

Salud Reproductiva Masculina



Editores: Biol. Gerardo Cerezo Parra
Dra. Rocío Núñez Calonge
Dra. Mónica Vazquez-Levin

Año 2023

SALUD REPRODUCTIVA MASCULINA

Gerardo Cerezo Parra, Rocío Núñez Calonge y Mónica Vazquez-Levin

Copyright © 2023 Gerardo Cerezo Parra, Rocío Núñez Calonge y Mónica Vazquez-Levin

ISBN: 978-607-99997-1-1

Todos los derechos reservados.

Diseño de portada: Melisa Dana Levin.

Registro editorial: Yao Díaz.

Editado en Ciudad de México, México.

Cómo citar este libro:

Cerezo Parra Gerardo, Rocío Núñez Calonge y Mónica Vazquez-Levin, eds. 2023. Salud Reproductiva Masculina. México: Yao Díaz, 2023.

Este material puede compartirse sin autorización previa de los editores. Se debe dar crédito de manera adecuada e indicar si se han realizado cambios. Queda prohibido hacer uso del material con propósitos comerciales.

CONTENTS

Title Page

Copyright

Editores

Autores

Introducción

Evaluación clínica de la infertilidad masculina

Fisiología del espermatozoide humano

Introducción a la espermatología

El análisis básico del semen

Actualización 2021 sobre el examen básico del semen por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y

El valor de la morfología del espermatozoide en la práctica clínica

Análisis de células redondas y semen:
importancia y determinación

Origen de la fragmentación del ADN espermático: Papel de la apoptosis, la inmadurez y el estrés oxid

Fragmentación del ADN espermático.

Fundamentos y metodología diagnóstica disponible para el laborato

Impacto de las infecciones en la fertilidad masculina

La importancia y las aplicaciones del análisis espermático asistido por computadora (CASA) en labora

Técnicas citogenéticas aplicadas
al estudio de la infertilidad masculina

Banco de semen humano en Canadá

Técnicas de procesamiento del semen para inseminación

Técnicas de micromanipulación espermática en el laboratorio de reproducción asistida

Vitrificación de espermatozoides humanos: efecto de crioprotectores y métodos de enfriamiento en la

Criopreservación de

Microrrobótica para el movimiento de espermatozoides controlado en forma remota

Varicocele: más allá de un trastorno vascular

Azoospermia: causas y tratamiento

Perspectiva actual del uso clínico de los antioxidantes para el tratamiento de la infertilidad masculina

Andrología reproductiva del varón adolescente

Anticoncepción hormonal masculina: una realidad

Andropausia

Efectos tóxicos de la exposición a metales y plaguicidas sobre los espermatozoides y su repercusión

Impacto de la edad y los factores clínicos y socioambientales sobre la calidad del semen

Disminución de la calidad del semen
en los últimos 30 años

Estudios globales en Andrología:
de la investigación al laboratorio clínico

La Andrología en la era de las técnicas de reproducción asistida:

La Iniciativa de Salud Reproductiva Masculina (MRHI). Historia y misión

ESTUDIOS GLOBALES EN ANDROLOGÍA: DE LA INVESTIGACIÓN AL LABORATORIO CLÍNICO

Mónica Hebe Vazquez-Levin

Gustavo Luis Verón

Ania Antonella Manjon

Camila Mariatti

Débora Catalano

Laboratorio de Estudios de Interacción Celular en Reproducción y Cáncer. Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME). Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de Argentina (CONICET) - Fundación IBYME (FIBYME). Buenos Aires, Argentina.

Autor correspondiente: Dra. Mónica Vazquez-Levin. Correo electrónico: mhvazl@gmail.com

La infertilidad afecta globalmente a 15-20% de las parejas en edad reproductiva (1) y se caracteriza por la incapacidad de concebir naturalmente tras un año de relaciones sexuales sin uso de anticonceptivos durante la fase fértil del ciclo menstrual (2). Esta enfermedad puede ser definida como primaria y secundaria, correspondiendo la primera a aquellas personas que nunca concibieron, mientras que la segunda a aquellas personas con al menos una concepción previa. Alrededor del 35% de los casos se debe a factores masculinos, 35% a femeninos, un 20% a factores combinados, y el 10% restante es de origen aún no asignable por limitaciones en el diagnóstico (2,3,4).

La evaluación de la fertilidad masculina comprende la realización de la evaluación exhaustiva de la historia clínica del paciente, su salud física general y reproductiva y, finalmente, el análisis de semen. Este último permite obtener información relevante sobre la funcionalidad testicular, de las glándulas accesorias, así como la capacidad eyaculatoria de la persona (5,6). Provee información sobre el volumen de eyaculado y algunos parámetros físico-químicos, así como la cantidad (concentración y cuenta) de espermatozoides presentes en el eyaculado, como su movilidad y morfología. En este sentido, una concentración y cuenta espermática menor a la definida como normal (oligozoospermia), así como la presencia de alteraciones en el porcentaje de espermatozoides móviles (astenozoospermia) y morfológicamente normales (teratozoospermia) han sido asociados a una baja tasa de éxito en la fecundación (7). Sin embargo, el análisis seminal solo puede predecir la fertilidad indiscutiblemente en casos de azoospermia, definidos por eyaculados con ausencia de espermatozoides (7-9). Las limitaciones en el diagnóstico de la infertilidad masculina podrían atribuirse, al menos en parte, a una falla en la comprensión de las bases moleculares de la infertilidad, ya que se estima que solo entre un 6 y 27% de los hombres con infertilidad presentan parámetros seminales dentro de los valores definidos como normales (normozoospermia) (10,11), por lo que resulta de gran importancia identificar marcadores moleculares que permitan establecer las causas de la infertilidad para así poder mejorar el diagnóstico actual y ofrecer tratamientos personalizados en cada caso.

En el área de la medicina reproductiva, existen pruebas complementarias al análisis de rutina del semen, entre las que se destaca el estudio de la fragmentación del ADN, y pruebas adicionales, como el cariotipo, la detección de microdeleciones ligadas al cromosoma Y, y el estudio de mutaciones en genes específicos asociados a patologías moleculares ya establecidas (12,13).

