Classificació del espermatozoides després del tractament amb el Kit Halosperm, de menys fragmentat a més fragmentat, sense halo. Imatge extreta de les instruccions del kit Halosperm de halotech DNA, SL.

3.5 IDENTIFICACIÓ DE BIOMARCADORS EN EL PLASMA SEMINAL MITJANÇANT LA METODOLOGIA 2D-DIGE

3.5.1. QUANTIFICACIÓ I PRECIPITACIÓ DE PROTEÏNES

Quantificació de proteïnes mitjançant la tècnica RC DC (Biorad)

BREU DESCRIPCIÓ:

Per a la quantificació de proteïna s'utilitza el tècnica RcDc que és un mètode colorimètric, que es basa en solubilitzar les proteïnes mitjançant una dissolució tampó i es separen per precipitació i centrifugació. Aquestes proteïnes es resuspenen posteriorment en els diferents reactius i la reacció que s'origina dona un color blau intens que es mesura per colorimetria. Comparant els valors obtinguts amb el patró corresponent s'assigna la quantitat de proteïna total de la mostra.

PROCEDIMENT:

Es prepara la recta patró amb BSA en aigua Mili-Q, es disposa per triplicat 25 µl de cada estàndard i de la dilució de cada mostra a quantificar en la placa. S'afegeix 125 µl de Reagent I per pouet, voltejar i s'incuba 1 minut a temperatura ambient. S'afegeixen 125 µl de Reagent II per pouet, voltejar i centrifugar 30 minuts a 6000 g a 10°C. S'elimina el sobrenedant invertint la placa sobre paper absorbent. Seguidament, s'afegeixen 125 µl de Reagent I per pouet, voltejar i incubar durant 1 minut. S'afegeixen 40 µl de Reagent II per pouet, voltejar i centrifugar a 6000 g durant 30 minuts a 10°C. Eliminar el sobrenedant invertint la placa sobre paper absorbent i centrifugar 5 minuts a 6000 g a 10°C. Eliminar el sobrenedant i afegir 127 µl de Reagent A', voltejar i incubar 5 minuts. Afegir 1 ml de Reagent B i incubar durant 15 minuts. Carregar els pouets a la microplaca amb 200 µl de cada estàndard i mostra. La absorbància es llegeix a 260 nm, essent estable després d'una hora.

Precipitació de proteïnes mitjançant tca/acetona

BREU DESCRIPCIÓ:

La precipitació de proteïnes és necessària per a evitar la presència de lípids i altres compostos presents en la mostra ja que poden interferir en la posterior electroforesi de proteïnes.

PROCEDIMENT:

Afegir els mateixos mil·lilitres de TCA 10% que de mostra, agitar durant una hora a 4°C i després centrifugar a 20000 g durant 10 minuts a 4°C, eliminar el sobrenedant. Afegir 1 ml d'acetona a -20°C, netejar el tap i les parets del tub. Centrifugar a 20000 g durant 1 minut a 4°C i eliminar el sobrenedant. Deixar assecar 5 minuts a l'aire. Redissoldre la mostra en Rehydratation buffer en funció de la quantitat de mostra inicial i la longitud de la tira.

3.5.2. MARCATGE AMB DIGE DE LES MOSTRES**BREU DESCRIPCIÓ:**

Els gels (2D-DIGE) utilitzen l'etiquetatge de les proteïnes de les mostres abans de l'electroforesi 2-D mitjançant diferents fluorescències (Cy2, Cy3 i Cy5). S'etiqueten per separat les proteïnes aïllades dels teixits o plasmes d'individus normals i malalts, per tant es poden separar i quantificar mitjançant tres conjunts diferents de longituds d'ona. Aquest enfoc tècnic permet superar molts dels desavantatges de l'anàlisi en 2-D tradicional, eliminant el fet que hagi d'haver coincidència entre els spots dels gels. Aquest nou sistema optimitzat mostra un major rendiment, facilitant l'ús, reproduïbilitat, i la quantificació precisa de les diferències en l'expressió de les proteïnes. Disminueix la variabilitat entre els gels deguda a la variació biològica.

PROCEDIMENT:

Per a fer el marcatge són imprescindibles tres condicions: que cada condició estigui per triplicat, que cada condició ha d'estar marcada amb 2 fluorocroms diferents i que totes les condicions s'han d'emparellar segons el disseny experimental. Per això, primer es preparen els pools de cada condició i el patró intern que permet una normalització de les dades d'expressió entre els diferents gels i augmentar així la reproductibilitat i precisió de les mesures (Taula 4). Es pipetejen els microlitres necessaris per obtenir 50 µg de proteïnes de cada una de les mostres que seran marcades. Pel patró intern es pipeteja el volum necessari per a que hi hagi els 80 µg de proteïna necessària. Primer es preparen les mostres, quantificant-les mitjançant el kit RC-DC (Biorad) i precipitant-les mitjançant TCA/Acetona. Es quantifica altra vegada la concentració proteica de cada una de les mostres després de la precipitació i es procedeix al marcatge amb els fluorocroms (Amersham Biosciences). Es preparen els diferents pools (CF, ATZ, ATZ-

Material i mètodes

VAR, AR) amb la mateixa concentració de proteïna per a cada mostra, i després es prepara un tub de 0,5 µl per a cada tipus de marcador (Cy2, Cy3, Cy5). Cada pool a marcar necessita 0,4 µl de Cye Dye stock solution i 0,6 µl de dimetilformamida (DMF), la quantitat necessària s'afegirà als tubs que s'han preparat. Es voltegen i centrifuguen les barreges. Un cop centrifugats, s'afegeix tota la solució de Cy2 al tub marcat com a patró intern i s'afegeix 0,95 µl de la solució Cy3 a cada tub que està preparat amb els 50 µg de proteïna que es vol marcar segons el disseny de marcatge que s'ha preparat (Taula 4), repetir per al Cy5. Es voltegen i centrifuguen les mescles i s'incuben 45 minuts en gel i en condicions de foscor. Després, es frena la reacció afegint els mateixos microlitres de lisina 10 mM que s'afegit de fluorocrom i s'incuba 10 minuts en gel i en la foscor. Per últim, s'ajusten els volums amb tampó DIGE 1x sense Tris (7 M urea, 2 M tiourea, 4% (p/v) CHAPS, 2 g/L DTT i 2% (v/v) d'amfòlits) i es congela fins al seu ús en la electroforesi de dues dimensions (2D).

Taula 4. Esquema del disseny experimental dels gels de 2D-DIGE per al marcatge de 4 condicions diferents: CF, ATZ, ATZ-VAR, AR (n= 6 mostres per a cada condició).

Gel n°	Cy2 (80 µg)	Cy3 (50 µg)	Cy5 (50 µg)
1	Patró intern	ATZ-VAR	ATZ
2	Patró intern	AR	ATZ-VAR
3	Patró intern	ATZ-VAR	CF
4	Patró intern	ATZ	AR
5	Patró intern	CF	ATZ
6	Patró intern	AR	CF

3.5.3 ELECTROFORESI, OBTENCIÓ I ANÀLISI DE LES IMATGES

L'electroforesi en dues dimensions (2D) és un mètode utilitzat per a l'anàlisi de mescles de proteïnes complexes. Permet separar les proteïnes segons dues propietats: el punt isoelèctric i el pes molecular.

Primera dimensió: Isoelectroenfocament amb cup-loading (tires de 24 cm)

BREU DESCRIPCIÓ:

En el cas dels gels 2D-DIGE, després del marcatge de les proteïnes amb els fluorocroms corresponents es procedeix a la primera dimensió, separant les proteïnes d'acord al seu punt isoelèctric en un gel de poliacrilamida amb un gradient de pH immobilitzat (en aquest estudi de 3-10) en condicions de desnaturalització.

PROCEDIMENT:

La separació pel punt isoelèctric o isoelectric focusing (IEF) es realitza amb tires de poliacrilamida de gradient immobilitzades de 24 cm de rang de pI 3-10 (GE Healthcare). Per hidratar les tires, es carreguen 450 µl de Rehydration Buffer / DeStreak (7 M urea, 2 M tiourea, 2% (w/v) CHAPS, 0,5% (v/v) IPG pH 3-10 buffer, 50 mM DTT, 1,2% (v/v) DeStreak) al centre del carril de l'Immobiline DryStrip on es col·loca la tira. Es treu del congelador la tira, es retira el plàstic que les protegeix, es col·loca al carril amb l'acrilamida cap avall i vigilant que l'acrilamida no toqui la part de carril que encara esta seca. Un cop situada, es cobreix completament el carril amb Immobiline DryStrip Cover Fluid per evitar la precipitació de la urea. I es deixa rehidratar durant 18 hores a temperatura ambient. Passat aquest temps, es retiren les tires i es guarden al congelador abans de carregar la mostra.

Per carregar les mostres, s'encén el sistema de IEF IPGphor (Amersham Biosciences) i es col·loca l'Ettan IPGphor Manifold. Es treuen les tires de congelador i es situen en els carrils amb l'acrilamida cap amunt. Es cobreixen les tires amb el Dry Immobiline DryStrip Cover i també almenys dos carrils contigus. S'humitegen els papers absorbents amb aigua mili-Q i es col·loquen en els extrems de les tires tocant part de l'acrilamida. Després, es posen els elèctrodes de manera que l'acrilamida, el paper i l'elèctrode estiguin a la mateixa alçada. Un cop situats, la mostra es carrega mitjançant el procediment cup-loading, els sample cups es

col·loquen segons el tipus de mostra i el pH de la tira en un extrem o altre d'aquesta. Seguidament, es carrega 150 ug de mostra just al centre del sample cup. És important que la mostra quedi coberta d'oli per evitar l'evaporació i la precipitació de la mostra (Dry Immobiline DryStrip Cover, Amersham Biosciences) durant tot l'isoelectroenfocament. I per últim, es posa en funcionament el programari per al cup-loading l'IPGphor I al PC: 3 h a 300 V, pujar fins a 1000 V en 6 h i 8000 V en 3 hores, enfoc a 8000 V durant 5 hores, arribant a un total de 56000 Vhr (Taula 5). Comprovar que tot funciona correctament. Quan finalitza la primera dimensió, les tires es congelen a -80°C fins al moment de realitzar la segona dimensió.

Taula 5. Esquema del disseny experimental dels gels de 2D-DIGE per al marcatge de 4 condicions diferents: CF, ATZ, ATZ-VAR, AR (n= 6 mostres per a cada condició).

Pas	Mode	Volts	Hores	VHrs
1	Step	300	5	
2	Gradient	1000	6	
3	Gradient	8000	3	
4	Step	8000	Variabile	70000
5	Step	500	6	
Condicions finals	-	500	23	89269

Segona dimensió: Electroforesi en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

BREU DESCRIPCIÓ:

En la segona dimensió, es separen les proteïnes en un gel de poliacrilamida segons el seu pes molecular. Se li afegeix un detergent, el SDS, que desnaturalitza les proteïnes i al unir-se a elles els hi confereix càrrega negativa i així migren en el camp electroforètic en funció de la seva massa molecular. A més a més, el fet d'utilitzar un agent reductor que trenca els enllaços disulfur (DTT) fa que es perdi la conformació de la proteïna, només conservant la seva estructura primària, evitant que la conformació de la proteïna interfereixi en la mobilitat electroforètica.

PROCEDIMENT:

La separació SDS-PAGE es realitza amb el sistema EttanDalt VI (Amersham Bioscience) Prèviament a la polimerització dels gels al 12% d'acrilamida, es netegen els vidres de baixa fluorescència del sistema amb aigua mili-Q i etanol i es posen en el suport de polimerització junt amb els plàstics necessaris per omplir l'espai que queda lliure. També, es col·loquen les pinces en els laterals de forma alternativa per fer pressió. Es preparen 450 ml de dissolució d'acrilamida/bisacrilamida (Bio-Rad) i amb l'ajuda d'un embut s'introdueix la barreja en el sistema d'electroforesi. S'afegeixen 2 ml d'isopropanol a sobre de cada gel i es deixa polimeritzar durant una hora. Després s'equilibren les tires afegint primer 10 ml de SDS equilibration buffer amb DTT (50 mM Tris-HCl pH 8,8, 6 M Urea, 30% (v/v) glicerol, 2% (w/v) SDS, 10 g/L DTT i blau de bromofenol) i després amb el mateix tampó però substituint el DTT per 25 g/L de IAA durant 15 min en cadascuna dels buffers i en agitació. Seguidament, es situa la tira a la part superior del gel i en el costat bàsic es situa un aplicador impregnat amb 5 µl d'un estàndard intern proteic (Precision Plus Protein Standard, Biorad), i es segella amb agarosa al 0,5% (p/v). Finalment, s'insereix el casset de l'electroforesi amb els gels a la cubeta. S'omple amb Running buffer 1x la cubeta inferior i amb Running buffer 2x la cubeta superior. Es posar la tapa i es connecta a la font d'alimentació on es concreten les condicions d'electroforesi (30 minuts a 2,5 W/gel i 5 hores a 12 W/gel). És important mantenir una temperatura de 20°C durant la electroforesi. Quan acaba l'electroforesi els gels es poden guardar a 4°C amb aigua MiliQ.

ANÀLISI D'IMATGE:

Els gels s'escanegen utilitzant un escàner, Thyphoon 9400 (GE Healthcare) amb el que s'obtenen les imatges a analitzar. Cada gel s'escaneja per a cadascun dels fluorocroms utilitzats Cy2, Cy3 i Cy5 amb longituds d'excitació/emissió de 488/520, 532/580 i 633/670, respectivament. L'estudi posterior de les imatges fluorescents es realitza amb el programa Progenesis SameSpot (Nonlinear Dynamics). Aquest programa produeix a través de les diferents rèpliques del gel estàndard intern, un gel virtual amb el perfil d'expressió proteica global i l'utilitza per fer les comparacions posteriors, localitzar les taques (o spots), determinar la seva intensitat i comparar detalladament els canvis d'expressió entre imatges corresponents a diferents mostres. Els nivells de proteïnes estandarditzats dels diferents grups es comparen mitjançant ANOVA d'un factor i les diferències es consideren significatives amb $p < 0,05$, a més d'un "fold change" > 2 .

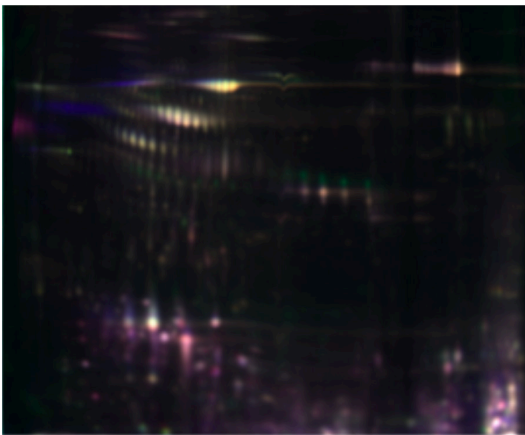


Figura 16. Proteïnes separades segons el seu punt isoelèctric i el pes molecular. Prèviament marcades amb diferents fluorocroms segons l'etiologia de les mostres, en aquest cas proteïnes de plasma seminal d'individus amb seminogrames normals, ATZ i el patró intern per normalitzar els gels mitjançant la tècnica 2D-DIGE.

3.5.4 TINCIÓ AMB PLATA DE PROTEÏNES EN GELS DE POLIACRILAMIDA

BREU DESCRIPCIÓ:

La tinció en plata es basa en la afinitat de les proteïnes pel catió plata. Consta dels següents passos: 1) Fixació, s'immobilitzen les proteïnes en el gel i eliminació de compostos que es troben en el gel i també són afins a la plata. 2) Sensibilització, augmenta la velocitat de la reducció de la plata per tal de millorar la unió entre les proteïnes i la plata. 3) Tinció, s'impregna el gel amb la plata. 4) Revelat, es redueix la plata que està unida a les proteïnes per tal de visualitzar la plata. 5) Aturada, s'atura la reducció de la plata.

PROCEDIMENT:

Després d'escanejar els gels es tenyeixen amb plata per poder identificar i digerir les proteïnes que es pretenen identificar. Per això, es submergeix el gel en una solució de fixació en agitació a 4°C durant 30 minuts. Després es descarta la solució de fixació i s'afegeix la solució de sensibilització durant 30 minuts en agitació suau i, havent descartat la solució de sensibilització, es realitzen 3 rentats de 5 minuts cada un amb aigua Mili-Q. Seguidament, s'afegeix la solució de tinció en agitació durant 20 minuts, es descarta la solució de tinció i es realitzen 2 rentats d'un minut amb aigua Mili-Q. A continuació, s'afegeix la solució de revelat i, en agitació suau, es controla visualment el revelat de les proteïnes en el gel. Posteriorment, es descarta aquesta solució i s'afegeix la solució de detenció durant 10 minuts. Finalment, es descarta aquesta solució i es realitzen 3 rentats de 5 minuts amb aigua Mili-Q. Es conserven els gels en aigua Mili-Q a 4°C. Els gels s'escanejen al GS-800 Calibrated Densitometer (Bio-Rad).

3.5.5 ANÀLISI DE PROTEÏNES PER ESPECTROFOTOMETRIA DE MASSES

Digestió de proteïnes en el gel i identificació de proteïnes

BREU DESCRIPCIÓ:

Consisteix en retallar els spots del gel que són d'interès i incubar-los per separat amb la tripsina que és una proteasa amb un patró de tall conegut, ja que talla per l'extrem carboxil dels residus de lisina i arginina i permet obtenir pèptids d'una mida apropiada per a l'anàlisi per espectrofotometria de masses. L'anàlisi es realitza de manera automàtica acumulant 4 espectres en un rang m/z de 750 a 5000. Els espectres es calibren externament utilitzant una barreja estàndard de 6 pèptids. I quan es detecten els ions corresponents a productes d'autòlisi de tripsina a la intensitat adequada, es fa el calibratge intern de l'espectre. Finalment, en l'anàlisi de MALDI-TOF s'obté un espectre de masses, del qual s'extreu una llista de pics. Aquest llistat s'utilitza per identificar les proteïnes presents en la mostra mitjançant una recerca en bases de dades adequada.

PROCEDIMENT:

Les taques d'interès que hi ha al gel es tallen manualment amb un bisturí en una campana de flux laminar vertical, es trossegen i s'introdueixen en diferents

pouets d'una placa de digestió. En un digestor automàtic (Digest MSPro, Invavis) les composicions de gel que hi ha als pouets de la placa de digestió es renten amb tampó bicarbonat i es deshidraten amb acetonitril (ACN). A continuació, les proteïnes es redueixen amb DTT 10 mM en tampó bicarbonat durant 50 minuts a 25°C i es carbamidometilen les cisteïnes reduïdes amb iodoacetamida 55 mM en un tampó bicarbonat durant 30 minuts a 25°C. Seguidament es renten els trossos de gel i s'incuben 8 hores amb tripsina. Els pèptids generats s'extreuen amb una solució d'ACN/aigua i es dipositen a la placa col·lectora. Es guarden en tubs a -80°C.

Els pèptids s'extreuen usant ACN/H₂O (2:1 v/v) i un 0,1% de TFA. L'espectròmetre de masses que s'utilitza per a visualitzar els pèptids és Voyager DE PRO MALDI-TPF (Applied Biosystems). Una fracció de 0,5 µl l'extracte peptídic i es carrega a les plaques junt amb 0,5 µl de matriu (3 g/L d'àcid cyano-4-hidroxicinnamic en ACN/H₂O (2:1 v/v) i un 0,1% de TFA) i es deixa assecar. Com a estàndard s'utilitza un mix peptídic de des-Arg-1 bradiquina (904,46 g/mol), glu1-fibrinopeptid B(1570,69 g/mol), angiotensin-1 (12996,69 g/mol), hormona adrenocorticotròpica (ACTH) 1-17 (2093,09 g/mol), ACTH 18-39 (2465,20 g/mol) i ACTH 7-38 (3657,93 g/mol). El programa Protein Prospector version 4.27.2 (UCSF Mass Spectrometry Facility) s'utilitza per identificar les proteïnes segons els següents paràmetres: tolerància de la massa dels pèptid, 100 ppm; enzim, tripsina; dos o tres trencaments permesos; modificacions estàtiques, cisteïnes carbamidometilades; modificacions dinàmiques, Glutamines N terminals modificades, oxidacions de metionina i acetilacions en regions N terminals. La base de dades usada és Uniprot i amb criteris estadístics s'identifiquen les proteïnes.

Identificació de proteïnes per LC/MS

BREU DESCRIPCIÓ:

Algunes de les taques del gel en no ser identificades per MALDI-TOF s'identifiquen per LC/MS. Es tracta d'una cromatografia líquida, HPLC (High Performance Liquid Chromatography), que separa els pèptids/proteïnes i posteriorment, els detecta amb l'espectrofotòmetre de masses per així poder identificar diferents proteïnes a partir de mostres més complexes com poden ser bandes de gels monodimensionals o bidimensionals.

PROCEDIMENT:

Els pèptids digerits prèviament es concentren i carreguen en una columna Pep-Map nano(LC Pacjings). Els pèptids s'elueixen amb un gradient d'ACN (Gradient: 0-60% de B en 22 min, B= 80% ACN, 0,1% FA (v/v) en aigua a un flux de 300 nL/min) a través d'una agulla PicoTip fins a la font nESI de la trampa de ions. Els dos pics més intensos de cada escaneig MS es fragmenten per MS/MS adquirint les masses entre 100-2800 m/z. La identificació de les proteïnes es fa usant el Protein Scape 2.1 (Bruker) i el motor de cerca MASCOT 2.0. La base de dades i els paràmetres de cerca que s'usen són els mateixos que en les identificacions per MALDI/TOF.

3.6 IDENTIFICACIÓ DE BIOMARCADORS EN ELS ESPERMATOZOIDES MITJANÇANT LA METODOLOGIA MARCATGE AMB TMT

Per a preparar la mostra, primer es descongela l'aliquota de mostra d'ejaculat durant 30s i es renta la mostra tres vegades amb PBS per extreure el medi de criopreservació, centrifugant a 700 g durant 5 min cada vegada. S'ajusta la concentració a aproximadament 10×10^6 espermatozoides/ml, per això s'observa a l'objectiu de 40X on s'ha de veure uns 10 espermatozoides per camp perquè totes les mostres han de tenir la mateixa concentració d'espermatozoides.

3.6.1 EXTRACCIÓ DE LES PROTEÏNES

En el tub que conté el botó amb els espermatozoides s'afegeix el tampó de lisi (50 mM Tris- HCl, 2% SDS, 10 mM DTT) i s'incuba durant 1 hora i es sonica tres vegades en gel. Les cèl·lules lisades es centrifuguen a 16100 g 15 min a 4 °C i quantifiquen usant Pierce BC protein Assay.

Es rescata el sobrenedant que es tracta amb DTT 30 minuts a 60 °C i amb 55 mM de IAA durant 30 min en condicions de foscor. Seguidament, les proteïnes es precipiten amb acetona durant 15 minuts a -20 °C i es centrifuguen (16100 x g, 4 °C, 15 min) Es tracten amb DTT i es deixen a 60°C durante 30 min.

A continuació, es rescata el sobrenedant que es tracta amb DTT 30 minuts a 60 °C i amb IAA 0.5 M, s'afegeix 1 µl per bloquejar la possible formació de ponts

disulfur. Es deixa reaccionar durant 30 min a la foscor i temperatura ambient. Segueix la precipitació, afegint al acetona al 100% que es deixa a -20°C , 15 min. Es centrifuguen a 4°C durant 15 min a 16100 g i es deixa assecar bé el sediment per procedir al marcatge diferencial isobàric.

3.6.2 MARCATGE AMB TMT

BREU DESCRIPCIÓ:

Les etiquetes isobàriques s'utilitzen per identificar i quantificar canvis relatius en mostres de proteïnes complexes. Es poden utilitzar amb una gran varietat de mostres incloent cèl·lules, teixits i fluids biològics; també permeten l'anàlisi simultània d'un gran nombre de mostres.

Les Tandem Mass Tag (TMT) són etiquetes químiques isobàriques formades per 4 regions: un reporter de masses que té un nombre únic de 13 substitucions de C, una regió d'enfilada escindible, un normalitzador de masses que té una massa única que equilibra la massa de l'etiqueta per fer totes les etiquetes iguals en massa i un grup reactiu als pèptids. Els grups reactius s'uneixen de manera covalent al pèptid N-terminal o als residus de lisina. Cada etiqueta es fragmenta durant MS/MS, produint ions reporters únics i la quantificació de proteïnes s'aconsegueix comparant la intensitat dels ions reporters.

PROCEDIMENT:

El marcatge diferencial isobàric es realitza seguint les instruccions del Kit. El botó es dissolt en TEAB al 50 mM en un volum adequat per tenir la concentració de $[1\mu\text{g}/\mu\text{l}]$. Per a la digestió de 50 μl s'afegeix $1\mu\text{l}$ de tripsina de $[1\mu\text{g}/\mu\text{l}]$ en 25 mM de ABC, i es deixa durant la nit a 37°C amb moviment continu. Abans de l'etiquetatge, es constitueix el control intern agafant la mateixa concentració de proteïnes de cada una les mostres per poder comparar després els resultats entre els diferents anàlisis multiplex (RUN). Els pèptids es dessalen usant una columna Strata X C18 SPE (Phenomenex, California, USA). Cada mostra es marca amb les etiquetes isobàriques, per això, es resuspenen els reactius de TMT10 plex amb 20 μl del dissolvent orgànic (DMSO). Es combinen els pèptids marcats de cada mostra en dos grups multiplex diferents (Run 1 i Run 2) seguint la següent taula:

Taula 6. Disseny experimental de les mostres marcades amb TMT 10 plex.

MOS TRA	CF 1	CF 2	CF 3	CF 4	CF 5	A R1	A R 2	A R 3	A R 4	A R5	AR 1Ao	AR 2A o	AR 3A o	AR 4A o	AR 5A o
TMT- tag 2oul	12 7 N	12 7C	13 0 N	12 7C	13 0 N	12 8 N	12 8C	13 0 C	12 8C	13 0 C	129 N	129 C	131	129 C	131

Incubar a temperatura ambient durant 1 hora i afegir hidroxilamina al 5% durant 15 min. Les mostres es cromatografien individualment amb un experiment curt de 40 minuts per a calcular en funció de la seva intensitat quin volum s'ha de prendre de cada mostra per ajuntar els diferents tags en un sol RUN, en aquest cas tindrem el RUN1 i RUN2 que constaran del següent:

RUN 1: Pool, AR1, AR2, AR3, CF1, CF2, CF3, AR01, AR02, AR03. Una vegada està tot junt es porten a assecat i es reconstitueix en 5 µl de 0,1% d'àcid fòrmic.

RUN 2: Pool, AR4, AR5, CF4, CF5, AR04, AR05. Igual que en l'anterior, una vegada està tot junt es porten a assecat i es reconstitueix en 5 µl de 0,1% d'àcid fòrmic. Les dues piscines multiplex que contenen els pèptids marcats s'assequen en una centrífuga al buit fins a gairebé la sequedat i es suspenen en 20 µL d'àcid trifluoracètic al 0,5% (TFA) en un 5% d'acetonitril. Posteriorment, es dur a terme la purificació de pèptids mitjançant l'ús de columnes de Pierce C18 Spin (Thermo Fisher Scientific) seguint les indicacions del fabricant.

3.6.3 ESPECTROFOTOMETRIA DE MASSES I ANÀLISI NANOLC-MS/MS

Els pèptids etiquetats s'analitzen mitjançant LC-MS/MS amb un LTQ-Orbitrap Velos (Thermo-Fisher Scientific) connectat amb un sistema Eksigent nanoLC ultra 2D plus (AB Sciex, Suïssa). Els pèptids s'injecten a una columna trap C18, (L 2cm, 100 µm ID, 5 µm, Thermoscientific). El gradient s'aplica en línia amb la columna analítica (L 15 cm, 75 µm ID, 3 µm, 100 Å, Thermoscientific). Fase mòvil A (97% H₂O-3%ACN, 0.1 % àcid fòrmic) fase mòvil B (97% ACN-3%H₂O, 0,1% àcid fòrmic). El gradient és el següent (0–5 min 0% to 0% B, 5–120 min 0% to 37% B, 120-125 min 37% fins a 100% B, 125-140 min 100% to 100% B) a un fluxe de 350 nl/min. Posteriorment, per obtenir espectres MS/MS de cada pèptid s'utilitza el LTQ Orbitrap Velos (Thermo Fisher Scientific).

Per a la recerca en la base de dades, els fitxers “raw” es van enviar contra fitxers SwissProt amb seqüències humanes i seqüències de “chicken”, un total de 23.733 proteïnes mitjançant la versió 28.0 de SEQUEST HT (Thermo Fisher Scientific). La tripsina/P es va especificar com a enzim de clivatge que permet fins a 2 clivatges que falten. La tolerància de massa per a ions precursors es va fixar en 20. Els residus de carbamidometil a Cys es van especificar com a modificació fixa i l'oxidació a Met es va especificar com a modificacions variables.

Es va ajustar un criteri d'identificació de proteïnes al 5% de FDR (false discovery rate) amb almenys un pèptid únic per proteïna. La normalització de la quantificació relativa de proteïnes es va calcular mitjançant la proporció entre les intensitats d'ions reportades corresponents a cada mostra individual i la intensitat d'ions del control intern. Per minimitzar l'efecte de la contaminació de les mostres, s'han exclòs de l'anàlisi de normalització aquells espectres identificats com a proteïnes derivades de Gallus gallus provinents del medi de crioperservació i del plasma seminal. La proteïna expressada diferencialment (DEP) s'identifica com aquella amb un canvi de més de 1,5 vegades com a valor de tall amb una $P < 0,05$ calculada per la prova-t de Student.

3.7 ANÀLISI ESTADÍSTICA

Tots els mètodes i procediments que s'han emprat per a la classificació i anàlisi de les dades i variables plantejats així com, la inferència estadística s'han realitzat mitjançant el programa d'anàlisi estadística SPSS (Statistical Package for Social Sciences). L'estudi de la normalitat de les variables analitzada es realitza mitjançant els test Kolmogorov-Smirnov i Shapiro-Wilks d'acord la grandària mostral obtinguda. El càlcul del valor de significació estadística per les variables paramètriques es determina segons el tipus de comparació, mitjançant, el test T de Student i ANOVA d'un factor. Per a les comparacions no paramètriques s'utilitzen els tests equivalents, test U de Mann-Whitney i test de Kruskal-Wallis. Per a les correlacions es fa el test de Spearman i quan el p-valor obtingut és igual o inferior a 0,05 es considera que les variables correlacionen. Per valorar el poder de predicció d'una variable es representa la corba ROC (Receiver Operating Characteristic) i si l'àrea per sota la corba és major de 0,7 es considera que la variable té un poder de predicció satisfactori.

Per a l'anàlisi de la imatge dels gels s'ha utilitzat la imatge de Cy2, en la que hi ha les mostres del patró intern, com a referència, que a més presenta les taques molt més ben definides que la resta d'imatges i s'alineen amb aquesta com a referència. El software calcula el volum de normalitat de les taques i s'ha corregit respecte la mediana de la seva dispersió. Posteriorment, es creen els diferents grups per comparar els gels: els nivells de proteïnes identificades en els gels estandarditzats dels diferents grups es comparen mitjançant l'ANOVA d'un factor i les diferències significatives amb $p < 0,05$, a més d'un "fold change" > 2 .

Per a l'anàlisi de les proteïnes analitzades per marcatge isobàric TMT, la identificació i quantificació es realitza mitjançant el Proteome Discover 1.4 validant mínim 2 pèptids per proteïna marcada amb un FDR d'1% o menys i almenys un pèptid únic per proteïna. Per trobar aquelles proteïnes diferencials es calcula el fold-change que consta del \log_2 de la ràtio de les mitjanes de les intensitats dels ions del marcatge isobàric i es normalitzen les dades. Es consideren diferencials aquelles proteïnes que tenen un fold-change $> 1,5$ o per sota de $0,67$ i una $p < 0,05$ mesurada per t-Student.

3.8 BIOINFORMÀTICA

S'utilitza la base de dades Uniprot que ofereix informació bàsica sobre les proteïnes com el nom, el gen, la funció, etc. La interfase PANTHER, dóna informació sobre la funció tant biològica com molecular i la localització. També s'utilitza el programa STRING 11.0 (Jensen et al., 2009) per determinar possibles interaccions entre les proteïnes expressades diferencialment. Aquest programa rastreja interaccions entre proteïnes de tipus directe (físiques) i indirecta (funcionals), tant teòriques com experimentals, recopilades a partir de fonts genòmiques, dades experimentals i de co-expressió, que es troben recopilades en nombroses bases de dades com són: KEGG i GO. Aquest conjunt d'interaccions predefinides es complementen amb interaccions predites per models computacionals d'associació funcional i co-expressió.

3.9 DISSENY EXPERIMENTAL

3.9.1 DISSENY EXPERIMENTAL DE L'ESTUDI 1:

En total s'analitzen 91 mostres de semen, d'aquestes 11 són controls fèrtils, 17 són normozoosèmics infèrtils, 21 són astenoteratozoospermics, 16 astenozoospermics, 19 teratozoospermic i 10 azoospermics (Taula 7). La mostra es separa en dues fraccions per centrifugació: els espermatozoides, que s'analitzen mitjançant l'assaig Cometa per a valorar la seva fragmentació del DNA i el plasma seminal, que s'analitza mitjançant la tècnica SRED, per a valorar la presència d'activitat nucleasa.

Taula 7. Característiques del seminograma i fragmentació de l'ADN dels espermatozoides de les mostres de semen emprades per a l'estudi 1.

Patologia	n	SMN Espermatozoides totals (10 ⁷ /ml)	SMN Mobilitat	SMN Morfologia	SDF Cometa alcalí	SDF Cometa neutre
Controls fèrtils	11	122,81 ± 61,01	50,38 ± 10,24	9,20 ± 3,87	21,31 ± 9,99	70,75 ± 25,66
SMN	17	107,47 ± 51,62	53,22 ± 6,81	19,53 ± 11,43	46,37 ± 8,36	56,08 ± 16,48
ASZ	16	86,17 ± 42,75	21,31 ± 6,95	6,38 ± 2,06	58,77 ± 12,04	59,53 ± 8,53
TZ	19	86,83 ± 48,19	41,18 ± 9,81	1,74 ± 0,93	52,53 ± 12,79	58,95 ± 14,52
ATZ	21	44,19 ± 24,89	16,85 ± 8,03	1,52 ± 1,12	61,67 ± 8,83	74,50 ± 8,74
A	10	-	-	-	-	-

3.9.2 DISSENY EXPERIMENTAL DE L'ESTUDI 2:

Per a trobar biomarcadors proteics d'infertilitat masculina, en el present treball s'analitza, mitjançant tècniques proteòmiques 2D-DIGE, el plasma seminal de 24 mostres procedents de 6 individus normozoospermics amb fertilitat provada, 6 pacients amb seminograma astenoteratozoospermic, 6 pacients amb astenoteratozoospermia i amb varicocele i per últim, 6 pacients normozoospermics amb historial clínic d'avortaments de repetició i sense factor de risc femení aparent (Taula 8).

Taula 8. Característiques del seminograma i fragmentació de l'ADN dels espermatozoides de les mostres de semen emprades per a l'estudi 2.

Patologia	n	SMN Espermatozoides totals (10 ⁶ /ml)	SMN Mobilitat	SMN Morfologia	SDF Cometa alcalí	SDF Cometa neutre	SCD test
Controls fèrtils	6	132,43 ± 73,82	53,69 ± 13,31	8,53 ± 4,76	23,53 ± 10,46	12,36 ± 4,31	<0,33
Avortaments de repetició	6	97,21 ± 96,31	49,21 ± 8,41	14,13 ± 12,33	36,73 ± 16,42	62,74 ± 12,47	<0,33
ATZ	6	53,19 ± 24,89	19,76 ± 9,52	2,63 ± 1,12	67,29 ± 12,66	74,29 ± 5,91	<0,33
ATZ-VAR	6	42,51 ± 63,57	12,45 ± 6,13	1,22 ± 1,44	71,22 ± 5,91	86,59 ± 11,83	<0,33

3.9.3 DISSENY EXPERIMENTAL DE L'ESTUDI 3:

S'analitzen els espermatozoides de mostres de 5 individus normozoospermics amb fertilitat provada, 5 pacients normozoospermics amb historial clínic d'avortaments de repetició sense factor de risc femení aparent abans i després d'un tractament amb antioxidants orals durant 3 mesos (Taula 9). Per a trobar biomarcadors proteics d'infertilitat masculina mitjançant la tècnica de marcatge amb TMT.

Taula 9. Característiques de la fragmentació de l'ADN dels espermatozoides de les mostres de semen emprades per a l'estudi 3.

Patologia	n	SDF Comet alcalí	SDF Comet neutre
Controls fèrtils	5	37,4 ± 12,64	51,60 ± 14,18
Avortaments de repetició	5	43,8 ± 11,07	75,6 ± 4,04
Avortaments de repetició després de tractament amb antioxidants	5	43,6 ± 1,51	64,2 ± 6,09

4. RESULTATS

4.1 ARTICLE I: CHARACTERIZATION OF NUCLEASE ACTIVITY IN HUMAN SEMINAL PLASMA AND ITS RELATIONSHIP TO SEMEN PARAMETERS, SPERM DNA FRAGMENTATION AND MALE INFERTILITY

RESULTATS DE L'OBJECTIU GENERAL 1: Article I

“Characterization of nuclease activity in human seminal plasma and its relationship to semen parameters, sperm dna fragmentation and male infertility”

Autors: Alba Fernandez-Encinas, Agustín García-Peiró, Jordi Ribas-Maynou, Carlos Abad, Maria José Amengual, Joaquina Navarro, Jordi Benet.

Revista: Journal of Urology (2016);195(1):213-9.

Characterization of Nuclease Activity in Human Seminal Plasma and its Relationship to Semen Parameters, Sperm DNA Fragmentation and Male Infertility

Alba Fernandez-Encinas, Agustí García-Peiró, Jordi Ribas-Maynou, Carlos Abad, María José Amengual, Joaquina Navarro and Jordi Benet*

From the Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia (AF-E, JR-M, JN, JB) and Centro de Infertilidad Masculina y Análisis de Barcelona, Universitat Autònoma de Barcelona (AG-P), Bellaterra and Servei d'Urologia (CA) and UDIAT, Centre Diagnòstic (MJA), Corporació Sanitària Parc Taulí, Sabadell, Institut Universitari Parc Taulí-Universitat Autònoma de Barcelona, Sabadell, Spain

Purpose: Some studies have shown that complementary biomarkers are needed in semen analysis to provide a more accurate diagnosis for couples with infertility problems. To our knowledge no study has been done to determine the relationships among nuclease activity in seminal plasma, semen parameters, sperm DNA fragmentation and male infertility.

Materials and Methods: A total of 94 semen samples were collected according to WHO 2010 semen analysis parameters. Samples were analyzed using the single radial enzyme diffusion method for nuclease activity in seminal plasma, and alkaline and neutral Comet assay for sperm DNA fragmentation. Samples were obtained from 11 fertile donors with proven fertility, 17 patients with normozoospermia in an infertile couple, and 16 patients with asthenozoospermia, 19 with teratozoospermia, 21 with asthenoteratozoospermia and 10 with azoospermia.

Results: Nuclease activity analyzed in seminal plasma was higher in patients than in controls. It correlated with sperm motility and morphology, and sperm DNA fragmentation measured by the alkaline Comet assay. No correlation with sperm DNA fragmentation was measured by the neutral Comet assay. ROC curves to determine male infertility revealed 0.658 sensitivity, 0.727 specificity and 0.705 cm² AUC for the single radial enzyme diffusion method, 0.918, 1 and 0.994 cm² for the alkaline Comet assay, and 0.917, 0.250 and 0.373 cm², respectively, for the neutral Comet assay.

Conclusions: Nuclease activity in seminal plasma corrected by sperm count is a good variable to predict male infertility. Results indicate that it could be a useful complementary parameter for male infertility diagnosis.