En las últimas décadas, el avance tecnológico en técnicas de biología molecular y su asequibilidad creciente ha permitido la identificación de potenciales biomarcadores a través de

abordajes de estudios globales o de las ómicas (genómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica). Las ómicas son disciplinas que estudian eventos e interacciones de entidades moleculares, estructuras celulares y procesos biológicos desde el ADN hasta su expresión y la función de las entidades resultantes. La genómica estudia el conjunto completo de genes de un individuo (14), mientras que la transcriptómica evalúa el contenido total de transcritos o ácidos ribonucleicos (ARNs), ofreciendo información sobre los perfiles de expresión en células o tejidos (15), y la proteómica el conjunto de las proteínas resultantes (16). Desde el área de la genómica y transcriptómica, el rápido desarrollo de tecnologías de alto rendimiento, caracterizadas por el análisis de una gran cantidad de muestras y datos mediante microarreglos de ADN y secuenciación de ADN y ARN, ha resultado en la caracterización exitosa de mutaciones a nivel genómico y del perfil de expresión a nivel de transcripto de varios organismos y tipos celulares. Este conocimiento llevó a un enriquecimiento en el entendimiento de varias patologías y sus bases moleculares. A estas disciplinas se han sumado otras ómicas, que analizan modificaciones epigenéticas y genéticas que regulan el transcriptoma y el proteoma, y más recientemente la glicómica, lipidómica, y metabolómica, entre otras. En conjunto, las ómicas permiten estudiar el comportamiento normal y las alteraciones fenotípicas a fin de evaluar a los sistemas biológicos desde un enfoque de la fisiología normal y anormal. Y a la aplicación del concepto de medicina personalizada, que hace referencia al abordaje personalizado del tratamiento de un paciente considerando un conjunto de datos que permiten predecir su respuesta a distintos tratamientos (17), y que comenzó a utilizarse a principios del siglo XXI luego de la publicación del “*Human Genome Project*” en el año 2003 (18).

Asimismo, las bases de datos originadas a partir de estos estudios resultan cada vez mayores, involucrando grandes tamaños muestrales para la obtención de resultados estadísticamente significativos. A su vez, estos estudios están contenidos en repositorios a gran escala destinados a la investigación clínica y translacional, que han crecido a nivel mundial en los últimos años y contienen información proveniente de estudios de análisis de expresión global, así como también información clínica de los pacientes involucrados en los mismos. El crecimiento constante de los repositorios de literatura hizo imperativo el uso de herramientas computacionales para identificar información relevante y ponerla en el contexto del conocimiento biomédico actual. Por este motivo, se han desarrollado numerosas herramientas, entre ellas DisGeNET (<https://www.disgenet.org/>), una plataforma que contiene información acerca de asociaciones entre genes y enfermedades humanas (19,20) y que ha sido ampliamente empleada en el estudio de las enfermedades y sus mecanismos moleculares subyacentes. Este crecimiento sostenido de la información biomédica fue acompañado de abordajes integradores tales como la bioinformática translacional, disciplina enfocada en la convergencia de bioinformática molecular, bioestadística, genética estadística e informática clínica, para transformar la información en conocimiento y así profundizar en los mecanismos subyacentes a las enfermedades y proveer información útil para la práctica clínica. Actualmente, la bioinformática se enfrenta a nuevos desafíos en la investigación translacional. La bioinformática translacional se ha propuesto y desarrollado como un nuevo campo en la investigación biomédica (21,22). El descubrimiento de conocimiento impulsado por el fenómeno de *big data*, definida como el conjunto de grandes cantidades de datos devenidos del uso de tecnologías de alto rendimiento, es el nuevo paradigma para la medicina translacional (23).

Específicamente en lo que concierne a la Salud Reproductiva Masculina, las ómicas se han comenzado a aplicar en años recientes, permitiendo estudiar de manera global y en mayor detalle los aspectos moleculares de la gameta masculina, así como describir los perfiles genómicos, transcripcionales y proteicos de pacientes para identificar biomarcadores de infertilidad y elegir estrategias compatibles con su diagnóstico. Finalmente, la integración de los datos recabados con las diversas ómicas en bases de datos de multi-ómicas, han permitido iniciar un acercamiento de la patología de la infertilidad masculina a la era de la medicina personalizada (24-26).

En el presente capítulo se reseñarán algunos avances en genómica, transcriptómica, proteómica, metabolómica, glicómica y lipidómica y algunas herramientas bioinformáticas asociadas al estudio de la salud reproductiva masculina (**Figura**).

Genómica

El potencial fértil masculino puede verse afectado por diversos factores, entre los que se destacan factores intrínsecos, como son la obstrucción del tracto genital masculino, fallas en la espermatogénesis o resistencia a hormonas, generalmente asociadas a alteraciones genéticas

(27,28) y factores extrínsecos como pueden ser la exposición a tóxicos, consumo de cigarrillo o alcohol, y condiciones medio-ambientales deletéreas (29,30).

Las alteraciones genéticas que podrían impactar sobre la fertilidad humana resultan, en algunos casos, de aberraciones estructurales o numéricas a nivel cromosomal, y mutaciones a nivel génico (31). Las pruebas genéticas más utilizadas incluyen el estudio del cariotipo para las detecciones de aberraciones numéricas o estructurales a nivel cromosómico y evaluación de la presencia de microdeleciones en el cromosoma Y (empleando PCR multiplex de marcadores de sitio etiquetados con secuencia mapeadas dentro de regiones específicas (32). Las alteraciones cromosómicas representan el 7% de las causas de fallas en la espermatogénesis (33). A modo de ejemplo, el síndrome de Klinefelter, determinado por un cariotipo 47 XXY, se caracteriza por la expresión de un fenotipo masculino eunucoide con azoospermia (34,35), y representa el 14% de los casos de azoospermia (36). Por otro lado, las microdeleciones del cromosoma Y se encuentran en el 10% de individuos con azoospermia obstructiva (OA) y en el 5% de individuos con oligozoospermia severa (37). Las microdeleciones frecuentes en la región del factor de azoospermia (AZF) del cromosoma Yq están asociadas con fallas en la espermatogénesis. Hay tres regiones distintas en AZF, AZFa, AZFb y AZFc, cada una de las cuales contiene varios genes para una variedad de funciones. AZFa se encuentra más proximal al centrómero, seguido de AZFb y, más distalmente, AZFc (38). Las deleciones graves de AZFa y AZFb no son transmisibles, mientras que los hombres con deleciones de AZFc comúnmente requerirán técnicas de reproducción médica asistida (TRMA).

El hallazgo de asociaciones entre la infertilidad y fenotipos asociados permite un mejor diagnóstico, manejo y tratamiento de las parejas en consulta por infertilidad. Asimismo, la identificación de estas alteraciones también permite determinar los riesgos a nivel hereditario por *screening* preconcepcional, y así optimizar las TRMA a emplear (39). Dado el amplio repertorio de entidades involucradas en el desarrollo del potencial fértil, resulta difícil la identificación de las causas genéticas de la infertilidad en la mayoría de los casos. Sin embargo, con las nuevas tecnologías para la secuenciación masiva de ADN y el acompañamiento por el desarrollo de abordajes bioinformáticos para su estudio, existe una creciente evidencia sobre distintos conjuntos de genes asociados a distintas causas genéticas de la infertilidad (40).