Key Words: testis; sperm count; infertility, male; DNA fragmentation; semen

TRADITIONAL macroscopic and microscopic semen analyses can provide an estimate of the fertilization ability of a sperm sample. However, they are not always sufficient for complete

diagnosis as in cases of idiopathic infertility, for which new biomarkers are needed. Recently sperm DNA fragmentation was introduced as a supplementary biomarker.^{1,2}

Abbreviations and Acronyms

ASZ = asthenozoospermia
ATZ = asthenoteratozoospermia
AZ = azoospermia
dsSDF = double-stranded SDF
ROS = reactive oxygen species
SDF = sperm DNA fragmentation
SMN = normozoospermia in infertile couple
SRED = single radial enzyme diffusion
ssSDF = single-stranded SDF
TZ = teratozoospermia

Accepted for publication July 23, 2015.
No direct or indirect commercial incentive associated with publishing this article.
The corresponding author certifies that, when applicable, a statement(s) has been included in the manuscript documenting institutional review board, ethics committee or ethical review board study approval; principles of Helsinki Declaration were followed in lieu of formal ethics committee approval; institutional animal care and use committee approval; all human subjects provided written informed consent with guarantees of confidentiality; IRB approved protocol number; animal approved project number.

Supported by ISCIII (Healthy Ministry, Madrid) Project PI14/00119 and Generalitat de Catalunya Project 2014SGR003.

* Correspondence: Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain (telephone: +34 935811773; FAX: +34 935811025; e-mail: jordi.benet@uab.cat).

The main purpose of the sperm cell is transmission of the paternal genome to the embryo. Therefore, sperm DNA integrity should have a key role in oocyte fecundation and subsequent proper development of the embryo and fetus.³ In addition DNA repair mechanisms in the sperm cell are almost nonexistent and it seems obvious that the oocyte could have limited ability to repair a severely damaged paternal genome. Moreover oocyte quality decreases with maternal age.⁴ Thus, if proper DNA repair does not exist in the first stages of embryo development, the embryo may be blocked, consequently resulting in a decreased pregnancy rate, especially for assisted reproduction techniques.⁵ Furthermore, sperm DNA damage caused slower embryo replication and chromosomal alterations in a recent study in mice.⁶

There are many techniques to assess sperm DNA fragmentation, such as the sperm chromatin structure assay,⁷ the TUNEL assay,⁸ the sperm chromatin dispersion test⁹ and the Comet assay¹⁰ among others. The Comet assay uses single cell gel electrophoresis and relies on the migration of fragmented DNA into the anode in an electrophoretic field before sperm nuclear decondensation. Therefore, the decondensation and electrophoresis steps give this technique greatly increased sensitivity and the singularity of being able to perform this assay under neutral or denaturing conditions. The 2-tailed Comet assay was developed to distinguish between double-stranded and single-stranded DNA breaks.¹¹ A previous study showed that SDF induced by hydrogen peroxide, which simulates ROS, had threefold greater alkalinity than the neutral Comet assay.¹² That study indicated that the alkaline Comet assay detects mostly ssSDF while SDF induced by Alu I, which causes mainly dsSDF, was twofold higher in the neutral Comet assay.¹²

Several mechanisms have been described as causes of sperm DNA damage.^{13,14} 1) Defects in selective apoptosis produced by Sertoli cells, which control overproduction of germ cells during spermatogenesis, may lead to an increased number of ejaculates with sperm DNA damage.¹⁵ 2) There may be defects in chromatin remodeling in which histones are replaced by protamines during spermiogenesis. Errors in this sperm specific process could result in breaks in the DNA of spermatozoa.¹⁶ 3) Low levels of ROS are necessary for sperm maturation and capacitation, and the acrosome reaction, although high ROS levels cause damage to cellular structures and sperm DNA. 4) There may be activation of caspases and endonuclease, which produces irreversible DNA damage.¹⁷ 5) Exposure to toxic substances in the environment or chemotherapeutic and/or radiotherapeutic drugs, among others, increases sperm DNA damage.¹⁸ Nevertheless, the details of how

sperm DNA occurs are still unsolved. Few studies have been done of the relation between nuclease action and SDF.

Nucleases are involved in multiple physiological processes such as DNA repair, apoptosis and DNA cleavage on topoisomerases. Each process requires different conditions to hydrolyze DNA and the level of activity shows clear differences when comparing tissues or body fluids. In humans urine and ejaculate are the body fluids that show the most nuclease activity.¹⁹

A study in ejaculated and epididymal samples of mammals revealed that the sperm cell can internalize exogenous DNA in sperm mediated transgenesis.²⁰ However, in response to this internalization an endonuclease present in the sperm cell completely degrades this external DNA.

A study using the plasmid degradation assay in mouse seminal plasma samples later demonstrated nuclease activity in spermatozoa and seminal plasma from the epididymis and the ejaculate, which was greater in the latter.²¹ That group also noted topoisomerase II DNA cleavage activation in epididymal and vas deferens spermatozoa, which degrades DNA into loop-sized fragments. This cleavage is reversible by ethylenediaminetetraacetic acid in epididymal sperm but not in vas deferens sperm, where the nuclease would degrade the DNA in an irreversible manner.²²

There are numerous techniques to evaluate nuclease activity in body fluids, including SRED, the plasmid degradation assay, the fluorimetric assay and zymography among others. In this study we used the SRED method,¹⁹ consisting of the formation of a dark circle of digested DNA when nucleases from samples are diffused radially in a matrix of agarose, DNA and ethidium bromide.

The objectives of the current study were to assess nuclease activity using the SRED method in seminal plasma in fertile and infertile groups classified by semen analysis. We also sought to establish a correlation among seminal plasma nuclease activity, semen parameters and sperm DNA fragmentation. Finally, we assessed the potential of the SRED method to predict male infertility.

MATERIALS AND METHODS

Sample Collection and Preparation

A total of 94 semen samples were collected from 11 donors with proven fertility who served as controls, 17 patients with SMN in an infertile couple, and 16 patients with ASZ, 19 with TZ, 21 with ATZ and 10 with AZ according to 2010 WHO guidelines (table 1). All samples were collected by masturbation after 2 to 5 days of recommended abstinence. Written informed consent was obtained from all patients and the study was approved by the ethics committee of the Corporació Sanitària Parc Taulí de Sabadell, Barcelona.

Table 1. Characteristics of patients and semen analysis in all groups

Sperm*	Mean \pm SD Control	Mean \pm SD SMNT	Mean \pm SD ASZ	Mean \pm SD TZ	Mean \pm SD ATZ
No. pts	11	17	16	19	21
Count (10^6 /ml)	122.81 \pm 61.01	107.47 \pm 51.62	86.17 \pm 42.75	86.83 \pm 48.19	44.19 \pm 24.89
% Progressive motility	50.38 \pm 10.24	53.22 \pm 6.815	21.31 \pm 6.95	41.18 \pm 9.81	16.85 \pm 8.03
% Vitality	78.32 \pm 13.54	80.29 \pm 11.43	52.56 \pm 18.23	77.58 \pm 11.64	50.33 \pm 20.12
% Normal morphology	9.20 \pm 3.87	19.53 \pm 11.43	6.38 \pm 2.06	1.74 \pm 0.93	1.52 \pm 1.12

* Obstructive AZ in 2 of 10 patients with AZ (no statistical difference vs nonobstructive AZ).

† Excluding common pathological conditions, eg clinical varicocele, infection and follicle-stimulating hormone.

After liquefaction routine semen analysis was performed and the semen was divided into 2 aliquots. Unprocessed semen sample (500 μ l) was cryopreserved with TEST (TES and tris) yolk buffer composed of 14% glycerol, 30% egg yolk, 1.98% glucose and 1.72% sodium citrate, and centrifuged at $13,300 \times$ gravity for 20 minutes at 4C. The resulting supernatant was aspirated and stored at -80°C until use.

SRED Method

This method is an adaptation of a previously applied procedure¹⁹ based on radial diffusion of the fluid containing enzymes in agarose gel containing DNA as substrate. Agarose gel was prepared to a concentration of 1% in 10 ml buffer composed of 20 mM tris, 5 mM CaCl_2 and 5 mM MgCl_2 , pH 7.3, containing 2.5 ml salmon testis DNA (2 mg/ml) (Sigma-Aldrich®) and 3 ml ethidium bromide. The mixture (2 ml) was distributed on a slide and the gel was solidified at room temperature. Wells 0.3 mm in diameter were cut, 5 μ l of the seminal plasma sample were dispensed in the wells and slides were incubated at 37C in a moist chamber for 24 hours.

The area of dark circles of hydrolyzed DNA was photographed and analyzed with ImageJ, version 1.34n (<http://rsb.info.nih.gov/ij>). In the area of the halo the length of the diameter of 6 axes separated by 30 degrees was measured and the average of these 6 values was calculated to obtain the mean value. Each sample was also replicated to decrease error.

To determine the equivalent activity of enzyme in the seminal plasma a calibration curve was performed

with known concentrations of bovine pancreatic DNase (20 $\times 10^3$, 25 $\times 10^3$, 35 $\times 10^3$, 50 $\times 10^3$, 65 $\times 10^3$, 75 $\times 10^3$, 90 $\times 10^3$, 100 $\times 10^3$, 110 $\times 10^3$, 125 $\times 10^3$, 135 $\times 10^3$ and 150 $\times 10^3$ Kunitz U). The halo of each sample was extrapolated (fig. 1). Nuclease activity is expressed in total Kunitz U and in relation to the sperm count as total Kunitz U per sperm count.

Comet Assay

The Comet assay (single cell gel electrophoresis) measures the amount of DNA damage in a single cell. In this study it was applied to sperm cells to measure SDF and performed using the protocol previously described in alkaline and neutral conditions.^{12,23} After staining with DAPI SlowFade® Gold Antifade and using an AX70 fluorescence microscope (Olympus®) a total of 400 spermatozoa per sample were classified as fragmented or not fragmented according to previously reported criteria.¹² Results are expressed as the percent of SDF.

Statistical Analysis

Data were analyzed with SPSS®, version 15. Descriptive statistical analysis of variables was performed. To determine differences in enzyme activity between groups the Mann-Whitney U test was used with the 99% CI ($p < 0.01$). Alternatively the Spearman test was applied to assess correlations between all variables. To assess sensitivity, specificity and AUC of the method according to fertility outcomes a ROC curve was constructed. The Youden index was used to select the optimum cutoff value.

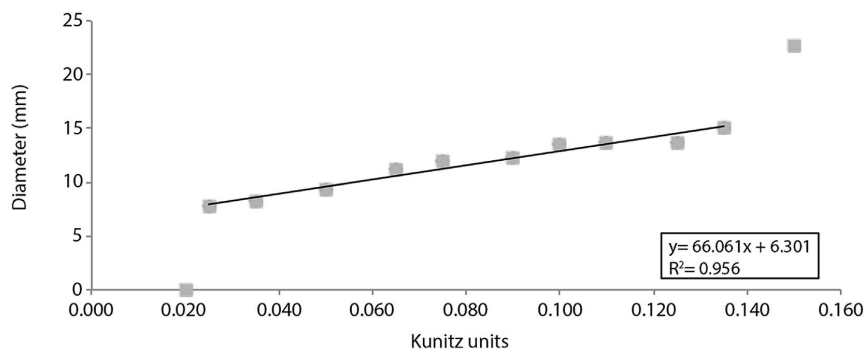


Figure 1. Calibration curve of bovine pancreatic DNase I measured by SRED

RESULTS

Assessments

Nuclease Seminal Plasma Concentration. To estimate nuclease activity of seminal plasma and determine the equivalent nuclease activity we created a calibration curve with known concentrations of bovine pancreatic DNase I (fig. 1). Results revealed differences in total nuclease activity in seminal plasma among the clinical groups (table 2 and fig. 2, A). Although there were no statistically significant differences ($p > 0.05$), the highest total nuclease activity was found in patients with ATZ and TZ (mean \pm SD 0.153 ± 0.019 and 0.158 ± 0.041 Kunitz U, respectively). Patients with SMN and ASZ showed values similar to those of fertile donors (mean 0.114 ± 0.016 , 0.121 ± 0.029 and 0.130 ± 0.016 Kunitz U, respectively, $p > 0.05$). No difference was found in patients with obstructive vs nonobstructive AZ. The AZ group, which showed the lowest nuclease activity (mean 0.085 ± 0.017 Kunitz U), was the only group that statistically differed from the other groups ($p < 0.01$).

Since part of the nuclease activity in the seminal plasma might be endogenous to sperm, total nuclease activity was expressed in relation to the sperm count (table 2 and fig. 2, B). This nuclease activity was greatest in the ATZ group compared to fertile donors, and to patients with SMN, TZ and ASZ (0.0042 ± 0.0024 Kunitz U per sperm count vs 0.0014 ± 0.0008 , 0.0014 ± 0.0009 , 0.0026 ± 0.0021 and 0.0019 ± 0.0014 , respectively, $p < 0.05$)

SDF Determined by Comet Assay. Mean ssSDF assessed by alkaline Comet assay statistically differed between fertile donors and all infertile patients, including those with ATZ, TZ, ASZ and SMN ($21.31\% \pm 9.99\%$ vs $61.67\% \pm 8.83\%$, $52.53\% \pm 12.79\%$, $58.77\% \pm 12.04\%$ and $46.37\% \pm 8.36\%$, respectively, $p < 0.05$). Mean dsSDF assessed by neutral Comet assay did not statistically differ between fertile donors and infertile patients with ATZ, TZ, ASZ and SMN ($70.75\% \pm 25.66\%$ vs $74.50\% \pm 8.74\%$, $58.95\% \pm 14.52\%$, $59.53\% \pm 8.53\%$

and $56.08\% \pm 16.48\%$, respectively, $p > 0.05$, table 2 and fig. 3).

Seminal Plasma Nuclease Activity Correlations with Variables

Table 3 lists correlations between SDF and total nuclease activity in seminal plasma or nuclease activity by sperm count and as expressed by the Spearman coefficient.

Total nuclease activity correlated statistically significantly only with sperm morphology (normal $r = 0.468$, $p < 0.001$ and abnormal $r = 0.422$, $p < 0.001$). No correlation was found between total nuclease activity and other semen parameters or SDF. On the other hand nuclease activity corrected by sperm count significantly correlated with sperm motility (progressive $r = 0.458$, nonprogressive $r = 0.603$, $p < 0.001$ and immobile $r = 0.535$, $p < 0.001$) and sperm morphology (normal $r = 0.458$, $p < 0.001$ and abnormal $r = 0.460$, $p < 0.001$). It mildly correlated with vitality ($r = 0.360$, $p < 0.001$) and ssSDF measured by alkaline Comet assay ($r = 0.315$, $p = 0.004$). There was no correlation with dsSDF measured by neutral Comet assay ($r = 0.042$, $p = 0.704$).

ROC Analysis

ROC analysis to determine male infertility demonstrated that sensitivity, specificity, the ROC AUC and the cutoff value were 0.658, 0.727, 0.705 cm^2 and 0.00152 Kunitz U, respectively, for nuclease activity corrected by sperm count. They were 0.732, 0.929, 0.994 cm^2 and 52.6%, respectively, for ssSDF measured by the alkaline Comet assay, and 0.917, 0.250, 0.373 cm^2 and 43.25%, respectively, for dsSDF measured by the neutral Comet assay (fig. 4).

DISCUSSION

Total Nuclease Activity in Seminal Plasma Correlated with Variables

Results show that nuclease activity existed in seminal plasma and also in all analyzed groups. The lowest total nuclease activity, which statistically

Table 2. Nuclease activity and SDF in groups

Group	No. Pts	Mean \pm SD No. Kunitz U		Mean \pm SD % Comet SDF	
		Total	Per Sperm Count	Alkaline	Neutral
Fertile control	11	$0.130 \pm 0.016^*$	$0.0014 \pm 0.0008†$	21.31 ± 9.99	70.75 ± 25.66
SMN	17	$0.114 \pm 0.016^{*†}$	$0.0014 \pm 0.0009†$	$46.37 \pm 8.36†$	$56.08 \pm 16.48†$
ASZ	16	$0.121 \pm 0.029^*$	$0.0019 \pm 0.0014†$	$58.77 \pm 12.04†$	$59.53 \pm 8.53†$
TZ	19	$0.158 \pm 0.041^*$	$0.0026 \pm 0.0021†$	$52.53 \pm 12.79†$	$58.95 \pm 14.52†$
ATZ	21	$0.153 \pm 0.019^*$	0.0042 ± 0.0024	$61.67 \pm 8.83†$	74.50 ± 8.74
AZ	10	0.085 ± 0.017	e	e	e

* Significantly different vs AZ ($p < 0.01$).

† Significantly different vs ATZ ($p < 0.01$).

‡ Significantly different vs fertile control ($p < 0.01$).

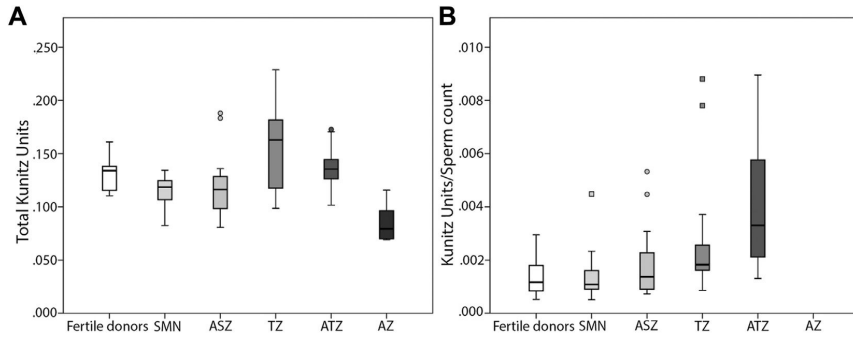


Figure 2. Total nuclease activity (A) and nuclease activity corrected by sperm count (B) measured by SRED in clinical groups

differed from the other groups, was observed in patients with AZ. We believe that nuclease activity in this group must be inherent, provided by seminal components such as the prostate and seminal fluid.

While in humans to our knowledge nuclease activity has not yet been evaluated in different constituents of semen, in animals it was observed that nuclease activity in bulls is higher in prostatic fluid and epididymal sperm.²⁴ In mice it is higher in ejaculate than in the epididymis.²¹ Therefore, levels of nuclease activity in each component of semen are different and vary by species.

On one hand when nuclease activity in the AZ group was compared to that in other groups of patients and donors, significantly decreased activity was observed. On the other hand the correlation between total nuclease activity and sperm count was slight (table 3). Furthermore, this correlation

increased when determined only in the ATZ and TZ groups, which had abnormal sperm morphology ($r = 0.317, p < 0.045$). These facts indicate that higher nuclease activity could have a sperm endogenous origin due to damaged and dead sperm rather than an exogenous origin. In a previous study in which qualitative nuclease activity was found endogenous and exogenous nuclease origins were also identified.²² However, the methodological approach in the current series did not enable us to quantitatively differentiate between nuclease activities. It could be interesting to find different involvement in sperm DNA fragmentation by differentiating endogenous from exogenous nucleases.

Nuclease Activity in Seminal Plasma Corrected by Sperm Count and Correlated with Variables

When nuclease activity in infertile patients was corrected by sperm count, nuclease activity increased as more sperm parameters were altered (fig. 2, B). The SMN and fertile donor groups had similar nuclease activity, indicating that nuclease

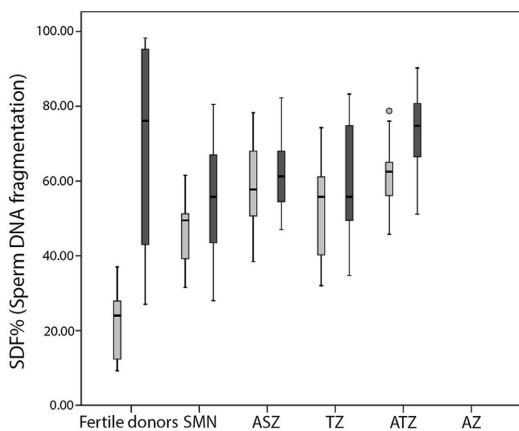


Figure 3. Alkaline (light gray bars) and neutral (dark gray bars) Comet assay SDF in clinical groups.

Table 3. Correlations between nuclease activity and variables

	No. Kunitz U		No. Kunitz U/Sperm Count	
	Spearman r	p Value	Spearman r	p Value
% Comet assay SDF:				
Alkaline	0.046	0.677	0.315*	0.004
Neutral	0.152	0.168	0.042	0.704
Sperm count (10 ⁶ /ml)	0.224*	0.030	e 0.935†	< 0.001
% Sperm motility:				
Progressive	e 0.127	0.249	e 0.433†	< 0.001
Nonprogressive	0.060	0.589	e 0.604†	< 0.001
Immotile	0.052	0.640	0.535†	< 0.001
% Vitality	e 0.094	0.421	e 0.360*	< 0.001
% Sperm morphology:†				
Normal	e 0.468	0.000	e 0.458	< 0.001
Abnormal	0.417	0.000	0.463	< 0.001

* Significant correlation ($p < 0.05$).
 † Significant correlation ($p < 0.01$).

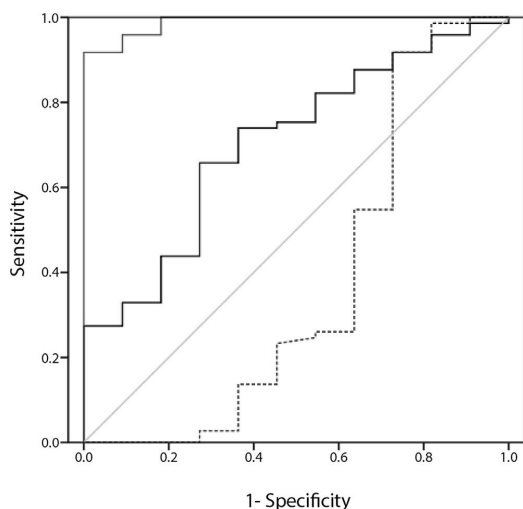


Figure 4. ROC curve of infertility status of nuclease activity corrected by sperm count Kunitz U (black curve), and percent SDF of alkaline (dark gray curve) and neutral (light gray curve) Comet assays. Diagonal line represents reference line.

activity is related to alterations in semen parameters.

Patients in whom sperm morphology as well as motility were affected showed higher levels of nuclease activity by sperm count (table 2). In these groups the contribution of endogenous nuclease would be higher than in the remaining groups. This fact is in agreement with the idea that loss of membrane integrity caused by ROS would be needed to degrade DNA through the nuclease pathway.^{25,26}

Moderate and statically significant correlations were observed of seminal plasma nuclease activity by sperm count with motility and morphology (table 3). These correlations agreed with the findings of other studies related to an apoptosis-like process with DNA fragmentation, motility and morphology of spermatozoa.²⁷

Moreover, statistically significant correlations were found between nuclease activity, and alkaline SDF and vitality. Therefore, the presence of nucleases in seminal fluid is most associated with an increase in ssSDF. A plausible explanation could be that nucleases are released from dead or defective sperm cells that show extensively damaged DNA produced by ROS. Once in the fluid the nucleases could degrade free external DNA. This would also explain the lack of correlation with the sperm count as well as the lower value in the normal semenogram group.

In addition, dsSDF measured by the neutral Comet assay revealed no correlation with nuclease activity, suggesting that dsSDF and seminal plasma nuclease activity are not related. Thus, dsSDF could be more associated with the action of a nonreleased endogenous nuclease than of an external nuclease. This type of DNA damage could have a physiological role because it would be needed for proper replacement of protamines by histones after fertilization. Moreover the ability of the machinery of the oocyte/early embryo to repair this type of damage is not related to fertilization. In fact the neutral Comet assay showed no association with male infertility.²⁸

Sperm DNA Fragmentation

In the current study specific SDF profiles are provided not only for the ATZ group, which we previously studied,¹² but also for semen samples from infertile patients in the SMN, ASZ and TZ groups. They showed an increasing incidence of DNA damage (ssSDF) when more semen parameters were altered. Moreover, while dsSDF measured by the neutral Comet assay revealed high values in some fertile controls and infertile groups, ssSDF by the alkaline Comet assay demonstrated higher values only in infertile patient groups, indicating poor prognosis for pregnancy. This is in agreement with previous results.^{12,29}

We found great variability in dsSDF in fertile donors by the neutral Comet assay, in accord with previous results of our group showing similar variability.³⁰

Infertility Prediction by ROC Curve

According to the predictive power of these assays the alkaline Comet assay was found to be a good predictor of male infertility while the neutral Comet assay had no relation to pregnancy but rather was related to the miscarriage risk.³⁰ In the current study a ssSDF threshold value of 52.6% was found for the alkaline Comet assay. This is in agreement with previous results from our group,²⁸ although other infertile patients with SMN, ASZ or TZ were included in the current study.

In this scenario the analysis of nuclease activity in seminal plasma shows good predictive values that are useful for diagnosis (ROC AUC 0.705). However, sensitivity and specificity did not reach alkaline Comet assay values. Thus, analyzing nuclease activity in seminal plasma would be useful to obtain information on etiology and provide better reproductive counseling.

CONCLUSIONS

Although nuclease activity is considered one of the critical factors to produce DNA damage, no

correlation between nuclease activity corrected by sperm count and SDF measured by the neutral Comet assay was found. In contrast vitality and SDF measured by the alkaline Comet assay correlated, indicating that nuclease activity could have a role in quality control of the damaged sperm. Moreover nuclease activity in seminal plasma shows predictive

potential considering its possible use as a parameter complementary to semen analysis. It could improve the diagnosis of idiopathic male infertility.

ACKNOWLEDGMENTS

Chuck Simmons revised the manuscript in English.

REFERENCES

- Zini A, Bielecki R, Phang D et al: Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men. *Fertil Steril* 2001; **75**: 674.
- Omran HM, Bakhiet M and Dashti MG: DNA integrity is a critical molecular indicator for the assessment of male infertility. *Mol Med Rep* 2011; **95**: 124.
- Meseguer M, Santiso R, Garrido N et al: Effect of sperm DNA fragmentation on pregnancy outcome depends on oocyte quality. *Fertil Steril* 2011; **95**: 124.
- Aitken RJ, De Iulius GN and McLachlan RI: Biological and clinical significance of DNA damage in the male germ line. *Int J Androl* 2009; **32**: 46.
- Zini A, Meriano J, Kader K et al: Potential adverse effect of sperm DNA damage on embryo quality after ICSI. *Hum Reprod* 2005; **20**: 3476.
- Gawecka JE, Marh J, Ortega M et al: Mouse zygotes respond to severe sperm DNA damage by delaying paternal DNA replication and embryonic development. *PLoS One* 2013; **8**: e56385.
- Evenson DP, Larson KL and Jost LK: Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J Androl* 2002; **23**: 25.
- Gorczyca W, Gong J and Darzynkiewicz Z: Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. *Cancer Res* 1993; **53**: 1945.
- Fernández JL, Muriel I, Goyanes V et al: Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertil Steril* 2005; **84**: 833.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR et al: A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1988; **175**: 184.
- Enciso M, Sarasa J, Agarwal A et al: A two-tailed Comet assay for assessing DNA damage in spermatozoa. *Reprod Biomed Online* 2009; **18**: 609.
- Ribas-Maynou J, García-Peiró A, Abad C et al: Alkaline and neutral Comet assay profiles of sperm DNA damage in clinical groups. *Hum Reprod* 2012; **27**: 652.
- Sakkas D and Alvarez JG: Sperm DNA fragmentation mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil Steril* 2010; **93**: 1027.
- Aitken RJ and De Iulius GN: On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 2010; **16**: 3.
- Sakkas D, Seli E, Manicardi GC et al: The presence of abnormal spermatozoa in the ejaculate: did apoptosis fail? *Hum Fertil (Camb)* 2004; **7**: 99.
- McPherson SM and Longo FJ: Nicking of rat spermatid and spermatozoa DNA: possible involvement of DNA topoisomerase II. *Dev Biol* 1993; **158**: 122.
- Said TM, Paasch U, Glander HJ et al: Role of caspases in male infertility. *Hum Reprod Update* 2004; **10**: 39.
- Evenson DP and Wixon R: Environmental toxicants cause sperm DNA fragmentation as detected by the Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA). *Toxicol Appl Pharmacol* 2005; **207**: 532.
- Nadano D, Yasuda T and Kishi K: Measurement of deoxyribonuclease I activity in human tissues and body fluids by a single radial enzyme-diffusion method. *Clin Chem* 1993; **39**: 448.
- Maione B, Pittoggi C, Achene L et al: Activation of endogenous nucleases in mature sperm cells upon interaction with exogenous DNA. *DNA Cell Biol* 1997; **16**: 1087.
- Yamauchi Y, Ajduk A, Riel JM et al: Ejaculated and epididymal mouse spermatozoa are different in their susceptibility to nuclease-dependent DNA damage and in their nuclease activity. *Biol Reprod* 2007; **77**: 636.
- Shaman JA, Prisztoka R and Ward WS: Topoisomerase IIB and an extracellular nuclease interact to digest sperm DNA in an apoptotic-like manner. *Biol Reprod* 2006; **75**: 741.
- Ribas-Maynou J, Gawecka JE, Benet J et al: Double-stranded DNA breaks hidden in the neutral Comet assay suggest a role of the sperm nuclear matrix in DNA integrity maintenance. *Mol Hum Reprod* 2014; **20**: 330.
- Tanigawa Y, Yoshihara K and Koide SS: Endonuclease activity in bull semen, testis and accessory sex organs. *Biol Reprod* 1975; **470**: 464.
- Aitken RJ: The capacitation-apoptosis highway: oysterols and mammalian sperm function. *Biol Reprod* 2011; **85**: 9.
- Koppers AJ, Mitchell LA, Wang P et al: Phosphoinositide 3-kinase signalling pathway involvement in a truncated apoptotic cascade associated with motility loss and oxidative DNA damage in human spermatozoa. *Biochem J* 2011; **436**: 687.
- Aziz N, Said T, Paasch U et al: The relationship between human sperm apoptosis, morphology and the sperm deformity index. *Hum Reprod* 2007; **22**: 1413.
- Ribas-Maynou J, García-Peiró A, Fernández-Encinas A et al: Comprehensive analysis of sperm DNA fragmentation by five different assays: TUNEL assay, SCSA, SCD test and alkaline and neutral Comet assay. *Andrology* 2013; **1**: 715.
- Simon L and Lewis SE: Sperm DNA damage or progressive motility: which one is the better predictor of fertilization in vitro? *Syst Biol Reprod Med* 2011; **57**: 133.
- Ribas-Maynou J, García-Peiró A, Fernández-Encinas A et al: Double stranded sperm DNA breaks, measured by Comet assay, are associated with unexplained recurrent miscarriage in couples without a female factor. *PLoS One* 2012; **7**: e44679.

4.2 ARTICLE II: PROTEOMIC ANALYSIS IN SEMINAL PLASMA OF FERTILE DONORS AND INFERTILE PATIENTS WITH DIFFERENT SPERM DNA FRAGMENTATION SIGNATURES

RESULTATS DE L'OBJECTIU GENERAL 2: Article II

“Proteomic analysis in seminal plasma of fertile donors and infertile patients with different sperm DNA fragmentation signatures”

Autors: Alba Fernandez-Encinas, Agustín García-Peiró, Javier Del Rey, Jordi Ribas-Maynou, Carlos Abad, Elena Prada, Maria José Amengual, Joaquina Navarro, Jordi Benet.

Revista: International Journal of Molecular Sciences (2020); 21(14):5046



Article

Proteomic Analysis in Seminal Plasma of Fertile Donors and Infertile Patients with Sperm DNA Fragmentation

Alba Fernandez-Encinas ¹, Agustín García-Peiró ², Javier del Rey ¹ , Jordi Ribas-Maynou ¹ , Carlos Abad ³, Maria José Amengual ⁴ , Elena Prada ⁵, Joaquima Navarro ¹ and Jordi Benet ^{1,*}

¹ Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain; alba.fernandez@e-campus.uab.cat (A.F.-E.); Javier.DelRey@uab.cat (J.d.R.); j.ribas87@gmail.com (J.R.-M.); joaquima.navarro@uab.cat (J.N.)

² Centro de Infertilidad Masculina y Análisis de Barcelona (CIMAB), 08192 Sant Quirze del Vallès, Spain; agusti.garcia@uab.cat

³ Servei d'Urologia, Corporació Sanitària Parc Taulí, Sabadell, Institut Universitari Parc Taulí—UAB, 08208 Sabadell, Spain; cabad@tauli.cat

⁴ UDIAT, Centre Diagnòstic, Corporació Sanitària Parc Taulí, Sabadell, Institut Universitari Parc Taulí—UAB, 08208 Sabadell, Spain; mjamengual@tauli.cat

⁵ Servei de Ginecologia, Hospital Universitari Mútua de Terrassa, 08221 Terrassa, Spain; eprada@mutuaterrassa.es

* Correspondence: jordi.benet@uab.cat; Tel.: +34-935-811-773

Received: 25 June 2020; Accepted: 15 July 2020; Published: 17 July 2020



Abstract: Seminal plasma proteomics studies could represent a new approach for the determination of molecular elements driving male infertility, resulting in a better male infertility characterization. The aim of this study is to investigate proteomic differences in seminal plasma samples from fertile and infertile individuals. For that, semen samples were selected according to semen analysis, clinical pathology, and values of sperm DNA fragmentation (alkaline and neutral Comet assay and Sperm Chromatin Dispersion test). A total of 24 seminal plasma samples classified in four groups were processed: fertile donors (FD), recurrent miscarriage patients (RM), asthenoteratozoospermic patients (ATZ), and asthenoteratozoospermic patients with varicocele (ATZ-VAR). Results obtained by 2D-differential gel electrophoresis (2D-DIGE) revealed 26 spots significantly increased in fertile donors when compared to patient groups. Also, eight spots in the ATZ group and two in the ATZ-VAR group were decreased compared to the other groups. Twenty-eight proteins were identified by mass spectrometry (MS), most of them involved in metabolic and cellular processes and with a catalytic or binding function. Protein–protein interactions through Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins (STRING) tool suggest that a large part of them were associated with each other. Furthermore, most of them were associated with ubiquitin C, indicating that it could play an important regulation role, resulting in a potential male infertility biomarker.

Keywords: seminal plasma; 2D-DIGE; sperm DNA fragmentation; biomarkers; male infertility

1. Introduction

Infertility is a disease involving both male and female partners with an approximate incidence of 7–15%, and male factor is involved in about half of the cases [1]. Traditionally, the approximation to male infertility issues has relied on basic semen analysis, including sperm concentration, motility, and morphology, but for many couples, these analyses are inconclusive to determine their reproductive potential [2]. To select patients for a treatment with In Vitro Fertilization (IVF) or Intra-Cytoplasmic

Sperm Injection (ICSI) semen analysis is used because there is a correlation between morphology of sperm and success with IVF and ICSI. Even so the most effective treatments are those that combine other sperm function tests [3]. Advances in the last decade have shown that sperm DNA integrity may be a good approximation to the sperm natural reproductive capacity and a potential predictor of embryonic development, becoming a suitable marker for male infertility [4,5]. Sperm DNA fragmentation (SDF) can be analyzed using different direct and indirect methodologies, as Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL), Comet assay, Sperm Chromatin Dispersion (SCD) test or Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA), among others. The respective advantages and disadvantages of these different methods have been widely reviewed by multiple authors [6–8]. Despite the effectiveness of SDF testing for the prediction natural fertility and intra-uterine insemination outcomes, current scientific evidence is has not reached a consensus regarding if SDF is associated to pregnancy rates after ICSI cycles [9], the fact that is probably associated with a lack of standardization of some methodologies among laboratories around the world [9–11]. Also, this lack of consensus may also be explained by the oocyte DNA repair capacity, which is related to women's age [12]. In fact, younger women suffer less implantation failures after IVF cycles [13].

Different intrinsic origins for DNA fragmentation in spermatozoa have been proposed over the years and also reviewed at different works [14–16]. First, the abnormal chromatin condensation during spermiogenesis [17], second, the consequence of sperm apoptosis-like [18], and finally, the imbalance of reactive oxygen species and antioxidant capacity [14,19]. Moreover, exogenous factors such as radiations infections, recreational drugs, heat stress, pollution, or the presence of varicocele affection may also cause oxidative stress, leading to genetic damage that can be produced at different stages of spermatogenesis [20]. Finally, iatrogenic DNA damage caused by sample manipulation prior to performing Assisted Reproductive Technology (ART) is a source of potential breaks [21].

Varicocele is the most common cause of correctable male infertility, with an incidence about 40% of infertile men [22]. The dilatation of the pampiniform plexus is the main affection of varicocele, causing a blood reflux that leads to an increase of the local temperature at the testis area, all leading to an increase of reactive oxygen species (ROS) and a decrease of antioxidant protection [23]. ROS has been shown to be higher as varicocele grade is worse, leading to a fertility reduction and an increase of DNA damage in affected men [24,25].

After meiosis and spermiogenesis, processes through which spermatogonia lead to differentiated sperm cells, the epididymis is the compartment where sperm maturation takes place, leading to the acquisition of motility and the ability to fertilize an oocyte. Despite the importance of studying these epididymal processes, the assessment of the human epididymis requires invasive procedure. In this sense, the molecular analysis of seminal plasma has been defined as a good approximation for this purpose [26]. It is known that sperm cells only constitute less than 10% of the semen volume, corresponding the remaining 90% to seminal plasma [27]. Seminal plasma (SP) is loaded with proteins that arise from secretions of seminal vesicles (~65% of semen volume), prostate (~25%), testes and epididymis (~10%), and bulbourethral and periurethral glands (~1%) [28]. The main functions of SP components are crucial for the natural reproductive success, as they have a role in regulating the capacitation process, in modulating the immune response and in the interaction and fusion of gametes [29]. Currently, studies analyze SP as a mirror of the estate of accessory glands, testing biochemical parameters like zinc, citric acid, and acid phosphatase in prostates secretions, fructose and prostaglandins in seminal vesicle, and neutral alpha-glycosidase in epididymis [30].

Protein content studies have been performed on SP since 1942 [31]. Recently, the potential of proteomic techniques allow a comprehensive study of the protein profile to compare different estates, enabling the discovery of new and non-invasive biomarkers for diagnostic and treatment procedures [32]. One of the first studies of differential proteomics in SP conducted by Starita-Gerbaldi and colleagues [33] compared the proteomic profile of SP samples from fertile individuals, vasectomized and azoospermic individuals, showing potential diagnostic markers of spermatogenesis impairment. Further studies also pursued this aim, by comparing SP protein expression profile of fertile men

compared to azoospermic patients [34], by characterizing the protein profile of a healthy individual [35], and by comparing SP from patients with idiopathic fertility and those subjected to assisted reproduction treatments [36]. None of these previous studies took into account the sperm chromatin status for the sample classification prior the analysis of SP and, to the best of our knowledge, only few proteomic studies have been conducted to date has been conducted in samples with a known SDF [37,38].

In order to identify alternative and non-invasive biomarkers that allow diagnosing specific etiologies of male factor infertility, in the present work we conducted a 2D-differential gel electrophoresis (2D-DIGE) approach to detect differential expression of SP proteins among four different groups of samples classified according their clinical status and characterized according semen analysis and DNA integrity.

2. Results

2.1. Sperm DNA Fragmentation

The analysis of sperm DNA fragmentation and the DNA degraded sperm (DDS) lead to the classification of homogeneous groups of samples: fertile donors (FD), recurrent miscarriage patients (RM), asthenoteratozoospermic patients (ATZ), and asthenoteratozoospermic patients with varicocele (ATZ-VAR); defined in Materials and Methods section. Overall results of each group are described in Table 1.

Table 1. Percentage of spermatozoa showing DNA fragmentation assessed by the Comet assay and Sperm Chromatin Dispersion (SCD) test (mean \pm standard deviation).