Uno de los desafíos presentes a la hora de discernir en qué conjunto de genes resulta óptimo el estudio de alteraciones genéticas asociadas a la infertilidad, es la distinción entre infertilidad sindrómica o no sindrómica. La infertilidad sindrómica se refiere a aquella devenida como una manifestación dentro de un conjunto de alteraciones inherentes a un síndrome particular (40), mientras que la no sindrómica se refiere al fenotipo de infertilidad sin otras manifestaciones clínicas relevantes (41). Dentro de la infertilidad sindrómica se destacan el hipopituitarismo, el síndrome endócrino caracterizado por la reducción o ausencia de una o más hormonas pituitarias, el hipogonadismo hipogonadotrófico, caracterizado por bajos niveles de las hormonas folículo estimulante (FSH) y luteinizante (LH), y la disquinesia ciliar primaria, asociada a la astenozoospermia (42).

Dentro de las alteraciones genómicas, se ha determinado que existen variantes estructurales con cambios en el número de copias ADN específico (CNV, del inglés *copy number variation*), y son las principales causas de variabilidad cuantitativa del genoma humano debida a la eliminación o duplicación de la secuencia original, sin ningún tipo de mutación. En este sentido, un estudio de análisis de perturbaciones espermatogénicas reveló que los CNV ligados al cromosoma X se asocian más con hombres infértiles que los controles (43). Así, la eliminación de CNV67 afecta a MAGEA9, un gen en el cromosoma X que se expresa específicamente en el testículo bajo condiciones fisiológicas (44). Sin embargo, es de destacar que además de los genes ligados al cromosoma X, se han identificado varios *loci* autosómicos que pueden afectar la fertilidad masculina como consecuencia de los CNV (45).

Además de los CNV, los polimorfismos genéticos de nucleótido simple (SNP, del inglés *single nucleotide polymorphism*) son variaciones genómicas en las que dos o más genotipos o alelos están presentes simultáneamente en una población. Los SNP son variaciones causadas por mutaciones en una sola posición en una secuencia de ADN. La mayoría de las variantes genéticas asociadas a la infertilidad masculina se encuentran en los cromosomas sexuales (46). También se han identificado otros polimorfismos autosómicos. Por ejemplo, los SNP en el gen que codifica para la enzima metileno-tetra-hidro-folato reductasa (*MTHFR*), un componente clave en el metabolismo del folato, contribuyen a un mayor riesgo de infertilidad masculina (47). Las alteraciones en el gen que codifica la enzima ADN polimerasa gamma (*POLG*), una enzima responsable de la replicación y reparación del ADN mitocondrial, también están asociadas a la

disfunción espermática; sin embargo, el papel de POLG en la infertilidad masculina sigue siendo cuestionado (48). Los SNP en los genes *MMR*, vía que juega un papel crítico en el mantenimiento de la integridad del genoma, recombinación meiótica y gametogénesis, reducen la función *MMR* y pueden conducir a mutaciones en otros genes. Específicamente la presencia de SNPs en los genes *MMR* (*MLH1*, *MSH2*, *PMS2*, *MLH3*, *MSH4*, *MSH5* y *MSH6*) se ha asociado a la infertilidad masculina (49).

Entre las alteraciones en el semen, la azoospermia o ausencia de espermatozoides en el eyaculado afecta al 1% de la población masculina y se corresponde con el 20% de los casos de infertilidad en el hombre (50). Su origen puede deberse a la obstrucción del tracto reproductor masculino (OA), o a fallas en la espermatogénesis (azoospermia no obstructiva, NOA). En la NOA, un estudio reciente ha identificado un conjunto de variantes de nucleótido simple en los genes: *ESX1*, *TEX13A*, *TEX14*, *DNAH1*, *FANCM*, *QRICH2*, *FSIP2*, *USP9Y*, *PMFBP1*, *MEI1*, *PIWIL1*, *WDR66*, *ZFX*, *KCND1*, *KIAA1210*, *DHRX*, *ZMYM3*, *FAM47C*, *FANCB*, *FAM50B* (genes previamente asociados a infertilidad), *TKTL1*, *IGSF1*, *ZFPM2*, *VCX3A* (variantes nóveles causales de enfermedades), y *ALG13*, *BEND2*, *BRWD3*, *DDX53*, *TAF4*, *FAM47B*, *FAM9B*, *FAM9C*, *MAGEB6*, *MAP3K15*, *RBMXL3*, *SSX3* y *FMR1N*, genes que podrían estar involucrados en la espermatogénesis (51). Por su parte, en la OA, la ausencia congénita de los conductos deferentes (CAVD, del inglés *congenital agenesis of vas deferens*) es una de las principales causas, y las mutaciones en los genes *CFTR* y *ADGRG2* causan la mayoría de las agenesias. A pesar de esto, el 10%-20% de los pacientes con CAVD permanecen sin un diagnóstico genético claro (52).

En los pacientes en los que se identifica la presencia de teratozoospermia, se destacan la macrozoospermia y la globozoospermia. La macrozoospermia tiene una incidencia menor al 1% en hombres con infertilidad, y se caracteriza por la presencia de espermatozoides con cabezas de gran tamaño y múltiples flagelos (53). Las causas principales de la macrozoospermia se asocian a mutaciones en el gen *AURKC*, cuya forma proteica se encuentra involucrada en la segregación de cromosomas y en la citoquinesis (54). Por otro lado, la globozoospermia se caracteriza por la presencia de espermatozoides con la cabeza redondeada y sin acrosoma, acompañados por defectos en la pieza media y alteraciones en la membrana nuclear (53). Este fenotipo se encuentra asociado a mutaciones en los genes *SPATA16* y *DPY19L2*. El primero codifica para una proteína específica del aparato de Golgi enriquecida en testículo, y el segundo para una proteína necesaria para la elongación de la cabeza del espermatozoide y la formación del acrosoma durante la espermatogénesis (42). Y estudios recientes han identificado nuevos genes relacionados a esta patología altamente compleja (55).

Con respecto a la astenozoospermia, su origen puede deberse a alteraciones en el axonema, mitocondria u otras estructuras del flagelo (56). Específicamente, se la ha asociado a mutaciones en los genes *DNAH1*, *CFAP43*, *CFAP44*, *SLC26A8*, *CATSPER1*, *SEPT12*, *CFAP43*, *CFAP44*, *DNAH1* y *PLCZ1* (42).

Contrastando con las patologías arriba mencionadas, en casos de infertilidad idiopática no existe un claro trasfondo genético que permita sospechar alteraciones genéticas puntuales, lo que dificulta su análisis por cariotipo o genes individuales. En este aspecto, la utilización reciente de la secuenciación de nueva generación (NGS; *next-generation sequencing*) representa una alternativa para mejorar y personalizar el diagnóstico de la infertilidad masculina mediante el análisis simultáneo de una gran cohorte de individuos y el *screening* de múltiples genes y variantes (39). Un estudio reciente de análisis de asociación genómica (*genome-wide association study*) delineó una región genómica polimórfica de *FSHB* como el principal determinante de los niveles de FSH en hombres con infertilidad idiopática. Dado el papel esencial de la FSH, la detección molecular de una de las variantes de nucleótido simple identificadas que causan la disminución de la FSH y, por lo tanto, disminuye la espermatogénesis, podría resolver el origen inexplicado por este factor etiológico (57).

Si bien todavía se carece de un consenso con respecto a los genes más representativos de cada fenotipo asociado a infertilidad, existen evidencias del aporte de paneles para asistir en el diagnóstico y terapéutica de la infertilidad. En este sentido, el avance en el diseño de paneles específicos se ha enfocado recientemente en genes involucrados en la etiología de distintas anomalías seminales, como son la azoospermia, teratozoospermia y astenozoospermia. El diseño de paneles específicos permite restringir el universo a explorar, al analizar las causas genéticas de la infertilidad en ciertas subpoblaciones. A diferencia de los estudios de microarreglos de ADN que proveen medidas promedio de la expresión de transcritos, la secuenciación de nueva generación permite la cuantificación a nivel de bases individuales. Si bien la NGS permite el estudio simultáneo de una gran cantidad de genes y muestras, su procesamiento, almacenamiento e

interpretación pueden resultar un desafío a la hora de encontrar nuevos potenciales biomarcadores. Esta capacidad trae aparejada la necesidad de visualizar estos resultados únicamente dentro de un marco genómico con herramientas específicas. Por lo tanto, se ha iniciado el desarrollo de plataformas que compilan la información recabada por los estudios genómicos y de otras ómicas, como es el repositorio *Male Infertility Knowledgebase* (MIK; <http://mik.bicnirrh.res.in/>) (58), que integra información sobre ~17 000 genes, sus vías asociadas, ontología génica, enfermedades y herramientas de análisis basadas en genes y secuencias y desarrollado para impulsar la investigación sobre la etiología genética de la infertilidad masculina. Además, incorpora información sobre aberraciones cromosómicas y asociaciones sindrómicas con la infertilidad masculina. Asimismo, *ReproGenomics Viewer* (RGV; <http://rgv.genouest.org>) (59), es un entorno de trabajo de especies múltiples y cruzadas para la visualización, extracción y comparación de conjuntos de datos ómicos publicados para la comunidad científica reproductiva. A partir de toda esta información compilada, el diseño y validación de paneles se podrá constituir en una herramienta fundamental para facilitar el acceso y el manejo de la información a nivel génico, adaptándose a la demanda para la terapéutica y adecuándose a las tecnologías que se aplican en otros campos de la medicina de precisión en infertilidad masculina.

Epigenómica

La epigenómica estudia los cambios epigenéticos en una célula, sin alterar la secuencia del ADN (60). La metilación del ADN y la modificación de histonas se encuentran entre los procesos epigenéticos mejor caracterizados (60). Asimismo, se ha involucrado a los ARN largos no codificantes (lncRNAs) y otros ARN no codificantes en la inducción de cambios epigenéticos (61). El mantenimiento epigenómico es un proceso continuo y juega un papel importante en la estabilidad de los genomas eucariotas al participar en mecanismos biológicos cruciales como la reparación del ADN (62).

La metilación del genoma es un proceso reversible y heredable, y se caracteriza por una modificación química covalente en los dinucleótidos de citosina-fosfato-guanina (CpG) que se encuentran en altas concentraciones cerca de los promotores de los genes. Las 'islas CpG' están ubicadas en diferentes regiones metiladas (DMR, del inglés *differentially methylated regions*) de genes, y su metilación difiere entre los alelos paternos y maternos, lo que influye en la transcripción de genes (63). La metilación ocurre durante el desarrollo embrionario y está implicada en numerosos procesos fisiológicos, como la impronta o "*imprinting*" genómica, la inactivación del cromosoma X y la expresión génica diferencial. Después de la fecundación, los alelos paternos se desmetilan activamente, mientras que el ADN materno sufre una desmetilación pasiva. Las primeras fases de la espermatogénesis se caracterizan por una reorganización que implica metilación del ADN, que se mantiene durante la meiosis y el posterior desarrollo de las gametas, afectando únicamente a genes específicos. Los llamados "genes impresos" escapan a la reprogramación epigenética después de la fecundación, lo que conduce al mantenimiento de la metilación del ADN de los espermatozoides en el embrión en desarrollo. La persistencia de patrones de línea germinal específicos de los padres podría justificar la participación epigenética en el riesgo potencial para la descendencia durante la TRMA (64).

Después de la meiosis, las células germinales experimentan varios reordenamientos de la cromatina, especialmente el reemplazo de histonas por protaminas, que son proteínas básicas pequeñas nucleares específicas del espermatozoide responsables de la condensación del genoma haploide (65). La relación entre las protaminas y el ADN da como resultado una remodelación estructural y molecular significativa del ADN espermático en las estructuras toroidales de nucleoprotamina. La interacción protamina-ADN no solo facilita la morfología normal y la forma hidrodinámica de la cabeza del espermatozoide, sino que también a la protección del ADN contra la oxidación y fragmentación (65,66). Dado que en los espermatozoides maduros el ADN está densamente empaquetado con protaminas y el genoma materno está densamente empaquetado con histonas, la estructura altamente condensada de la nucleoprotamina debe desempaquetarse y reorganizarse en una estructura nucleosomal durante la fecundación (67).

Es por esto que las modificaciones epigenéticas incorrectas durante cada etapa de estos procesos pueden conducir a la infertilidad masculina severa. Los estudios iniciales revelaron que la hipermetilación del ADN, especialmente en las regiones promotoras de los genes *PLAG1*, *PAX8*, *DIRAS3*, *MEST*, *SFN*, *NTF3* y *HRAS*, podían estar asociadas con una disminución en el conteo, la motilidad y la morfología normal de los espermatozoides (68). También se encontró que el gen *H19* estaba hipometilado en hombres con teratozoospermia y oligoastenoteratozoospermia (69). El gen

H19 es parte de un grupo de genes en el brazo corto (p) del cromosoma 11 que se somete al *imprinting* genómico, y también está involucrado en el crecimiento y desarrollo (70). Posteriormente, un estudio comparó la metilación CpG de los genes *LIT1*, *SNRPN*, *MEST*, *H19*, *PLAGL1*, *PEG3* e *IGF2* en espermatozoides de hombres fértiles e infértiles, e identificó una relación significativa entre la alteración de la espermatogénesis y la hipermetilación de los genes, excepto en el gen *IGF2* (71).