Group and Pathology	SDF (Alkaline Comet)	SDF (Neutral Comet)	DDS (SCD Test)
Group FD ($n = 6$)	23.53 \pm 10.46	12.36 \pm 4.31	<0.33
Group RM ($n = 6$)	36.73 \pm 16.42	62.74 \pm 12.47	<0.33
Group ATZ ($n = 6$)	67.29 \pm 12.66	74.29 \pm 5.91	<0.33
Group ATZ-VAR ($n = 6$)	71.22 \pm 5.91	86.59 \pm 11.83	>0.33

2.2. Analysis of Differentially Expressed Proteins Using 2D-Differential Gel Electrophoresis (2D-DIGE)

The quantitative comparison of seminal plasma proteome profile among all groups analyzed highlighted 96 differentially expressed protein spots (two-fold variation or more in expression, $p < 0.05$). Among them, 26 spots were differential expressed between FD group and all infertile groups, 22 spots were up-regulated and four spots were down-regulated. Eight spots showed up-regulated differential expression in ATZ group respect other groups. Two spots showed down-regulated differential expression between ATZ-VAR group and other groups. RM group showed differential expression in two spots with FD group. A representative 2D-DIGE gel image as example of the gel quality and sample complexity is shown in Figure 1.

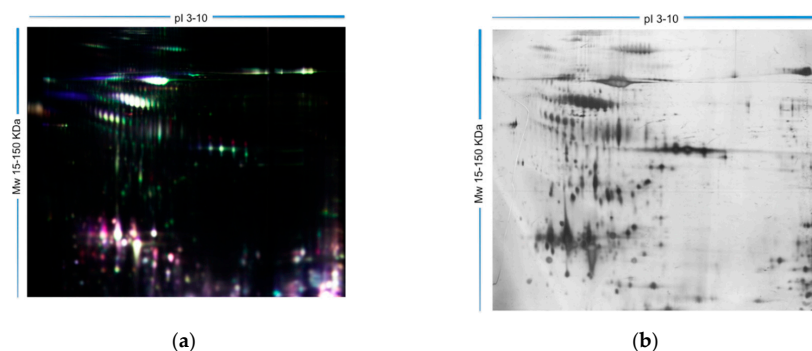


Figure 1. Distribution spots of differentially expressed proteins from seminal plasma samples among fertile and patients group. Representative image in fluorescence difference gel electrophoresis (DIGE) (a) and in silver stained (b).

2.3. Identification of Differentially Expressed Proteins Using Mass Spectrometry (MS)

Out of 96 differentially expressed spots, 42 spots were analyzed by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry (MS) and liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). From them, 32 spots could be identified, representing 28 different proteins (Table 2). In some cases, spots contained more than one protein and in other cases, different spots represented the same protein, facts that are explained by post-translational modifications. Examples of them are the Prostate-Specific antigen (five spots), Clusterin (six spots), Albumin (four spots), etc. The most pronounced changes in protein levels were detected for Prostate-Specific antigen with a fold change (15-fold, $p < 0.01$), Annexin A3 (9.9-fold each, $p < 0.01$), and Clusterin (4.2-fold each, $p < 0.01$).

Table 2. Proteins with differential expression in seminal plasma from fertile donor group vs. patient groups analyzed.

Group and Pathology	Protein Name	Symbol	Uniprot Accession Number	Fold-Change		
				RM	ATZ	ATZ-VAR
Group 1: FD ($n = 6$)	N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1	DDAH1_HUMAN	O94760	2.0	2.7	2.2
	Annexin A3	ANXA3_HUMAN	P12429	0.022	0.946	0.021
	Clusterin	CLUS_HUMAN	P10909	13.1	11.7	2.0
	Prostaglandin-H2 D-isomerase	PTGDS_HUMAN	P41222	2.3	2.6	2.6
	Semenogelin-1	SEMG1_HUMAN	P04279	2.8	1.5	2.7
	Beta-2-microglobulin	B2MG_HUMAN	Q91966	3.7	2.5	2.5
	Prostate-specific antigen	KLK3_HUMAN	P07288	15.0	11.4	2.2
	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 4	TGM4_HUMAN	P49221	3.8	4.1	4.4
	cdNA FLJ78262, highly similar to Homo sapiens semenogelin II (SEMG2), mRNA	A8K6Z6_HUMAN	A8K6Z6	4.6	5.0	3.9
	cdNA FLJ75803, highly similar to Homo sapiens cysteine-rich secretory protein 1 (CRISP1), transcript variant 1, mRNA	A8K8Y2_HUMAN	A8K8Y2	1.9	2.5	1.8
	Prostatic acid phosphatase	PPAP_HUMAN	P15309	2.0	2.7	2.2
	Ankyrin repeat domain-containing protein SOWAHA	SWAHA_HUMAN	Q2M3V2	3.7	2.5	2.5
	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-beta catalytic subunit	PP1B_HUMAN	P62140	2.0	2.7	2.2
	Epididymal secretory protein E3-beta	EP3B_HUMAN	P56851	2.2	2.2	2.6
	Albumin	F6KPG5_HUMAN	F6KPG5	4.2	2.7	4.7
	Apolipoprotein E	Apolipoprotein E (Fragment)	D9ZB55	1.9	2.5	1.8
cdNA, FLJ92074, highly similar to Homo sapiens progesterone-associated endometrial protein (placental protein 14, pregnancy-associated endometrial alpha-2-globulin, alpha uterine protein) (PAEP), mRNA	B2R4F9_HUMAN	B2R4F9	5.4	3.6	2.9	
Group 2: normal semen analysis (FD and RM) vs. abnormal semen analysis (ATZ and ATZ-VAR)	Creatine kinase B-type	KCRB_HUMAN	P02787	1.3	2.3	2.2
	Gastrin	PEPC_HUMAN	P20142	1.7	2.0	2.1
	Actin, cytoplasmic 1	ACTB_HUMAN	P60709	1.0	1.8	1.9
	Fibronectin 1 (FN1)	Q9UQS6_HUMAN	Q9UQS6	1.2	2.0	2.0
Group 3: ATZ vs. other groups	Serotransferrin	TRFE_HUMAN	P02787	1.3	1.1	2.5
	Prolactin-inducible protein	PIP_HUMAN	P12273	1.3	1.4	2.2
	Beta-actin	F1BXA6_HUMAN	F1BXA6	1.3	1.4	2.2
	Neutrophil defensin 1	DEF1_HUMAN	P59665	1.3	1.4	2.2
	Cystatin-S	CYTS_HUMAN	P01036	2.4	2.7	4.4
Alpha-1-antitrypsin	A1AT_HUMAN	P01009	1.5	1.9	2.2	
Group 4: ATZ-VAR vs. other groups				RM	ATZ	FD
	Aminopeptidase N	AMPN_HUMAN	P15144	3.1	2.5	2.0

2.4. Functional Classification of Protein and Protein-Protein Interaction Network

The functional classification of identified proteins was based on Gene Ontology (GO), using PANTHER 8.0 bioinformatics software platform), which reveals the different functions, processes and cellular localization of the proteins involved. The classification based on cellular localization (Figure 2a) showed that the majority of proteins are presented at extracellular (41.7%) and matrix (8.3%) regions. The classification based on cellular function (Figure 2b) revealed that a large majority of proteins are involved in catalytic activity (42.9%) followed by binding activity (28.6%), enzyme regulator activity (14.3%), structural molecule activity (7.1%), receptor activity (3.6%), and transport activity (3.6%). Regarding biological process classification, proteins are involved in metabolic processes (24.2%), cellular localization (14.5%), cellular processes (12.9%), and reproduction (9.7%) (Figure 2c).

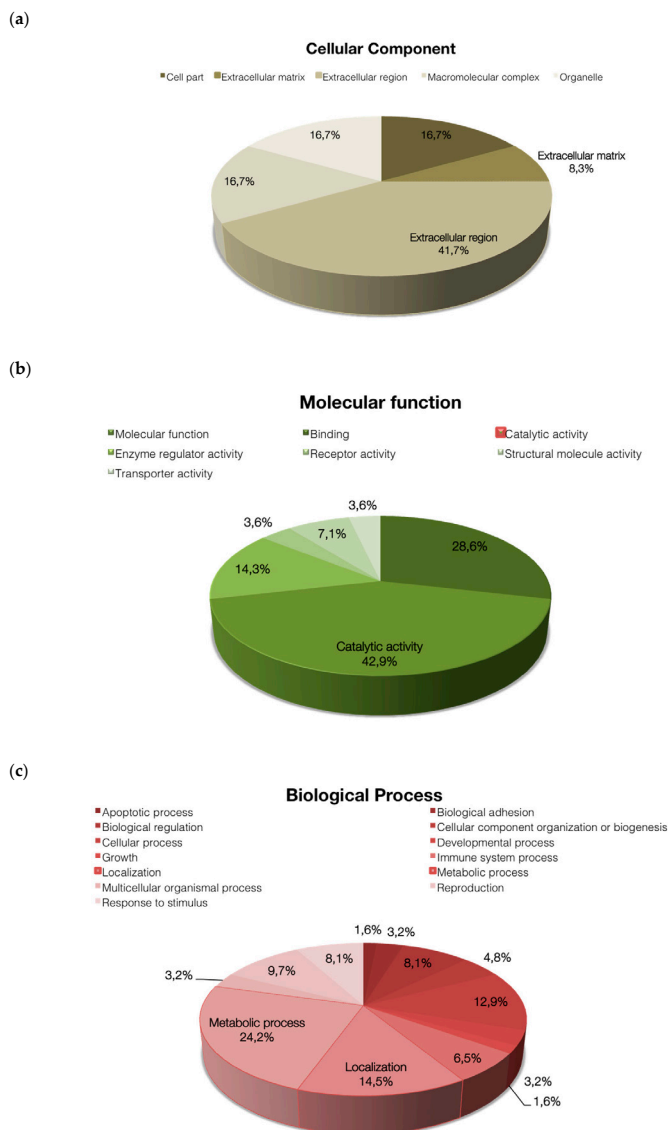
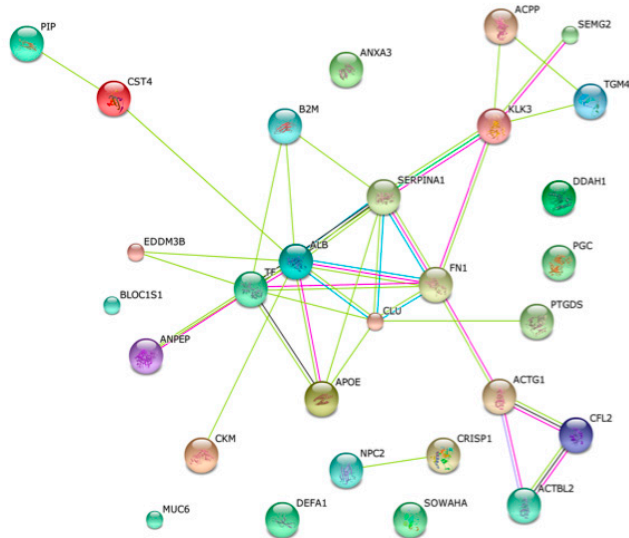


Figure 2. Classification of the differential proteins according to their (a) cellular component, (b) molecular function, and (c) biological process, by using the information available at the Panther Web site.

To create protein-protein interaction network for identified seminal plasma proteins, Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins (STRING) software was used. The generated network shows the proteins as nodes that are linked through edges. During the search, most of the proteins were clustered into pathways (Figure 3a). Moreover, looked a second level shell, the most highlight is that many of the differential expressed proteins identified in this study interact with Ubiquitin C (Figure 3b).

(a)



(b)

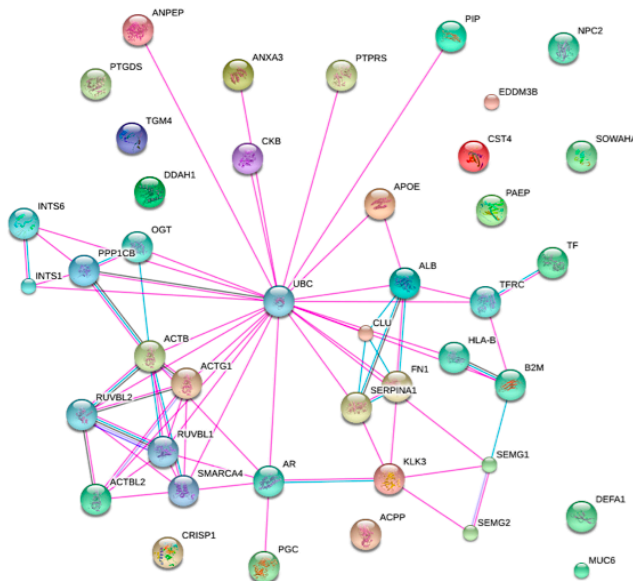


Figure 3. Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins (STRING) Network nodes among identified proteins (a) and in a second shell (b).

3. Discussion

The use of 2D-DIGE in quantitative proteomics allows the analysis of multiple study groups within the same experimental design. In the present study, this advantage has been used to investigate and compare the seminal plasma protein profile of fertile and infertile males, classified according to their clinical status and with well-defined DNA damage and semen analysis parameters. Then, the singularity of the present study remains on this strict definition of homogeneous groups, performed here for the first time (Tables 1 and 3).

Both motility, morphology, and DNA damage are parameters that help in the diagnosis of the infertile male. In this sense, recent studies using Comet assay provide information about different types of DNA breaks (single- and double-stranded). This distinction is important since our previous studies demonstrated that single stranded DNA damage is caused by oxidative stress and to the capacity of achieving a natural pregnancy, while double stranded DNA breaks are enzymatic and related to a higher risk of recurrent miscarriage [8,39]. In this sense, the DNA damage data obtained for the donors and patients included in the present study fit the specific profiles of single- and double-stranded DNA breaks defined previously [40].

Varicocele is a common cause of male infertility, through the increase of oxidative stress, varicocele patients present affectations in sperm function, leading to altered semen parameters and DNA damage [24]. SCD test allows for to distinguish varicocele patients from infertile patients without varicocele, through the evaluation of the percentage of the total degraded DNA sperm respect total SDF [41]. In the present study, ATZ patients with varicocele also show this profile with high DDS, presenting differences to those patients without varicocele. Surgical varicocelectomy is at the present moment the most effective treatment for varicocele treatment, and different studies have shown that the affected parameters are recovered afterwards [42,43].

In the present study, we took advantage of the proteomics strategy combined to a characterization of homogeneous groups, and we have found 17 proteins with differential expression in FD in comparison to infertile patients the other patients groups analyzed (Table 2).

On one hand, most of these proteins were described before like Prostate-Specific Antigen, Annexin A3, Clusterin, Prostaglandin-H2 D-isomerase, Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 4, Prostatic acid phosphatase, Apolipoprotein E, Glycodelin, semenogelin II, Epididymal secretory protein E3-beta, Beta-2-microglobulin, CRISP1, and Albumin [37,44–46]. PSA is a protein whose expression was found significantly increased in FD in front of the other analyzed patient groups. PSA is known to be responsible for carrying out the liquefaction process in semen, releasing sperm motility active entangled to achieve to reach the egg to fertilize. Also, previous studies found that men with reduced sperm motility had low levels of PSA in the seminal fluid [47,48]. It has also been reported that PSA may have a higher impact on sperm function and fertility due to its role in semenogelins and fibronectin fragmentation [49]. In fact, both proteins are also expressed differentially in the groups studied. Our results, however, are in disagreement with these previous proteomic studies showing a higher expression of PSA in infertile individuals [46,50], fact that could be explained by the presence of different isoforms of the protein [51].

On the other hand, we describe here for the first time, differences in SP (G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1 (DDAH1), Serine/threonine-protein phosphatase PP1-beta catalytic subunit, and Ankyrin repeat domain-containing protein SOWAHA. DDAH1 is a protein that acts as a regulator of the generation of nitric oxide that it is involved in a wide range of biological processes [52]. In reproduction, while sustained concentrations of nitric oxide is a necessary compound to achieve capacitation, allowing acrosome reaction and sperm–oocyte interaction [53], it has been reported that high concentrations of nitric oxide play a detrimental effect on sperm motility and sperm function, since the formation of nitrogen radicals and inhibit cell respiration with the consequence of energy loss, and drive protein modifications, membrane lipid peroxidation and DNA fragmentation [54,55].

As expected, differentially expressed proteins between those subjects with normal sperm motility and morphology (FD and RM) and those with abnormal values (ATZ and ATZ-VAR) were found

(Table 2): ACTB, KCRB, PEPC, and FN1. In fact, it is well known that these proteins are involved in motility and energy functions, and our results also support their role in the motility and morphology of sperm.

For ATZ samples, an overexpression of the following six proteins has been observed in comparison to other groups: Cystatin-S, Neutrophil defensin 1, Beta-actin, Prolactin-inducible protein (PIP), Alpha-1-antitrypsin, and Serotransferrin (Table 2). The ontology functional analysis revealed that PIP has an endopeptidase activity interacting with other proteins like fibronectin, actin, keratin, myosin, and albumin [56]. Also previous studies showed that they are related to male infertility and to poor sperm quality [57], and found them upregulated in samples with elevated ROS, azoospermia, and asthenoteratozoospermia [34,46,58].

For ATZ-VAR group, Aminopeptidase N (AMPN) was found differential and downregulated protein expression (Table 2). This multifunctional enzyme is involved in sperm regulation and fertility, as previous works have shown that increased AMPN affects sperm motility and early embryo development in mouse [59,60], also acting as a regulatory factor in angiogenesis in the female reproductive system [61].

The fact that most of the proteins analyzed here are involved in metabolic processes and catalytic function (Figure 2) suggests that SDF from the analyzed groups is mostly caused by oxidative damage. It is well known that non-fertile sperm present deregulation of proteins involved in metabolism, energy production, leading to high ROS, causing the aforementioned detrimental effects [38,62]. Also, it is noteworthy that post-translational modifications occur before proteins are poured into seminal fluid, since we have found similar proteins at different spots. These post-translational modifications, including ubiquitination, phosphorylation, acetylation, sumoylation, and others, may have an important role in sperm due to its transcriptional and traductional inactivity, thus helping in the regulation protein stability and activity both in physiological and pathological states [63]. Interactions among differential proteins identified in the present study provide a substantial confirmation that ubiquitin C might indeed be involved in sperm fertility regulation (Figure 3a,b). Ubiquitin is known to play a role in regulating multiple cellular pathways by linking a variable number of ubiquitin chains at different protein positions in targeted proteins [64]. In reproduction, it has been described to have a role in fertilization by marking defective sperm, remodeling plasma membrane in capacitation, in acrosome reaction, in promoting sperm–oocyte interaction and in paternal mitochondrial inheritance [65]. Also, studies showed the presence of ubiquitinated sperm cells in samples with DNA fragmentation, suggesting a role in semen quality control [66,67].

Table 3. Characteristics of patients for 2D-differential gel electrophoresis (2D-DIGE) analysis selected by pathology, DNA degraded sperm (DDS), and Sperm DNA fragmentation (SDF) values¹, measured by SCD test and Comet assay, respectively.

Group and Pathology	DDS (SCD Test)	SDF (Alkaline Comet)	SDF (Neutral Comet)
FD (<i>n</i> = 6)	<0.33	<45%	<50%
RM (<i>n</i> = 6)	<0.33	<45%	>50%
ATZ (<i>n</i> = 6)	<0.33	>45%	>50%
ATZ-VAR (<i>n</i> = 6)	>0.33	>45%	>50%

¹ For DDS, the cut-off value for varicocele patients is 0.30 [41]. The cut-off value for alkaline Comet assay is 45% of SDF and for neutral comet assay is 50% of SDF [68].

In summary, the present study identifies for the first time a differential protein expression in SP in different groups homogeneously defined by pathology, semen analysis and DNA fragmentation. The proteomic data by 2D-DIGE confirm the different expression of 28 proteins as potential biomarkers of infertility. Overall, the present data suggest that major proteins are involved in energy metabolism, catalytic function and have an extracellular location. Indeed, the present results strongly support the interaction between the differential proteins and ubiquitin C role in degradation of those that are

defectives. Further experiments might explore the use of the detected proteins as potential prognostic markers of infertility and ART outcomes.

4. Materials and Methods

4.1. Semen Samples and Sperm DNA Fragmentation

4.1.1. Samples and Study Design

Semen samples have been collected from six fertile donors and 18 infertile patients. All samples were collected by masturbation after 2–5 days of recommended abstinence. Written informed consent was obtained for all patients and the hospital ethical committee approved the present study on 2 September 2017 with registration number 2017902 and all methods were carried out in accordance with the Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) guidelines and regulations. The inclusion criteria for the study enrollment was to belong to one of the clinical groups defined for the study: Fertile donors, recurrent miscarriage patients with at least 2 miscarriages, and infertile patients without or with varicocele. Infertility has been defined by the WHO as the inability to achieve a clinical pregnancy in 12 months of unprotected relationships. No exclusive criteria were defined regarding smoking, drinking, the use of recreational drugs, etc.

After the collection of semen samples, seminal plasma was separated from sperm fraction and kept until sample groups were established. Basic analysis of sperm, including concentration, motility, and morphology, was performed following WHO guidelines and thresholds. Sperm DNA damage analysis through SCD, alkaline Comet and neutral Comet were performed following the protocols described below with the aim of defining homogeneous groups of samples that would be subjected to proteomic studies.

Then, SP samples were categorized in four groups according pathology, basic sperm analysis and DNA status, taking into account the threshold values summarized in Table 3:

1. Fertile Donors (FD), including samples from six fertile donors who presented normal semen analysis, low DNA degraded sperm (DDS), low SDF by alkaline and neutral Comet assay.
2. Recurrent Miscarriage (RM), including samples from six recurrent miscarriage patients without female factor, who presented normal semen analysis (sperm count, motility and morphology), low DDS, low SDF by alkaline and high SDF by neutral Comet assay.
3. Asthenoteratozoospermic infertile patients without varicocele (ATZ), including samples from six ATZ patients, with low DDS, high SDF by alkaline and neutral Comet assay.
4. Asthenoteratozoospermic infertile patients with varicocele (ATZ-VAR), including samples from six ATZ patients with varicocele, with high values of DDS and SDF for both Comet assays.

4.1.2. Semen Collection, Basic Semen Analysis, and Cryopreservation

After liquefaction, routine semen analysis was performed according to WHO (2010) and, subsequently, the semen was divided into two aliquots; 500 μ L of unprocessed semen sample was cryopreserved with Test yolk buffer (14% glycerol, 30% egg yolk, 1.98% glucose, 1.72% sodium citrate), and 500 μ L was centrifuged at 13,300 g for 20 min at 4 °C, the resulting supernatant being aspirated and stored at –80 °C until use for 2D-DIGE.

4.1.3. DNA Integrity Tests: SCD, Alkaline Comet and Neutral Comet

SCD and Comet assays have a common first steps that comprise sperm thawing for 30 s at 37 °C, washing three times in PBS (phosphate-buffered saline), adjusting the concentration at 10⁶ sperm/mL, mixing sperm sample with low melting point agarose 1% (Sigma Aldrich; St Louis, MO, USA) at 1:2 ratio, and jellifying the mixture in a pre-treated slide for gel adhesion at 4 °C for 5 min.

After, the coverslips were carefully removed and alkaline and neutral Comet assays and SCD test were performed according the protocols described before for Comet assay [40], and in the manufacturer's instruction for SCD.

The assessment of fragmented and non-fragmented sperm cells were conducted by the assessment of 500 sperm previously dyed with antifade DAPI Slowfade Gold (Invitrogen; Eugene, OR, USA) and under the epifluorescence microscopy. For Comet assay, the classification of fragmented or non-fragmented sperm and the cut-off values for alkaline and neutral Comet assay were described by our research group [40]. For the assessment of the DNA degradation index (DDS), SCD test was performed according to the manufacturers' instructions of the Halosperm Kit (Halotech DNA; Madrid, Spain). Degraded sperm (DDS), besides not having haloes, were characterized by the presence of a faint and/or nonuniformly stained chromatin core. DDS index was calculated as the proportion of degraded sperm in the whole population of sperm with fragmented DNA, the cut-off value was 0.33 or above [41].

4.2. Proteomic Analysis of Seminal Plasma

4.2.1. Sample Preparation for 2-D DIGE

SP proteins were precipitated by 2-DE Clean-Up kit (GE Healthcare, Chicago, IL, USA), resuspended in a buffer containing 7 M urea, 2 M thiourea, 40 mM Tris, 4% *w/v* CHAPS, pH 8.5 and finally stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until use. A RC DC Protein Assay Kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) was used to determine protein concentration of samples.

4.2.2. Protein Labeling with CyDye DIGE

Protein labeling was performed as previously described [69]. A pairwise comparison was performed among the four groups of study. In brief, each group were differentially labeled at a concentration of 400 pmol of CyDye DIGE fluors (Cy3 or Cy5) per 50 μg of protein for 30 min in the dark at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. To eliminate variations between gels an internal standard composed by a pool of all samples (fertile and infertile patients) and labeled with Cy2 was used. Finally, the same amounts of Cy3, Cy5, and the standard with Cy2 were mixed to run on the gels.

4.2.3. Two-Dimensional Gel Electrophoresis

Immobiline Dry strips 24 cm, pH 3–10 (GE Healthcare) were rehydrated overnight in 450 μL of buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 2% *w/v* CHAPS, 0.5% *v/v* IPG pH 3–10 buffer, 50 mM DTT, 1.2% *v/v* DeStreak (Sigma)) and were loaded with one hundred and fifty micrograms of protein. The first dimension of isoelectric focusing was run on an IPGphor EF System (GE Healthcare, Chicago, IL, USA). Optimal protein focusing was achieved by starting at 300 V for 5 h, followed by a two steps at 1000 V for 6 h and 8000 V for 3 h. in the gradient and focusing from 8000 to 56,000 V/h. Strips were stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Before second dimension, the strips were thawed and equilibrated in two steps for 15 min each, first buffer (50 mM Tris-HCl, 30% *v/v* glycerol, 6 M urea, 10 g/L DTT, 2% *w/v* SDS, and 0.01% *w/v* bromophenol blue, pH 8.8), the second also contained 2.5% iodoacetamide. The second dimension was performed by 12% polyacrylamide gels. Strips were loaded onto the gels and sealed with a solution of 0.5% agarose (*w/v*) containing a trace of bromophenol blue. The gels were run on the Ettan DALT VI (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) at 2,5 W/gel for 30 min followed by 12 W/gel till the bromophenol blue dye front reached the bottom of the gel at $20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

All gels were scanned using a Typhoon image scanner 9410 (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) at three different emission/excitation wavelengths, namely, 488/520, 532/580, or 633/670 nm and silver stained was carried out using a standard protocol for MS analysis. After scanning, the 2-D DIGE images were analyzed with the software Progenesis SameSpot (Nonlinear Dynamics, Newcastle, UK). Volumes of individual spots were normalized against the total volume of all the spots in the gel. Spot

volume ratio change with $p < 0.05$ and having an absolute fold change greater than two were criteria for MS identification of abundance differences.

4.2.4. Spot Picking and In-Gel Digestion for MS Analysis

MS was performed as described previously [69]. Gels were stained with silver and then the spots selected for analyses were manually excised and digested using an automatic device (DigestPro MS, Intavis). The processing involved reduction with dithiothreitol (DTT), derivatization with iodoacetamide (IAA), and enzymatic digestion with trypsin (37 °C, 8 h). The resulting peptide mixture was spotted on a MALDI plate and analyzed using a MALDI-TOF/TOF MS (ABI-Sciex 4800). For each sample one MS spectra was obtained. The MALDI-TOF spectra were interpreted by database search (Mascot, Matrix Science) with a significance threshold of the Molecular Weight Search (MOWSE) score of $p < 0.05$. All identifications were manually validated. The database used for identification was SwissProt restricted to human proteins.

Each unidentified spot was reanalyzed by LC-MS/MS. Proteins were dissolved using a buffer containing urea and DTT. The extract was derivatized with iodoacetamide and digested according to internal protocols. The tryptic extracts were analyzed by LC-MS/MS in data-dependent mode. The MS system used was a Velos LTQ (ThermoFisher, Waltham, MA, USA) equipped with a microESI ion source. The tryptic extracts were diluted to 20 μ L with 5% methanol with 1% formic acid and loaded into a chromatographic system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). The Velos LTQ was operated in the positive ion mode with a spray voltage of 2 kV. The scan range for full scans was m/z 450–2000.

4.2.5. Protein Identification

The obtained mass spectra were subjected to a Mascot search engine. Probability-based protein identification was performed by searching sequence databases using mass spectrometry data with 0.8 Da peptide tolerance, two miss-cleavages, carbamidomethylation and methionine oxidation as variable modifications. Protein annotation was performed by using the Uniprot database.

4.2.6. Functional Enrichment Analysis

Analysis by PANTHER database (Protein Analysis Through Evolutionary Relationships, <http://pantherdb.org>) was used to determine the percentage of proteins from our dataset involved in the “molecular function”, “biological process” and “cellular component”. The obtained PANTHER data was further analyzed, and graphs were prepared using MS Excel 2007.

STRING database (version 8.3; <http://string.embl.de/>) was used to identify the protein-protein interaction network to show the interactions of identified proteins with a specific group of molecules.

Author Contributions: Conceptualization, J.B., J.N., A.F.-E., A.G.-P., and J.R.-M.; methodology J.B., A.F.-E., A.G.-P., J.R.-M., and J.d.R.; data acquisition A.F.-E., A.G.-P., J.R.-M., J.d.R., C.A., M.J.A., and E.P.; writing—original draft preparation, A.F.-E.; writing—review and editing, J.B., J.N., A.F.-E., A.G.-P., J.R.-M., and J.d.R.; supervision, J.B., J.N., and A.G.-P.; funding acquisition, J.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the European Regional Development Fund and Instituto de Salud Carlos III (Economy, Industry and Competitiveness Ministry, Madrid, Spain; Project PI14/00119) and Generalitat de Catalunya (Project 2017SGR1796).

Acknowledgments: We would like to thank the Servei de Proteòmica del Laboratori CSIC-UAB, especially Montserrat Carrascal and Joaquín Abián.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

2D-DIGE	2D-Differential Gel Electrophoresis
SP	Seminal Plasma
SDF	Sperm DNA Fragmentation
FD	Fertile Donors
ATZ	Asthenoteratozoospermic Group
ATZ-VAR	Asthenoteratozoospermic with Varicocele Group
RM	Recurrent Miscarriage
SCD	Sperm Chromatin Dispersion
MS	Mass Spectrometry
DDS	Degraded DNA Sperm
ART	Assisted Reproductive Technology
ICSI	Intra-Cytoplasmic Sperm Injection

References

1. Mosher, W.D.; Pratt, W.F. Fecundity and infertility in the United States: Incidence and trends. *Fertil. Steril.* **1991**, *56*, 192–193. [[CrossRef](#)]
2. Sigman, M.; Baazeem, A.; Zini, A. Semen analysis and sperm function assays: What do they mean? *Semin. Reprod. Med.* **2009**, *27*, 115–123. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Liu, D.Y.; Baker, H.W. Evaluation and assessment of semen for IVF/ICSI. *Asian J. Androl.* **2002**, *4*, 281–285.
4. Aitken, R.J.; De Iuliis, G.N.; Finnie, J.M.; Hedges, A.; McLachlan, R.I. Analysis of the relationships between oxidative stress, DNA damage and sperm vitality in a patient population: Development of diagnostic criteria. *Hum. Reprod.* **2010**, *25*, 2415–2426. [[CrossRef](#)]
5. Barratt, C.L.R.; Aitken, R.J.; Björndahl, L.; Carrell, D.T.; de Boer, P.; Kvist, U.; Lewis, S.E.M.; Perreault, S.D.; Perry, M.J.; Ramos, L.; et al. Sperm DNA: Organization, protection and vulnerability: From basic science to clinical applications—A position report. *Hum. Reprod.* **2010**, *25*, 824–838. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Evenson, D.P. The Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA[®]) and other sperm DNA fragmentation tests for evaluation of sperm nuclear DNA integrity as related to fertility. *Anim. Reprod. Sci.* **2016**, *169*, 56–75. [[CrossRef](#)]
7. Ward, W.S. Eight tests for sperm DNA fragmentation and their roles in the clinic. *Transl. Androl. Urol.* **2017**, *6* (Suppl. 4), S468–S470. [[CrossRef](#)]
8. Ribas-Maynou, J.; Benet, J. Single and double strand sperm DNA damage: Different reproductive effects on male fertility. *Genes* **2019**, *10*, 105. [[CrossRef](#)]
9. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. The clinical utility of sperm DNA integrity testing: A guideline. *Fertil. Steril.* **2013**, *99*, 673–677. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Agarwal, A.; Ayaz, A.; Samanta, L.; Sharma, R.; Assidi, M.; Abuzenadah, A.M.; Sabanegh, E. Comparative proteomic network signatures in seminal plasma of infertile men as a function of reactive oxygen species. *Clin. Proteom.* **2015**, *12*, 23. [[CrossRef](#)]
11. Simon, L.; Carrell, D.T. Sperm DNA damage measured by comet assay. *Methods Mol. Biol.* **2013**, *927*, 137–146. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Mihalas, B.P.; Redgrove, K.A.; McLaughlin, E.A.; Nixon, B. Molecular mechanisms responsible for increased vulnerability of the ageing oocyte to oxidative damage. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, *2017*, 4015874. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Bhattacharya, S.; Maheshwari, A.; Mollison, J. Factors associated with failed treatment: An analysis of 121,744 women embarking on their first IVF cycles. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e82249. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Aitken, R.J.; De Iuliis, G.N. On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. *Mol. Hum. Reprod.* **2010**, *16*, 3–13. [[CrossRef](#)]
15. Muratori, M.; Marchiani, S.; Tamburrino, L.; Baldi, E. Sperm DNA fragmentation: Mechanisms of origin. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2019**, *1166*, 75–85. [[CrossRef](#)]
16. Panner Selvam, M.K.; Ambar, R.F.; Agarwal, A.; Henkel, R. Etiologies of sperm DNA damage and its impact on male infertility. *Andrologia* **2020**, e13706. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

17. García-Peiró, A.; Martínez-Heredia, J.; Oliver-Bonet, M.; Abad, C.; Amengual, M.J.; Navarro, J.; Jones, C.; Coward, K.; Gosálvez, J.; Benet, J. Protamine 1 to protamine 2 ratio correlates with dynamic aspects of DNA fragmentation in human sperm. *Fertil. Steril.* **2011**, *95*. [[CrossRef](#)]
18. Sakkas, D.; Seli, E.; Bizzaro, D.; Tarozzi, N.; Manicardi, G.C. Abnormal spermatozoa in the ejaculate: Abortive apoptosis and faulty nuclear remodelling during spermatogenesis. *Reprod. Biomed. Online* **2003**, *7*, 428–432. [[CrossRef](#)]
19. Lettieri, G.; D'Agostino, G.; Mele, E.; Cardito, C.; Esposito, R.; Cimmino, A.; Giarra, A.; Trifuoggi, M.; Raimondo, R.; Notari, T.; et al. Discovery of the involvement in DNA oxidative damage of human sperm nuclear basic proteins of healthy young men living in polluted areas. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 4198. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Barati, E.; Nikzad, H.; Karimian, M. Oxidative stress and male infertility: Current knowledge of pathophysiology and role of antioxidant therapy in disease management. *Cell. Mol. Life Sci.* **2020**, *77*, 93–113. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Gosálvez, J.; Cortés-Gutiérrez, E.; López-Fernández, C.; Fernández, J.L.; Caballero, P.; Nuñez, R. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation dynamics in fertile donors. *Fertil. Steril.* **2009**, *92*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Alsaikhan, B.; Alrabeeh, K.; Delouya, G.; Zini, A. Epidemiology of varicocele. *Asian J. Androl.* **2016**, *18*, 179. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Hassanin, A.M.; Ahmed, H.H.; Kaddah, A.N. A global view of the pathophysiology of varicocele. *Andrology* **2018**, *6*, 654–661. [[CrossRef](#)]
24. Vakalopoulos, I.; Kampantais, S.; Lymperti, S.; Grivas, N.; Ioannidis, A.; Mykoniatis, I.; Nikolaou, V.; Dimitriadis, G. Should we expand the indications for varicocele treatment? *Transl. Androl. Urol.* **2017**, *6*, 931–942. [[CrossRef](#)]
25. Jensen, C.F.S.; Østergren, P.; Dupree, J.M.; Ohl, D.A.; Sønksen, J.; Fode, M. Varicocele and male infertility. *Nat. Rev. Urol.* **2017**, *14*, 523–533. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Samanta, L.; Parida, R.; Dias, T.R.; Agarwal, A. The enigmatic seminal plasma: A proteomics insight from ejaculation to fertilization. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **2018**, *16*, 41. [[CrossRef](#)]
27. Verze, P.; Cai, T.; Lorenzetti, S. The role of the prostate in male fertility, health and disease. *Nat. Rev. Urol.* **2016**, *13*, 379–386. [[CrossRef](#)]
28. Drabovich, A.P.; Saraon, P.; Jarvi, K.; Diamandis, E.P. Seminal plasma as a diagnostic fluid for male reproductive system disorders. *Nat. Rev. Urol.* **2014**, *11*, 278. [[CrossRef](#)]
29. Szczykutowicz, J.; Kałuzka, A.; Kaźmierowska-Niemczuk, M.; Ferens-Sieczkowska, M. The potential role of seminal plasma in the fertilization outcomes. *BioMed Res. Int.* **2019**, *2019*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Bromfield, J.J. Seminal fluid and reproduction: Much more than previously thought. *J. Assist. Reprod. Genet.* **2014**, *31*, 627–636. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Victor, R.; Moore Dan, H.; Miller, E.G. Proteins of human seminal plasma. *J. Biol. Chem.* **1942**, *144*, 667.
32. Thelen, J.J.; Miernyk, J.A. The proteomic future: Where mass spectrometry should be taking us. *Biochem. J.* **2012**, *444*, 169–181. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Starita-Geribaldi, M.; Poggioli, S.; Zucchini, M.; Garin, J.; Chevallier, D.; Fenichel, P.; Pointis, G. Mapping of seminal plasma proteins by two-dimensional gel electrophoresis in men with normal and impaired spermatogenesis. *Mol. Hum. Reprod.* **2001**, *7*, 715–722. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Yamakawa, K.; Yoshida, K.; Nishikawa, H.; Kato, T.; Iwamoto, T. Comparative analysis of interindividual variations in the seminal plasma proteome of fertile men with identification of potential markers for azoospermia in infertile patients. *J. Androl.* **2007**, *28*, 858–865. [[CrossRef](#)]
35. Pilch, B.; Mann, M. Large-scale and high-confidence proteomic analysis of human seminal plasma. *Genome Biol.* **2006**, *7*, R40. [[CrossRef](#)]
36. Liu, X.; Liu, G.; Zhu, P.; Wang, Y.; Wang, J.; Zhang, W.; Wang, W.; Li, N.; Wang, X.; Zhang, C.; et al. Characterization of seminal plasma proteomic alterations associated with the IVF and rescue-ICSI pregnancy in assisted reproduction. *Andrology* **2020**, *8*, 407–420. [[CrossRef](#)]
37. Intasqui, P.; Camargo, M.; Del Giudice, P.T.; Spaine, D.M.; Carvalho, V.M.; Cardozo, K.H.; Zylbersztejn, D.S.; Bertolla, R.P. Sperm nuclear DNA fragmentation rate is associated with differential protein expression and enriched functions in human seminal plasma. *BJU Int.* **2013**, *112*, 835–843. [[CrossRef](#)]