En un trabajo de recapitulación reciente, Rotondo y colaboradores (72) indicaron que las investigaciones publicadas respaldan la hipótesis de que la metilación del ADN espermático está asociada con alteraciones espermáticas que pueden afectar a varios parámetros del semen y se asocian a infertilidad. En el metanálisis de ensayos clínicos controlados que comparan hombres con infertilidad idiopática con controles fértiles, se incluyeron veinticuatro estudios. Como resultado, los niveles de metilación del gen *H19* resultaron significativamente más bajos en hombres infértiles. Por su parte, el nivel medio de metilación de los genes *MEST* y *SNRPN* fue significativamente mayor en hombres infértiles. Y los niveles de metilación del gen *LINE-1* no difirieron entre hombres infértiles y controles.

En cuanto a los ARNs no codificantes pequeños (sncRNA, del inglés *small non coding RNA*), trabajos recientes mostraron cambios dinámicos en los espermatozoides a medida que transitan a través del entorno testicular hacia los segmentos del epidídimo. Los estudios demostraron que los cambios están mediados por los epididimosomas durante el tránsito a través del conducto adluminal en el epidídimo, y los cambios en el contenido de sncRNA de los espermatozoides se derivan de agresiones ambientales que alteran significativamente el desarrollo embrionario temprano y predisponen a la descendencia a trastornos metabólicos (73). En la siguiente sección se mencionarán otros antecedentes sobre los ARN no codificantes (ncRNA).

Un conocimiento profundo del estado de metilación del ADN espermático en asociación con un potencial reproductivo reducido podría mejorar el desarrollo de nuevas herramientas de diagnóstico para esta enfermedad. Teniendo en cuenta el uso generalizado de las TRMA, la metilación del ADN de genes específicos implicados en la espermatogénesis adquiere una relevancia clínica cada vez mayor, lo que representa una posible explicación del aumento de la incidencia de síndromes relacionados con la impronta genómica en embarazos asistidos médicamente.

Transcriptómica

Como se mencionó previamente, la transcriptómica es el estudio del transcriptoma, término que incluye el conjunto de todas las moléculas de ácido ribonucleico (ARN) expresadas en una célula, tejido u organismo (74). Durante mucho tiempo, el dogma central de la biología molecular asumió que un gen se transcribía en un ARN mensajero (ARNm), que a su vez se traducía en una proteína que cumplía una o varias funciones estructurales, biológicas y/o reguladoras dentro de la célula. Sin embargo, ahora está claro que el transcriptoma es una maquinaria mucho más compleja, compuesta por varias clases de ARN que realizan una miríada de funciones. Es así como un gran porcentaje de los genes humanos contienen más de un exón empalmado de forma alternativa (75) y, por lo tanto, pueden producir numerosas formas de ARN y proteínas.

Según lo indican diferentes estudios, el testículo es el órgano que expresa mayor cantidad de genes y proteínas tejido-específico (76-78) y un mayor número de eventos de *splicing* alternativo en numerosos genes (79-82). Además, los genes expresados en la gonada masculina muestran una mayor tasa de divergencia entre especies tanto a nivel génico como proteico (83). Estas características se atribuyen a la selección sexual por medio de la cual se ejerce una presión de selección específica que permite que se den mutaciones que provean una ventaja reproductiva transmisible más fácilmente a la progenie, fijándose así relativamente más rápido (84). Para poder generar espermatozoides móviles capaces de fecundar, las células germinales del testículo llevan a cabo el proceso de espermatogénesis durante el cual deben realizar la meiosis y la espermiogénesis. Este es un proceso de diferenciación extremo que involucra factores moleculares específicos de funciones, muchos de ellos expresados durante la espermatogénesis (84).

Además, durante la evolución de las especies euterias, el cromosoma Y se acortó progresivamente, impidiendo el alineamiento entre los cromosomas X e Y en la profase I de la meiosis; por este motivo, para prevenir los alineamientos y recombinaciones defectuosas, los cromosomas sexuales se condensan en una estructura nuclear específica llamada cuerpo XY

(85,86) cuya alta condensación lleva al silenciamiento transcripcional completo durante esta etapa (87), en un proceso conocido como inactivación meiótica de los cromosomas sexuales. Para compensar el cese de transcripción de genes cruciales para las células, un gran número o de genes ligados al X se han transpuesto a cromosomas autosómicos durante la evolución, adquiriendo una expresión meiótica y post-meiotica específica (88,89). Por último, debido a la heterocigosis de los cromosomas sexuales en machos que permite que rasgos reproductivos ventajosos se fijen más rápidamente, los genes ligados al cromosoma X se encuentran sobreexpresados entre aquellos que se expresan preferencialmente en células somáticas testiculares espermatogonias y espermátides post-meióticas (90). Las especificaciones mencionadas respecto del programa de expresión de la célula germinal masculina hacen de este un ambiente rico para estudiar los mecanismos reguladores de la expresión génica a diferentes niveles, así como el descubrimiento de nuevos genes e isoformas proteicas (84).

El análisis global de los ARN mensajeros (ARNm) de los espermatozoides y del testículo ha permitido cuantificar la expresión de miles de genes expresados diferencialmente (DEG, del inglés *differentially expressed genes*) en una única muestra, y de esta manera avanzar hacia un mejor entendimiento de las bases moleculares del potencial fértil del hombre, así como la identificación de nuevos biomarcadores que se relacionen con la infertilidad masculina (91,92). En este sentido, una de las tecnologías más ampliamente utilizadas para el estudio de la transcriptómica son los microarreglos de ADN, tecnología a partir de la cual se han podido identificar alteraciones en los perfiles de transcripción de eyaculados de pacientes con anomalías en la calidad seminal. En estudios publicados en 2007, se determinó que los genes *RBM1*, *DAZ1*, *TSPY1* y *DDX3Y* se encontraban diferencialmente expresados en varones con oligozoospermia o azoospermia en comparación con controles de individuos normozoospermicos (93). Por su parte, Montjean y colaboradores (94) estudiaron el transcriptoma en espermatozoides de pacientes con oligozoospermia y lo compararon con el de individuos normozoospermicos; como resultado, identificaron 157 transcritos sobre/infraexpresados, y el 83 % de los genes regulados se encontraron al menos 2 veces infraexpresados en los pacientes infértiles. Asimismo, observaron una reducción de hasta 43 veces en la expresión de genes implicados en la espermatogénesis y motilidad de los espermatozoides, así como asociados a procesos antiapoptóticos de las células germinales (*PRM2*, *SPZ1*, *SPATA-4*, *MEA-1*, *CREM*).