38. Intasqui, P.; Camargo, M.; Antoniassi, M.P.; Cedenho, A.P.; Carvalho, V.M.; Cardozo, K.H.M.; Zylbersztein, D.S.; Bertolla, R.P. Association between the seminal plasma proteome and sperm functional traits. *Fertil. Steril.* **2016**, *105*, 617–628. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Agarwal, A.; Barbăroșie, C.; Ambar, R.; Finelli, R. The impact of single- and double-strand dna breaks in human spermatozoa on assisted reproduction. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 3882. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Ribas-Maynou, J.; García-Peiró, A.; Abad, C.; Amengual, M.J.; Navarro, J.; Benet, J. Alkaline and neutral comet assay profiles of sperm DNA damage in clinical groups. *Hum. Reprod.* **2012**, *27*, 652–658. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Esteves, S.C.; Gosálvez, J.; López-Fernández, C.; Núñez-Calonge, R.; Caballero, P.; Agarwal, A.; Fernández, J.L. Diagnostic accuracy of sperm DNA degradation index (DDSi) as a potential noninvasive biomarker to identify men with varicocele-associated infertility. *Int. Urol. Nephrol.* **2015**, *47*, 1471–1477. [[CrossRef](#)]
42. Lacerda, J.I.; Del Giudice, P.T.; da Silva, B.F.; Nichi, M.; Fariello, R.M.; Fraietta, R.; Restelli, A.E.; Blumer, C.G.; Bertolla, R.P.; Cedenho, A.P. Adolescent varicocele: Improved sperm function after varicocelectomy. *Fertil. Steril.* **2011**, *95*, 994–999. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Dave, P.; Farber, N.; Vij, S. Conventional semen analysis and advanced sperm function tests in diagnosis and management of varicocele. *Andrologia* **2020**, e13629. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Batruch, I.; Lecker, I.; Kagedan, D.; Smith, C.R.; Mullen, B.J.; Grober, E.; Lo, K.C.; Diamandis, E.P.; Jarvi, K.A. Proteomic analysis of seminal plasma from normal volunteers and post-vasectomy patients identifies over 2000 proteins and candidate biomarkers of the urogenital system. *J. Proteome Res.* **2011**, *10*, 941–953. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Del Giudice, P.T.; Da Silva, B.F.; Lo Turco, E.G.; Fraietta, R.; Spaine, D.M.; Santos, L.F.A.; Pilau, E.J.; Gozzo, F.C.; Cedenho, A.P.; Bertolla, R.P. Changes in the seminal plasma proteome of adolescents before and after varicocelectomy. *Fertil. Steril.* **2013**, *100*, 667–672. [[CrossRef](#)]
46. Sharma, R.; Agarwal, A.; Mohanty, G.; Du Plessis, S.S.; Gopalan, B.; Willard, B.; Yadav, S.P.; Sabanegh, E. Proteomic analysis of seminal fluid from men exhibiting oxidative stress. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **2013**, *11*, 85. [[CrossRef](#)]
47. Ahlgren, G.; Rannevik, G.; Lilja, H. Impaired secretory function of the prostate in men with oligo-asthenozoospermia. *J. Androl.* **1995**, *16*, 491–498. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Elzanaty, S.; Richthoff, J.; Malm, J.; Giwercman, A. The impact of epididymal and accessory sex gland function on sperm motility. *Hum. Reprod.* **2002**, *17*, 2904–2911. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Lilja, H. Structure, function, and regulation of the enzyme activity of prostate-specific antigen. *World J. Urol.* **1993**, *11*, 188–191. [[CrossRef](#)]
50. Yang, G.-Z.; Zhu, P.-Y.; Hu, Y.-A.; Ge, Y.-F. Examination and significance of seminal prostate specific antigen in infertile patients. *Zhonghua Nan Ke Xue* **2003**, *9*, 596–598. [[PubMed](#)]
51. Végvári, Á.; Rezeli, M.; Sihlbom, C.; Häkkinen, J.; Carlsohn, E.; Malm, J.; Lilja, H.; Laurell, T.; Marko-Varga, G. Molecular microheterogeneity of prostate specific antigen in seminal fluid by mass spectrometry. *Clin. Biochem.* **2012**, *45*, 331–338. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Bredt, D.S. Endogenous nitric oxide synthesis: Biological functions and pathophysiology. *Free Radic. Res.* **1999**, *31*, 577–596. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Herrero, M.B.; de Lamirande, E.; Gagnon, C. Nitric oxide regulates human sperm capacitation and protein-tyrosine phosphorylation in vitro. *Biol. Reprod.* **1999**, *61*, 575–581. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Balercia, G.; Moretti, S.; Vignini, A.; Magagnini, M.; Mantero, F.; Boscaro, M.; Ricciardo-Lamonica, G.; Mazzanti, L. Role of nitric oxide concentrations on human sperm motility. *J. Androl.* **2004**, *25*, 245–249. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Drevet, J.R.; Aitken, R.J. Oxidative damage to sperm DNA: Attack and defense. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2019**, *1166*, 107–117. [[CrossRef](#)]
56. Tomar, A.K.; Sooch, B.S.; Singh, S.; Yadav, S. Quantification studies in human seminal plasma samples identify prolactin inducible protein as a plausible marker of azoospermia. *Biomarkers* **2012**, *17*, 545–551. [[CrossRef](#)]
57. Capková, J.; Elzeinová, F.; Novák, P. Increased expression of secretory actin-binding protein on human spermatozoa is associated with poor semen quality. *Hum. Reprod.* **2007**, *22*. [[CrossRef](#)]
58. Martínez-Heredia, J.; de Mateo, S.; Vidal-Taboada, J.M.; Ballecà, J.L.; Oliva, R. Identification of proteomic differences in asthenozoospermic sperm samples. *Hum. Reprod.* **2008**, *23*, 783–791. [[CrossRef](#)]

59. Khatun, A.; Rahman, M.S.; Ryu, D.-Y.; Kwon, W.-S.; Pang, M.-G. Elevated aminopeptidase n affects sperm motility and early embryo development. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0184294. [[CrossRef](#)]
60. Khatun, A.; Kang, K.-H.; Ryu, D.-Y.; Rahman, M.S.; Kwon, W.-S.; Pang, M.-G. Effect of aminopeptidase N on functions and fertility of mouse spermatozoa in vitro. *Theriogenology* **2018**, *118*. [[CrossRef](#)]
61. Shui, L.-J.; Meng, Y.; Huang, C.; Qian, Y.; Liu, J.-Y. Aminopeptidase N expression in the endometrium could affect endometrial receptivity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2019**, *514*, 469–474. [[CrossRef](#)]
62. Intasqui, P.; Antoniassi, M.P.; Camargo, M.; Nichi, M.; Carvalho, V.M.; Cardozo, K.H.; Zylbersztejn, D.S.; Bertolla, R.P. Differences in the seminal plasma proteome are associated with oxidative stress levels in men with normal semen parameters. *Fertil. Steril.* **2015**, *104*. [[CrossRef](#)]
63. Maciel, V.L., Jr.; Tamashiro, L.K.; Bertolla, R.P. Post-translational modifications of seminal proteins and their importance in male fertility potential. *Expert Rev. Proteom.* **2019**, *16*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Komander, D. The emerging complexity of protein ubiquitination. *Biochem. Soc. Trans.* **2009**, *37*, 937–953. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Zigo, M.; Manaskova-Postlerova, P.; Jonakova, V.; Kerns, K.; Sutovsky, P. Compartmentalization of the proteasome-interacting proteins during sperm capacitation. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 12583. [[CrossRef](#)]
66. Sutovsky, P.; Moreno, R.; Ramalho-Santos, J.; Dominko, T.; Thompson, W.E.; Schatten, G. A putative, ubiquitin-dependent mechanism for the recognition and elimination of defective spermatozoa in the mammalian epididymis. *J. Cell Sci.* **2001**, *114*, 1665–1675.
67. Muratori, M.; Marchiani, S.; Criscuoli, L.; Fuzzi, B.; Tamburino, L.; Dabizzi, S.; Pucci, C.; Evangelisti, P.; Forti, G.; Noci, I.; et al. Biological meaning of ubiquitination and DNA fragmentation in human spermatozoa. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.* **2007**, *63*, 153. [[PubMed](#)]
68. Ribas-Maynou, J.; García-Peiró, A.; Fernandez-Encinas, A.; Amengual, M.J.; Prada, E.; Cortés, P.; Navarro, J.; Benet, J. Double stranded sperm DNA breaks, measured by comet assay, are associated with unexplained recurrent miscarriage in couples without a female factor. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e44679. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Martiáñez, T.; Carrascal, M.; Lamarca, A.; Segura, M.; Durany, N.; Masgrau, R.; Abian, J.; Gella, A. UTP affects the schwannoma cell line proteome through P2Y receptors leading to cytoskeletal reorganisation. *Proteomics* **2012**, *12*, 145–156. [[CrossRef](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

4.3 ARTICLE III: TMT-BASED PROTEOMIC ANALYSIS OF HUMAN SPERMATOZOA FROM UNEXPLAINED RECURRENT MISCARRIAGE PATIENTS BEFORE AND AFTER ORAL ANTIOXIDANT TREATMENT

RESULTATS DE L'OBJECTIU GENERAL 3: Article III

“TMT-based proteomic analysis of human spermatozoa from unexplained recurrent miscarriage patients before and after oral antioxidant treatment”

Autors: Alba Fernandez-Encinas, Agustín García-Peiró, Jordi Ribas-Maynou, Olga Martínez-Pasarell, Joaquina Navarro, Jordi Benet.

Revista: Manuscrit en revisió

TMT-based proteomic analysis of human spermatozoa from unexplained recurrent miscarriage patients before and after oral antioxidant treatment.

Alba Fernandez-Encinas ¹, Jordi Ribas-Maynou ¹, Agustín García-Peiró ², Olga Martínez-Pasarell ³, Joaquina Navarro ¹, and Jordi Benet ^{1*}

¹ Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia. Universitat Autònoma de Barcelona. 08193 Bellaterra, Spain.

² Centro de Infertilidad Masculina y Análisis de Barcelona (CIMAB). Sant Quirze del Vallès, Barcelona, Spain

³ Fundació Puigvert Hospital de Sant Pau i de la Santa Creu, Barcelona, Spain

* Correspondence: jordi.benet@uab.cat; Tel.: (+34) 935811773.

Abstract:

Recurrent miscarriage is the consecutive loss of two or more clinical pregnancy before 20 weeks of gestation, which affects 1% to 5% of women. Despite various identified causes of miscarriages, there is still a lack of specific biomarkers for the disease to achieve an effective diagnosis of idiopathic patients. The aim of this study is to identify differences in protein expression of sperm from fertile donors and unexplained recurrent miscarriage patients, both before and after oral treatment with antioxidants. Bioinformatics analysis revealed that largely differentially expressed proteins (DEPs), localized in cell or in membrane, are involved in cellular and metabolic processes, also in reproductive function. Protein-protein interactions among DEPs showed diverse clusters in network edges related to: cellular metabolism, cytoskeleton and DNA damage. No significant differences were found between recurrent miscarriage group (RM) and recurrent miscarriage after antioxidant treatment group (RM-OA) but some proteins ameliorated the changes observed in RM-OA towards fertile donor. Among them, LMO7, MMP28, NEFH and BNC2. H2B, GPX4 and PRDM2 proteins were found deregulated and were involved in DNA damage, remodeling and repairing DNA in sperm nucleus, also decondensing paternal DNA in the embryo, respectively.

Keywords: sperm; recurrent miscarriage; sperm DNA fragmentation; proteomics; male infertility.

1. Introduction

Pregnancy loss, which is the interruption of a pregnancy after fertilization is a common issue in human reproduction, reaching nearly 50% of embryos generated ^{1,2}. Pregnancy loss can happen before the embryo is successfully implanted in the uterus, between embryo implantation and the recognition of biochemical pregnancy, or when pregnancy is clinically recognized through heartbeat. In the two first situations, the pregnancy loss cannot clinically be differentiated from infertility, and in the third, a miscarriage occur. Miscarriage is the most serious complication of a recently achieved pregnancy, representing the loss of the fetus before it has reached viability to be born. Studies have reported an approximate incidence of about 15%, and it has been quoted that between 25% and 50% of women experience miscarriages

during her reproductive life ^{2,3}. Miscarriages may happen spontaneously or in a recurrent manner. Recurrent miscarriages are defined as two or more consecutive clinical pregnancy losses before reaching the end of the first trimester or early second trimester, and have a lower incidence of about 1% to 5% couples trying to conceive ^{4,5}. Since the incidence of recurrent miscarriage is increased in comparison to the combined incidence of two or three spontaneous miscarriages, which would be in the range of 0.34% to 2.25%, the physiopathology of recurrent miscarriage deserves to be studied in depth. Then, multiple studies identified different causes leading to this disease, which can be classified into genetic abnormalities, structural abnormalities, infections, endocrine abnormalities, immune dysfunctions, antiphospholipid syndrome, thrombophilic disorders, or unknown^{2,6,7}. Among all them, cytogenetic abnormalities such as trisomy, polyploidy and monosomy represent the most common affectations, being reported in at least 50% to 60% of miscarriages^{3,8-10}. Also, antiphospholipid syndrome happen in about 15% of women in recurrent miscarriage, being the miscarriage rate up to 90% in women with the disease ¹¹⁻¹³.

It is undeniable that both the sperm cell and the oocyte are almost equally responsible for causing human infertility. Regarding male factors, different reports have shown that affectations in the sperm DNA can be translated into the embryo, leading to lower embryo quality, associated to male-factor infertility ¹⁴. About that, and in relation to miscarriages, two different origins can be identified in the literature: in one hand, multiple studies have found an association between miscarriages and sperm DNA integrity affectations analyzed using different methodologies ¹⁵⁻¹⁸. These affectations have been related to oxidative stress, being the main causes of the disease being the increase of reactive oxygen species, which are the major effectors of sperm DNA damage, or the decrease of natural antioxidant system ^{19,20}. To reduce oxidative DNA damage and reactive oxygen species, antioxidant treatments are routinely applied to human males. Despite it is well known that antioxidants lead to a reduction of oxidative damage, the Cochrane report on antioxidants for male subfertility shows that no conclusive results are obtained in this direction yet ²¹. On the other hand, it has been shown that the presence of double-stranded DNA breaks at the sperm toroid linker regions (TLR) are associated to a higher risk of recurrent pregnancy loss in couples with unexplained recurrent miscarriage²², and to a higher risk of implantation failures in couples undergoing intracytoplasmic sperm injection (ICSI)²³. These specific double-strand breaks remain associated at the nuclear matrix and, if not repaired in the first stages of embryo development, might cause genetic defects such as loss of chromosomal fragments or alterations of the genetic code ²².

Both of previous approaches are important for the diagnosis and prognosis of recurrent miscarriage and their contributions may help couples and clinicians by informing about the risk of miscarriage. However, more specific biomarkers need to be identified in order to better characterize the upcoming issues in an infertile couple. In this sense, a recent study by Xue et al., identified 38 proteins that were significantly altered in recurrent miscarriage patients, mostly related to metabolic processes, biological regulation and protein binding activities ²⁴. Also, a study by Sutovsky et al., identified that patients with high SPTRX3 protein content in semen are prone to recurrent miscarriage ²⁵. Finally, recently it has been reported some seminal plasma proteins which could be also associated to recurrent miscarriage, as prostate-specific antigen or clusterin, which were found to be upregulated, and annexin A3, which were found downregulated ²⁶.

The discovery of new biomarkers that specifically establish a relation between human sperm cells and recurrent miscarriage is of high importance, since assisted reproduction methods such as ICSI select unique sperm cells to be injected to the oocyte. These new markers may serve as diagnostic approaches or for the design of new sperm selection methods that reduce future miscarriages. Then, the main aim of the present work is to use a high-throughput proteomic approach to identify differences in sperm cells between a cohort of recurrent miscarriage patients where male factor has been observed and fertile donors. As a secondary

objective, we aimed to determine if antioxidant treatment caused an ameliorative effect to the differentially expressed proteins.

2. Results

2.1 Sperm DNA fragmentation

Patients included in each of the three groups used for proteomic characterization were tested for their DNA fragmentation values, double strand DNA damage using neutral Comet and oxidative DNA damage using alkaline Comet, for all three groups included in this work, are shown in Table 1

Table 1. Sperm DNA fragmentation (mean \pm SD) in fertile donors and unexplained RM samples before and after oral antioxidants treatment.

Group and Pathology	Oxidative DNA damage (Alkaline Comet)	Double strand breaks (Neutral Comet)
FD (n=5)	37.4 \pm 12.64	51.6 \pm 14.18
RM (n=5)	43.8 \pm 11.07	75.6 \pm 4.04
RM-OA (n=5)	43.6 \pm 1.51	64.2 \pm 6.09

2.2 Analysis of differentially expressed proteins (DEPs)

TMT labeling following LC-MS/MS analysis resulted in the identification of 607 proteins with unique peptides or polypeptide segments. In comparison with fertile donors, recurrent miscarriage group showed twenty-three proteins significantly upregulated (fold-change >1.5 , $p < 0.05$) and 6 downregulated (fold-change <0.67 , $p < 0.05$). Similarly, recurrent miscarriage group after oral antioxidant treatment showed twenty-five proteins upregulated and 5 downregulated compared to fertile donors (Table 2). The greater changes in protein levels were detected for PR domain zinc finger protein 2 (4.49-fold, $p < 0.01$), Microtubule-associated protein 2 (3.20-fold each, $p < 0.01$), A-kinase anchor protein 4 (2.49-fold, $p < 0.01$) and Zinc finger protein basonuclin-2 (0.36-fold each, $p < 0.01$). Although no DEPs were found between RM and RM-AO groups, there were proteins that were statistically different between RM and FD, and that lost these statistical differences when comparing RM-AO and FD. This fact meant that treatment with antioxidants improved their expression level. These proteins that improved after the treatment were: LIM domain only protein 7, Matrix metalloproteinase-28, Neurofilament heavy polypeptide and Zinc finger protein basonuclin-2. Other proteins also improved their level of expression although to a minor extent: PR domain zinc finger protein 2, Ankyrin repeat and SOCS box protein 14, Calcium-binding tyrosine phosphorylation-regulated protein, Chromosome-associated kinesin KI4B, Microtubule-associated protein 2 and Sperm surface protein Sp17.

Table 2. DEPs in human spermatozoa from fertile donor (FD) vs recurrent miscarriage before (RM) and after oral antioxidant treatment (RM-OA).

Protein name	Gene name	Uniprot Ac	FD vs RM		FD vs RM-OA	
			Ratio FD/RM	p-value	Ratio FD/RM	p-value
Upregulated						

28S ribosomal protein S31, mitochondrial	RT31_HUMAN	Q92665	1.86	0.04	1.61	0.04
Acrosin	ACRO_HUMAN	P10323	2.03	0.00	1.89	0.00
A-kinase anchor protein 3	AKAP3_HUMAN	O75969	1.69	0.01	1.70	0.01
A-kinase anchor protein 4	AKAP4_HUMAN	Q5JQC9	2.49	0.02	2.58	0.01
Ankyrin repeat and SOCS box protein 14	ASB14_HUMAN	A6NK59	2.53	0.01	2.09	0.02
ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	ATPA_HUMAN	P25705	1.49	0.02	1.63	0.01
Calcium-binding tyrosine phosphorylation-regulated protein	CABYR_HUMAN	O75952	2.10	0.00	1.59	0.01
Cathelicidin antimicrobial peptide	CAMP_HUMAN	P49913	1.56	0.05	1.69	0.02
Chromosome-associated kinesin KI4B	KIF4B_HUMAN	Q2VIQ3	2.10	0.00	1.59	0.01
Dynein light chain 1, cytoplasmic	DYL1_HUMAN	P63167	1.89	0.06*	2.20	0.02
Glutathione S-transferase Mu 3	GSTM3_HUMAN	P21266	1.91	0.01	2.03	0.00
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, testis-specific	G3PT_HUMAN	O14556	1.92	0.02	1.98	0.01
Histone H2B type 1-A	H2B1A_HUMAN	Q96A08	2.17	0.00	2.33	0.00
Heat shock protein beta-1	HSPB1_HUMAN	P04792	2.30	0.01	2.67	0.00
LIM domain only protein 7	LMO7_HUMAN	Q8WWI1	1.63	0.03	1.12	0.63*
Matrix metalloproteinase-28	MMP28_HUMAN	Q9H239	1.99	0.01	1.64	0.03*
Microtubule-associated protein 2	MTAP2_HUMAN	P11137	3.20	0.00	2.54	0.00
Neurofilament heavy polypeptide	NFH_HUMAN	P12036	1.72	0.03	1.49	0.06*
Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase	GPX4_HUMAN	P36969	1.80	0.02	2.08	0.00
PR domain zinc finger protein 2	PRDM2_HUMAN	Q13029	4.49	0.01	2.76	0.02
Probable C-mannosyltransferase DPY19L2	D19L2_HUMAN	Q6NUT2	2.19	0.02	2.05	0.02
Pyruvate kinase PKM	KPYM_HUMAN	P14618	2.03	0.01	1.85	0.01
Serum amyloid P-component	SAMP_HUMAN	P02743	1.96	0.01	1.76	0.05

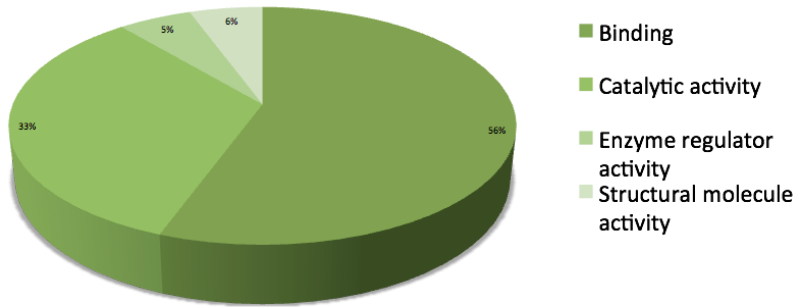
Sperm acrosome membrane-associated protein 4	SACA4_HUMAN	Q8TDM5	1.61	0.07*	1.86	0.03
Sperm protein associated with the nucleus on the X chromosome B1	SPNXB_HUMAN	Q9NS25	1.56	0.03	2.14	0.00
Sperm surface protein Sp17	SP17_HUMAN	Q15506	2.73	0.00	2.19	0.00
Two pore calcium channel protein 1	TPC1_HUMAN	Q9ULQ1	1.74	0.01	1.60	0.03
Zona pellucida-binding protein 1	ZPBP1_HUMAN	Q9BS86	1.84	0.07*	1.96	0.02
Downregulated						
Clusterin	CLUS_HUMAN	P10909	0.47	0.00	0.52	0.00
Hepatocyte growth factor activator	HGFA_HUMAN	Q04756	0.60	0.02	0.48	0.00
Nebulin-related-anchoring protein	NRAP_HUMAN	Q86VF7	0.37	0.02	0.38	0.01
Prolactin-inducible protein	PIP_HUMAN	P12273	0.44	0.01	0.54	0.00
Ras-specific guanine nucleotide-releasing factor RalGPS1	RGPS1_HUMAN	Q5JS13	0.29	0.01	0.37	0.00
Zinc finger protein basoonuclin-2	BNC2_HUMAN	Q6ZN30	0.36	0.05	0.43	0.07*

*Proteins that did **not** show statistical differences with the specific group compared.

2.3 Functional Enrichment and Clustering Analyses of DEPs

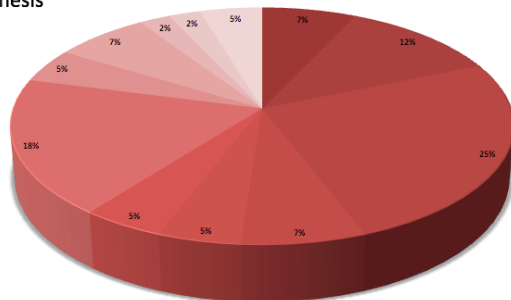
Functional enrichment analyses were performed to investigate the biological functions, processes and cellular localization of DEPs. Classification was based on Gene Ontology (GO) using PANTHER 15.0 bioinformatics software platform. DEPs in both RM and RM-OA groups had similar GO enrichment classification. The analysis revealed that DEPs were largely involved in binding and catalytic activity molecular function; other functions were transcription regulation and transporting activity as shown in (Fig.1A). They were also enriched in diversity of processes, mainly in cellular and metabolic processes accounted for ~ 40% and in component organization or biogenesis (Fig.1B). Interestingly, development, reproduction and reproductive processes added up to 15.6%. Moreover, DEPs were found to be in the cell and cell part in 16.9% each, also in organelle or organelle part (24.7%) and membrane (15.6%) (Fig.1C).

A. Molecular function



B. Biological process

- Biological regulation
- Cellular component organization or biogenesis
- Cellular process
- Developmental process
- Immune system process
- Localization
- Metabolic process
- Multi-organism process
- Multicellular organismal process
- Reproduction
- Reproductive process
- Responds to stimulus



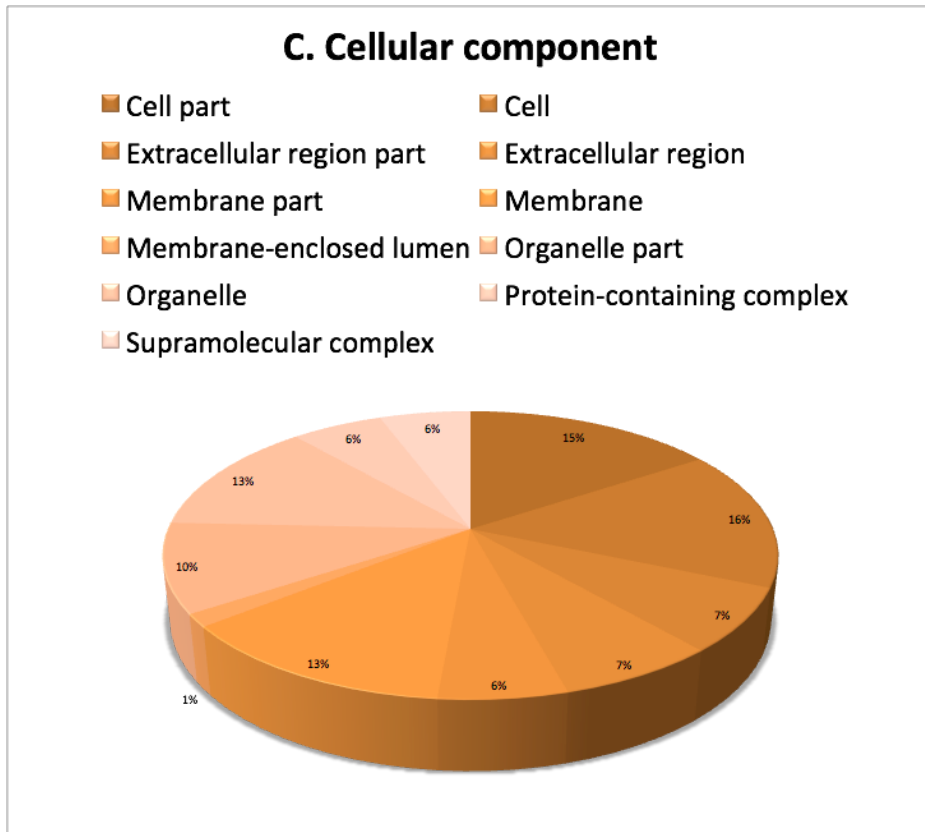


Figure 1. Classification and annotation of DEPs by PANTHER database (Protein Analysis Through Evolutionary Relationships). GO analysis of DEPs in sperm of recurrent miscarriage patients before and after antioxidant treatment vs fertile donors. Proteins were classified by their molecular function (A), biological process (B) and cellular component (C).

To create protein-protein interaction network for identified DEPs in sperm of RM, RM-OA patients and FD proteins, software String 11.0 was used. The generated network shows the proteins as nodes that are linked through edges. Search revealed that most of proteins were clustered in nodes related to: cytoskeleton and largest with sperm surface, metabolism, and, finally DNA-histones interaction (Fig.2A). Moreover, in a second level shell, most clustered proteins are involved in ATP synthase complex and mitochondrial ribosomal protein; all nodes of interaction were connected by PKD (Fig. 2B).

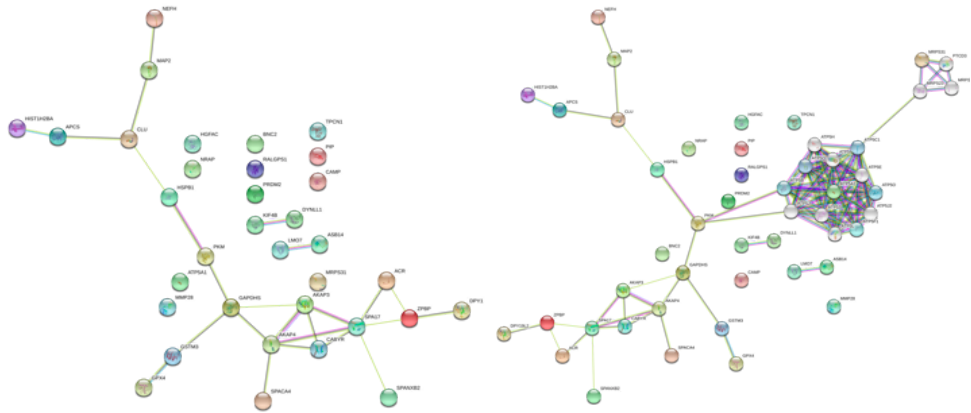


Figure 2. Map of Protein-Protein interactions of DEPs analyzed by Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins (STRING) in a first shell, direct interconnections (A) and second shell, indirect interconnections (B).

3. Discussion

The search of sperm protein biomarkers that allow researchers and clinicians to better characterize infertile couples and that enable a new generation of personalized and directed therapies is a crucial topic to advance in the human reproduction field. Since double-stranded DNA damage is a male condition leading to a higher risk of miscarriage even in couples without female factors described ²⁷, the definition of differential proteins between these group and fertile donors is interesting to know the potential paths leading to pathology. Here, it has been tested the molecular differences of recurrent miscarriage patients with double-stranded DNA damage and fertile donors, and also, the effect of antioxidants among these patients.

Comparative proteomics studies have previously been conducted on sperm ²⁸⁻³⁰, however only a few recent reports included patients with recurrent miscarriage ^{24,31}. The present study is the first to compare the protein profile of patients with recurrent miscarriage taking into account the double-stranded DNA fragmentation profile of sperm and analyzing same semen samples before and after treatment with oral antioxidants. The use of TMT in quantitative proteomics permits the analysis of multiple groups within the same experimental design with high resolution. Here, it has been identified and quantified a total of 607 proteins from 15 semen samples grouped according to their clinical status and having a defined oxidative and double-stranded DNA damage. A total of thirty-four proteins showed a differential expression between fertile donors and other recurrent miscarriage groups. Some of them were previously described in recurrent miscarriage or in ROS+ patients like A-Kinase anchor protein 4 (AKAP4), Histone H2B type 1-A (H2B1A), Prolactin-induced protein (PIP), Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PT), Sperm protein associated with the nucleus X chromosome (SPANXB), Glutathione S-transferase mu 3 (GSTM3), Clusterin (CLU), among others ^{24,31,32}. Others were described for first time in recurrent miscarriage group like PR domain zinc finger protein 2 (PRDM2), Serum amyloid P-component (SAMP), LIM domain only protein 7 (LMO7), Probable C-mannosyltransferase DPY19L2 (DPY19L2), among others.

Slight differences were found regarding double-stranded DNA damage between recurrent miscarriage patients and the same patients after antioxidants, fact that suggests that the route

for the generation of these DNA breaks may not depend on oxidative stress³³. Similarly, no significant differences in protein abundance were found between these groups, and only a change in LIM domain only protein 7, Matrix metalloproteinase-28, Neurofilament heavy polypeptide and Zinc finger protein basonuclin-2 were identified, leading to more similarity of RM-OA to FD than RM to FD. Studies have been conducted comparing patient samples before and after antioxidant supplementation, but results are highly antagonistic³⁴⁻³⁶. Also,³⁷ have improved the ROS detection techniques with which they have isolated the proteins of the sperm that were adducted. These derived mainly from the prostate, indicating that oxidative stress originates from external fluids and not from the sperm cell itself.

GO enrichment analysis revealed that functions of the identified proteins in RM and RM-OA groups were very similar and significantly enriched in binding and catalytic function and interestingly in cellular and metabolic processes, demonstrating that these pathways are important to the etiology of recurrent miscarriage infertility in accordance to previous studies^{24,31}. Also, more than 15% of DEPs were involved in developmental or reproductive functions which indicate that they are involved in sperm fertility function. Finally, as expected, analysis of protein localization showed that DEPs were mostly located in the intracellular part of the cell. Therefore, proteins analyzed derived mostly from the cell and organelles, not from the extracellular fluid. Also, membrane proteins accounted for 15.6% like A-kinase anchor protein 3 and 4, Microtubule-associated protein 2, Calcium-binding tyrosine phosphorylation-regulated protein, Probable C-mannosyltransferase DPY19L2, Zona pellucida-binding protein 1 and Two pore calcium channel protein 1. These could be interesting as new protein biomarkers for sperm selection before ART treatment.

Protein-protein interactions among DEPs showed diverse clusters in network edges related to (Fig.2A): cellular metabolism, cytoskeleton (motility and sperm-egg fusion) and DNA damage. Six proteins were directly involved in metabolic processes participating in glycolysis and oxide-reduction processes. All were upregulated in recurrent miscarriage samples: Pyruvate kinase PKM (KPYM), Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PT), Glutathione S-transferase Mu 3 (GSTM3), Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (GPX4). Mitochondrial membrane ATP synthase (ATPA) was also significantly upregulated but only in the RM-OA group. Most of them has been demonstrated its sensibility to ROS³⁸. GSTM3 is an important detoxifying enzyme and has a role in cell detoxification from ROS, cellular signaling for capacitation and fertilizing ability³⁹, in animals has been established as a biomarker in cryotolerance and fertility^{40,41}. GPX4 is an essential antioxidant enzyme that protects cell from ROS⁴² and it is localized in three different cell components: cytosolic, mitochondrial and nuclear. In nuclear cell, GPX4 is associated to MAR regions and has a role in DNA condensation during spermiogenesis⁴³ and in a paternal decondensation affecting embryo development^{44,45}. DNA double-strand breaks are also localized in MAR regions in order to be repaired by the future embryo^{46,47}.

Cytoskeleton is very important in sperm cells since it is responsible for cell movement and shape, as well as, sperm-egg fusion, acrosome reaction, vesicular transport, among others. Acrosin, A-kinase anchor protein 3 (AKAP3), A-kinase anchor protein 4 (AKAP4), Microtubule-associated protein 2 (MAP2), Calcium-binding tyrosine phosphorylation-regulated protein, Matrix metalloproteinase-28, Probable C-mannosyltransferase DPY19L2, Ras-specific guanine nucleotide-releasing factor RalGPS1 and Sperm surface protein Sp17 were upregulated. In contrast, Nebulin-related-anchoring protein was downregulated and Neurofilament heavy polypeptide (NEFH) in the RM-OA group improved its profile after treatment with oral antioxidants. NEFH has not been characterized yet in human sperm, although it has been characterized in shrimp along with MAP2 and Tau proteins in the subacrosomal zone of the sperm⁴⁸. However, MAP2 has been found in human sperm⁴⁹ and interacts with neurofilaments and microtubules to stabilize their growth⁵⁰.

Protein regulation such as folding and post-translational modifications like ubiquitination, phosphorylation, etc. is very important in maintenance of correct cellular processes. Ankyrin repeat and SOCS box protein 14, Heat shock protein beta-1 (HSPB1) are involved in and were found upregulated. LIM domain only protein 7 was also upregulated but only in RM group, RM-OA group improves their expression profile. LMO7 protein is implicated in large biological functions through ubiquitination pathway. PPI revealed its interaction with ASB14, which is an ankyrin repeat and cytokine signaling (SOCS) box (ASB) family protein that regulates proteins via polyubiquitination (Wang et al., 2019). Some LMO7 functions are related to actin cytoskeleton organization as cell-cell junctions or cell-matrix junctions ⁵¹, in embryonic development and oncogenesis, etc ⁽⁵²⁾. LMO7 through its LIM domain has also been shown to act to control the progression of mitosis and to exert an effect on SAC (Spindle Assembly Checkpoint). HSPB1 is a protein regulated by cellular stressors such as ROS, acts in the maintenance of the cytoskeleton ⁵³ and has been shown to be in high concentration in sperm resulting in poor quality blastocyst, clusterin as well ⁵⁴. Clusterin also protects against ROS, participating in multiple biological processes like stress response, cell cycle control, DNA repair in apoptosis ^{31,55}. Recently, CLU has been proposed as a new biomarker due to its role as regulator of paternal factors ⁵⁶.

Chromosome-associated kinesin KIF4B, Histone H2B type 1-A (H2B1A), PR domain zinc finger protein 2 (PRDM2), Serum amyloid P-component (SAP), Sperm protein associated with the nucleus on the X chromosome B1 (SPANXB1) and Zinc finger protein basonuclin-2 (BNC2) are located to sperm nucleus. Sperm DNA is packaged by histones that are replaced by protamines during spermiogenesis, alterations in this process cause defects in chromatin packaging and damage to sperm DNA ⁵⁷⁻⁵⁹. An increase in sperm nucleus of H2B1A has been shown to lead to decreased mobility, DNA compaction and increased sperm DNA fragmentation ⁶⁰. Another DEP involved in SDF is PRDM2 which a study suggested that it is part of the double-strand break repair complex (DSB), critical for maintaining DNA integrity ⁶¹ APCS had already been described in samples from infertile patients ^{62,63}. It is known to have a specific interaction with chromatin favoring its solubilization ⁶⁴ and therefore may contribute to physiological development handling of chromatin released from cells in vivo. It has also been shown that apoptotic cells, which carry chromatin fragments on their surface, are always coated with SAP ⁶⁵. In a previous study SAP correlated with infertile patients who showed high sperm DNA fragmentation and poorer embryonic quality ⁶⁶. BNC2 improved its profile in patients after antioxidant treatment and found it under-expressed. It has been described as a DNA-binding protein that regulates meiosis and mitosis in male germ cells ⁶⁷ may also be involved in the activation of the paternal genome.

In conclusion, the present study analyzed for the first time the profile of protein with differential expression in recurrent miscarriage before and after oral antioxidant treatment. No significant differences between RM and RM-OA group were found, but some proteins improved their profile in relation to fertile donors values such as LMO7, MMP28, NFH and BNC2. In addition proteins differentially expressed between fertile donors and recurrent miscarriage groups are vulnerable to oxidative stress and implicated in cytoskeleton organization and acrosome reaction, ATP production sperm for motility. H2B, GPX4 and PRM2 proteins have been found deregulated and may be involved in sperm double-strand breaks that cause in RM patients since they could play a role in the remodeling and repair of DNA in sperm nucleus and decondensation of the paternal DNA in the embryo, respectively. Further studies should analyze the specific effect of each protein on development to improve the knowledge of the molecular basis of the miscarriage disease.

4. Materials and Methods

4.1. Samples and study design

Semen samples have been collected from five fertile donors and five infertile patients with recurrent miscarriage, both before and after oral antioxidant treatment. Semen samples from patients were classified in three groups according their clinical features, and oxidative and double-stranded DNA damage was measured using Comet assay;

- i) Fertile donors (FD) group: included five fertile donors who presented normal semen parameters, low alkaline Comet and low neutral Comet.
- ii) Recurrent miscarriage (RM) group: included samples from five recurrent miscarriage patients to whose couple was discarded for the most common related female factors. All these patients showed high values of neutral Comet, and four of them low values of alkaline Comet.
- iii) Recurrent miscarriage after oral antioxidant treatment (RM-AO) group included samples from the previous RM patients who took an oral antioxidant treatment (1500 mg L-Carnitine , 20 mg Coenzyme Q10, 60 mg Vitamin C, 10mg Vitamin E, 200 µg Folic acid , 1 µg Vitamin B12, 50 µg Selenium and 10 mg Zinc) for three months.

All samples were collected by masturbation after 2-5 days of recommended abstinence. Written informed consent was obtained for all patients and the Parc Taulí Hospital ethics committee approved the present study on 2 September 2017 with registration number 2017902.

4.1.2 Semen collection and cryopreservation

After liquefaction, routine semen analysis was performed according to WHO (2010) and, subsequently, the semen was divided into two aliquots; 500 µl each of unprocessed semen sample was cryopreserved with Test yolk buffer (14% glycerol, 30% egg yolk, 1.98% glucose, 1.72% sodium citrate) and stored at -80°C until use for TMT analysis or Comet assay.

4.1.3 DNA integrity tests: alkaline Comet and neutral Comet

Comet assay is performed in two versions, alkaline Comet and neutral Comet, detecting different types of DNA breaks. The complete protocol has been described elsewhere²³, briefly, samples were thawed for 30s at 37°C and washed in PBS. After adjusting sperm concentration to 1·10⁶ sperm/mL, and mixing samples with 1% low melting point agarose, microgels were mounted by pouring 15 µl in two different slides and cooling at 4°C for 5 minutes. Then, coverslips were removed, lysis steps were performed, and electrophoresis was conducted at alkaline pH for alkaline Comet and at neutral pH for neutral Comet. Finally, slides were dehydrated, stained with DAPI (Slowfade Gold antifade, TermoFisher, USA) and evaluated according to previously reported criteria⁶⁸.

4.2. Proteomic analysis of spermatozoa

4.2.1 Sample preparation for proteomic analysis

Each sample was thawed at 37°C for 30s and washed three times with PBS to keep sperm cells in a pellet. Sperm cells were lysed with a buffer [50 mM Tris-HCl, 2 % SDS, 10 mM dithiothreitol (DTT)] were solubilized and sonicated three times on ice. The lysed cells were centrifuged at 16100 × g for 15 min at 4 °C and supernatant were carefully collected. Proteins were quantified using Pierce BC protein Assay using manufacture protocol.

Finally, proteins were reduced in 5 mM dithiothreitol at 60°C for 30 min, alkylated with 0.5 M iodoacetamide for 30 min in the dark. Proteins were precipitated with cold 100% acetone for

15 min at -20°C . After centrifugation ($16100 \times g$, 4°C , 15 min) and protein pellets resuspended in 50 mM TEAB (tetraethylammonium bicarbonate) to a concentration of $[1 \mu\text{l} / \mu\text{l}]$.

4.2.2 Trypsin digestion and TMT-labeling

The proteins were digested with trypsin in a mass ratio of trypsin to protein (1:50) overnight at 37°C with constant shaking. After trypsin digestion, internal control was constituted with the same concentration of proteins from all samples. Peptides from samples were desalted using a Strata X C18 SPE column (Phenomenex, California, USA) and vacuum-dried. Samples were labeled with TMT isobaric tags according to the manufacturer's instructions for a 10-plex TMT kit (ThermoFisher, Massachusetts, USA). The peptide mixture was then incubated with the prepared TMT reagent for 2 h, at room temperature and pooled in two different multiplex experiments, Run 1 with 9 samples (TMT tags 127N, 127C, 128N, 128C, 129N, 129C, 130N, 130C, and 131) and 1 internal control (TMT tag 126), and Run 2 with 6 samples (TMT tags 127 C, 128C, 129C, 130N, 130C and 131) and 1 internal control (TMT tag 126). After, pooled samples were dried and reconstituted in 0.1% formic acid. Finally, peptide clean up and fractionation were performed by using Pierce C18 Spin Columns (ThermoFisher, Massachusetts, USA) following manufacturer's protocol.

4.2.3 Liquid chromatography and mass spectrometry analysis

The TMT-labeled tryptic peptide mixture peptide clean up and fractionation were performed by using reverse-phase nanoscale liquid chromatography (nanoLC) with trap column C-18 (L 2 cm, $100 \mu\text{m}$ ID, $5 \mu\text{m}$, ThermoScientific) and analytical column (L 15 cm, $75 \mu\text{m}$ ID, $3 \mu\text{m}$, ThermoScientific) with a 3-97% acetonitrile gradient in 0.1% acid formic over 125 min at flow rate of 350 nL/min. Subsequently, to obtain MS/MS spectra of each peptide were used a LTQ Orbitrap Velos (ThermoFisher, Massachusetts, USA).

4.2.4 Protein identification, quantification and data analysis

All raw files were searched against SwissProt in-house protein fasta file with *Homo sapiens* and *Gallus gallus* sequences, a total of 23733 proteins using SEQUEST HT version 28.0 (Thermo Fisher Scientific). Settings searches were used: two missing cleavages for Trypsin, 0.6 Da fragment mass tolerance, 20 ppm precursor mass tolerance, carbamidomethylation on Cys were specified as the fixed modification and oxidation on Met was specified as variable modifications.

Criterion to accept protein identification was adjusted to 1% of false discovery rate (FDR) and at least one unique peptide per protein. The normalized TMT quantification of relative protein values was calculated by the ratio between the reported ion intensities from each individual sample and the reporter ion intensity from the internal control. To minimize the effect of samples contamination, those spectra identified as chicken-derived proteins from the cryopreservation medium and seminal plasma were excluded from the normalization analysis. Differentially expressed protein (DEP) was identified as that with a cut-off value over 1.5-fold change for upregulated and 0.67-fold change for downregulated with a $P < 0.05$ calculated by Student's t-test.

4.2.5 Functional enrichment analysis

The determination of the percentage of proteins involved in "molecular function", "biological process" and "cellular component" was performed by PANTHER database (Protein

Analysis Through Evolutionary Relationships, <http://pantherdb.org>) and data obtained was prepared as a graphs using MS Excel 2011.

Protein-protein interaction networks were performed by using STRING database (version 8.3; <http://string.embl.de/>) to show interactions of identified proteins with a specific group of molecules.

Author Contributions:

Conceptualization, Jordi Benet, Joaquina Navarro, Alba Fernandez-Encinas, Agustín Garcia-Peiró and Jordi Ribas-Maynou; methodology Jordi Benet, Joaquina Navarro, Alba Fernandez-Encinas, Agustín Garcia-Peiró, Jordi Ribas-Maynou; data acquisition Alba Fernandez-Encinas, Agustín Garcia-Peiró, Jordi Ribas-Maynou, Olga Martínez-Pasarell; writing—original draft preparation, Alba Fernandez-Encinas and Jordi Ribas-Maynou writing—review and editing, Jordi Benet, Joaquina Navarro, Alba Fernandez-Encinas, Agustín Garcia-Peiró, Jordi Ribas-Maynou; supervision, Jordi Benet, Joaquina Navarro, Agustín Garcia-Peiró.

Funding: This research was funded by the European Regional Development Fund and Instituto de Salud Carlos III (Economy, Industry and Competitiveness Ministry, Madrid, Spain; Project PI14/00119) and Generalitat de Catalunya (Project 2017SGR1796)

Acknowledgments: We would like to thank the *Servei de Proteòmica del Laboratori UB*.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest

Abbreviations

TMT	Tandem Mass Tag
DEP	Differentially Expression protein
SDF	Sperm DNA fragmentation
FD	Fertile donors
RM	Recurrent miscarriage group
RM-OA	Recurrent miscarriage after oral antioxidant treatment group
MS	Mass spectrometry
TMT	Tag Mass Tag

References

1. Chard, T. Frequency of Implantation and Early Pregnancy Loss in Natural Cycles. *Baillieres. Clin. Obstet. Gynaecol.* **1991**, *5* (1). [https://doi.org/10.1016/S0950-3552\(05\)80077-X](https://doi.org/10.1016/S0950-3552(05)80077-X).
2. Rai, R.; Regan, L. Recurrent Miscarriage. *Lancet (London, England)* **2006**, *368* (9535), 601–611. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)69204-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)69204-0).
3. Stirrat, G. M. Recurrent Miscarriage. *Lancet (London, England)* **1990**, *336* (8716), 673–675. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(90\)92159-f](https://doi.org/10.1016/0140-6736(90)92159-f).
4. Hogge, W. A.; Byrnes, A. L.; Lanasa, M. C.; Surti, U. The Clinical Use of Karyotyping Spontaneous Abortions. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **2003**, *189* (2), 397–400; discussion 400–2. [https://doi.org/10.1067/s0002-9378\(03\)00700-2](https://doi.org/10.1067/s0002-9378(03)00700-2).
5. Evaluation and Treatment of Recurrent Pregnancy Loss: A Committee Opinion. *Fertil. Steril.* **2012**, *98* (5). <https://doi.org/10.1016/J.FERTNSTERT.2012.06.048>.
6. Ewington, L. J.; Tewary, S.; Brosens, J. J. New Insights into the Mechanisms Underlying Recurrent Pregnancy Loss. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* **2019**, *45* (2), 258–265. <https://doi.org/10.1111/jog.13837>.

7. Woolner, A. M. F.; Nagdeve, P.; Raja, E.-A.; Bhattacharya, S.; Bhattacharya, S. Family History and Risk of Miscarriage: A Systematic Review and Meta-Analysis of Observational Studies. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* **2020**. <https://doi.org/10.1111/aogs.13940>.
8. Fritz, B.; Hallermann, C.; Olert, J.; Fuchs, B.; Bruns, M.; Aslan, M.; Schmidt, S.; Coerdts, W.; Müntefering, H.; Rehder, H. Cytogenetic Analyses of Culture Failures by Comparative Genomic Hybridisation (CGH)–Re-Evaluation of Chromosome Aberration Rates in Early Spontaneous Abortions. *Eur. J. Hum. Genet.* **2001**, *9* (7), 539–547. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5200669>.
9. Quintero-Ronderos, P.; Laissue, P. Genetic Variants Contributing to Early Recurrent Pregnancy Loss Etiology Identified by Sequencing Approaches. *Reprod. Sci.* **2020**, *27* (8), 1541–1552. <https://doi.org/10.1007/s43032-020-00187-6>.
10. Homer, H. A. Modern Management of Recurrent Miscarriage. *Aust. N. Z. J. Obstet. Gynaecol.* **2019**, *59* (1), 36–44. <https://doi.org/10.1111/ajo.12920>.
11. Rai, R. S.; Regan, L.; Clifford, K.; Pickering, W.; Dave, M.; Mackie, I.; McNally, T.; Cohen, H. Antiphospholipid Antibodies and Beta 2-Glycoprotein-I in 500 Women with Recurrent Miscarriage: Results of a Comprehensive Screening Approach. *Hum. Reprod.* **1995**, *10* (8), 2001–2005. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a136224>.
12. Petri, M. Antiphospholipid Syndrome. *Transl. Res.* **2020**, *0* (0). <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2020.04.006>.
13. (Cohen, H.; Sayar, Z.; Efthymiou, M.; Gaspar, P.; Richards, T.; Isenberg, D. Management of Anticoagulant-Refractory Thrombotic Antiphospholipid Syndrome. *Lancet. Haematol.* **2020**, *7* (8), e613–e623. [https://doi.org/10.1016/S2352-3026\(20\)30116-2](https://doi.org/10.1016/S2352-3026(20)30116-2).
14. Ribas-Maynou, J.; Yeste, M.; Salas-Huetos, A. The Relationship between Sperm Oxidative Stress Alterations and IVF/ICSI Outcomes: A Systematic Review from Nonhuman Mammals. *Biology (Basel)*. **2020**, *9* (7). <https://doi.org/10.3390/biology9070178>.
15. Lewis, S. E. M.; Aitken, R. J.; Conner, S. J.; Iulius, G. De; Evenson, D. P.; Henkel, R.; Giwercman, A.; Gharagozloo, P. The Impact of Sperm DNA Damage in Assisted Conception and beyond: Recent Advances in Diagnosis and Treatment. *Reprod. Biomed. Online* **2013**, *27* (4), 325–337. <https://doi.org/10.1016/J.RBMO.2013.06.014>.
16. Borini, A.; Tarozzi, N.; Bizzaro, D.; Bonu, M. A.; Fava, L.; Flamigni, C.; Coticchio, G. Sperm DNA Fragmentation: Paternal Effect on Early Post-Implantation Embryo Development in ART. *Hum. Reprod.* **2006**, *21* (11), 2876–2881. <https://doi.org/10.1093/humrep/del251>.
17. Yifu, P.; Lei, Y.; Shaoming, L.; Yujin, G.; Xingwang, Z. Sperm DNA Fragmentation Index with Unexplained Recurrent Spontaneous Abortion: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J. Gynecol. Obstet. Hum. Reprod.* **2020**. <https://doi.org/10.1016/J.JOGOH.2020.101740>.
18. McQueen, D. B.; Zhang, J.; Robins, J. C. Sperm DNA Fragmentation and Recurrent Pregnancy Loss: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Fertil. Steril.* **2019**, *112* (1), 54–60.e3. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2019.03.003>.
19. Robinson, L.; Gallos, I. D.; Conner, S. J.; Rajkhowa, M.; Miller, D.; Lewis, S.; Kirkman-Brown, J.; Coomarasamy, A. The Effect of Sperm DNA Fragmentation on Miscarriage Rates: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Hum. Reprod.* **2012**, *27* (10), 2908–2917. <https://doi.org/10.1093/humrep/des261>.
20. Gil-Villa, A. M.; Cardona-Maya, W.; Agarwal, A.; Sharma, R.; Cadavid, A. Assessment of Sperm Factors Possibly Involved in Early Recurrent Pregnancy Loss. *Fertil. Steril.* **2010**, *94* (4), 1465–1472. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.05.042>.
21. Smits, R. M.; Mackenzie-Proctor, R.; Yazdani, A.; Stankiewicz, M. T.; Jordan, V.; Showell, M. G. Antioxidants for Male Subfertility. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2019**, No. 3. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD007411.pub4>.
22. Ribas-Maynou, J.; García-Peiró, A.; Fernandez-Encinas, A.; Amengual, M. J.; Prada, E.; Cortés, P.; Navarro, J.; Benet, J. Double Stranded Sperm DNA Breaks, Measured by Comet Assay, Are Associated with Unexplained Recurrent Miscarriage in Couples without a Female Factor. *PLoS One* **2012**, *7* (9), e44679. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044679>.
23. Casanovas, A.; Ribas-Maynou, J.; Lara-Cerrillo, S.; Jimenez-Macedo, A. R.; Hortal, O.; Benet, J.; Carrera, J.; García-Peiró, A. Double-Stranded Sperm DNA Damage Is a Cause of Delay in Embryo Development and Can Impair Implantation Rates. *Fertil. Steril.* **2019**, *111* (4), 699–707.e1. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.11.035>.

24. Xue, D.; Zhang, Y.; Wang, Y.; Wang, J.; An, F.; Sun, X.; Yu, Z. Quantitative Proteomic Analysis of Sperm in Unexplained Recurrent Pregnancy Loss. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **2019**, *17* (1), 52. <https://doi.org/10.1186/s12958-019-0496-5>.
25. (Sutovsky, P.; Aarabi, M.; Miranda-Vizuete, A.; Oko, R. Negative Biomarker Based Male Fertility Evaluation: Sperm Phenotypes Associated with Molecular-Level Anomalies. *Asian J. Androl.* **2015**, *17* (4), 554–560. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.153847>.
26. Fernandez-Encinas, A.; Garcia-Peiró, A.; Del Rey, J.; Ribas-Maynou, J.; Abad, C.; Amengual, M. J.; Prada, E.; Navarro, J.; Benet, J. Proteomic Analysis in Seminal Plasma of Fertile Donors and Infertile Patients with Sperm DNA Fragmentation. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21* (14). <https://doi.org/10.3390/ijms21145046>.
27. Ribas-Maynou, J.; Garcia-Peiró, A.; Fernandez-Encinas, A.; Amengual, M. J.; Prada, E.; Cortés, P.; Navarro, J.; Benet, J. Double Stranded Sperm DNA Breaks, Measured by Comet Assay, Are Associated with Unexplained Recurrent Miscarriage in Couples without a Female Factor. *PLoS One* **2012**. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044679>.
28. (Cao, X.; Cui, Y.; Zhang, X.; Lou, J.; Zhou, J.; Bei, H.; Wei, R. Proteomic Profile of Human Spermatozoa in Healthy and Asthenozoospermic Individuals. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **2018**, *16* (1), 16. <https://doi.org/10.1186/s12958-018-0334-1>.
29. (Pini, T.; Parks, J.; Russ, J.; Dzieciatkowska, M.; Hansen, K. C.; Schoolcraft, W. B.; Katz-Jaffe, M. Obesity Significantly Alters the Human Sperm Proteome, with Potential Implications for Fertility. *J. Assist. Reprod. Genet.* **2020**, *37* (4), 777–787. <https://doi.org/10.1007/s10815-020-01707-8>.
30. Jodar, M.; Attardo-Parrinello, C.; Soler-Ventura, A.; Barrachina, F.; Delgado-Dueñas, D.; Cívico, S.; Calafell, J. M.; Ballecà, J. L.; Oliva, R. Sperm Proteomic Changes Associated with Early Embryo Quality after ICSI. *Reprod. Biomed. Online* **2020**, *40* (5), 700–710. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2020.01.004>.
31. Mohanty, G.; Jena, S. R.; Nayak, J.; Kar, S.; Samanta, L. Proteomic Signatures in Spermatozoa Reveal the Role of Paternal Factors in Recurrent Pregnancy Loss. *World J. Mens. Health* **2020**, *38* (1), 103–114. <https://doi.org/10.5534/wjmh.190034>.
32. Sharma, R.; Agarwal, A.; Mohanty, G.; Hamada, A. J.; Gopalan, B.; Willard, B.; Yadav, S.; du Plessis, S. Proteomic Analysis of Human Spermatozoa Proteins with Oxidative Stress. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **2013**, *11*, 48. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-11-48>.
33. Paiano, J.; Wu, W.; Yamada, S.; Sciascia, N.; Callen, E.; Paola Cotrim, A.; Deshpande, R. A.; Maman, Y.; Day, A.; Paull, T. T.; Nussenzweig, A. ATM and PRDM9 Regulate SPO11-Bound Recombination Intermediates during Meiosis. *Nat. Commun.* **2020**, *11* (1), 857. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14654-w>.
34. Bassiri, F.; Tavalaee, M.; Dattilio, M.; Nasr-Esfahani, M. H. Micronutrients in Support to the Carbon Cycle Activate Antioxidant Defences and Reduce Sperm DNA Damage in Infertile Men Attending Assisted Reproductive Technology Programs: Clinical Trial Study. *Int. J. Fertil. Steril.* **2020**, *14* (1), 57–62. <https://doi.org/10.22074/ijfs.2020.6084>.
35. Nazari, L.; Salehpour, S.; Hosseini, S.; Allameh, F.; Jahanmardi, F.; Azizi, E.; Ghodssi-Ghassemabadi, R.; Hashemi, T. Effect of Antioxidant Supplementation Containing L-Carnitine on Semen Parameters: A Prospective Interventional Study. *JBRA Assist. Reprod.* **2020**. <https://doi.org/10.5935/1518-0557.20200043>.
36. Micić, S.; Lalic, N.; Djordjevic, D.; Bojanic, N.; Bogavac-Stanojevic, N.; Busetto, G. M.; Virmani, A.; Agarwal, A. Double-blind, Randomised, Placebo-controlled Trial on the Effect of L-carnitine and L-acetylcarnitine on Sperm Parameters in Men with Idiopathic Oligoasthenozoospermia. *Andrologia* **2019**, *51* (6), e13267. <https://doi.org/10.1111/and.13267>.
37. Netherton, J. K.; Hetherington, L.; Ogle, R. A.; Gavvani, M. M.; Velkov, T.; Villaverde, A. I. B.; Tanphaichitr, N.; Baker, M. A. Mass Spectrometry Reveals New Insights into the Production of Superoxide Anions and 4-Hydroxynonenal Adducted Proteins in Human Sperm. *Proteomics* **2020**, *20* (2), e1900205. <https://doi.org/10.1002/pmic.201900205>.
38. Nowicka-Bauer, K.; Nixon, B. Molecular Changes Induced by Oxidative Stress That Impair Human Sperm Motility. *Antioxidants (Basel, Switzerland)* **2020**, *9* (2). <https://doi.org/10.3390/antiox9020134>.
39. Llavanera, M.; Mateo-Otero, Y.; Bonet, S.; Barranco, I.; Fernández-Fuertes, B.; Yeste, M. The Triple Role of Glutathione S-Transferases in Mammalian Male Fertility. *Cell. Mol. Life Sci.* **2020**, *77* (12), 2331–2342. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03405-w>.

40. Llavanera, M.; Delgado-Bermúdez, A.; Fernandez-Fuertes, B.; Recuero, S.; Mateo, Y.; Bonet, S.; Barranco, I.; Yeste, M. GSTM3, but Not IZUMO1, Is a Cryotolerance Marker of Boar Sperm. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* **2019**, *10*, 61. <https://doi.org/10.1186/s40104-019-0370-5>.
41. Kwon, W.-S.; Oh, S.-A.; Kim, Y.-J.; Rahman, M. S.; Park, Y.-J.; Pang, M.-G. Proteomic Approaches for Profiling Negative Fertility Markers in Inferior Boar Spermatozoa. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 13821. <https://doi.org/10.1038/srep13821>.
42. Conrad, M.; Schneider, M.; Seiler, A.; Bornkamm, G. W. Physiological Role of Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase in Mammals. *Biol. Chem.* **2007**, *388* (10), 1019–1025. <https://doi.org/10.1515/BC.2007.130>.
43. Puglisi, R.; Maccari, I.; Pipolo, S.; Mangia, F.; Boitani, C. The Nuclear Form of Glutathione Peroxidase 4 Colocalizes and Directly Interacts with Protamines in the Nuclear Matrix during Mouse Sperm Chromatin Assembly. *Spermatogenesis* **2014**, *4*, e28460. <https://doi.org/10.4161/spmg.28460>.
44. Meseguer, M.; de los Santos, M. J.; Simón, C.; Pellicer, A.; Remohí, 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* (5), 1376–1385. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2006.03.053>.
45. Puglisi, R.; Maccari, I.; Pipolo, S.; Conrad, M.; Mangia, F.; Boitani, C. The Nuclear Form of Glutathione Peroxidase 4 Is Associated with Sperm Nuclear Matrix and Is Required for Proper Paternal Chromatin Decondensation at Fertilization. *J. Cell. Physiol.* **2012**, *227* (4), 1420–1427. <https://doi.org/10.1002/jcp.22857>.
46. Ward, W. S. Function of Sperm Chromatin Structural Elements in Fertilization and Development. *Mol. Hum. Reprod.* **2010**, *16* (1), 30–36. <https://doi.org/10.1093/molehr/gap080>.
47. Ribas-Maynou, J.; Benet, J. Single and Double Strand Sperm DNA Damage: Different Reproductive Effects on Male Fertility. *Genes (Basel)*. **2019**, *10* (2). <https://doi.org/10.3390/genes10020105>.
48. Baldwin, J. D.; Griffin, F. J.; Clark, W. H. Immunological Characterisation of the Acrosomal Filament in the Marine Shrimp *Sicyonia Ingentis*. *Zygote* **1998**, *6* (4), 329–339. <https://doi.org/10.1017/s0967199498000288>.
49. Maunoury, R.; Hill, A. M. [Immunocytochemical Localization in Human Spermatozoa of Tubulin and the Associated High Molecular Weight Proteins MAP1 and MAP2]. *C. R. Seances Acad. Sci. D.* **1980**, *291* (4), 425–428.
50. Magley, R. A.; Rouhana, L. Tau Tubulin Kinase Is Required for Spermatogenesis and Development of Motile Cilia in Planarian Flatworms. *Mol. Biol. Cell* **2019**, *30* (17), 2155–2170. <https://doi.org/10.1091/mbc.E18-10-0663>.
51. Ooshio, T.; Irie, K.; Morimoto, K.; Fukuhara, A.; Imai, T.; Takai, Y. Involvement of LMO7 in the Association of Two Cell-Cell Adhesion Molecules, Nectin and E-Cadherin, through Afadin and α -Actinin in Epithelial Cells. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279* (30), 31365–31373. <https://doi.org/10.1074/JBC.M401957200>.
52. Velthuis, A. J. W. te; Bagowski, C. P. PDZ and LIM Domain-Encoding Genes: Molecular Interactions and Their Role in Development. *Sci. World J.* **2007**, *7*, 1470. <https://doi.org/10.1100/TSW.2007.232>.
53. Clarke, J. P.; Mearow, K. M. Cell Stress Promotes the Association of Phosphorylated HspB1 with F-Actin. *PLoS One* **2013**, *8* (7), e68978. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068978>.
54. McReynolds, S.; Dzieciatkowska, M.; Stevens, J.; Hansen, K. C.; Schoolcraft, W. B.; Katz-Jaffe, M. G. Toward the Identification of a Subset of Unexplained Infertility: A Sperm Proteomic Approach. *Fertil. Steril.* **2014**, *102* (3), 692–699. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.05.021>.
55. Hosseinfar, H.; Gourabi, H.; Salekdeh, G.; Alikhani, M.; Mirshahvaladi, S.; Sabbaghian, M.; Modarresi, T.; Gilani, M. Study of Sperm Protein Profile in Men with and without Varicocele Using Two-Dimensional Gel Electrophoresis. *Urology* **2013**, *81* (2). <https://doi.org/10.1016/J.UROLOGY.2012.06.027>.
56. Mohanty, G.; Jena, S. R.; Nayak, J.; Kar, S.; Samanta, L. Quantitative Proteomics Decodes Clusterin as a Critical Regulator of Paternal Factors Responsible for Impaired Compensatory Metabolic Reprogramming in Recurrent Pregnancy Loss. *Andrologia* **2020**, *52* (2), e13498. <https://doi.org/10.1111/and.13498>.
57. Erenpreiss, J.; Spano, M.; Erenpreisa, J.; Bungum, M.; Giwercman, A. Sperm Chromatin Structure and Male Fertility: Biological and Clinical Aspects. *Asian J. Androl.* **2006**, *8* (1), 11–29. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7262.2006.00112.x>.

58. Manochantr, S.; Chiamchanya, C.; Sobhon, P. Relationship between Chromatin Condensation, DNA Integrity and Quality of Ejaculated Spermatozoa from Infertile Men. *Andrologia* **2012**, *44* (3), 187–199. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2010.01128.x>.
59. Darmishonnejad, Z.; Zarei-Kheirabadi, F.; Tavalae, M.; Zarei-Kheirabadi, M.; Zohrabi, D.; Nasr-Esfahani, M. H. Relationship between Sperm Telomere Length and Sperm Quality in Infertile Men. *Andrologia* **2020**, *52* (5), e13546. <https://doi.org/10.1111/and.13546>.
60. Zini, A.; Zhang, X.; San Gabriel, M. Sperm Nuclear Histone H2B: Correlation with Sperm DNA Denaturation and DNA Stainability. *Asian J. Androl.* **2008**, *10* (6), 865–871. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7262.2008.00415.x>.
61. Khurana, S.; Kruhlak, M. J.; Kim, J.; Tran, A. D.; Liu, J.; Nyswaner, K.; Shi, L.; Jailwala, P.; Sung, M.-H.; Hakim, O.; Oberdoerffer, P. A Macrohistone Variant Links Dynamic Chromatin Compaction to BRCA1-Dependent Genome Maintenance. *Cell Rep.* **2014**, *8* (4), 1049. <https://doi.org/10.1016/j.CELREP.2014.07.024>.
62. Naaby-Hansen, S.; Herr, J. C. Heat Shock Proteins on the Human Sperm Surface. *J. Reprod. Immunol.* **2010**, *84* (1), 32–40. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2009.09.006>.
63. Sonesson, A.; Hillarp, A.; Giwercman, A.; Malm, J. Determination of Serum Amyloid P Component in Seminal Plasma and Correlations with Serum Hormone Levels in Young, Healthy Men. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **2011**, *71* (7), 569–575. <https://doi.org/10.3109/00365513.2011.596567>.
64. Butler, P. J.; Tennent, G. A.; Pepys, M. B. Pentraxin-Chromatin Interactions: Serum Amyloid P Component Specifically Displaces H1-Type Histones and Solubilizes Native Long Chromatin. *J. Exp. Med.* **1990**, *172* (1), 13–18. <https://doi.org/10.1084/jem.172.1.13>.
65. Breathnach, S. M.; Kofler, H.; Sepp, N.; Ashworth, J.; Woodrow, D.; Pepys, M. B.; Hintner, H. Serum Amyloid P Component Binds to Cell Nuclei in Vitro and in Vivo Deposits of Extracellular Chromatin in Systemic Lupus Erythematosus. *J. Exp. Med.* **1989**, *170* (4), 1433–1438. <https://doi.org/10.1084/jem.170.4.1433>.
66. Heidari, M.; Darbandi, S.; Darbani, M.; Amirjanati, N.; Bozorgmehr, M.; Zeraati, H.; Akhondi, M. M.; Sadeghi, M. R. Evaluating the Potential of Three Sperm Surface Antigens as Egg-Adhesion Biomarkers for Human Sperm Selection. *J. Reprod. Infertil.* **2018**, *19* (4), 203–210.
67. Vanhoutteghem, A.; Messiaen, S.; Hervé, F.; Delhomme, B.; Moison, D.; Petit, J.-M.; Rouiller-Fabre, V.; Livera, G.; Djian, P. The Zinc-Finger Protein Basonuclin 2 Is Required for Proper Mitotic Arrest, Prevention of Premature Meiotic Initiation and Meiotic Progression in Mouse Male Germ Cells. *Development* **2014**, *141* (22), 4298–4310. <https://doi.org/10.1242/dev.112888>.
68. Ribas-Maynou, J.; García-Peiró, A.; Abad, C.; Amengual, M. J.; Navarro, J.; Benet, J. Alkaline and Neutral Comet Assay Profiles of Sperm DNA Damage in Clinical Groups. *Hum. Reprod.* **2012**, *27* (3), 652–658. <https://doi.org/10.1093/humrep/der461>.

5. DISCUSSIÓ

La infertilitat masculina afecta al ~50% de les parelles que tenen problemes per concebre, actuant com a únic factor en un ~20% dels casos d'infertilitat i contribuint conjuntament amb el factor d'infertilitat femenina en un ~30% de casos (Thoma et al., 2013). Als laboratoris d'andrologia habitualment s'utilitza el seminograma per valorar la infertilitat en les mostres de semen, que valora aspectes macroscòpics com el volum, el color, viscositat i també microscòpics com són el nombre, mobilitat, morfologia, vitalitat dels espermatozoides. Tot i que ens dóna una aproximació del potencial de fertilització que té la mostra de vegades no és suficient. Hi ha mostres amb variables de seminograma fora dels intervals de referència que poden ser fèrtils i, mostres que tenen valors dins de l'interval de referència que poden correspondre a individus infèrtils (Guzick et al., 2001). Per això es necessita una avaluació més completa que complementi les eines de diagnòstic, com ara identificar nous biomarcadors que ens ajudin a fer un diagnòstic més acurat i a conèixer la etiologia de la infertilitat. En aquest sentit, les tècniques de valoració de la fragmentació de l'ADN de l'espermatozoide han emergit durant els últims anys en resposta aquesta necessitat i s'han realitzat multitud d'estudis que mostren que també existeix una correlació entre aquesta i el potencial de fertilització (Varghese et al., 2009; Evgeni et al., 2015; Xie et al., 2019). Però novament, es necessiten nous biomarcadors per poder personalitzar els diagnostics i els tractaments reproductius en les parelles infèrtils; així com conèixer els mecanismes cel·lulars associats a la infertilitat. En el present treball, s'han seleccionat les mostres d'ejaculat objecte d'estudi en base als nivells de fragmentació de l'ADN de doble cadena o de cadena simple mesurats amb les estratègies Comet, tant alcalí com neutre i el test SCD (Singh et al., 1988; Fernández et al., 2003) per a seleccionar de manera acurada les mostres que s'han utilitzat per a realitzar l'estudi. En el primer treball (Article 1) s'ha valorat l'activitat nucleasa present en el líquid seminal com a biomarcador predictiu de la infertilitat masculina, així com els valors de fragmentació de l'ADN dels espermatozoides. El segon treball (Article 2) es tracta de l'aplicació de la tècnica 2D-DIGE per a trobar proteïnes diferencials en el líquid seminal de controls fèrtils i diferents grups de pacients infèrtils (ATZ, ATZ-VAR i AR), aquestes mostres han estat seleccionades prèviament segons el seminograma, l'historial clínic (varicocele i avortaments de repetició) i el seu perfil característic de fragmentació de l'ADN dels espermatozoides valorat amb Comet a alcalí i neutre, i amb el test SCD per la ratio d'espermatozoides completament degradats. Per últim (Article 3), s'ha realitzat un estudi de proteòmica

diferencial amb la tècnica TMT en controls fèrtils i pacients que presenten avortaments de repetició abans i després de prendre un tractament oral d'antioxidants.

5.1 ANÀLISI DEL NIVELL DE FRAGMENTACIÓ EN L'ADN DELS ESPERMATOZOIDES DE LES MOSTRES ANALITZADES

En el present treball s'ha dut a terme la determinació dels nivells de fragmentació de l'ADN dels espermatozoides mitjançant dues tècniques, l'assaig Cometa i el test SCD (Singh et al., 1988; Fernández et al., 2003). Aquestes anàlisis s'han realitzat en mostres de semen tant d'individus fèrtils com infèrtils amb seminogrames alterats com astenozoospermia, astenoteratozoospermia amb o sense varicocele, teratozoospermia i seminogrames normals amb causa d'infertilitat desconeguda i pacients amb avortaments de repetició. Els resultats trobats en aquest treball corroboren el que altres estudis ja han determinat (Ribas-Maynou 2012; Xie et al., 2019), que els pacients amb seminogrames alterats mostren en general, una fragmentació de l'ADN dels espermatozoides més elevada que els individus fèrtils. Per tant, la valoració del dany en l'ADN dels espermatozoides permet correlacionar-la amb el potencial de fertilitat de les mostres de semen. A més però, també s'han trobat resultats discordants on individus amb valors paramètrics normals del seminograma mostren nivells elevats de dany en l'ADN dels seus espermatozoides igual que altres estudis on també s'ha trobat, l'inversa, individus infèrtils amb paràmetres del seminograma anòmals que mostren nivells normals de dany en l'ADN dels espermatozoides (Giwercman et al., 2009; Simon et al., 2010).

En la actualitat, existeix un profund debat sobre quina és la millor metodologia de detecció de fragmentació de l'ADN dels espermatozoides per a determinar el potencial d'infertilitat de les mostres de semen. Cadascuna es basa en diferents mecanismes per a detectar aquests com ja hem vist en el (1.3.4), i un altra aspecte discutit és l'estandardització interlaboratoris d'aquestes tècniques i mètodes de comptatge (Ribas-Maynou et al., 2013; Ribas-Maynou i Benet, 2019). Aquestes diferències que presenten les diferents metodologies alhora de detectar els trencaments de l'ADN dels espermatozoides s'han utilitzat en aquest treball per a seleccionar de manera més acurada les mostres ja que permet diferenciar entre diferents perfils característics de fragmentació de l'ADN dels espermatozoides tal com s'explica a continuació.

5.1.1 COMET ALCALÍ: VALORACIÓ DELS TRENCAMENTS DE CADENA SENZILLA

En la realització de la tècnica d'assaig cometa en la versió alcalina, els espermatozoides es sotmeten a un tractament alcalí previ a la electroforesi (veure apartat 3.3.1) la qual cosa fa que les cadenes de l'ADN es separin i amb la posterior electroforesi de quatre minuts migren els diferents fragments de l'ADN en cadenes senzilles formant el cometa característic. Aquest tipus de tractament s'ha demostrat que permet detectar majoritàriament els trencaments de l'ADN de cadena senzilla. A més està descrit que estan associats al dany produït per espècies reactives de l'oxigen d'origen extern (dieta, fumar, tòxics ambientals, etc) o intern (augment de leucòcits, varicocele, etc), més que no pas un origen apoptòtic o per acció de nucleases (Simon et al., 2013; Ribas-Maynou i Benet, 2019).

D'acord amb estudis previs, els resultats d'aquest treball mostren que els pacients amb nivells més elevats de dany en l'ADN dels espermatozoides per a l'assaig Cometa alcalí són els que tenen el seminograma alterat com ASZ, TZ i ATZ amb i sense varicocele, essent el grup amb nivells més elevats, els ATZ. S'observa, per tant, que com més paràmetres del seminograma estan alterats més augmenta el dany de l'ADN dels espermatozoides, indicant un pitjor pronòstic d'embaràs (Yang et al., 2019). En canvi, els pacients amb avortaments de repetició no presenten uns nivells elevats (>45%) sinó que són semblants als dels controls fèrtils, tot i que aquests últims tenen un nivell una mica més baixos aquests resultats concorden amb altres estudis previs (Ribas-Maynou et al., 2012; Kamkar et al., 2018). De manera controvertida, pacients infèrtils que presenten el seminograma normal mostren nivells alts en l'anàlisi de l'assaig Cometa alcalí com ja s'havia descrit (Giwercman et al., 2009; Simon et al., 2010) el que significa que el potencial de fertilització d'aquests pacients està disminuït.

En aquest treball també s'ha analitzat el poder predictiu de la infertilitat que tenen les diferents variables estudiades com els paràmetres del seminograma, les diferents tècniques de fragmentació de l'ADN dels espermatozoides o l'activitat nucleasa del líquid seminal. Les corbes ROC realitzades mostren que l'assaig Cometa alcalí és una bona variable amb una àrea sota la corba, sensibilitat, especificitat i valor lliandar de 0,994, 0,732, 0,929, 52,6%, respectivament similars als d'altres estudis previs, tot i que en el present estudi s'han inclòs altres grups de

pacients infèrtils que no s'havien estudiat abans (ASZ i TZ) (Simon et al., 2011; Ribas-Maynou et al., 2013).

5.1.2 COMETA NEUTRE: VALORACIÓ DELS TRENCAMENTS DE CADENA DOBLE

L'assaig Cometa neutre es realitza en condicions de pH neutres, per tant, les cadenes d'ADN dels nuclis dels espermatozoides no es desnaturalitzen i els trencaments que s'observen són majoritàriament de doble cadena i n'hi ha de dos tipus: els extensos o els localitzats. En els trencaments de doble cadena extensos s'observen al microscopi les cues del cometa llargues i separades del nucli, per contra, en el localitzat les fibres de cromatina estan unides a les regions MAR (Kaneke et al., 2012; Ribas-Maynou i Benet, 2019). Aquest tipus de dany en les dues cadenes de l'ADN dels espermatozoides està més relacionat a l'acció de nucleases i/o topoisomerases durant el reemplaçament d'histones per protamines. S'ha de tenir en compte també, que aquests fragments de doble cadena resten units a la matriu nuclear gràcies a proteïnes com la topoisomerasa 2B, tot plegat s'hereta en el pronucli masculí fins a la primera divisió mitòtica. En aquest punt encara es pot donar la reparació d'aquests trencaments i sembla que la qualitat de l'òcit té un paper important en el futur desenvolupament de l'embrió (Yamauchi et al., 2007; Shaman et al., 2007).

Els resultats dels nivells de dany de l'ADN dels espermatozoides mesurats mitjançant l'assaig Cometa neutre indiquen que són més elevats en els grups de pacients infèrtils tot i que, també s'ha vist com alguns individus fèrtils presenten valors elevats, mostrant un subgrup, com ja s'havia descrit prèviament. En conseqüència aquests trencaments no tindrien implicacions negatives en la consecució de l'embaràs (Ribas-Maynou et al., 2012b).

Amb l'ampliació de grups clínics s'ha vist que en el 85% dels pacients amb avortaments de repetició que tenen un seminograma normal presentaven aquest perfil de fragmentació carateristic: valors baixos de trencaments de cadena senzilla (Cometa alcalí) i valors elevats de trencaments de cadena doble (Cometa neutre). També l'anàlisi d'alguns pacients han mostrat després d'un tractament oral amb antioxidants que la fragmentació de l'ADN dels espermatozoides no millorava, indicant que aquests no són deguts a ROS si no que hi ha altres causes implicades. El poder predictiu de la infertilitat que té l'assaig Cometa neutre mitjançant la

corba ROC mostra uns resultats de l'àrea sota la corba, sensibilitat, especificitat i valor llindar són 0,373, 0,917, 0,250, and 43,25%, respectivament. Indica per tant, que aquests valors no tenen relació amb l'embaràs però sí amb els pacients d'avortaments de repetició, essent aquesta tècnica una eina d'important valor en la detecció d'aquests pacients.

5.1.3 SCD TEST: VALORACIÓ DELS ESPERMATOZOIDES AMB L'ADN COMPLETAMENT DEGRADAT

La tècnica SCD test es basa en el principi que els espermatozoides amb l'ADN fragmentat no produeixen l'halo característic dels bucles d'ADN dispersos que s'observen en els espermatozoides amb l'ADN no fragmentat, després de la desnaturalització d'aquests i l'eliminació de proteïnes nuclears.