Utilizando también la tecnología de microarreglos de ADN, Jodar y colaboradores (95) analizaron la expresión de transcritos en espermatozoides de pacientes astenozoospermicos y donantes fértiles. Como resultado, se identificaron varios transcritos presentes en diferente abundancia en los pacientes en comparación con los controles. Y validaron la expresión diferencial de tres de los transcritos detectados (*ANXA2*, *BRD2* y *OAZ3*), mediante PCR en tiempo real en un conjunto mayor de muestras, identificándose una correlación positiva entre la expresión de estos transcritos y la motilidad progresiva.

A fin de determinar si la expresión de genes testiculares sirve para definirlos como biomarcadores predictivos de la presencia de espermatogénesis en pacientes con NOA, Hashemi y colaboradores estudiaron la expresión del gen *ZMYND15* y los genes blanco *TNP1*, *PRM1* y *SPEM1* en biopsias testiculares de pacientes con NOA y en pacientes con OA. Los niveles de estos transcritos también se compararon en muestras de pacientes azoospermicos con recuperación de espermatozoides positiva y negativa. Como resultado, el nivel de expresión de los genes estudiados fue significativamente menor en las muestras testiculares de pacientes con NOA. De manera similar, los niveles de expresión de estos transcritos fueron menores en las muestras con recuperación espermática negativa frente a la positiva. Los autores concluyeron que el nivel de expresión de *ZMYND15* puede tener potencial para predecir una recuperación exitosa con una sensibilidad del 90 % y una especificidad del 60 % para la población total y una sensibilidad del 100 % y una especificidad del 75 % para NOA. En un estudio posterior del mismo grupo realizado sobre 63 hombres azoospermicos (16 OA y 47 NOA sometidos a microdissección de tejido testicular) se estudiaron siete marcadores moleculares *ESX1*, *DAZ*, *DAZL* (marcadores premeióticos) y *ZMYND15*, *PRM1*, *TNP1* y *SPEM1* (marcadores posmeióticos) para predecir el éxito de la recuperación de espermatozoides. Como resultado, se determinó que *SPEM1* fue el gen con el mejor poder positivo (96 %) y negativo (85 %) para predecir el resultado de microdissección de tejido testicular (96).

Los estudios globales del transcriptoma también han sido empleados en pacientes sometidos a diferentes TRMA, para comparar los perfiles de expresión de aquellos que obtuvieron un embarazo exitoso o no, y así poder trasladar los resultados a la clínica. En particular, se compararon los perfiles de transcripción de grupos de pacientes que realizaron una inseminación

intrauterina, y se encontraron diferencias de expresión entre aquellos que lograron el embarazo respecto de los que no lo lograron. Como resultado, en el grupo de los pacientes que lograron embarazo, se identificaron 756 genes con expresión aumentada y 741 con expresión exclusiva, mientras que solo 194 genes presentaron expresión aumentada en el grupo que no logró embarazo y 976 de expresión exclusiva. Dentro de los transcritos diferencialmente expresados, se identificó una expresión exclusiva del gen *BCL-2* (del inglés *B-cell lymphoma 2*) que se encuentra relacionado con la apoptosis, así como del gen codificante de la protocadherina 1 (*PCDH1*) y de integrina beta 4 (*ITGB4*), ambos relacionados con el reconocimiento e interacción célula-célula, en los pacientes donde la inseminación no fue exitosa (97). El mismo grupo reportó también las diferencias entre los perfiles de transcripción de grupos de pacientes que realizaron una inyección intracitoplasmática (ICSI), encontrándose 50 transcritos diferencialmente expresados en el semen fresco de los pacientes que lograron la ICSI exitosa, respecto de los que no, y más de 2000 transcritos expresados exclusivamente en uno de estos dos grupos. Para el caso del semen congelado, no se encontraron genes diferencialmente des-regulados entre los dos grupos, pero se encontraron cientos de genes exclusivos para uno de los dos grupos. Las diferencias observadas en todos los casos se atribuyen al fallo en la ICSI, ya que se encontraron diferencias en los transcriptomas de los espermatozoides de pacientes que lograron una ICSI exitosa cuando comparados con los que no lo lograron (98).

En años recientes, los estudios de expresión del ARN empleando NGS han ganado relevancia. Así, el estudio del transcriptoma de espermatozoides de 96 parejas diagnosticadas con infertilidad idiopática que realizaron diferentes tratamientos en la clínica, llevó a la identificación de 648 SRE (SRE, del inglés *sperm RNA elements*) que no presentaron variabilidad en 32 de las 35 parejas del estudio que lograron un embarazo con nacimiento vivo por coito programado (CP)/inseminación intrauterina (IIU). Las parejas que presentaron estos 648 SER presentaron una mayor tasa de éxito mediante CP/IIU (73%) que aquellas que tuvieron falta de alguno de estos SREs (27%). Además, 40% de los SRE identificados fueron encontrados en regiones exónicas de genes involucrados en espermatogénesis, motilidad espermática, fecundación y en los primeros estadios de la embriogénesis previo a la implantación. Y 8 de estos SRE se relacionaron con problemas de infertilidad, por lo cual los pacientes con falla de estos no lograrían un embarazo con CP/IIU, pero sí podrían tener éxito con TRMA. Por otra parte, algunos SRE ausentes en pacientes que no lograron un embarazo exitoso por reproducción asistida, podrían estar relacionados con la fecundación o embriogénesis temprana, por lo que estas técnicas no serían viables para conseguir el embarazo. De esta manera, los autores sugieren que la implementación de SRE en la clínica permitiría evitar los 2 a 4 ciclos que suelen hacerse de IIU antes de derivar a otros procedimientos en parejas que tienen bajas posibilidades de embarazo por falta de SRE, así como ayudar a la toma de decisiones de las parejas donde los SRE sugieren una baja chance de embarazo aún con procedimientos de reproducción asistida, evitando así exponer a la mujer a procedimientos invasivos con poca probabilidad de resultados exitosos (99). Estudios posteriores expandieron los anteriores y reportaron un conjunto de genes relacionados a la infertilidad idiopática: *ACE*, *GIGYF2* y *ODF2* presentaron correlaciones negativas, mientras que *GPX4*, *NDRG1* y *RPS24* tenían SRE ausentes en al menos un individuo de la cohorte de prueba. Asimismo, *GPX4* y *RPS24* fueron asociados con defectos de desarrollo y/o letalidad neonatal (100).

Como se mencionó previamente, además de los ARNm, una gran parte del transcriptoma está compuesto por ARN que no codifica para proteínas, conocidos como ncRNA. Estos ARN están involucrados en una amplia variedad de procesos biológicos, y los relacionados a la biología reproductiva no escapan a su regulación (101). Entre ellos se incluye su rol en la diferenciación/ desarrollo de los testículos (102) y la espermatogénesis (103). Los ncRNA largos (lncRNA, del inglés *long non coding RNA*), de más de 200 pb, están involucrados en muchos mecanismos, como la regulación transcripcional, postranscripcional y directa de la actividad proteica (104). Los sncRNA, de menos de 200 pb, entre ellos los micro ARN (miRNA), los ARN pequeños de interferencia (siRNA) y los *Piwi-interacting RNA* (piRNA), en su mayoría regulan la expresión génica a nivel transcripcional y/o postranscripcional (105,106).