Està demostrat que és una bona variable per predir la infertilitat masculina (Fernandez et al., 2005; Nuñez-Calonge et al., 2012). A més, en un estudi en el que es van analitzar 593 homes amb diverses etiologies, es va trobar que els valors de fragmentació de l'ADN eren significativament més alts tant en pacients amb varicocele ($35,7\% \pm 18,3\%$) com leucocitospèrmia ($41,7\% \pm 17,6\%$) en comparació amb homòlegs amb càncer testicular i parelles amb fallades de cicles d'ART repetidament. Els autors van descriure una subpoblació específica amb danys massius d'ADN nuclear, els anomenats espermatozoides degradats, que eren més freqüents en el grup d'homes amb varicocele. Tot i que, aquest subgrup no era exclusiu de pacients amb varicoceles, es va veure sobrerrepresentat en aquest grup. Mitjançant l'anàlisi de la corba ROC, la DDSi, definida com la proporció d'espermatozoides degradats a tota la població d'espermatozoides amb ADN fragmentat, va ser capaç d'identificar pacients amb varicocele amb un 94% de precisió (Esteves et al., 2015).

Aquesta troballa és important ja que els individus amb varicocele, tot i ser molt més freqüent en homes amb infertilitat, també n'hi ha en homes fèrtils i determinar quins pacients es veuen afectats negativament per varicocele permetria definir més acuradament quins es poden beneficiar de la cirurgia (Majzoub et al., 2016).

5.2 DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT NUCLEASA EN EL LÍQUID SEMINAL DE LES MOSTRES ANALITZADES

L'origen de la fragmentació de l'ADN dels espermatozoides s'ha estudiat en profunditat (Sakkas i Alvarez, 2010; Aitken i Luliis, 2010; Muratori et al., 2019) i entre altres causes una de les possibles explicacions és l'activitat nucleasa durant el reemplaçament de les histones per les protamines o bé durant una apoptosis-like produïda per l'estrès oxidatiu. Per tant, l'activitat nucleasa sembla que té un paper important en el desenvolupament de l'espermatozoide i, pot ser indicadora del dany en aquest. Amb aquesta premisa es va dur a terme l'estudi de determinació d'activitat nucleasa en el líquid seminal de diferents tipus de pacients infèrtils (TZ, ASZ, ATZ, SMN i AZ) i un grup control de fèrtils. En primer lloc, s'ha posat a punt la tècnica de detecció d'activitat nucleasa en el líquid seminal per posteriorment aplicar-la a les mostres. S'han analitzat les diferències entre els diferents grups de pacients i finalment, s'ha correlacionat amb altres valors paramètrics del seminograma i s'ha calculat el potencial de diagnòstic d'aquesta nova variable, l'activitat nucleasa del líquid seminal.

5.2.1 POSADA A PUNT DE LA TÈCNICA SRED PER A DETERMINAR L'ACTIVITAT NUCLEASA EN EL LÍQUID SEMINAL

S'ha desenvolupat una variant de la tècnica SRED, aquesta tècnica es basa en la determinació de l'activitat nucleasa de manera indirecta i quantitativa. Es realitza en una matriu d'agarosa que conté ADN, les nucleases presents en la mostra van hidrolitzar aquest ADN i apareix un halo sota la llum UV després de la tinció de l'ADN. Aquesta variant està basada en el protocol de Nadano et al., 1993 que permet detectar activitat nucleasa en les mostres de líquid seminal. S'ha adaptat el suport, que en aquest cas es tracta d'un portaobjectes en el que s'ha solidificat el gel d'agarosa i l'ADN i s'ha aplicat un forat per introduir la mostra.

La recta patró amb ADNasa I pancreàtica Bovina permet obtenir la concentració de nucleasa i conèixer els límits de detecció de la tècnica. S'observa que hi ha dos límits un a cada extrem de la corva patró, el superior es degut a la mida del suport on es realitza la tècnica que no és molt gran i l'inferior que es degut a la falta de sensibilitat de la tècnica. En aquest treball no és un problema perquè l'activitat nucleasa de les mostres de líquid seminal no tenen concentracions més elevades que aquest últim valor i la majoria són inferiors que l'anterior.

5.2.2 ANÀLISI DE L'ACTIVITAT NUCLEASA EN EL LÍQUID SEMINAL

Mitjançant la tècnica SRED, s'ha analitzat l'activitat nucleasa de 15 pacients amb seminogrames normals (SMN), 15 pacients astenoteratozoospèrmics (ATZ), 10 pacients astenozoospèrmics (ASZ), 7 pacients azoospèrmics (AZ) (acudint per infertilitat a l'Hospital Parc Taulí de Sabadell) i 11 controls de fertilitat provada (CF) procedents de l'Institut de Reproducció CEFER (Barcelona). Els resultats mostren que hi ha activitat nucleasa en el líquid seminal humà i que tots els grups analitzats en presenten, essent el valor més baix en el grup de pacients azoospèrmics que no tenen espermatozoides en la seva mostra. Aquesta dada indica que les nucleases provenen dels espermatozoides i que la concentració de nucleasa que mostren els azoospèrmics és fisiològica, provinent de fluids seminals com els protostàtics o el fluid seminal. Això es correspondria amb l'existència de nucleases extracel·lulars prèviament descrita (Shaman et al., 2006).

En relació a que les nucleases provenen dels espermatozoide, si s'expressa la concentració de nucleasa en relació al nombre d'espermatozoides que té cada mostra, s'obté la variable concentració de nucleases expressada en funció de la concentració d'espermatozoides per mil·lilitre. Aquesta mostra que el grup de pacients amb seminograma normal i els controls fèrtils tenen valors similars, indicant que l'activitat nucleasa esta relacionada amb els paràmetres del seminograma. El grup ATZ, que tenen afectada la mobilitat i la morfologia, mostren concentracions molt més elevades que els altres grups. Aquests resultats es corresponen amb el model que suggereixen Aitken et al., 2011, segons el qual durant la apoptosís-like dels espermatozoides s'induiria una pèrdua de mobilitat i les espècies reactives de l'oxigen fragmentarien l'ADN dels espermatozoides i provocarien una situació d'estrès oxidatiu que faria que s'activessin endonucleases. Això tindria lloc, ja en una fase post-mortem d'aquests i no abans. Les nucleases que podrien actuar són, d'una banda, la CAD que es troba al citosol, i d'altra banda, el factor inductor d'apoptosís que es troba al mitocondri juntament també amb la endoG. Totes tres es troben en compartiments diferents del nucli i per tant, no tenen accessible l'ADN. Per últim, la topoisomerasa II tot i que sí que es troba al nucli no podria actuar ja que l'ADN està molt empaquetat i per tant, inaccessible. Només quan s'ha perdut la integritat de les membranes podrien actuar.

5.2.3 VALORACIÓ DE LES CORRELACIONS ENTRE L'ACTIVITAT NUCLEASA EN EL LÍQUID SEMINAL I LES VARIABLES DEL SEMINOGRAMA

En primer lloc, s'ha correlacionat la concentració de nucleases total del líquid seminal amb les diferents variables del seminograma (concentració d'espermatozoides, mobilitat, morfologia, vitalitat i SDF) i no s'observa cap correlació entre la concentració de nucleases totals del líquid seminal i les variables analitzades (veure taula 1 de l'article nº1). Si part de l'activitat nucleasa és fisiològica com es demostra amb la presència d'activitat nucleasa en els pacients AZ i l'altra part depèn de la producció per espermatozoide, sembla lògic que no hi hagi correlacions entre les variables.

En segon lloc, s'observa les correlacions moderades entre la concentració de nucleases del líquid seminal, expressada en funció del nombre d'espermatozoides, amb la mobilitat, morfologia, vitalitat i el Cometa alcalí (veure taula 2 de l'article nº1), essent més elevada amb el Cometa alcalí. Aquestes correlacions confirmarien els resultats trobats en altres treballs que relacionen l'apoptosi-like amb la fragmentació de l'ADN la mobilitat i la morfologia dels espermatozoides (Aziz et al., 2007, Moustafa et al., 2004). A més, com s'ha comentat anteriorment, per a què les nucleases poguessin actuar degradant l'ADN hi hauria d'haver una pèrdua de la integritat del nucli i de les membranes. És coherent amb el fet que el grup d'individus amb més activitat nucleasa és precisament el que té afectada la morfologia i la mobilitat.

A més no s'ha trobat correlació amb el Cometa neutre suggerint que els trencaments de doble cadena dels espermatozoides no estan relacionats amb l'activitat nucleasa, sinó que estan més associats a l'acció d'una nucleasa endògena, en compte d'una exògena. Aquest dany en l'ADN pot ser fisiològic per a facilitar el propi reemplaçament de protamines per histones després de la fertilització, de fet el Cometa neutre no correlaciona amb la infertilitat masculina.

5.2.4 VALORACIÓ DE L'ACTIVITAT NUCLEASA EN EL LÍQUID SEMINAL COM A VARIABLE PER PREDIR LA INFERTILITAT MASCULINA

L'anàlisi de la corba ROC per comprovar si l'activitat nucleasa present en el líquid seminal permet predir la infertilitat masculina reflecteix que és una bona variable ja que té una àrea per sota la corba de 0,778 i és estadísticament significativa diferent de 0,5 ($p < 0,001$). El valor llindar a partir del qual la variable pot diferenciar entre individus fèrtils i infèrtils és 0,0015 amb una sensibilitat del 76% i una especificitat del 70%. El que significa que el 76% de totes les mostres es diagnostiquen com a infèrtils correctament i el 30% que es diagnostiquen com a fèrtils podrien ser incorrectament identificades com a infèrtils. Així que la concentració de l'activitat nucleasa expressada en funció del nombre d'espermatozoides per mil·lilitre permet obtenir informació valuosa per a manejar la etiologia del diagnòstic d'infertilitat.

5.3 ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ PROTEICA DIFERENCIAL EN EL LÍQUID SEMINAL D'INDIVIDUS INFÈRILS I FÈRILS

Per al diagnòstic i el tractament de la infertilitat de les parelles s'ha de conèixer millor la etiologia per poder actuar o prendre decisions amb base científica i personalitzar en tot el procés, per això són necessaris nous biomarcadors que ajudin a elucidar aquests enigmes. Actualment, el diagnòstic de la infertilitat masculina es basa en els valors de referència del seminograma i, tot i que, dona una aproximació del potencial de fertilització de la mostra no sempre és suficient per poder diagnosticar i personalitzar el tractament (Hamada et al., 2012). En els últims anys s'han incrementat els estudis de proteòmica per descobrir nous biomarcadors que ajudin a definir el potencial de fertilitat de les mostres de semen (Agarwal et al., 2016; Jodar et al., 2017).

En aquest estudi s'ha analitzat el perfil proteic del líquid seminal d'individus amb fertilitat provada i s'ha comparat amb el de diferents grups de pacients infèrtils prèviament caracteritzats segons el seu seminograma, patologia d'infertilitat i grau de fragmentació de l'ADN dels espermatozoides. Així, les 24 mostres de líquid seminal van ser classificades en quatre grups: controls fèrtils (CF), avortaments de repetició (AR), astenoteratozoospermics (ATZ) i astenoteratozoospermics amb varicocele (ATZ-VAR).

5.3.1 SELECCIÓ DE LES MOSTRES SEGONS ELS CRITERIS ESTABLERTS: SEMINOGRAMA, PATOLOGIA I FRAGMENTACIÓ DE L'ADN DELS ESPERMATOZOIDES MITJANÇANT DIFERENTS TÈCNiques.

La singularitat del present estudi és la selecció prèvia de les mostres segons criteris estrictes per tal de definir i homogeneïtzar els grups: anàlisi del seminograma, la integritat de l'ADN dels espermatozoides mesurada per diferents tècniques (assaig Cometa i test SCD) i patologia, permetent comprendre millor la etiologia d'aquests tipus de mostres i contribuir a trobar biomarcadors que ajudin a determinar el potencial de fertilitat amb major precisió.

El grup de pacients que presenten avortaments de repetició sense factor femení descrit (AR) presenten valors normals del seminograma, normozoospermics, com en el cas del grup d'individus fèrtils però en canvi, el perfil de fragmentació de l'ADN dels espermatozoides mesurat mitjançant l'assaig Cometa és diferent. Tots dos grups presenten baixos nivells de trencaments de cadena simple amb l'assaig Cometa alcalí, però per l'assaig Comet neutre (trencaments de cadena doble) el grup de pacients AR presenten valors més elevats. Aquests resultats ja havien estat descrits prèviament (Ribas-Maynou et al., 2012). Diferències en la expressió proteica entre aquests dos grups permet conèixer les proteïnes implicades en la infertilitat, en la integritat de l'ADN dels espermatozoides i/o els mecanismes implicats en les primeres setmanes del desenvolupament embrionari. D'altra banda, el grup de pacients amb ATZ presenten el seminograma alterat, tant per la morfologia com per la mobilitat dels espermatozoides, igual que el grup ATZ-VAR. Tot i que, sota el microscopi i mitjançant les tècniques de SDF com Comet alcalí i neutre aquests dos grups no difereixen ja que tots dos presenten valors alts, sí que a nivell clínic presenten diferències, la presència de varicocele. Es tracta d'una patologia en la que la dilatació de les venes dels testicles impedeix que la sang circuli correctament, la qual cosa provoca una hipertèrmia, hipoxia i estrès oxidatiu (Dada et al., 2003 i Cho et al., 2016), aquests pacients presenten una fertilitat compromesa amb alteració dels paràmetres del seminograma i la integritat de l'ADN dels espermatozoides (Cho et al., 2016). En ocasions, requereix l'operació si presenta dolor o molestia. L'avaluació de la infertilitat dels pacients que presenten varicocele es basa en la realització del seminograma, de tècniques de quantificació de ROS, d'antioxidants (Agarwal et al., 2016) i de valoració de SDF (García-Peiró et al., 2014). Tot i això, aquestes proves no informen dels can-

vis moleculars a nivell subcel·lular associats amb la poca capacitat de fertilització dels espermatozoides. Un estudi de Esteves et al., 2015 ha comprovat que els pacients amb varicocele presenten un ratio de espermatozoides degradats respecte el total dels fragmentats mesurada amb SCD test molt més elevada que els que no pateixen aquesta patologia, indicant que és un bon biomarcador per diagnosticar aquests pacients. Així, en el present estudi s'ha utilitzat tant l'historial clínic com aquest paràmetre de SDF per seleccionar les mostres amb varicocele i conèixer millor els mecanismes involucrats en aquesta patologia.

5.3.2 ANÀLISI PROTEÒMICA DIFERENCIAL DE LÍQUID SEMINAL MITJANÇANT 2D-DIGE DELS GRUPS ANALITZATS

L'anàlisi proteòmica 2D-DIGE del plasma seminal d'individus fèrtils i infèrtils que han estat pre-seleccionats segons el seu seminograma, patologia i grau de fragmentació del DNA dels espermatozoides (ATZ, ATZ-VAR, AR) revela que en els gels hi ha 96 spots (taques) amb una expressió significativament diferencial de proteïnes (fold-change >2 i $p < 0,05$).

Dels quals 26 mostren diferències entre el grup de control fèrtils i la resta de grups de pacients infèrtils, 22 estan sobreexpressats i 4 infraexpressats, l'estudi de les proteïnes corresponents a aquests spots estarien implicades en la infertilitat. D'aquest spots s'han identificat 17 proteïnes (Taula 3, Article 2). La gran majoria ja han estat descrites abans com a proteïnes amb expressió diferencial entre els individus fèrtils i els infèrtils, algunes són l'Antigen específic prostàtic, l'Annexina A3, la Clusterina, la Prostaglandina-H2 D-isomerasa, la proteïna Glutamina gamma-glutamilttransferasa 4, la fosfatasa àcida prostàtica, apolipoproteïna E, la Glicodelina, la Semenogelina II, la proteïna secretora epididimal E3-beta, la beta-2-Microglobulina, la CRISP1 i l'Albumina (Batruch et al., 2011; Intasqui et al., 2013 i Sharma et al., 2013).

La que ha mostrat una major expressió diferencial ha estat l'Antigen específic prostàtic (PSA) i a més, s'ha trobat en 5 spots diferents indicant que existeixen diferents isoformes de la proteïna amb modificacions post-traduccionals, aquests fets són concordants amb resultats prèviament publicats (Végyvári, et al., 2012). La PSA és una serin proteasa regulada per andrògens i està involucrada en la liqüefacció del semen escindint les proteïnes semenogelines I i II per permetre la mobilitat lliure dels espermatozoides per tal que puguin fecundar l'òocit (Balk et al., 2003). A la vegada, les semenogelines estan implicades en la capacitació,

mobilitat, la fertilitat dels espermatozoides, amb la qual cosa la funció de la PSA va més enllà de la líquiefacció, influint també en la fertilitat (Gupta et al., 2017). A més, pot escindir altres proteïnes com la proteïna inhibidora C o la Fibronectina 1 implicades en la infertilitat (Christensson et al., 1994). Aquesta última també ha mostrat expressió diferencial en aquest estudi. La seva implicació en la reproducció és coneguda, així ho demostra l'estudi on baixos nivells de PSA en el plasma seminal correlacionen amb baixos nivells de mobilitat en el percentatge d'espermatozoides mòbils (Ahlgren et al., 1995 i Elzanaty et al., 2002) la qual cosa concorda amb la sobreexpressió en els controls fèrtils respecte els infèrtils trobada en el present estudi. Tot i que, hi ha altres estudis que veuen com la PSA augmenta a mesura que els percentatge immòbils disminueix (Yang et al., 2003 i Sharma et al., 2013), una possible explicació podria ser que no s'estigui comparant l'expressió de les mateixes isoformes de la PSA.

Per primera vegada en el plasma seminal s'ha identificat les següents proteïnes diferencials: (G),N(G)-dimetilarginina dimetilaminohidrolasa 1 (DDAH1), la proteïna serina/treonina fosfatasa PP1-beta catalitic subunit i la Ankyrin repeat domain-containing protein SOWAHA. La DDAH1 es tracta d'una proteïna enzimàtica de 31 KDa que metabolitza la dimetilarginina asimètrica, un inhibidor endògen de la síntesis d'òxids nítrics, involucrats en múltiples processos biològics (Bredt, 1999). Com a inhibidor de la dimetilarginina asimètrica, la sobreexpressió d'aquesta proteïna condueix indirectament a un augment de l'expressió d'òxid nítric (Saratsis, et al., 2012). En la reproducció, l'òxid nítric és important per processos com la capacitació, la reacció acrosòmica i la fusió entre oòcit i espermatozoide (Herrero et al., 1999). A més, es coneix que elevades concentracions d'òxid nítric influeixen de manera negativa en la mobilitat dels espermatozoides degut a que la formació d'aquests radicals lliures inhibeixen la cadena respiratòria fent disminuir la producció d'energia i provocant danys en l'ADN (Balercia et al., 20004; Drevet et al., 2019). La concentració d'òxid nítric s'ha determinat en el plasma seminal d'individus amb seminogrames normals i alterats i s'ha trobat correlacions tant amb la morfologia com amb els nivells de testosterona (Huang et al., 2006).

El grup de pacients que presenta el seminograma alterat, ATZ, va mostrar 8 spots amb expressió diferencial i sobreexpressats respecte a la resta. Dels quals se n'han identificat sis proteïnes: Cistatina-S, Neutròfil defensina 1, Beta-actina, proteïna induïble de la prolactina (PIP), Alpha-1-antitripsina i Serotransferrina.

L' Alpha-1-antitripsina esta relacionada amb la motilitat progressiva dels espermatozoides en el plasma seminal, a més, pot tenir implicacions durant la maduració dels espermatozoides, des de l'epidídim fins a la fecundació en el tracte reproductor femení (Ding et al., 2007). La PIP ha estat molt estudiada, té moltes funcions com a immunoreguladora, activitat antimicrobiana, apoptosi i progressió de tumors (Tomar et al., 2012). Interactua també amb nombroses proteïnes com la Fibronectina durant la líquüefacció, el fibrinogen, l'actina, la queratina, la miosina, la tropomiosina (Schenkels et al., 1994), la glicoproteïna zinc-alfa-2 humana (Hassan et al., 2008) i l'albumina sèrica humana (Kumar et al., 2012). L'expressió de PIP sembla variar entre diferents estudis. Com en el present, en un estudi previ s'analitzava en individus amb diverses alteracions dels paràmetres del semen van trobar que s'expressava en els grups que difereixen en paràmetres de concentració i morfologia d'espermatozoides (Sharma et al., 2013c). Tanmateix, s'ha vist que les concentracions de PIP augmenten molt en els grups postius per a ROS+ en comparació amb el grup negatiu per a ROS- (Sharma et al., 2013a). D'altra banda, es va observar que la PIP baixava en pacients astenozoospermàtics en comparació amb els donants (Martinez-Heredia et al., 2008).

El grup de pacients amb ATZ i varicocele (ATZ-VAR) mostra 2 spots diferencials infraexpressats en aquest grup respecte la resta, indicant que podrien estar implicats en els processos inflamatoris de la patologia i es poden estudiar per diagnosticar aquests pacients. En aquests s'ha identificat la proteïna, Aminopeptidasa N (AMPN). Es tracta d'un enzim que multifuncional que esta involucrat en la regulació de processos cel·lulars en l'espermatozoide, i per tant, també en la fertilitat. Estudis anteriors, van demostrar que l'aminopeptidasa N afecta a la mobilitat dels espermatozoides i al desenvolupament embrionari dels ratolins (Khatun et al., 2017).

El grup de pacients amb avortaments de repetició va mostrar 2 spots diferencials però no es van poder identificar les proteïnes corresponents. Destacar que encara que no es coneguin proteïnes diferencials en aquest grup respecte els altres, sí que n'hi ha amb els controls fèrtils i que per tant, es poden tenir en compte en estudis posteriors. Resulta interessant, l'anàlisi de proteïnes diferencials que hi ha entre els grups amb seminogrames normals (controls i AR) i els grups d'infèrtils (ATZ i ATZ-VAR) que s'han identificat com a: Actina citoplasmàtica 1 (ACTB), Creatina quinasa tipus B, Gastrisina (PEPC) i la Fibronectina 1, es coneixen amb funcions

relacionades amb el metabolisme i la energia, per tant implicades en la mobilitat flagelar, pel que estarien implicades en la pèrdua de mobilitat i/o la morfologia cel·lular (Asseo et al., 1981).

5.3.3 ANÀLISI BIOINFORMÀTICA DE LES PROTEÏNES EXPRESSADES DIFERENCIALMENT EN EL LÍQUID SEMINAL DELS GRUPS ANALITZATS

L'anàlisi "in silico" de les proteïnes del líquid seminal amb expressió diferencial en els diferents grups s'ha realitzat amb èxit mitjançant les eines bioinformàtiques com Uniprot, PANTHER, STRING, etc, per tal de poder valorar la seva localització, les vies que es veuen afectades, etc.

La plataforma PANTHER (Protein Analysis Through Evolutionary Relationship) ha permès classificar les proteïnes identificades com a diferencials en funció dels termes de Gene Ontology (GO) de procés biològic, de funció molecular i de localització.

Pel que fa al procés biològic, en el conjunt de les proteïnes expressades de manera diferencial, s'han trobat dos termes de GO significativament sobre-representats: el procés metabòlic i la localització (Figura 1C, article 2). Quan s'han agrupat les proteïnes en termes de GO de funció molecular resulta que la categoria d'activitat catalítica està significativament representada (Figura 1B, article 2), i pel que fa a la localització, la regió extracel·lular és la més representada, concorda amb la fracció de plasma seminal que s'ha analitzat. Degut a la sobrerrepresentació de proteïnes provinents tant de processos metabòlics com catalítics, aquests resultats suggereixen que el dany en l'ADN dels espermatozoides dels grups analitzats està causat majoritàriament pel dany oxidatiu.

L'anàlisi de les interaccions entre les proteïnes diferencials identificades en aquest estudi mitjançant la plataforma STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins) revela que moltes d'elles estan associades entre elles. Però si a més, es cerca amb quines altres estan relacionades s'observa que totes elles ho estan amb la Ubiquitina C (UBC). La UBC és una poliubiquitina regulada per l'estrès en mamífers, és induïda durant l'estrès i proporciona ubiquitina addicional necessària per eliminar proteïnes danyades/desplegades (Tsirigotis et al., 2001). La poliubiquitina-C té un paper important en diversos processos biològics, com la reparació de l'ADN, la immunitat innata i l'activitat de la qui-

nasa (Ryu et al., 2007; Kim et al., 2018). La poliubiquitina-C també és una molècula de senyalització clau que connecta i coordina el proteasoma i l'autofàgia per eliminar els agregats tòxics de proteïnes (Hao et al., 2013). La seva expressió ha estat descrita en espermatozoide humans amb l'ADN fragmentat (Muratori et al., 2005) i ha estat descrita la seva relació amb la qualitat del semen, s'encarrega de marcar espermatozoides defectuosos, remodelar la membrana plasmàtica durant la capacitació, participa en la reacció acrosomica, en la promoció de la interacció espermatozoide-oòcit i en l'herència mitocondrial paterna (Muratori et al., 2007; Zigo et al., 2019).

5.4 ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ PROTEICA DIFERENCIAL EN ELS ESPERMATOZOIDES D'INDIVIDUS FÈRTILS I D'AVORTAMENTS DE REPETICIÓ ABANS I DESPRÉS DEL TRACTAMENT AMB ANTIOXIDANTS

En el present estudi s'ha realitzat l'anàlisi proteòmica d'expressió diferencial mitjançant la tècnica de marcatge isobàric TMT en espermatozoides d'individus fèrtils i individus que han presentat avortaments de repetició sense factor femení descrit (AR) abans i després del tractament amb antioxidants (AR-AO). Fins al moment, s'han realitzat pocs estudis de proteòmica en aquest grup de pacients (Xue et al., 2019; Mohanty et al., 2020) però a més, per tal d'homogeneitzar les mostres s'han analitzat també l'estat del dany de l'ADN mitjançant l'assaig Cometa. En aquest sentit s'ha tingut en compte que el perfil diferencial de fragmentació de doble cadena de l'ADN dels espermatozoides mesurat amb Cometa neutre comporta un major risc de patir avortaments de repetició (Ribas-Maynou et al., 2012). D'altra banda, també s'ha incorporat a l'estudi l'anàlisi del proteoma tant abans com després de la pressa oral del tractament amb antioxidants. Hi ha estudis que indiquen que el tractament de pacients infèrtils amb antioxidants orals milloren els paràmetres i el potencial de fertilització (Micic et al., 2019; Bassiri et al., 2020). Per tant, en aquest estudi s'ha analitzat el canvi d'expressió de proteïnes entre els controls fèrtils i els avortaments de repetició amb trencaments de doble cadena i observat l'efecte del tractament amb antioxidants sobre aquests pacients.

5.4.1 SELECCIÓ DE LES MOSTRES D'AVORTAMENTS DE REPETICIÓ I TRACTAMENT AMB ANTIOXIDANTS ORALS

Les mostres emprades per a aquest estudi proteòmic s'han seleccionat en base a diferents criteris per a homogeneïtzar les mostres. El primer criteri és el seminograma, totes les mostres analitzades, fèrtils i infèrtils són mostres normozoospermiques. El segon criteri és la patologia, les mostres de pacients infèrtils mostren un historial d'avortaments de repetició sense factor femení. L'últim criteri, la fragmentació en l'ADN dels espermatozoides, s'han seleccionat aquelles mostres de pacients amb avortaments de repetició que mostraven un perfil de fragmentació característic, en els que els nivells de fragmentació de cadena senzilla amb el Cometa alcalí es mostren baixos i, en canvi, els trencaments de cadena doble amb el Cometa neutre es mostren alts (fet prèviament caracteritzat, Ribas-Maynou et al., 2012). Els individus fèrtils mostren un perfil de fragmentació dins dels valors de referència (Ribas-Maynou et al., 2012).

5.4.2 ANÀLISI PROTEÒMICA DIFERENCIAL EN ELS ESPERMATOZOIDES MITJANÇANT MARCATGE TMT EN ELS GRUPS ANALITZATS

El proteoma de l'espermatozoide s'ha analitzat en varies condicions d'infertilitat com diferents alteracions del seminograma, idiopàtica, varicocele, obesitat, etc. (Cao et al., 2018; Pini et al., 2020; Jodar et al., 2020). Algunes anàlisis de proteòmica s'han realitzat en mostres de pacients amb avortaments de repetició (Mohanty et al., 2020a; Mohanty et al., 2020b; Xue et al., 2019) però cap estudi previ contempla també l'efecte del tractament oral amb antioxidants i el perfil de fragmentació de l'ADN dels espermatozoides.

En aquest tercer estudi, la comparació quantitativa de l'expressió proteica realitzada mitjançant el marcatge amb TMT dels espermatozoides d'individus fèrtils vers individus amb avortaments de repetició abans i després d'un tractament amb antioxidants ha permès identificar 607 proteïnes. Aquest nombre baix de proteïnes identificades pot ser degut a que les mostres han estat criopreservades amb un medi que conté rovell d'ou, aquest conté proteïnes com les vitelogenines que poden emmascarar moltes altres proteïnes menys abundants. Per evitar aquest problema s'ha realitzat la normalització corresponent. De les proteïnes identificades, 29 són diferencials entre el grup de CF i AR, 26 estan sobreexpres-

sades (fold-change >1,5 i $p < 0,05$) i 6 infraexpressades (fold change < 0,67 i $p < 0,05$) (Taula 2 de l'article 3). De les 30 proteïnes diferencials entre els CF i els AR-AO, 25 estan sobreexpressades i 5 infraexpressades. En la comparació entre els dos grups de pacients abans i després del tractament amb antioxidants no s'han trobat diferències significatives indicant que l'acció de les ROS no són les que provoquen els canvis més significatius entre aquests grups. Hi ha estudis publicats que han valorat l'efecte dels antioxidants en pacients infèrtils i els resultats no són clarificadors (Micic et al., 2019; Nazari et al., 2020). Recentment, Netherton et al., 2020 han millorat la tecnologia per a la mesura de les ROS i han comprovat que moltes de les proteïnes afectades per ROS provenen de la pròstata i no de l'espermatozoide, per tant, indiquen que l'estat oxidatiu prové de l'ambient exterior de l'espermatozoide no de l'interior d'aquest pel que apunta que caldria revisar aquesta qüestió. Cal mencionar però, que l'expressió de certes proteïnes millora en els AR-AO en comparació als CF, així ho fan: LMO7 (*LIM domain only protein 7*), MMP28 (*Matrix metalloproteinase-28*), NEHF (*Neurofilament heavy polypeptide*), BNC2 (*Zinc finger protein basonuclin-2*), la implicació d'aquestes proteïnes es descriu en els següents paràgrafs.

Pel que fa als processos metabòlics hi ha sis proteïnes que estan directament involucrades i que participen en processos d'oxidació-reducció en la glicòlisi. Totes es troben sobreexpressades en les mostres d'avortaments de repetició: PKM (Pyruvate kinase PKM), G3PT (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, testis-specific), GSTM3 (Glutathione S-transferase mu 3), GPX4 (Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase). La ATPA (ATP synthase subunit alpha, mitochondrial) també està sobreexpressada però només en el grup AR-AO. La majoria d'aquestes proteïnes són sensibles a ROS (Nowicka-Bauer i Nixon, 2020). El GSTM3 és un enzim detoxificant molt important i té un paper en la desintoxicació cel·lular de ROS, la senyalització cel·lular per a la capacitat i fertilització (Llavanera et al., 2020). En animals s'ha establert com un biomarcador de criotolerància i fertilitat (Kwon et al., 2015; Llavanera et al., 2019). GPX4 és un enzim antioxidant essencial que protegeix a les cèl·lules de les ROS (Conrad et al., 2007) i el trobem en tres components cel·lulars diferents: el citosol, la mitocondria i el nucli. En el nucli cel·lular s'associa a les regions anomenades MAR i participa en la condensació de l'ADN durant l'espermioogènesi (Puglisi et al., 2014), també en la descondensació de la cromatina del pronucli masculí que afecta al correcte desenvolupament embrionari (Meseguer et al., 2006; Puglisi et al., 2012). Els trencaments de doble cadena de l'ADN també es localitzen a les regions

de MAR fet que permet que es puguin reparar en el futur embrió (Ward, 2010; Ribas-Maynou i Benet, 2019).

El citoesquelet és molt important en l'espermatozoide, ja que és el responsable del moviment i la forma de les cèl·lules, així com de la fusió entre els gàmetes, la reacció acrosoma, el transport vesicular, entre d'altres. En el present treball s'han trobat proteïnes sobreexpressades que pertanyen al citoesquelet i les seves funcions: Acrosina, AKAP3 (A-kinase anchor protein 3), AKAP4 (A-kinase anchor protein 4), MAP2 (Microtubule-associated protein 2), CABYR (Calcium-binding tyrosine phosphorylation-regulated protein), PMMP28 (Matrix metalloproteinase-28), DPY19L2 (Probable C-mannosyltransferase DPY19L2), RalGPS1 (Ras-specific guanine nucleotide-releasing factor RalGPS1) i SP17 (Sperm surface protein Sp17). Per contra, la proteïna NEFH del grup AR-AO millora el seu perfil després del tractament amb antioxidants orals. La NEFH encara no s'ha caracteritzat en l'espermatozoide humà, tot i que s'ha caracteritzat en una espècie de gamba juntament amb les proteïnes MAP2 i Tau, concretament a la zona subacrosòmica de l'espermatozoide (Baldwin et al., 1998). Tot i això, la proteïna MAP2 sí que s'ha trobat a l'espermatozoide humà (Maunoury i Hill, 1980) i s'ha descrit que interacciona amb neurofilaments i microtúbuls per estabilitzar el seu creixement (Magley i Rouhana, 2019).

La regulació de les proteïnes que es realitza mitjançant modificacions tant en el plegament de les proteïnes com post-traduccional, com poden ser la ubiquitinació, la fosforilació, la glicosilació, etc., és molt important per mantenir els processos cel·lulars en correcte funcionament. La AKAP4 i HSPB1 (Heat shock protein beta-1) participen en aquests processos i en el present treball s'han trobat desregulades. La proteïna LMO7 també està sobreexpressada però només en el grup AR, el grup AR-AO millora el seu perfil d'expressió. Aquesta proteïna està implicada en moltes funcions biològiques gràcies a modificacions post-traduccional, en concret la ubiquitinació. El mapa d'interaccions entre les proteïnes diferencials revela la seva associació amb ASB14, que és una proteïna que regula altres proteïnes mitjançant la poliubiquitinació (Wang et al., 2019). Algunes funcions de la LMO7 estan relacionades amb l'organització del citoesquelet d'actina com ara les unions cèl·lula-cèl·lula o unions de matriu-cèl·lula (Ooshio et al., 2004), en desenvolupament embrionari i oncogènesi, etc (Aartjan et al., 2007). També s'ha demostrat que la LMO7 a través del seu domini LIM actua en el control de la progressió de la mitosi i exerceix un efecte sobre SAC (Spindle Assembly

Checkpoint). La HSPB1 és una proteïna regulada per estressors cel·lulars com ara ROS, actua en el manteniment del citoesquelet (Clarke et al., 2013) i s'ha demostrat que quan està en concentracions elevades en els espermatozoides, en resulten blastocists de baixa qualitat, fet que també s'ha descrit per a la proteïna Clusterina (CLU) (McReynolds et al., 2014). La clusterina també protegeix contra ROS, a la vegada que participa en múltiples processos biològics com són la resposta a l'estrès, el control del cicle cel·lular, la reparació de l'ADN en l'apoptosi, etc (Hosseninfar et al., 2013; Mohanty et al., 2020). Recentment, la CLU s'ha proposat com a nou biomarcador a causa del seu paper com a regulador de factors paterns en pacients amb historial clínic d'avortaments de repetició (Mohanty et al., 2020b).

Les proteïnes KIF4B (Chromosome-associated kinesin KIF4B), H2B1A (Histone H2B type 1-A), PRDM2 (PR domain zinc finger protein 2), SAP (Serum amyloid P-component), SPANXB1 (Sperm protein associated with the nucleus on the X chromosome B1) i la BNC2 (Zinc finger protein basonuclin-2) estan localitzades en el nucli dels espermatozoides. L'ADN d'espermatozoides s'empaqueta per histones i durant l'espermioïgenesis es substitueixen per protamines. Es coneix que alteracions en aquest procés causen defectes en l'empaquetament de cromatina fet que fa que l'ADN de l'espermatozoide sigui més susceptible a danys (Erenpreiss et al., 2006; Manochantr et al., 2012; Darmishonjad et al., 2020). Treballs previs han demostrat que un augment de l'expressió en el nucli espermàtic d'H2B1A condueix a disminuir la mobilitat, la compactació de l'ADN i la fragmentació de l'ADN espermàtic (Zini et al., 2008). Una altra proteïna expressada diferencialment implicada en la fragmentació de l'ADN dels espermatozoides és PRDM2, un estudi va suggerir que forma part del complex de reparació de trencament de doble cadena (DSB), crític per mantenir la integritat de l'ADN (Khurana et al., 2014). D'altra banda, la SAP ja s'havia descrit en mostres de pacients infèrtils (Sorensson et al., 2012; Naaby-Hansen et al., 2010). A més, es coneix que interacciona de manera específica amb la cromatina afavorint la seva solubilització (Butler et al., 1990) i per tant, pot contribuir al desenvolupament fisiològic de la manipulació de la cromatina alliberada de les cèl·lules *in vivo*. També s'ha demostrat que les cèl·lules apoptòtiques, que porten fragments de cromatina a la seva superfície sempre estan recobertes de SAP (Breathnach et al., 1989). En un estudi anterior, SAP es va correlacionar amb pacients infèrtils que mostraven una fragmentació de l'ADN d'espermatozoides elevada i una qualitat embrionària més pobre (Heidari et al., 2018). La proteïna BNC2 ha millorat el seu perfil d'expressió en els pacients després del tractament antioxidant i s'ha trobat infraexpressada.

S'ha descrit com una proteïna que uneix l'ADN i que regula la meiosi i la mitosi en les cèl·lules germinals masculines (Vanhoutteghem et al., 2014) fet que fa pensar que també podria estar implicada en l'activació del genoma patern.

5.4.3 ANÀLISI BIOINFORMÀTICA DE LES PROTEÏNES EXPRESSADES DIFERENCIALMENT EN ELS ESPERMATOZOIDES DELS GRUPS ANALITZATS

L'anàlisi "in silico" de les proteïnes amb expressió diferencial del present estudi s'ha realitzat amb èxit mitjançant eines bioinformàtiques com Uniprot, PANTHER, STRING, etc, per tal de poder valorar la seva localització, les vies que es veuen afectades, etc. Els resultats revelen que les anàlisis de les DEPs entre CF vs AR i CF vs AR-AO són molt similars. Essent les funcions d'unió i catalítiques les més enriquides, i de manera interessant, els processos cel·lulars i metabòlics també. Aquestes dades concorden amb estudis anteriors (Mohanty et al., 2020; Xue et al., 2019) i a més, demostren que són vies importants per a la etiologia de la infertilitat per avortament recurrent idiopàtic. També s'ha observat que el 15% estaven implicades en funcions reproductives. Finalment, i tal i com s'espera la majoria de les proteïnes provenen de l'interior cel·lular, i dels orgànuls i la membrana. Proteïnes com la AKAP3, AKAP4, MAP2, CABYR, D19L2, ZPBP1 (Zona pellucida-binding protein 1) i TPC1 (Two pore calcium channel protein 1) són proteïnes de membrana i poden ser susceptibles de constituir nous biomarcadors proteics per a tècniques de selecció d'espermatozoides abans de la fecundació de l'oòcit en els programes de reproducció assistida.

Al observar les interaccions entre les proteïnes amb expressió diferencial dels grups analitzats (Figura 2 de l'article 3) es mostren diferents nodes que estan relacionats amb diverses estructures i activitats cel·lulars com són: el metabolisme cel·lular, el citoesquelet (mobilitat i fusió de gàmetes) i per últim, el dany en l'ADN.

A més, en un segon nivell d'interacció s'observa que apareix un quart node d'interacció associat al complex ATP sintasa i que els diferents nodes d'interacció estan a la vegada associats amb la PKD.