Los ncRNA presentes en el semen podría evidenciar desregulaciones en la espermatogénesis, con el consecuente impacto en la calidad del semen y los trastornos de la fertilidad. Algunos estudios, de hecho, sugieren el potencial de los ncRNA como biomarcadores de enfermedades reproductivas o para el éxito de la reproducción (107). Un estudio de Cui y colaboradores (108) analizó un conjunto de miRNA espermáticos y demostró que el hsa-miR-34c-5p es el único ncRNA en semen que muestra un valor predictivo robusto para infertilidad idiopática masculina en hombres tratados con TRMA, asociándose en los resultados del tratamiento ICSI con calidad embrionaria, implantación, embarazo clínico, y nacido vivo. Por otro lado, Abu-Halima et al.

(109) usaron qRT-PCR para validar en una cohorte de 226 hombres en tratamiento por infertilidad un conjunto de 5 microRNAs (hsamiR-34b-5p, 34b-3p, 34c-5p, 122-5p y 429), e informaron que estos miARN muestran un buen valor de diagnóstico de oligozoospermia. Por su parte, Wang y colaboradores reportaron la potencia diagnóstica de hsa-miR-122-5p, 146-5p, 181a-5p, 34c-5p, 374b-5p, 509-5p y 513a-5p para azoospermia (110), el panel de 3-miARN hsa-miR-141, 429 y 7-1-3p para NOA (111), hsa-miR-122-5p, 146-5p, 181a-5p, 34c-5p, 374b-5p, 509-5p y 513a-5p para astenozoospermia (110) y hsa-miR-210-3p para diszoospermia inducida por varicocele (112).

Otras investigaciones analizaron el potencial de diagnóstico de los piRNA para la azoospermia y la astenozoospermia. En particular, el estudio de Hong y colaboradores (113) empleó tecnología de secuenciación de alto rendimiento en una cohorte de 302 hombres, e identificó un panel de 61 piRNA expresados diferencialmente entre donantes normozoospermicos y pacientes infértiles. Después de validación por qRT-PCR, demostraron la regulación hacia menores niveles de 5 piRNA individuales (piR-30198, 31068, 31925, 43771 y 43773) en plasma seminal de pacientes con azoospermia y astenozoospermia, en comparación con los hombres normozoospermicos. Los mismos investigadores también probaron el potencial de diagnóstico de estos piRNAs combinados en un panel de 5 piRNAs (piR-31068, 31925, 43771, 43773, y 30198) y otro de 4 piRNAs (piR-31068, 31925, 43771 y 43773), y encontraron un mayor valor diagnóstico para azoospermia en el panel de 5 piRNAs. Es más, estos investigadores informaron que piR-30198 puede discriminar entre pacientes con astenozoospermia y azoospermia, mientras que Barceló y colaboradores (114) reportaron al piR-58527 como un biomarcador útil para diferenciar NOA de OA. La aplicación potencial de estos ARN no codificantes como biomarcadores de semen no invasivos podrían minimizar o evitar la toma de muestras quirúrgicas para el diagnóstico y tratamiento, sin embargo, deben ser validados por otros grupos antes de su uso clínico.

Proteómica

La proteómica es la disciplina de los estudios globales que estudia los proteomas, o conjuntos de proteínas de tejidos, células y fluidos, para determinar su composición, su estructura primaria (secuencia de aminoácidos), y en ciertos casos sus modificaciones postraduccionales, su localización de forma cualitativa y cuantitativa (115). Si bien la mayoría de los protocolos de análisis empleando microarreglos de ADN o NGS utilizados para abordar estudios de transcriptómica involucran la selección de los ARNm poliadenilados por medio de oligo-dTs, debe tenerse en cuenta que no es correcto asumir que la abundancia de los ARNm se corresponde bien con la de las proteínas, ya que el destino de los ARNm se encuentra regulado por modificaciones, procesamientos, almacenamientos, entre otros. Por lo tanto, si se extrapolaran los cambios de la expresión génica a los de la expresión proteica, podría interpretarse incorrectamente el impacto funcional de estos datos (116). Es por ello que, a pesar de conocer los perfiles de transcriptómica de las personas sanas y pacientes afectados con diversas enfermedades, se ha demostrado que el estudio de los perfiles de proteómica aporta información valiosa y distintiva. En particular, la transcripción y la traducción en el testículo no se encuentran acopladas, por lo que estos dos procesos no están necesariamente relacionados. Por su parte, el espermatozoide es una célula altamente compleja pero de fácil accesibilidad, por lo que los estudios de proteómica pueden hacerse a fin de caracterizar la composición proteica de la gameta masculina y sus alteraciones en asociación con diversas patologías (117). Según el trabajo de Assidi y colaboradores (118), la proteómica de los espermatozoides maduros generalmente revela dos tipos de proteínas: (a) las proteínas de origen extracelular, principalmente de glándulas sexuales accesorias, adsorbida en la superficie de la gameta, entre ellas seminogelina-1 y antígeno prostático específico (PSA), y (b) las proteínas celulares divididas en fracciones solubles e insolubles en detergente. La fracción soluble en detergente comprende proteínas en el citoplasma, moléculas de señalización y receptores de membrana, mientras que la fracción insoluble en detergente comprende principalmente proteínas del citoesqueleto y de asociación a cromatina nuclear. Hasta un 11% de las proteínas espermáticas participan en la defensa celular contra el estrés oxidativo y la apoptosis.