5.5 PERSPECTIVA DE FUTUR

La revolució de les tècniques -òmiques, combinades amb els programes bioinformàtics que ha esclatat en els darrers anys, ha permès augmentar el coneixement i la comprensió de les causes de la infertilitat masculina; així com identificar possibles biomarcadors d'interés en el pronòstic com en el diagnòstic de la infertilitat masculina i també en la predicció de resultats reproductius en els programes de reproducció assistida. Tot i així, encara cal realitzar estudis que demostrin la validació clínica d'aquests panells de biomarcadors per a que puguin usar-se en la clínica de forma eficient i segura.

A més, i de rellevant interès, la comprensió de les bases biològiques i moleculars associats a la infertilitat masculina serviran per complementar la planificació de tractaments en reproducció assistida i per a la recerca bàsica fet que possibilitarà la seva aplicació translacional en revertir la fisiopatologia o la millorin.

6. CONCLUSIONS

Conclusions

Les conclusions derivades de la investigació realitzada en aquest treball són les següents:

Per a l'**OBJECTIU GENERAL 1** "Caracterització de l'activitat nucleasa en el líquid seminal":

PRIMERA. S'ha desenvolupat la tècnica SRED per ser aplicada en el líquid seminal, permetent quantificar la concentració de nucleases del líquid seminal.

SEGONA. L'activitat nucleasa en el líquid seminal està present en totes les mostres analitzades i és més baixa en els individus azoospèrmics, a més mostra expressió diferencial entre els diferents grups analitzats.

TERCERA. Els individus controls fèrtils (CF) mostren molta activitat nucleasa total en el líquid seminal, en canvi, tenen molt poca activitat nucleasa en relació al nombre d'espermatozoides per mil·lilitre, indicant que aquesta depèn del nombre d'espermatozoides que hi ha a la mostra.

QUARTA. La concentració de nucleases del líquid seminal en relació al nombre d'espermatozoides per mil·lilitre és més elevada en els individus astenoteratozoospèrmics (ATZ) i correlaciona amb la fragmentació de cadena senzilla de l'ADN (Cometa alcalí), la mobilitat, la vitalitat i la morfologia dels espermatozoides.

CINQUENA. La correlació amb la vitalitat i els trencaments de cadena senzilla de l'ADN dels espermatozoides (Comet alcalí), indica que està implicada en el control de qualitat dels espermatozoides danyats.

SISENA. L'activitat nucleasa en el líquid seminal és una bona variable per predir la infertilitat masculina, indicant que és un paràmetre complementari en el diagnòstic de la infertilitat masculina.

Per a l'**OBJECTIU GENERAL 2** "Anàlisi proteòmic diferencial de líquid seminal mitjançant 2D-DIGE de mostres segons el seminograma, patologia i grau de fragmentació de l'ADN dels espermatozoides":

PRIMERA. La metodologia 2D-DIGE combinada amb tècniques d'espectrometria de masses revelen l'existència de 17 proteïnes expressades de manera diferencial en el plasma seminal d'individus fèrtils en comparació amb la resta de grups, així com 6 proteïnes en el grup d'astenoteratozoospermics (ATZ) i una en el grup d'astenoteratozoospermics amb varicocele (ATZ-VAR). També s'han trobat 5 proteïnes diferencials entre les mostres amb seminogrames normals (controls fèrtils i avortaments de repetició) i les mostres amb seminogrames anòmals (ATZ i ATZ-VAR), indicant que tenen un gran potencial com a biomarcadors.

SEGONA. Les proteïnes que s'expressen de forma diferencial en aquest estudi estan relacionades principalment amb processos metabòlics, tenen bàsicament una funció catalítica i més de la meitat es troben a l'espai extracel·lular.

TERCERA. A més, l'anàlisi bioinformàtica mostra que gran part d'aquestes proteïnes estan associades entre elles i amb la ubiquitina C, indicant que aquesta té un paper important en la regulació de gran part de les proteïnes trobades i pot ser un biomarcador d'infertilitat masculina que reflecteixi la deficiència d'altres proteïnes biomarcadores.

Per a l'**OBJECTIU GENERAL 3** "Anàlisi proteòmic diferencial dels espermatozoides mitjançant marcatge amb TMT de mostres de controls fèrtils vers avortaments de repetició abans i després del tractament oral amb antioxidants":

PRIMERA. La metodologia que combina el marcatge amb TMT i les tècniques d'espectrometria de masses revelen l'existència de 34 proteïnes amb expressió diferencial relatives als espermatozoides d'individus fèrtils en comparació amb els grups d'avortaments de repetició abans i després del tractament oral amb antioxidants, permetent conèixer millor l'etiologia del dany en aquests pacients i indicant que tenen un gran potencial com a biomarcadors.

SEGONA. El perfil de fragmentació de l'ADN dels pacients amb avortaments de repetició abans i després del tractament amb antioxidants mesurat mitjançant l'assaig Cometa no presenta diferències significatives, tot i que en algunes mostres s'observa una millora.

TERCERA. D'igual manera que la fragmentació de l'ADN dels espermatozoides, el perfil proteic entre els avortaments de repetició abans i després del tractament amb antioxidants no difereix de manera significativa, tot i que algunes proteïnes milloren el seu perfil de manera significativa després del tractament amb antioxidants (LMO7, MMP28, NEFH i BNC2); indicant que tot i que algunes proteïnes són vulnerables a l'estrès oxidatiu, la patologia espermàtica d'aquests pacients no és deguda principalment a aquest.

QUARTA. Les proteïnes que s'expressen de forma diferencial en aquest estudi estan relacionades principalment amb processos cel·lulars i metabòlics, funció catalítica i d'unió, i la gran majoria es localitzen dins la cèl·lula; d'entre aquestes n'hi ha que es localitzen a la membrana i són candidates a biomarcadores en la selecció d'espermatozoides per a cicles de reproducció assistida..

CINQUENA. La identificació de proteïnes diferencials com H2B1A, GPX4 i PRDM2 que estan involucrades en el dany en l'ADN, la remodelació i reparació de l'ADN dels espermatozoides, així com en la descondenació de l'ADN patern en l'embrió; mostra que la seva desregulació té conseqüències en els trencaments de l'ADN dels espermatozoides i afecta al correcte desenvolupament de l'embrió.

SISENA. A més, el mapa d'interaccions entre les proteïnes diferencials mostra que es distribueixen en tres grups: metabolisme, citoesquelet (mobilitat i fusió de gàmetes) i dany en l'ADN dels espermatozoides.

BIBLIOGRAFIA

A

- Adler I. D. (1996). Comparison of the duration of spermatogenesis between male rodents and humans. *Mutation research*, 352(1-2), 169–172. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(95\)00223-5](https://doi.org/10.1016/0027-5107(95)00223-5)
- Agarwal, A., Bertolla, R., & Samanta, L. (2016). Sperm proteomics: potential impact on male infertility treatment. *Expert Review of Proteomics*, 13(3). <https://doi.org/10.1586/14789450.2016.1151357>
- Agarwal, A., Ayaz, A., Samanta, L., Sharma, R., Assidi, M., Abuzenadah, A. M., & Sabane-gh, E. (2015). Comparative proteomic network signatures in seminal plasma of infertile men as a function of reactive oxygen species. *Clinical Proteomics*. <https://doi.org/10.1186/s12014-015-9094-5>
- Agarwal, A., Baskaran, S., Panner Selvam, M. K., Barbăroşie, C., & Master, K. (2020). Unraveling the Footsteps of Proteomics in Male Reproductive Research: A Scientometric Approach. *Antioxidants & Redox Signaling*, 32(8), 536–549. <https://doi.org/10.1089/ars.2019.7945>
- Agarwal, A., Durairajanayagam, D., Halabi, J., Peng, J., & Vazquez-Levin, M. (2014). Proteomics, oxidative stress and male infertility. *Reproductive BioMedicine Online*. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2014.02.013>
- Agarwal, A., Gupta, S., & Sharma, R. (2016). Oxidation–Reduction Potential Measurement in Ejaculated Semen Samples. In *Andrological Evaluation of Male Infertility*. https://doi.org/10.1007/978-3-319-26797-5_22
- Agarwal, A., Majzoub, A., Esteves, S. C., Ko, E., Ramasamy, R., & Zini, A. (2016). Clinical utility of sperm DNA fragmentation testing: practice recommendations based on clinical scenarios. *Translational andrology and urology*, 5(6), 935–950. <https://doi.org/10.21037/tau.2016.10.03>
- Agarwal, A., Panner Selvam, M. K., Samanta, L., Vij, S. C., Parekh, N., Sabanegh, E., ... Sharma, R. (2019). Effect of Antioxidant Supplementation on the Sperm Proteome of Idiopathic Infertile Men. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 8(10). <https://doi.org/10.3390/antiox8100488>

- Agarwal, A., Saleh, R. A., & Bedaiwy, M. A. (2003). Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertility and Sterility*. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(02\)04948-8](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(02)04948-8)
- Ahlgreen, G., Rannevik, G., & Lilja, H. (1995). Impaired Secretory Function of the Prostate in Men With OligoAsthenozoospermia. *Journal of Andrology*, 16(6), 491–498. <https://doi.org/10.1002/J.1939-4640.1995.TB00569.X>
- Aitken, R. J., & De Iuliis, G. N. (2010). On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. *Molecular Human Reproduction*, 16(1), 3–13. <https://doi.org/10.1093/molehr/gap059>
- Aitken, R. J., & Krausz, C. (2001). Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction*. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1220497>
- Alban, A., David, S. O., Bjorkesten, L., Andersson, C., Sloge, E., Lewis, S., & Currie, I. (2003). A novel experimental design for comparative two-dimensional gel analysis: Two-dimensional difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal standard. *Proteomics*. <https://doi.org/10.1002/pmic.200390006>
- Alvarez-Garcia, I., & Miska, E. A. (2005). MicroRNA functions in animal development and human disease. *Development*. <https://doi.org/10.1242/dev.02073>
- Amaral, A., Castillo, J., Estanyol, J. M., Balleascà, J. L., Ramalho-Santos, J., & Oliva, R. (2013). Human sperm tail proteome suggests new endogenous metabolic pathways. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP*, 12(2), 330–342. <https://doi.org/10.1074/mcp.M112.020552>
- Amaral, A., Castillo, J., Ramalho-Santos, J., & Oliva, R. (2014). The combined human sperm proteome: cellular pathways and implications for basic and clinical science. *Human reproduction update*, 20(1), 40–62. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmt046>
- Ambekar, A. S., Kelkar, D. S., Pinto, S. M., Sharma, R., Hinduja, I., Zaveri, K., ... Mukherjee, S. (2015). Proteomics of follicular fluid from women with polycystic ovary syndrome suggests molecular defects in follicular development. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. <https://doi.org/10.1210/jc.2014-2086>
- Ambros, V. (2001). microRNAs: Tiny regulators with great potential. *Cell*. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00616-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00616-X)

- Amann R. P. (2008). The cycle of the seminiferous epithelium in humans: a need to revisit?. *Journal of andrology*, 29(5), 469–487. <https://doi.org/10.2164/jandrol.107.004655>
- Aslam, B., Basit, M., Nisar, M. A., Khurshid, M., & Rasool, M. H. (2017). Proteomics: Technologies and their applications. *Journal of Chromatographic Science*. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmw167>
- Asseo, P. P., Panidis, D. K., Papadimas, J. S., & Ikkos, D. G. (1981). Creatine kinase in seminal plasma of infertile men: activity and isoenzymes. *International Journal of Andrology*, 4(4), 431–439. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.1981.tb00727.x>
- Aston, K. I., & Carrell, D. T. (2009). Genome-wide study of single-nucleotide polymorphisms associated with azoospermia and severe oligozoospermia. *Journal of Andrology*. <https://doi.org/10.2164/jandrol.109.007971>
- Azpiazu, R., Amaral, A., Castillo, J., Estanyol, J. M., Guimerà, M., Ballejà, J. L., ... Oliva, R. (2014). High-throughput sperm differential proteomics suggests that epigenetic alterations contribute to failed assisted reproduction. *Human Reproduction*. <https://doi.org/10.1093/humrep/deu073>

B

- Baker, M. A., Witherdin, R., Hetherington, L., Cunningham-Smith, K., & Aitken, R. J. (2005). Identification of post-translational modifications that occur during sperm maturation using difference in two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics*, 5(4), 1003–1012. <https://doi.org/10.1002/pmic.200401100>
- Baldwin, J. D., Griffin, F. J., & Clark, W. H. (1998). Immunological characterisation of the acrosomal filament in the marine shrimp *Sicyonia ingentis*. *Zygote (Cambridge, England)*, 6(4), 329–339. <https://doi.org/10.1017/S0967199498000288>
- Balercia, G., Moretti, S., Vignini, A., Magagnini, M., Mantero, F., Boscaro, M., ... Mazzanti, L. (2004). Role of nitric oxide concentrations on human sperm motility. *Journal of Andrology*, 25(2), 245–249. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2004.tb02784.x>

- Balk, S. P., Ko, Y.-J., & Bubley, G. J. (2003). Biology of prostate-specific antigen. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 21(2), 383–391. <https://doi.org/10.1200/JCO.2003.02.083>
- Bantscheff, M., Lemeer, S., Savitski, M. M., & Kuster, B. (2012). Quantitative mass spectrometry in proteomics: Critical review update from 2007 to the present. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6203-4>
- Barad, O., Meiri, E., Avniel, A., Aharonov, R., Barzilai, A., Bentwich, I., ... Einat, P. (2004). MicroRNA expression detected by oligonucleotide microarrays: System establishment and expression profiling in human tissues. *Genome Research*. <https://doi.org/10.1101/gr.2845604>
- Barratt, C. L. R. (2009). Male infertility joins the translational medicine revolution. Sperm DNA: From basic science to clinical reality. *Molecular Human Reproduction*. <https://doi.org/10.1093/molehr/gap094>
- Barratt, C. L. R., Björndahl, L., De Jonge, C. J., Lamb, D. J., Martini, F. O., McLachlan, R., ... Tournaye, H. (2017). The diagnosis of male infertility: An analysis of the evidence to support the development of global WHO guidance-challenges and future research opportunities. *Human Reproduction Update*. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmx021>
- Bassiri, F., Tavalae, M., Dattilio, M., & Nasr-Esfahani, M. H. (2020). Micronutrients in Support to The Carbon Cycle Activate Antioxidant Defences and Reduce Sperm DNA Damage in Infertile Men Attending Assisted Reproductive Technology Programs: Clinical Trial Study. *International Journal of Fertility & Sterility*, 14(1), 57–62. <https://doi.org/10.22074/ijfs.2020.6084>
- Batruch, I., Lecker, I., Kagedan, D., Smith, C. R., Mullen, B. J., Grober, E., ... Jarvi, K. A. (2011). Proteomic analysis of seminal plasma from normal volunteers and post-vasectomy patients identifies over 2000 proteins and candidate biomarkers of the urogenital system. *Journal of Proteome Research*. <https://doi.org/10.1021/pr100745u>
- Bela Szecsi, P., Halgreen, H., Wong, R. N. S., Kjaer, T., & Tang, J. (1995). Cellular Origin, Complementary Deoxyribonucleic Acid and N-Terminal Amino Acid Sequences of Human Seminal Progastricsin1. *Biology of Reproduction*. <https://doi.org/10.1095/biolreprod53.1.227>

Bibliografia

- Bobadilla, J. L., Macek, M., Fine, J. P., & Farrell, P. M. (2002). Cystic fibrosis: A worldwide analysis of CFTR mutations - Correlation with incidence data and application to screening. *Human Mutation*. <https://doi.org/10.1002/humu.10041>
- Bogle, O. A., Kumar, K., Attardo-Parrinello, C., Lewis, S. E. M., Estanyol, J. M.,
- Ballesca, J. L., & Oliva, R. (2017). Identification of protein changes in human spermatozoa throughout the cryopreservation process. *Andrology*, 5(1), 10–22. <https://doi.org/10.1111/andr.12279>
- Bonassi, S., Neri, M., & Puntoni, R. (2001). Validation of biomarkers as early predictors of disease. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(01\)00194-](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(01)00194-)
- Boyd, S. D. (2008). Everything you wanted to know about small RNA but were afraid to ask. *Laboratory Investigation*. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2008.32>
- Bracke, A., Peeters, K., Punjabi, U., Hoogewijs, D., & Dewilde, S. (2018). A search for molecular mechanisms underlying male idiopathic infertility. *Reproductive Biomedicine Online*, 36(3), 327–339. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2017.12.005>
- Breathnach, S. M., Kofler, H., Sepp, N., Ashworth, J., Woodrow, D., Pepys, M. B., & Hintner, H. (1989). Serum amyloid P component binds to cell nuclei in vitro and to in vivo deposits of extracellular chromatin in systemic lupus erythematosus. *The Journal of Experimental Medicine*, 170(4), 1433–1438. <https://doi.org/10.1084/jem.170.4.1433>
- Bredt, D. S. (1999). Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology. *Free Radical Research*, 31(6), 577–596. <https://doi.org/10.1080/10715769900301161>
- Bromfield, J. J. (2014). Seminal fluid and reproduction: Much more than previously thought. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. <https://doi.org/10.1007/s10815-014-0243-y>
- Bueno, M. J., & Malumbres, M. (2011). MicroRNAs and the cell cycle. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.02.002>

- Burden, H. P., Holmes, C. H., Persad, R., & Whittington, K. (2006). Prostatomes - Their effects on human male reproduction and fertility. *Human Reproduction Update*. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmi052>
- Burnum, K. E., Frappier, S. L., & Caprioli, R. M. (2008). Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Imaging Mass Spectrometry for the Investigation of Proteins and Peptides. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 1(1), 689–705. <https://doi.org/10.1146/annurev.anchem.1.031207.112841>
- Butler, P. J., Tennent, G. A., & Pepys, M. B. (1990). Pentraxin-chromatin interactions: serum amyloid P component specifically displaces H1-type histones and solubilizes native long chromatin. *The Journal of Experimental Medicine*, 172(1), 13–18. <https://doi.org/10.1084/jem.172.1.13>

C

- Caballero, I., Parrilla, I., Almiñana, C., del Olmo, D., Roca, J., Martínez, E. A., & Vázquez, J. M. (2012). Seminal Plasma Proteins as Modulators of the Sperm Function and Their Application in Sperm Biotechnologies. *Reproduction in Domestic Animals*. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02028.x>
- Caballero, I., Vazquez, J. M., García, E. M., Parrilla, I., Roca, J., Calvete, J. J., ... Martínez, E. A. (2008). Major proteins of boar seminal plasma as a tool for biotechnological preservation of spermatozoa. *Theriogenology*. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.07.013>
- Cadavid J, A. P., Alvarez, A., Markert, U. R., & Maya, W. C. (2014). Differential protein expression in seminal plasma from fertile and infertile males. *Journal of Human Reproductive Sciences*. <https://doi.org/10.4103/0974-1208.142485>
- Cao, X., Cui, Y., Zhang, X., Lou, J., Zhou, J., Bei, H., & Wei, R. (2018). Proteomic profile of human spermatozoa in healthy and asthenozoospermic individuals. *Reproductive Biology and Endocrinology : RB&E*, 16(1), 16. <https://doi.org/10.1186/s12958-018-0334-1>
- Casanovas, A., Ribas-Maynou, J., Lara-Cerrillo, S., Jimenez-Macedo, A. R., Hortal, O., Benet, J., ... García-Peiró, A. (2019). Double-stranded sperm DNA damage is a cause of delay in embryo development and can impair implantation rates. *Fertility and Sterility*, 111(4), 699–707.e1. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.11.035>

- Castillo, J., Simon, L., de Mateo, S., Lewis, S., & Oliva, R. (2011). Protamine/DNA ratios and DNA damage in native and density gradient centrifuged sperm from infertile patients. *Journal of Andrology*. <https://doi.org/10.2164/jandrol.110.011015>
- Chan, P. J., Orzylowska, E. M., Corselli, J. U., Jacobson, J. D., & Wei, A. K. (2015). A simple sperm DNA toroid integrity test and risk of miscarriage. *BioMed Research International*. <https://doi.org/10.1155/2015/780983>
- Chiu, P. C. N., Chung, M. K., Tsang, H. Y., Koistinen, R., Koistinen, H., Seppala, M., ... Yeung, W. S. B. (2005). Glycodelin-S in human seminal plasma reduces cholesterol efflux and inhibits capacitation of spermatozoa. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M504103200>
- Cho, C. L., & Agarwal, A. (2018). Role of sperm DNA fragmentation in male factor infertility: A systematic review. *Arab Journal of Urology*. <https://doi.org/10.1016/j.aju.2017.11.002>
- Cho, C. L., Agarwal, A., Majzoub, A., & Esteves, S. C. (2017). Clinical utility of sperm DNA fragmentation testing: Concise practice recommendations. *Translational Andrology and Urology*. <https://doi.org/10.21037/tau.2017.07.28>
- Cho, C.-L., Esteves, S. C., & Agarwal, A. (2016). Novel insights into the pathophysiology of varicocele and its association with reactive oxygen species and sperm DNA fragmentation. *Asian Journal of Andrology*, 18(2), 186–193. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.170441>
- Christensson, A., & Lilja, H. (1994). Complex formation between protein C inhibitor and prostate-specific antigen in vitro and in human semen. *European Journal of Biochemistry*, 220(1). <https://doi.org/10.1111/J.1432-1033.1994.TB18597.X>
- Clarke, J. P., & Mearow, K. M. (2013). Cell stress promotes the association of phosphorylated HspB1 with F-actin. *PloS One*, 8(7), e68978. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068978>
- Collodel, G., Castellini, C., Iacoponi, F., Noto, D., & Signorini, C. (2020). Cytosolic phospholipase A2 and F2 isoprostanes are involved in semen quality and human infertility—A study on leucocytospermia, varicocele and idiopathic infertility. *Andrologia*. <https://doi.org/10.1111/and.13465>

- Conrad, M., Schneider, M., Seiler, A., & Bornkamm, G. W. (2007). Physiological role of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in mammals. *Biological Chemistry*, 388(10), 1019–1025. <https://doi.org/10.1515/BC.2007.130>
- Cui, Y., Zhu, H., Zhu, Y., Guo, X., Huo, R., Wang, X., ... Sha, J. (2008). Proteomic analysis of testis biopsies in men treated with injectable testosterone undecanoate alone or in combination with oral levonorgestrel as potential male contraceptive. *Journal of Proteome Research*, 7(9). <https://doi.org/10.1021/PR800259T>
- Cui, Z., Sharma, R., & Agarwal, A. (2016). Proteomic analysis of mature and immature ejaculated spermatozoa from fertile men. *Asian Journal of Andrology*, 18(5). <https://doi.org/10.4103/1008-682X.164924>

D

- Dada, R., Gupta, N. P., & Kucheria, K. (2003). Spermatogenic arrest in men with testicular hyperthermia. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*, Suppl 1, 235–243. <https://doi.org/10.1002/tcm.10050>
- Darmishonnejad, Z., Zarei-Kheirabadi, F., Tavalae, M., Zarei-Kheirabadi, M., Zohrabi, D., & Nasr-Esfahani, M. H. (2020). Relationship between sperm telomere length and sperm quality in infertile men. *Andrologia*, 52(5), e13546. <https://doi.org/10.1111/and.13546>
- de Mateo, S., Martínez-Heredia, J., Estanyol, J. M., Domínguez-Fandos, D., Domínguez-Fandos, D., Vidal-Taboada, J. M., ... Oliva, R. (2007). Marked correlations in protein expression identified by proteomic analysis of human spermatozoa. *Proteomics*, 7(23), 4264–4277. <https://doi.org/10.1002/pmic.200700521>
- Del Giudice, P. T., Belardin, L. B., Camargo, M., Zylbersztejn, D. S., Carvalho, V. M., Cardozo, K. H. M., ... Cedenho, A. P. (2016). Determination of testicular function in adolescents with varicocele - a proteomics approach. *Andrology*. <https://doi.org/10.1111/andr.12174>
- Del Giudice, P. T., Da Silva, B. F., Lo Turco, E. G., Fraietta, R., Spaine, D. M., Santos, L. F. A., ... Bertolla, R. P. (2013). Changes in the seminal plasma proteome of adolescents before and after varicocelectomy. *Fertility and Sterility*. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.04.036>

- Dias, T. R., Samanta, L., Agarwal, A., Pushparaj, P. N., Panner Selvam, M. K., & Sharma, R. (2019). Proteomic Signatures Reveal Differences in Stress Response, Antioxidant Defense and Proteasomal Activity in Fertile Men with High Seminal ROS Levels. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(1). <https://doi.org/10.3390/ijms20010203>
- Ding, Z., Qu, F., Guo, W., Ying, X., Wu, M., & Zhang, Y. (2007). Identification of sperm forward motility-related proteins in human seminal plasma. *Molecular Reproduction and Development*, 74(9), 1124–1131. <https://doi.org/10.1002/mrd.20624>
- Divya, V. (2014). Dynamics of Spermatogenesis. *Annual Research & Review in Biology*, 4(1), 38–50. <https://doi.org/10.9734/ARRB/2014/4289>
- Donker, R. B., Vloeberghs, V., Groen, H., Tournaye, H., Van Ravenswaaij-Arts, C. M. A., & Land, J. A. (2017). Chromosomal abnormalities in 1663 infertile men with azoospermia: The clinical consequences. *Human Reproduction*. <https://doi.org/10.1093/humrep/dex307>
- Drabovich, A. P., Saraon, P., Jarvi, K., & Diamandis, E. P. (2014). Seminal plasma as a diagnostic fluid for male reproductive system disorders. *Nature Reviews Urology*. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2014.74>
- Drevet, J. R., & Aitken, R. J. (2019). Oxidative Damage to Sperm DNA: Attack and Defense. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1166, 107–117. https://doi.org/10.1007/978-3-030-21664-1_7
- du Plessis, S. S., Kashou, A. H., Benjamin, D. J., Yadav, S. P., & Agarwal, A. (2011). Proteomics: a subcellular look at spermatozoa. *Reproductive Biology and Endocrinology : RB&E*, 9, 36. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-9-36>
- Durairajanayagam, D., Rengan, A. K., Sharma, R. K., & Agarwal, A. (2015). Sperm biology from production to ejaculation. In *Unexplained Infertility: Pathophysiology, Evaluation and Treatment*. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2140-9_5

E

- Edwards, J. J., Tollaksen, S. L., & Anderson, N. G. (1981). Proteins of human semen. I. Two-dimensional mapping of human seminal fluid. *Clinical Chemistry*. <https://doi.org/10.1093/clinchem/27.8.1335>

- Elzanaty, S., Richthoff, J., Malm, J., & Giwercman, A. (2002). The impact of epididymal and accessory sex gland function on sperm motility. *Human Reproduction* (Oxford, England), 17(11), 2904–2911. <https://doi.org/10.1093/humrep/17.11.2904>
- Enciso, M., Sarasa, J., Agarwal, A., Fernández, J. L., & Gosálvez, J. (2009). A two-tailed Comet assay for assessing DNA damage in spermatozoa. *Reproductive BioMedicine Online*. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60003-X](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60003-X)
- Erenpreiss, J., Spano, M., Erenpreisa, J., Bungum, M., & Giwercman, A. (2006). Sperm chromatin structure and male fertility: biological and clinical aspects. *Asian Journal of Andrology*, 8(1), 11–29. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7262.2006.00112.x>
- Esteves, S. C., Gosálvez, J., López-Fernández, C., Núñez-Calonge, R., Caballero, P., Agarwal, A., & Fernández, J. L. (2015). Diagnostic accuracy of sperm DNA degradation index (DDSi) as a potential noninvasive biomarker to identify men with varicocele-associated infertility. *International Urology and Nephrology*, 47(9), 1471–1477. <https://doi.org/10.1007/s11255-015-1053-6>
- Evenson, D. P., Larson, K. L., & Jost, L. K. (2002). Sperm chromatin structure assay: Its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *Journal of Andrology*. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2002.tb02599.x>
- Evgeni, E., Charalabopoulos, K., & Asimakopoulos, B. (2014). Human sperm DNA fragmentation and its correlation with conventional semen parameters. *Journal of Reproduction & Infertility*, 15(1), 2–14. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24696791>

F

- FDA-NIH Biomarker Working Group. (2017). BEST (Biomarkers , EndpointS, and other Tools). Updated, September 25. <https://doi.org/10.1164/rccm.201301-0153OC>
- Fernández, J. L., Vázquez-Gundín, F., Rivero, M. T., Genescá, A., Gosálvez, J., & Goyanes, V. (2001). DBD-FISH on neutral comets: Simultaneous analysis of DNA single- and double-strand breaks in individual cells. *Experimental Cell Research*. <https://doi.org/10.1006/excr.2001.5328>

- Fernández, J. L., Muriel, L., Goyanes, V., Segrelles, E., Gosálvez, J., Enciso, M., ... De Jonge, C. (2005). Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertility and Sterility*, 84(4), 833–842. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2004.11.089>
- Fernández, J. L., Muriel, L., Rivero, M. T., Goyanes, V., Vazquez, R., & Alvarez, J. G. (2003). The sperm chromatin dispersion test: A simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *Journal of Andrology*. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2003.tb02641.x>
- Foresta, C., Moro, E., & Ferlin, A. (2001). Y chromosome microdeletions and alterations of spermatogenesis. *Endocrine Reviews*. <https://doi.org/10.1210/er.22.2.226>
- Francavilla, S. (2002). Fas expression correlates with human germ cell degeneration in meiotic and post-meiotic arrest of spermatogenesis. *Molecular Human Reproduction*. <https://doi.org/10.1093/molehr/8.3.213>
- Fröhlich, J. U., Nissen, H. P., Heinze, I., Schirren, C., & Kreysel, H. W. (1980). Free Amino Acid Composition of Human Seminal Plasma in Different Andrological Diagnoses. *Andrologia*. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.1980.tb00602.x>
- Fuentes-Mascorro, G., Serrano, H., & Rosado, A. (2000). Sperm chromatin. *Archives of Andrology*. <https://doi.org/10.1080/01485010050193995>
- Fung, K. Y. C., Glode, L. M., Green, S., & Duncan, M. W. (2004). A comprehensive characterization of the peptide and protein constituents of human seminal fluid. *Prostate*. <https://doi.org/10.1002/pros.20089>

G

- Galliano, D., & Pellicer, A. (2014). MicroRNA and implantation. *Fertility and Sterility*. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.04.023>
- Gandini, L. (2000). Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. *Human Reproduction*. <https://doi.org/10.1093/humrep/15.4.830>

- García-Peiró, A., Martínez-Heredia, J., Oliver-Bonet, M., Abad, C., Amengual, M. J., Navarro, J., Jones, C., Coward, K., Gosálvez, J., & Benet, J. (2011). Protamine 1 to protamine 2 ratio correlates with dynamic aspects of DNA fragmentation in human sperm. *Fertility and Sterility*, 95(1), 105–109. <https://doi.org/10.1016/J.FERTNSTERT.2010.06.053>
- García-Peiró, A., Ribas-Maynou, J., Oliver-Bonet, M., Navarro, J., Checa, M. A., Nikolaou, A., ... Benet, J. (2014). Multiple determinations of sperm DNA fragmentation show that varicocelectomy is not indicated for infertile patients with subclinical varicocele. *BioMed Research International*, 2014, 181396. <https://doi.org/10.1155/2014/181396>
- Gatewood, J. M., Cook, G. R., Balhorn, R., Bradbury, E. M., & Schmid, C. W. (1987). Sequence-specific packaging of DNA in human sperm chromatin. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.3576213>
- Gatti, J. L., Castella, S., Dacheux, F., Ecroyd, H., Métayer, S., Thimon, V., & Dacheux, J. L. (2004). Post-testicular sperm environment and fertility. In *Animal Reproduction Science*. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.05.011>
- Gawecka, J. E., Marh, J., Ortega, M., Yamauchi, Y., Ward, M. A., & Ward, W. S. (2013). Mouse Zygotes Respond to Severe Sperm DNA Damage by Delaying Paternal DNA Replication and Embryonic Development. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056385>
- Giacomini, E., Ura, B., Giolo, E., Luppi, S., Martinelli, M., Garcia, R. C., & Ricci, G. (2015). Comparative analysis of the seminal plasma proteomes of oligoasthenozoospermic and normozoospermic men. *Reproductive Biomedicine Online*, 30(5), 522–531. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2015.01.010>
- Giwercman, A., Lindstedt, L., Larsson, M., Bungum, M., Spano, M., Levine, R. J., & Rylander, L. (2010). Sperm chromatin structure assay as an independent predictor of fertility in vivo: A case-control study. *International Journal of Andrology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2009.00995.x>
- Goodacre, R. (2007). Metabolomics of a Superorganism. *The Journal of Nutrition*. <https://doi.org/10.1093/jn/137.1.259s>

- Gorczyca, W., Traganos, F., Jesionowska, H., & Darzynkiewicz, Z. (1993). Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA in situ to denaturation in abnormal human sperm cells: Analogy to apoptosis of somatic cells. *Experimental Cell Research*. <https://doi.org/10.1006/excr.1993.1182>
- Gray, S., & Huggins, C. (1942). Electrophoretic Analysis of Human Semen. *Experimental Biology and Medicine*, 50(2), 351–353. <https://doi.org/10.3181/00379727-50-13795>
- Gupta, N., Sudhakar, D. V. S., Gangwar, P. K., Sankhwar, S. N., Gupta, N. J., Chakraborty, B., ... Rajender, S. (2017). Mutations in the prostate specific antigen (PSA/ KLK3) correlate with male infertility. *Scientific Reports*, 7(1), 11225. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10866-1>
- Guzick, D. S., Overstreet, J. W., Factor-Litvak, P., Brazil, C. K., Nakajima, S. T., Coutifaris, C., ... National Cooperative Reproductive Medicine Network. (2001). Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. *The New England Journal of Medicine*, 345(19), 1388–1393. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa003005>
- H
- Halliwell, B., & Cross, C. E. (1994). Oxygen-derived species: Their relation to human disease and environmental stress. In *Environmental Health Perspectives*. <https://doi.org/10.2307/3432205>
- Hamada, A., Esteves, S. C., Nizza, M., & Agarwal, A. (2012). Unexplained male infertility: diagnosis and management. *International Braz j Urol : Official Journal of the Brazilian Society of Urology*, 38(5), 576–594. <https://doi.org/10.1590/s1677-55382012000500002>
- Hamamah, S., Seguin, F., Barthelemy, C., Akoka, S., Le Pape, A., Lansac, J., & Royere, D. (1993). ¹H nuclear magnetic resonance studies of seminal plasma from fertile and infertile men. *Journal of Reproduction and Fertility*. <https://doi.org/10.1530/jrf.o.0970051>
- Hammoud, S., Liu, L., & Carrell, D. T. (2009). Protamine ratio and the level of histone retention in sperm selected from a density gradient preparation. *Andrologia*. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2008.00890.x>

- Hao, R., Nanduri, P., Rao, Y., Panichelli, R. S., Ito, A., Yoshida, M., & Yao, T.-P. (2013). Proteasomes activate aggresome disassembly and clearance by producing unanchored ubiquitin chains. *Molecular Cell*, 51(6), 819–828. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.08.016>
- Hashemitabar, M., Sabbagh, S., Orazizadeh, M., Ghadiri, A., & Maryam, B. (2015). A proteomic analysis on human sperm tail: comparison between normozoospermia and asthenozoospermia. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 32(6). <https://doi.org/10.1007/S10815-015-0465-7>
- Hassan, M. I., Waheed, A., Yadav, S., Singh, T. P., & Ahmad, F. (2008). Zinc alpha 2-glycoprotein: a multidisciplinary protein. *Molecular Cancer Research : MCR*, 6(6), 892–906. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-07-2195>
- Heidari, M., Darbandi, S., Darbani, M., Amirjanati, N., Bozorgmehr, M., Zeraati, H., ... Sadeghi, M. R. (2018). Evaluating the Potential of Three Sperm Surface Antigens as Egg-adhesion Biomarkers for Human Sperm Selection. *Journal of Reproduction & Infertility*, 19(4), 203–210. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30746335>
- Herrero, M. B., de Lamirande, E., & Gagnon, C. (1999). Nitric oxide regulates human sperm capacitation and protein-tyrosine phosphorylation in vitro. *Biology of Reproduction*, 61(3), 575–581. <https://doi.org/10.1095/biolreprod61.3.575>
- Hood, L., & Flores, M. (2012). A personal view on systems medicine and the emergence of proactive P4 medicine: Predictive, preventive, personalized and participatory. *New Biotechnology*. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2012.03.004>
- Hosseinfar, H., Gourabi, H., Salekdeh, G., Alikhani, M., Mirshahvaladi, S., Sabbaghian, M., ... Gilani, M. (2013). Study of sperm protein profile in men with and without varicocele using two-dimensional gel electrophoresis. *Urology*, 81(2). <https://doi.org/10.1016/J.UROLOGY.2012.06.027>
- Huang, I., Jones, J., & Khorram, O. (2006). Human seminal plasma nitric oxide: correlation with sperm morphology and testosterone. *Medical Science Monitor : International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 12(3), CR103-6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16501419>

Hud, N. V., Allen, M. J., Downing, K. H., Lee, J., & Balhorn, R. (1993). Identification of the Elemental Packing Unit of DNA in Mammalian Sperm Cells by Atomic Force Microscopy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1993.1773>

I

Inhorn, M. C., & Patrizio, P. (2014). Infertility around the globe: New thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21st century. *Human Reproduction Update*. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmv016>

J

James, P. (1997). Protein identification in the post-genome era: The rapid rise of proteomics. *Quarterly Reviews of Biophysics*. <https://doi.org/10.1017/S0033583597003399>

Jansen, S., Ekhlasi-Hundrieser, M., & Töpfer-Petersen, E. (2001). Sperm adhesion molecules: Structure and function. *Cells Tissues Organs*. <https://doi.org/10.1159/000016809>

Jodar, M., Attardo-Parrinello, C., Soler-Ventura, A., Barrachina, F., Delgado-Dueñas, D., Cívico, S., ... Oliva, R. (2020). Sperm proteomic changes associated with early embryo quality after ICSI. *Reproductive Biomedicine Online*, 40(5), 700–710. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2020.01.004>

Jodar, M., Sandler, E., & Krawetz, S. A. (2016). The protein and transcript profiles of human semen. *Cell and Tissue Research*. <https://doi.org/10.1007/s00441-015-2237-1>

Jodar, M., Soler-Ventura, A., Oliva, R., & Molecular Biology of Reproduction and Development Research Group. (2017). Semen proteomics and male infertility.

Journal of Proteomics, 162, 125–134. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.08.018>

Johnston, D. S., Wooters, J., Kopf, G. S., Qiu, Y., & Roberts, K. P. (2005). Analysis of the human sperm proteome. In *Annals of the New York Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1196/annals.1336.021>

Jungheim, E. S., Yee, M., Leung, M., Macones, G. A., Odem, R. R., Pollack, L. M., & Hamilton, B. H. (2009). World Health Organization (WHO) Revised Glossary on ART Terminology. *Hum Reprod*.

Juriscova, A. (1999). DNA damage in round spermatids of mice with a targeted disruption of the Pp1cgamma gene and in testicular biopsies of patients with non-observative azoospermia. *Molecular Human Reproduction*. <https://doi.org/10.1093/molehr/5.4.323>

K

Kagedan, D., Lecker, I., Batruch, I., Smith, C., Kaploun, I., Lo, K., ... Jarvi, K. A. (2012). Characterization of the seminal plasma proteome in men with prostatitis by mass spectrometry. *Clinical Proteomics*. <https://doi.org/10.1186/1559-0275-9-2>

Kamkar, N., Ramezani, F., & Sabbaghian, M. (2018). The relationship between sperm DNA fragmentation, free radicals and antioxidant capacity with idiopathic repeated pregnancy loss. *Reproductive Biology*, 18(4), 330–335. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2018.11.002>

Kaneko, S., Yoshida, J., Ishikawa, H., & Takamatsu, K. (2012). Single-cell pulsed-field gel electrophoresis to detect the early stage of DNA fragmentation in human sperm nuclei. *PloS One*, 7(7), e42257. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042257>

Kang, C., Lee, Y., & Lee, J. E. (2016). Recent advances in mass spectrometry-based proteomics of gastric cancer. *World Journal of Gastroenterology*. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i37.8283>

Kavalier, F. (2005). Investigation of recurrent miscarriages. *British Medical Journal*. <https://doi.org/10.1136/bmj.331.7509.121>

Kemal Duru, N., Morshedi, M., & Oehninger, S. (2000). Effects of hydrogen peroxide on DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. *Fertility and Sterility*. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(00\)01591-0](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(00)01591-0)

Khatun, A., Rahman, M. S., Ryu, D.-Y., Kwon, W.-S., & Pang, M.-G. (2017). Elevated aminopeptidase N affects sperm motility and early embryo development. *PloS One*, 12(8), e0184294. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184294>

- Khurana, S., Kruhlak, M. J., Kim, J., Tran, A. D., Liu, J., Nyswaner, K., ... Oberdoerffer, P. (2014). A Macrohistone Variant Links Dynamic Chromatin Compaction to BRCA1-Dependent Genome Maintenance. *Cell Reports*, 8(4), 1049. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2014.07.024>
- Kim, J., Kim, Y., Choi, H., Kwon, A., Jekarl, D. W., Lee, S., ... Kim, M. (2018). Ubiquitin C decrement plays a pivotal role in replicative senescence of bone marrow mesenchymal stromal cells. *Cell Death & Disease*, 9(2), 139. <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0032-5>
- Kim, Y.-H., Haidl, G., Schaefer, M., Egner, U., Mandal, A., & Herr, J. C. (2007). Compartmentalization of a unique ADP/ATP carrier protein SFEC (Sperm Flagellar Energy Carrier, AAC4) with glycolytic enzymes in the fibrous sheath of the human sperm flagellar principal piece. *Developmental Biology*, 302(2), 463–476. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.10.004>
- Koziorowska-Gilun, M., Koziorowski, M., Fraser, L., & Strzezek, J. (2011). Antioxidant defence system of boar cauda epididymidal spermatozoa and reproductive tract fluids. *Reproduction in Domestic Animals*. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01701.x>
- Kratz, E. M., Kaluza, A., Ferens-Sieczkowska, M., Olejnik, B., Fiutek, R., Zimmer, M., & Piwowar, A. (2016). Gelatinases and their tissue inhibitors are associated with oxidative stress: A potential set of markers connected with male infertility. *Reproduction, Fertility and Development*. <https://doi.org/10.1071/RD14268>
- Krausz, C., & Riera-Escamilla, A. (2018). Genetics of male infertility. *Nature Reviews Urology*. <https://doi.org/10.1038/s41585-018-0003-3>
- Kruger, T. F., Acosta, A. A., Simmons, K. F., Swanson, R. J., Matta, J. F., Veeck, L. L., ... Brugo, S. (1987). New method of evaluating sperm morphology with predictive value for human in vitro fertilization. *Urology*. [https://doi.org/10.1016/0090-4295\(87\)90246-9](https://doi.org/10.1016/0090-4295(87)90246-9)
- Kumar, S., Tomar, A. K., Singh, S., Saraswat, M., Singh, S., Singh, T. P., & Yadav, S. (2012). Human serum albumin as a new interacting partner of prolactin inducible protein in human seminal plasma. *International Journal of Biological Macromolecules*, 50(2), 317–322. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2011.12.015>

- Kwon, W.-S., Oh, S.-A., Kim, Y.-J., Rahman, M. S., Park, Y.-J., & Pang, M.-G. (2015). Proteomic approaches for profiling negative fertility markers in inferior boar spermatozoa. *Scientific Reports*, 5, 13821. <https://doi.org/10.1038/srep13821>
- Lakshmiopathy, U., Love, B., Goff, L. A., Jörnsten, R., Graichen, R., Hart, R. P., & Chestnut, J. D. (2007). MicroRNA expression pattern of undifferentiated and differentiated human embryonic stem cells. *Stem Cells and Development*. <https://doi.org/10.1089/scd.2007.0026>
- Lan, N., Montelione, G. T., & Gerstein, M. (2003). Ontologies for proteomics: Towards a systematic definition of structure and function that scales to the genome level. *Current Opinion in Chemical Biology*. [https://doi.org/10.1016/S1367-5931\(02\)00020-0](https://doi.org/10.1016/S1367-5931(02)00020-0)
- Lange, V., Picotti, P., Dörmann, B., & Aebersold, R. (2008). Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: A tutorial. *Molecular Systems Biology*. <https://doi.org/10.1038/msb.2008.61>
- Lemkecher, T., Dartigues, S., Vaysse, J., Kulski, O., Barraud-Lange, V., Gattegno, L., & Wolf, J. P. (2005). Leucocytospermia, oxidative stress and male fertility: Facts and hypotheses. *Gynecologie Obstetrique et Fertilité*. <https://doi.org/10.1016/j.gyobfe.2005.01.001>
- Liang, H., & Li, W. H. (2007). MicroRNA regulation of human protein-protein interaction network. *RNA*. <https://doi.org/10.1261/rna.634607>
- Lilja, H., & Abrahamsson, P. A. (1988). Three predominant proteins secreted by the human prostate gland. *The Prostate*. <https://doi.org/10.1002/pros.2990120105>
- Lilja, H., Abrahamsson, P. A., & Lundwall, A. (1989). Semenogelin, the predominant protein in human semen. Primary structure and identification of closely related proteins in the male accessory sex glands and on the spermatozoa. *Journal of Biological Chemistry*.
- Lilja, H., Oldbring, J., Rannevik, G., & Laurell, C. B. (1987). Seminal vesicle-secreted proteins and their reactions during gelation and liquefaction of human semen. *The Journal of Clinical Investigation*. <https://doi.org/10.1172/JCI113070>

- Lindholmer, C., & Eliasson, R. (1974). Zinc and magnesium in human spermatozoa from different fractions of split ejaculates. *International Journal of Fertility*.
- Lindholmer, C. (1974). The Importance of Seminal Plasma for Human Sperm Motility. *Biology of Reproduction*. <https://doi.org/10.1095/biolreprod10.5.533>
- Liu, X., Wang, W., Zhu, P., Wang, J., Wang, Y., Wang, X., ... Liu, F. (2018). In-depth quantitative proteome analysis of seminal plasma from men with oligoasthenozoospermia and normozoospermia. *Reproductive Biomedicine Online*, 37(4), 467–479. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2018.06.025>
- Llavanera, M., Delgado-Bermúdez, A., Fernandez-Fuertes, B., Recuero, S., Mateo, Y., Bonet, S., ... Yeste, M. (2019). GSTM3, but not IZUMO1, is a cryotolerance marker of boar sperm. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 10, 61. <https://doi.org/10.1186/S40104-019-0370-5>
- Llavanera, M., Mateo-Otero, Y., Bonet, S., Barranco, I., Fernández-Fuertes, B., & Yeste, M. (2020). The triple role of glutathione S-transferases in mammalian male fertility. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 77(12), 2331–2342. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03405-w>
- Lopes, S., Sun, J. G., Jurisicova, A., Meriano, J., & Casper, R. F. (1998). Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and Sterility*. <https://doi.org/10.1097/00005392-199811000-00111>

M

- Macleod, J., & Gold, R. Z. (2017). The Male Factor in Fertility and Infertility. II. Spermatozoön Counts in 1000 Men of Known Fertility and in 1000 Cases of Infertile Marriage. *Journal of Urology*. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2016.10.077>
- Magley, R. A., & Rouhana, L. (2019). Tau tubulin kinase is required for spermatogenesis and development of motile cilia in planarian flatworms. *Molecular Biology of the Cell*, 30(17), 2155–2170. <https://doi.org/10.1091/mbc.E18-10-0663>

- Majzoub, A., Esteves, S. C., Gosálvez, J., & Agarwal, A. (2016). Specialized sperm function tests in varicocele and the future of andrology laboratory. *Asian Journal of Andrology*, 18(2), 205–212. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.172642>
- Mann, M., Hendrickson, R. C., & Pandey, A. (2001). Analysis of Proteins and Proteomes by Mass Spectrometry. *Annual Review of Biochemistry*. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.70.1.437>
- Manochantr, S., Chiamchanya, C., & Sobhon, P. (2012). Relationship between chromatin condensation, DNA integrity and quality of ejaculated spermatozoa from infertile men. *Andrologia*, 44(3), 187–199. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2010.01128.x>
- Marouga, R., David, S., & Hawkins, E. (2005). The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. <https://doi.org/10.1007/s00216-005-3126-3>
- Martínez-Heredia, J., de Mateo, S., Vidal-Taboada, J. M., Balleascà, J. L., & Oliva, R. (2008). Identification of proteomic differences in asthenozoospermic sperm samples. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 23(4), 783–791. <https://doi.org/10.1093/humrep/den024>
- Martínez-Heredia, J., Estanyol, J. M., Balleascà, J. L., & Oliva, R. (2006). Proteomic identification of human sperm proteins. *Proteomics*. <https://doi.org/10.1002/pmic.200600094>
- Massart, A., Lissens, W., Tournaye, H., & Stouffs, K. (2012). Genetic causes of spermatogenic failure. *Asian Journal of Andrology*. <https://doi.org/10.1038/aja.2011.67>
- Mathy, G., & Sluse, F. E. (2008). Mitochondrial comparative proteomics: Strengths and pitfalls. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2008.04.042>
- Maunoury, R., & Hill, A. M. (1980). [Immunocytochemical localization in human spermatozoa of tubulin and the associated high molecular weight proteins MAP1 and MAP2]. *Comptes Rendus Des Seances de l'Academie Des Sciences. Serie D, Sciences Naturelles*, 291(4), 425–428. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6777063>

Bibliografia

- Maxwell, W. M., de Graaf, S. P., Ghaoui, R. E. H., & Evans, G. (2007). Seminal plasma effects on sperm handling and female fertility. *Society of Reproduction and Fertility Supplement*. <https://doi.org/10.5661/rdr-vi-13>
- McLay, D. W., & Clarke, H. J. (2003). Remodelling the paternal chromatin at fertilization in mammals. *Reproduction*. <https://doi.org/10.1530/rep.o.1250625>
- McMichael, A. J., & Hall, A. J. (1997). The use of biological markers as predictive early-outcome measures in epidemiological research. IARC Scientific Publications.
- McPherson, S., & Longo, F. J. (1993). Chromatin structure-function alterations during mammalian spermatogenesis: DNA nicking and repair in elongating spermatids. *European Journal of Histochemistry : EJH*.
- McReynolds, S., Dzieciatkowska, M., Stevens, J., Hansen, K. C., Schoolcraft, W. B., & Katz-Jaffe, M. G. (2014). Toward the identification of a subset of unexplained infertility: a sperm proteomic approach. *Fertility and Sterility*, 102(3), 692–699. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.05.021>
- Mehrparavar, B., Minai-Tehrani, A., Arjmand, B., & Gilany, K. (2019). Metabolomics of male infertility: A new tool for diagnostic tests. *Journal of Reproduction and Infertility*.
- Meseguer, M., De los Santos, M., Simon, C., Pellicer, A., Remohi, J., & Garrido, N. (2006). Effect of sperm glutathione peroxidases 1 and 4 on embryo asymmetry and blastocyst quality in oocyte donation cycles. *Fertility and Sterility*, 86(5), 1376–1385. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2006.03.053>
- Mi, H., Guo, N., Kejariwal, A., & Thomas, P. D. (2007). PANTHER version 6: Protein sequence and function evolution data with expanded representation of biological pathways. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl869>
- Micic, S., Lalic, N., Djordjevic, D., Bojanic, N., BogavacStanojevic, N., Busetto, G. M., ... Agarwal, A. (2019). Doubleblind, randomised, placebocontrolled trial on the effect of Lcarnitine and Lacetylcarnitine on sperm parameters in men with idiopathic oligoasthenozoospermia. *Andrologia*, 51(6), e13267. <https://doi.org/10.1111/and.13267>

- Milardi, D., Grande, G., Vincenzoni, F., Messana, I., Pontecorvi, A., De Marinis, L., ... Marana, R. (2012). Proteomic approach in the identification of fertility pattern in seminal plasma of fertile men. *Fertility and Sterility*. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.10.013>
- Mohanty, G., Jena, S. R., Nayak, J., Kar, S., & Samanta, L. (2020). Quantitative proteomics decodes clusterin as a critical regulator of paternal factors responsible for impaired compensatory metabolic reprogramming in recurrent pregnancy loss. *Andrologia*, 52(2), e13498. <https://doi.org/10.1111/and.13498>
- Mohanty, G., Jena, S. R., Nayak, J., Kar, S., & Samanta, L. (2020). Proteomic Signatures in Spermatozoa Reveal the Role of Paternal Factors in Recurrent Pregnancy Loss. *The World Journal of Men's Health*, 38(1), 103–114. <https://doi.org/10.5534/wjmh.190034>
- Mudrak, O., Tomilin, N., & Zalensky, A. (2005). Chromosome architecture in the decondensing human sperm nucleus. *Journal of Cell Science*. <https://doi.org/10.1242/jcs.02581>
- Muratori, M., Marchiani, S., Criscuoli, L., Fuzzi, B., Tamburino, L., Dabizzi, S., ... Baldi, E. (2007). Biological meaning of ubiquitination and DNA fragmentation in human spermatozoa. *Society of Reproduction and Fertility Supplement*, 63, 153–158. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17566270>
- Muratori, M., Marchiani, S., Forti, G., & Baldi, E. (2005). Sperm ubiquitination positively correlates to normal morphology in human semen. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 20(4), 1035–1043. <https://doi.org/10.1093/humrep/deh678>
- Muratori, M., Marchiani, S., Tamburrino, L., & Baldi, E. (2019). Sperm DNA Fragmentation: Mechanisms of Origin. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1166, 75–85. https://doi.org/10.1007/978-3-030-21664-1_5

N

- Naaby-Hansen, S., Flickinger, C., & Herr, J. (1997). Two-dimensional gel electrophoretic analysis of vectorially labeled surface proteins of human spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 56(3). <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD56.3.771>

- Naaby-Hansen, S., & Herr, J. C. (2010). Heat shock proteins on the human sperm surface. *Journal of Reproductive Immunology*, 84(1), 32–40. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2009.09.006>
- Nadano, D., Yasuda, T., & Kishi, K. (1993). Measurement of deoxyribonuclease I activity in human tissues and body fluids by a single radial enzyme-diffusion method. *Clinical Chemistry*. <https://doi.org/10.1093/clinchem/39.3.448>
- Nazari, L., Salehpour, S., Hosseini, S., Allameh, F., Jahanmardi, F., Azizi, E., ... Hashemi, T. (2020). Effect of antioxidant supplementation containing L-carnitine on semen parameters: a prospective interventional study. *JBRA Assisted Reproduction*. <https://doi.org/10.5935/1518-0557.20200043>
- Netherton, J. K., Hetherington, L., Ogle, R. A., Gavgani, M. M., Velkov, T., Villaverde, A. I. B., ... Baker, M. A. (2020). Mass Spectrometry Reveals New Insights into the Production of Superoxide Anions and 4-Hydroxynonenal Adducted Proteins in Human Sperm. *Proteomics*, 20(2), e1900205. <https://doi.org/10.1002/pmic.201900205>
- Nixon, B., Mitchell, L. A., Anderson, A. L., McLaughlin, E. A., O'bryan, M. K., & Aitken, R. J. (2011). Proteomic and functional analysis of human sperm detergent resistant membranes. *Journal of Cellular Physiology*, 226(10), 2651–2665. <https://doi.org/10.1002/jcp.22615>
- Nowicka-Bauer, K., & Nixon, B. (2020). Molecular Changes Induced by Oxidative Stress that Impair Human Sperm Motility. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 9(2). <https://doi.org/10.3390/antiox9020134>
- Núñez-Calonge, R., Caballero, P., López-Fernández, C., Guijarro, J. A., Fernández, J. L., Johnston, S., & Gosálvez, J. (2012). An improved experimental model for understanding the impact of sperm DNA fragmentation on human pregnancy following ICSI. *Reproductive Sciences (Thousand Oaks, Calif.)*, 19(11), 1163–1168. <https://doi.org/10.1177/1933719112459238>
-
- Okutman, O., Rhouma, M. Ben, Benkhalifa, M., Muller, J., & Viville, S. (2018). Genetic evaluation of patients with non-syndromic male infertility. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. <https://doi.org/10.1007/s10815-018-1301-7>

- Oliva, R. (2006). Protamines and male infertility. *Human Reproduction Update*. <https://doi.org/10.1093/humupd/dml009>
- Olsen, J. V., & Mann, M. (2013). Status of large-scale analysis of posttranslational modifications by mass spectrometry. *Molecular and Cellular Proteomics*. <https://doi.org/10.1074/mcp.O113.034181>
- Ooshio, T., Irie, K., Morimoto, K., Fukuhara, A., Imai, T., & Takai, Y. (2004). Involvement of LMO7 in the Association of Two Cell-Cell Adhesion Molecules, Nectin and E-cadherin, through Afadin and α -Actinin in Epithelial Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 279(30), 31365–31373. <https://doi.org/10.1074/JBC.M401957200>
- Owen, D. H., & Katz, D. F. (2005). A review of the physical and chemical properties of human semen and the formulation of a semen simulant. *Journal of Andrology*. <https://doi.org/10.2164/jandrol.04104>

P

- Palmer, S. S., & Barnhart, K. T. (2013). Biomarkers in reproductive medicine: The promise, and can it be fulfilled? In *Fertility and Sterility*. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.11.019>
- Panner Selvam, M. K., & Agarwal, A. (2018). Update on the proteomics of male infertility: A systematic review. *Arab Journal of Urology*. <https://doi.org/10.1016/j.aju.2017.11.016>
- Panner Selvam, M. K., Agarwal, A., Pushparaj, P. N., Baskaran, S., & Bendou, H. (2019). Sperm Proteome Analysis and Identification of Fertility-Associated Biomarkers in Unexplained Male Infertility. *Genes*, 10(7). <https://doi.org/10.3390/genes10070522>
- Pini, T., Parks, J., Russ, J., Dzieciatkowska, M., Hansen, K. C., Schoolcraft, W. B., & Katz-Jaffe, M. (2020). Obesity significantly alters the human sperm proteome, with potential implications for fertility. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 37(4), 777–787. <https://doi.org/10.1007/s10815-020-01707-8>
- Politch, J. A., Tucker, L., Bowman, F. P., & Anderson, D. J. (2007). Concentrations and significance of cytokines and other immunologic factors in semen of healthy fertile men. *Human Reproduction*. <https://doi.org/10.1093/humrep/dem281>

- Poongothai, J., Gopenath, T. S., Manonayaki, S., & Poongothai, S. (2009). Genetics of human male infertility. *Singapore Medical Journal*.
- Primakoff, P., & Myles, D. G. (2002). Penetration, adhesion, and fusion in mammalian sperm-egg interaction. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1072029>
- Puglisi, R., Maccari, I., Pipolo, S., Conrad, M., Mangia, F., & Boitani, C. (2012). The nuclear form of glutathione peroxidase 4 is associated with sperm nuclear matrix and is required for proper paternal chromatin decondensation at fertilization. *Journal of Cellular Physiology*, 227(4), 1420–1427. <https://doi.org/10.1002/jcp.22857>
- Puglisi, R., Maccari, I., Pipolo, S., Mangia, F., & Boitani, C. (2014). The nuclear form of glutathione peroxidase 4 colocalizes and directly interacts with protamines in the nuclear matrix during mouse sperm chromatin assembly. *Spermatogenesis*, 4, e28460. <https://doi.org/10.4161/spmg.28460>

R

- Reinders, J., Lewandrowski, U., Moebius, J., Wagner, Y., & Sickmann, A. (2004). Challenges in mass spectrometry-based proteomics. *Proteomics*. <https://doi.org/10.1002/pmic.200400869>
- Ribas-Maynou, J., García-Peiró, A., Abad, C., Amengual, M. J., Navarro, J., & Benet, J. (2012). Alkaline and neutral Comet assay profiles of sperm DNA damage in clinical groups. *Human reproduction (Oxford, England)*, 27(3), 652–658. <https://doi.org/10.1093/humrep/der461>
- Ribas-Maynou, J., García-Peiró, A., Fernandez-Encinas, A., Amengual, M. J., Prada, E., Cortés, P., ... Benet, J. (2012). Double Stranded Sperm DNA Breaks, Measured by Comet Assay, Are Associated with Unexplained Recurrent Miscarriage in Couples without a Female Factor. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044679>
- Ribas-Maynou, J., García-Peiró, A., Fernández-Encinas, A., Abad, C., Amengual, M. J., Prada, E., ... Benet, J. (2013). Comprehensive analysis of sperm DNA fragmentation by five different assays: TUNEL assay, SCSA, SCD test and alkaline and neutral Comet assay. *Andrology*, 1(5), 715–722. <https://doi.org/10.1111/j.2047-2927.2013.00111.x>

- Ribas-Maynou, J., & Benet, J. (2019). Single and double strand sperm DNA damage: Different reproductive effects on male fertility. *Genes*. <https://doi.org/10.3390/genes10020105>
- Rickard, J. P., Pini, T., Soleilhavoup, C., Cognie, J., Bathgate, R., Lynch, G. W., ... De Graaf, S. P. (2014). Seminal plasma aids the survival and cervical transit of epididymal ram spermatozoa. *Reproduction*. <https://doi.org/10.1530/REP-14-0285>
- Rima, D., Shiv, B. K., Bhavna, C. h., Shilpa, B., & Saima, K. h. (2016). Oxidative Stress Induced Damage to Paternal Genome and Impact of Meditation and Yoga - Can it Reduce Incidence of Childhood Cancer?. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*, 17(9), 4517–4525.
- Rodríguez-Martínez, H., Kvist, U., Ernerudh, J., Sanz, L., & Calvete, J. J. (2011). Seminal plasma proteins: What role do they play? *American Journal of Reproductive Immunology*. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2011.01033.x>
- Rümke, P. (1974). The origin of immunoglobulins in semen. *Clinical and Experimental Immunology*.
- Ryu, K.-Y., Maehr, R., Gilchrist, C. A., Long, M. A., Bouley, D. M., Mueller, B., ... Kopito, R. R. (2007). The mouse polyubiquitin gene UbC is essential for fetal liver development, cell-cycle progression and stress tolerance. *The EMBO Journal*, 26(11), 2693–2706. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601722>
- S
- Sakkas, D., & Alvarez, J. G. (2010). Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertility and Sterility*, 93(4), 1027–1036. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.10.046>
- Sakkas, D., Manicardi, G., Grace Bianchi, P., Bizzaro, D., & Bianchi, U. (1995). Relationship between the Presence of Endogenous Nicks and Sperm Chromatin Packaging in Maturing and Fertilizing Mouse Spermatozoa1. *Biology of Reproduction*. <https://doi.org/10.1095/biolreprod52.5.1149>
- Sakkas, D., Mariethoz, E., Manicardi, G., Bizzaro, D., Bianchi, P. G., & Bianchi, U. (1999). Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Reviews of Reproduction*. <https://doi.org/10.1530/ror.o.0040031>

- Sakkas, D., Ramalingam, M., Garrido, N., & Barratt, C. L. R. (2015). Sperm selection in natural conception: What can we learn from Mother Nature to improve assisted reproduction outcomes? *Human Reproduction Update*. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmv042>
- Salas-Huetos, A., James, E. R., Aston, K. I., Carrell, D. T., Jenkins, T. G., & Yeste, M. (2020). The role of miRNAs in male human reproduction: a systematic review. *Andrology*. <https://doi.org/10.1111/andr.12714>
- Saleh, R. A., & Agarwal, A. (2002). Oxidative stress and male infertility: From research bench to clinical practice. *Journal of Andrology*. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2002.tb02324.x>
- Samanta, L., Parida, R., Dias, T. R., & Agarwal, A. (2018). The enigmatic seminal plasma: A proteomics insight from ejaculation to fertilization. *Reproductive Biology and Endocrinology*. <https://doi.org/10.1186/s12958-018-0358-6>
- Saratsis, A. M., Yadavilli, S., Magge, S., Rood, B. R., Perez, J., Hill, D. A., ... Nazarian, J. (2012). Insights into pediatric diffuse intrinsic pontine glioma through proteomic analysis of cerebrospinal fluid. *Neuro-Oncology*, 14(5), 547–560. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noso67>
- Schenkels, L. C., Schaller, J., Walgreen-Weterings, E., Schadee-Eestermans, I. L., Veerman, E. C., & Nieuw Amerongen, A. V. (1994). Identity of human extra parotid glycoprotein (EP-GP) with secretory actin binding protein (SABP) and its biological properties. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*, 375(9), 609–615. <https://doi.org/10.1515/bchm3.1994.375.9.609>
- Schmidt, A., Forne, I., & Imhof, A. (2014). Bioinformatic analysis of proteomics data. *BMC Systems Biology*. <https://doi.org/10.1186/1752-0509-8-S2-S3>
- Shaman, J. A., Yamauchi, Y., & Ward, W. S. (2007). Function of the sperm nuclear matrix. *Archives of Andrology*, 53(3), 135–140. <https://doi.org/10.1080/01485010701329378>
- Sharma, R., Agarwal, A., Mohanty, G., Du Plessis, S. S., Gopalan, B., Willard, B., ... Sabanegh, E. (2013). Proteomic analysis of seminal fluid from men exhibiting oxidative stress. *Reproductive Biology and Endocrinology : RB&E*, 11, 85. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-11-85>

Sharma, R., Agarwal, A., Mohanty, G., Jesudasan, R., Gopalan, B., Willard, B., ...

Sabanegh, E. (2013). Functional proteomic analysis of seminal plasma proteins in men with various semen parameters. *Reproductive Biology and Endocrinology : RB&E*, 11, 38. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-11-38>

Simon, L., Brunborg, G., Stevenson, M., Lutton, D., McManus, J., & Lewis, S. E. M. (2010). Clinical significance of sperm DNA damage in assisted reproduction outcome. *Human Reproduction*. <https://doi.org/10.1093/humrep/deq103>

Simon, L., & Carrell, D. T. (2013). Sperm DNA damage measured by comet assay. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 927, 137–146. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-038-0_13

Simon, L., Lutton, D., McManus, J., & Lewis, S. E. M. (2011). Sperm DNA damage measured by the alkaline Comet assay as an independent predictor of male infertility and in vitro fertilization success. *Fertility and Sterility*, 95(2), 652–657. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.08.019>

Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., & Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175(1), 184–191. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(88\)90265-0](https://doi.org/10.1016/0014-4827(88)90265-0)

Singh, N. P., Danner, D. B., Tice, R. R., McCoy, M. T., Collins, G. D., & Schneider, E. L. (1989). Abundant alkali-sensitive sites in DNA of human and mouse sperm. *Experimental Cell Research*. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(89\)90344-3](https://doi.org/10.1016/0014-4827(89)90344-3)

Sinha, K., Das, J., Pal, P. B., & Sil, P. C. (2013). Oxidative stress: The mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis. *Archives of Toxicology*. <https://doi.org/10.1007/s00204-013-1034-4>

Snel, B. (2000). STRING: a web-server to retrieve and display the repeatedly occurring neighbourhood of a gene. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/28.18.3442>

Starita-Geribaldi, M. (2001). Mapping of seminal plasma proteins by two-dimensional gel electrophoresis in men with normal and impaired spermatogenesis. *Molecular Human Reproduction*. <https://doi.org/10.1093/molehr/7.8.715>

- Starita-Geribaldi, M., Roux, F., Garin, J., Chevallier, D., Fénichel, P., & Pointis, G. (2003). Development of narrow immobilized pH gradients covering one pH unit for human seminal plasma proteomic analysis. In *Proteomics*. <https://doi.org/10.1002/pmic.200300493>
- Stoevesandt, O., Elbs, M., Köhler, K., Lellouch, A. C., Fischer, R., André, T., & Brock, R. (2005). Peptide microarrays for the detection of molecular interactions in cellular signal transduction. *Proteomics*. <https://doi.org/10.1002/pmic.200401095>
- Strzerek, J., Fraser, L., Hołody, D., & Wysocki, P. (1998). Biochemical Properties and Usefulness of Boar Semen for Liquid Preservation Following Atropine Administration. *Journal of Veterinary Medicine Series A: Physiology Pathology Clinical Medicine*. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0442.1998.tb00849.x>
- Szczykutowicz, J., Kałuża, A., Kaźmierowska-Niemczuk, M., & Ferens-Sieczkowska, M. (2019). The potential role of seminal plasma in the fertilization outcomes. *BioMed Research International*. <https://doi.org/10.1155/2019/5397804>
- Szecs, P. B., & Lilja, H. (1995). Seminal progastricsin. In *Advances in Experimental Medicine and Biology*. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1871-6_12
- T
- Tahmasbpour, E., Balasubramanian, D., & Agarwal, A. (2014). A multi-faceted approach to understanding male infertility: gene mutations, molecular defects and assisted reproductive techniques (ART). *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. <https://doi.org/10.1007/s10815-014-0280-6>
- Taylor, S. L., Weng, S. L., Fox, P., Duran, E. H., Morshedi, M. S., Oehninger, S., & Beebe, S. J. (2004). Somatic cell apoptosis markers and pathways in human ejaculated sperm: Potential utility as indicators of sperm quality. *Molecular Human Reproduction*. <https://doi.org/10.1093/molehr/gah099>
- Thoma, M. E., McLain, A. C., Louis, J. F., King, R. B., Trumble, A. C., Sundaram, R., & Buck Louis, G. M. (2013). Prevalence of infertility in the United States as estimated by the current duration approach and a traditional constructed approach. *Fertility and Sterility*, 99(5), 1324-1331.e1. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.11.037>

- Thompson, A., Agarwal, A., & Du Plessis, S. (2014). Physiological Role of Reactive Oxygen Species in Sperm Function: A Review. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-9158-3_4
- Tomar, A. K., Sooch, B. S., Singh, S., & Yadav, S. (2012). Quantification studies in human seminal plasma samples identify prolactin inducible protein as a plausible marker of azoospermia. *Biomarkers : Biochemical Indicators of Exposure, Response, and Susceptibility to Chemicals*, 17(6), 545–551. <https://doi.org/10.3109/1354750X.2012.699555>
- Toshimori, K. (2003). Biology of spermatozoa maturation: An overview with an introduction to this issue. *Microscopy Research and Technique*. <https://doi.org/10.1002/jemt.10311>
- Tsirigotis, M., Zhang, M., Chiu, R. K., Wouters, B. G., & Gray, D. A. (2001). Sensitivity of mammalian cells expressing mutant ubiquitin to protein-damaging agents. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(49), 46073–46078. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109023200>

U

- Utleg, A. G., Yi, E. C., Xie, T., Shannon, P., White, J. T., Goodlett, D. R., ... Lin, B. (2003). Proteomic analysis of human prostasomes. *Prostate*. <https://doi.org/10.1002/pros.10255>

V

- Valverde, M., & Rojas, E. (2009). Environmental and occupational biomonitoring using the Comet assay. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2008.11.001>
- Van Assche, E., Bonduelle, M., Tournaye, H., Joris, H., Verheyen, G., Devroey, P., ... Liebaers, I. (1996). Cytogenetics of infertile men. *Human Reproduction*. https://doi.org/10.1093/humrep/11.suppl_4.1
- Vanhoutteghem, A., Messiaen, S., Hervé, F., Delhomme, B., Moison, D., Petit, J.-M., ... Djian, P. (2014). The zinc-finger protein basoon 2 is required for proper mitotic arrest, prevention of premature meiotic initiation and meiotic progression in mouse male germ cells. *Development (Cambridge, England)*, 141(22), 4298–4310. <https://doi.org/10.1242/dev.112888>

- Varghese, A., Bragais, F., Mukhopadhyay, D., Kundu, S., Pal, M., Bhattacharyya, A., & Agarwal, A. (2009). Human sperm DNA integrity in normal and abnormal semen samples and its correlation with sperm characteristics. *Andrologia*, 41(4). <https://doi.org/10.1111/J.1439-0272.2009.00917.X>
- Vaux, D. L., & Flavell, R. A. (2000). Apoptosis genes and autoimmunity. *Current Opinion in Immunology*. [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(00\)00168-](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(00)00168-)
- Végvári, Á., Rezeli, M., Sihlbom, C., Häkkinen, J., Carlsohn, E., Malm, J., ... Marko-Varga, G. (2012). Molecular microheterogeneity of prostate specific antigen in seminal fluid by mass spectrometry. *Clinical Biochemistry*, 45(4–5), 331–338. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2011.11.018>
- Velthuis, A. J. W. te, & Bagowski, C. P. (2007). PDZ and LIM Domain-Encoding Genes: Molecular Interactions and their Role in Development. *The Scientific World Journal*, 7, 1470. <https://doi.org/10.1100/TSW.2007.232>
- Vorona, E., Zitzmann, M., Gromoll, J., Schüring, A. N., & Nieschlag, E. (2007). Clinical, endocrinological, and epigenetic features of the 46,XX male syndrome, compared with 47,XXY Klinefelter patients. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. <https://doi.org/10.1210/jc.2007-0447>

W

- Wang, C., Yang, H., & Gao, C. (2019). Potential biomarkers for heart failure. *Journal of Cellular Physiology*, 234(6), 9467–9474. <https://doi.org/10.1002/jcp.27632>
- Wang, J., Wang, J., Zhang, H. R., Shi, H. J., Ma, D., Zhao, H. X., ... Li, R. S. (2009). Proteomic analysis of seminal plasma from asthenozoospermia patients reveals proteins that affect oxidative stress responses and semen quality. *Asian Journal of Andrology*. <https://doi.org/10.1038/aja.2009.26>
- Ward, W. S. (2010). Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development. *Molecular Human Reproduction*, 16(1), 30–36. <https://doi.org/10.1093/molehr/gap080>
- Wichmann, I., Vaalasti, A., Vaalasti, T., & Tuohimaa, P. (1989). Localization of lactoferrin in the male reproductive tract. *International Journal of Andrology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.1989.tb01302.x>

World Health Organization. (2010). Laboratory manual for the examination and processing of human semen. Cambridge: Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1038/aja.2008.57>

X

Xie, D., Lu, C., Zhu, Y., Zhu, S., Yang, E.-J., & Jin, X. (2018). Analysis on the association between sperm DNA fragmentation index and conventional semen parameters, blood microelements and seminal plasma ROS in male patients with infertility. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 15(6), 5173–5176. <https://doi.org/10.3892/etm.2018.6115>

Xu, W., Hu, H., Wang, Z., Chen, X., Yang, F., Zhu, Z., ... Qiao, Z. (2012). Proteomic characteristics of spermatozoa in normozoospermic patients with infertility. *Journal of Proteomics*, 75(17), 5426–5436. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.06.021>

Xue, D., Zhang, Y., Wang, Y., Wang, J., An, F., Sun, X., & Yu, Z. (2019). Quantitative proteomic analysis of sperm in unexplained recurrent pregnancy loss. *Reproductive Biology and Endocrinology : RB&E*, 17(1), 52. <https://doi.org/10.1186/s12958-019-0496-5>

Y

Yamakawa, K., Yoshida, K., Nishikawa, H., Kato, T., & Iwamoto, T. (2007). Comparative analysis of interindividual variations in the seminal plasma proteome of fertile men with identification of potential markers for azoospermia in infertile patients. *Journal of Andrology*. <https://doi.org/10.2164/jandrol.107.002824>

Yamauchi, Y., Shaman, J. A., & Ward, W. S. (2007). Topoisomerase II-mediated breaks in spermatozoa cause the specific degradation of paternal DNA in fertilized oocytes. *Biology of Reproduction*, 76(4), 666–672. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.057067>

Yang GZ, Zhu PY, Hu YA, G. Y. (2003). Examination and Significance of Seminal Prostate Specific Antigen in Infertile Patients. *Zhonghua Nan Ke Xue*, 9(8), 596598.

- Yang, H., Li, G., Jin, H., Guo, Y., & Sun, Y. (2019). The effect of sperm DNA fragmentation index on assisted reproductive technology outcomes and its relationship with semen parameters and lifestyle. *Translational Andrology and Urology*, 8(4). <https://doi.org/10.21037/TAU.2019.06.22>
- Yang, L., Nyalwidhe, J. O., Guo, S., Drake, R. R., & Semmes, O. J. (2011). Targeted identification of metastasis-associated cell-surface sialoglycoproteins in prostate cancer. *Molecular and Cellular Proteomics*. <https://doi.org/10.1074/mcp.M110.007294>
- Yates, J. R. (2011). A century of mass spectrometry: From atoms to proteomes. *Nature Methods*. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1659>
- Yi, Y. J., Manandhar, G., Oko, R. J., Breed, W. G., & Sutovsky, P. (2007). Mechanism of sperm-zona pellucida penetration during mammalian fertilization: 26S proteasome as a candidate egg coat lysin. *Society of Reproduction and Fertility Supplement*.
- Yu, J., Chen, Z., Ni, Y., & Li, Z. (2012). CFTR mutations in men with congenital bilateral absence of the vas deferens (CBAVD): A systemic review and meta-analysis. *Human Reproduction*. <https://doi.org/10.1093/humrep/der377>

Z

- Zegers-Hochschild, F., Adamson, G. D., de Mouzon, J., Ishihara, O., Mansour, R., Nygren, K., ... Vanderpoel, S. (2009). International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology, 2009*. *Fertility and Sterility*. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.09.009>
- Zhang, Z., Voothuluru, P., Yamaguchi, M., Sharp, R. E., & Peck, S. C. (2013). Developmental distribution of the plasma membrane-enriched proteome in the maize primary root growth zone. *Frontiers in Plant Science*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00033>
- Zhang, Z., Zhang, Y., Liu, C., Zhao, M., Yang, Y., Wu, H., ... Jiang, H. (2017). Serum metabolomic profiling identifies characterization of non-obstructive azoospermic men. *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms18020238>

- Zhu, Y., Wu, Y., Jin, K., Lu, H., Liu, F., Guo, Y., ... Zhou, Z. (2013). Differential proteomic profiling in human spermatozoa that did or did not result in pregnancy via IVF and AID. *Proteomics - Clinical Applications*. <https://doi.org/10.1002/prca.201200078>
- Zigo, M., Manaskova-Postlerova, P., Jonakova, V., Kerns, K., & Sutovsky, P. (2019). Compartmentalization of the proteasome-interacting proteins during sperm capacitation. *Scientific Reports*, 9(1), 12583. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49024-0>
- Zini, A., Zhang, X., & San Gabriel, M. (2008). Sperm nuclear histone H2B: correlation with sperm DNA denaturation and DNA stainability. *Asian Journal of Andrology*, 10(6), 865–871. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7262.2008.00415.x>

ABREVIACIONS I ACRÒNIMS

2D-DIGE:	Electroforesi diferencial en dues dimensions
ADN:	Àcid desoxirribonucleic
ADNasa:	ADN nucleasa I
ARN:	Àcid ribonucleic
ASZ:	Astenozoospèrmia
ATZ:	Asteneratozoospèrmia
ATZ-VAR:	Asteneratozoospèrmia amb varicocele
AR:	Avortament de repetició
AR-AO:	Avortament de repetició després del tractament amb antioxidants
AZ:	Azoospèrmia
BSA:	Sèrum albúmina bovina
CF:	Control fèril
DTT:	Dithiothreitol
FIV:	Fecundació in vitro
ICSI:	Intracytoplasmic Sperm Injection
IA:	Inseminació artificial
Kb:	Kilobases
LC-MS/MS:	Cromatografia líquida capilar acoblada a espectrometria de masses en tàndem.
MAR:	Matrix Attachment Region
OMS:	Organització Mundial de la salut (anglès, WHO)

PBS:	Phosphate-buffered saline
ROS:	Espècies reactives d'oxigen
SCD:	Sperm Chromatin Structure Assay
SDF:	Sperm Chromatin Fragmentation
SSB:	Fragmentació de cadena senzilla de l'ADN (anglès, single strand breaks)
SDB	Fragmentació de cadena doble de l'ADN (anglès, double strand breaks)
SMN:	Seminograma normal en pacients infèrtils
SP:	Plasma seminal
SRED:	Single Radial Enzyme Diffusion
STRING:	Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins
TMT:	Tandem Mass Tag
TUNEL:	Terminal transferasa dUTP Nick-End-Labeling
TZ:	Teratozoospermia