El análisis de proteómica se ha aplicado al estudio de pacientes con alteraciones en el semen. En estudios realizados en muestras de semen de pacientes con astenozoospermia se identificó una expresión diferencial de proteínas; en el estudio de Wang y col (119) se identificaron 45 proteínas sobreexpresadas y 56 infraexpresadas en comparación con el control, identificándose entre las infraexpresadas a PARK7 (anteriormente DJ-1). En otro estudio sobre pacientes con astenozoospermia, se identificaron 66 fosfoproteínas diferencialmente reguladas. Las proteínas más desreguladas pertenecieron principalmente a las HSPs (del inglés *heat shock protein*, o

proteínas de choque térmico), proteínas del citoesqueleto, de la vaina fibrosa y del metabolismo energético. Además, por microscopia electrónica se observaron defectos en las mitocondrias y vainas fibrosas de los espermatozoides, que los autores sugieren que podrían estar relacionados con las alteraciones observadas en el proteoma. Más aún, el análisis de las vías de señalización reveló que el metabolismo energético de carbohidratos, la señalización de AMPc mediada por PKA, la señalización de PI3K/AKT y la vía de señalización regulada por actina basada en la motilidad por Rho estuvieron significativamente alteradas, indicando que la motilidad espermática estaría regulada por estas vías. De esta manera, con el uso de tecnologías de proteómica, los autores identificaron moléculas de firma o "*signature*" de la astenozoospermia (120). Otro estudio comparó los perfiles proteómicos de las colas de espermatozoides de 35 pacientes astenozoospermicos y 33 normozoospermicos con el uso de cromatografía líquida en combinación con espectrometría de masas (LC-MS/MS). Como resultado, se identificaron 14 proteínas con abundancia alterada al compararlas con las de los controles. De estas, 10 ya habían sido previamente relacionadas con la astenozoospermia (GAPDS, COX6B, ODF2, AKAP4, PHGPx, CLU, GST Mu3, KRT1, VDAC2 y HSPA2), pero las 4 proteínas restantes (HSPA9, TUBB2B, SPANX B y ASRGL1) se asociaron con esta condición por primera vez en este estudio (121).

Teniendo en cuenta el impacto que tiene la obesidad sobre la calidad seminal, en otro estudio se compararon los perfiles de proteómica de 3 pacientes con astenozoospermia y obesidad y 3 pacientes fértiles empleando LC-MS/MS. Se cuantificaron en total 1975 proteínas de las cuales 127 presentaron cambios en su abundancia estadísticamente significativos (105 disminuidas y 22 aumentadas en los pacientes con obesidad). Las proteínas con baja abundancia en la astenozoospermia asociada a obesidad se pueden separar en diferentes grupos (proteínas del citoesqueleto, proteínas vesiculares, proteínas del proteasoma) todas ellas relacionadas con la espermatogénesis cuyos cambios podrían causar un funcionamiento anormal del espermatozoide. Dentro de las proteínas con abundancia afectada se encontró a ERp57, una proteína multifunción bien caracterizada cuya función principal es mediar el correcto plegamiento y control de calidad de glicoproteínas recién sintetizadas en el retículo endoplasmático. Por otra parte, se encontró disminuida a la proteína ACTRT2 en el grupo en estudio, proteína del citoesqueleto se localiza en la región post-acrosomal y en la pieza media, por lo que su deficiencia podría causar anomalías en el citoesqueleto, especialmente en la pieza media donde se encuentra la vaina mitocondrial que provee de energía para la motilidad espermática (122).

Otros estudios han identificado varias proteínas que se correlacionan con la integridad del ADN del espermatozoide y pueden servir como marcadores para discriminar OA de NOA (123,124).

Dado que el varicocele es la causa más común de infertilidad masculina, resulta de interés caracterizar, a través de estudios de proteómica, las alteraciones en los perfiles proteicos de pacientes con esta patología. En el estudio de Hossenif y colaboradores (125), se compararon los perfiles proteómicos de 20 pacientes oligozoospermicos con varicocele con los de 20 donantes control normozoospermicos empleando la electroforesis en gel de dos dimensiones. Como resultado, se encontraron 15 "*spots*" con diferencias consistentes entre los grupos estudiados. En el grupo de individuos con varicocele, uno fue exclusivo de este grupo, 12 presentaron su abundancia disminuida y 2 aumentada. Los 15 "*spots*" correspondieron a 10 proteínas de "*shock*" térmico, mitocondriales y del citoesqueleto (ACPP, CLU, PARK7, KLK3, PIP, SOD1, SEMG2, SEMG2re, ATP5D, HSPA5). Más adelante, el mismo grupo demostró que en 20 pacientes a los que se les realizó una varicocelectomía, las abundancias de 3 de las proteínas identificadas (HSPA5, SOD1, ATP5D) relacionadas con producción espermática, protección de la integridad del ADN y motilidad espermática, difirió antes y luego de la cirugía, siendo estas comparables con las de pacientes control sanos luego de la cirugía (126). En un estudio posterior, Agarwal y colaboradores (127) compararon los perfiles proteicos de muestras de espermatozoides de 5 hombres infértiles con varicocele unilateral con los de 5 hombres fértiles control. Como resultado, se identificaron 369 proteínas diferencialmente expresadas entre ambos grupos. De estas, 29 se identificaron como proteínas de interés por su rol en espermatogénesis y otros eventos reproductivos fundamentales como la maduración espermática, la adquisición de motilidad, la hiperactivación, la capacitación, la reacción acrosomal y la fecundación. Las anotaciones funcionales de este estudio mostraron evidencias de que el varicocele unilateral afecta principalmente a la bioquímica de pequeñas moléculas y a las modificaciones post-traduccionales de las proteínas.

En relación a los cambios en la expresión de proteínas y el varicocele en adolescentes, un estudio reportó los resultados de proteómica empleando electroforesis en dos dimensiones y

espectrometría de masas del plasma seminal de tres grupos de adolescentes de entre 10 y 19 años en un estadio de Tanner V, distribuidos en 3 grupos: 21 adolescentes sin varicocele y parámetros seminales normales (control), 28 adolescentes con varicocele grado II o III con parámetros seminales normales (VNS) y 18 adolescentes con varicocele y parámetros seminales anormales (VAS). Como resultado, del total de “spots” identificados en la electroforesis, 47 fueron caracterizados, identificándose proteínas relacionadas con la espermatogénesis, la motilidad y la capacitación, la inmunidad, la apoptosis, el transporte de moléculas, y la inflamación. En particular, se identificaron en el grupo VAS a las proteínas IBP-3 y SMG1 exclusivamente expresadas, que se relacionan con la regulación de la apoptosis, en los VNS a BRE1B y E3-beta, que mantienen la espermatogénesis y función espermática durante hipertermia e hipoxia tisular y en el grupo control a NPC2, IDH y la proteína linfocitaria restringida a membrana, cuya presencia podría asociarse con la homeostasis y el mantenimiento de la función espermática en un ambiente inocuo. De esta manera, se identificaron proteínas reguladoras de la apoptosis sobreexpresadas en los pacientes con varicocele y semen anormal, mientras que las proteínas relacionadas con espermatogénesis se vieron sobreexpresadas en el grupo con varicocele y parámetros seminales normales respecto del control que expresó proteínas relacionadas a la homeostasis. Por este motivo, los autores proponen la utilización de algunas de las proteínas identificadas para un diagnóstico más temprano del varicocele, incluso ante ausencia de cambios en el análisis seminal (128).

También se ha utilizado la proteómica para evaluar las diferencias de perfiles entre hombres que logran el embarazo o no, luego de TRMA. Se ha presentado un caso de estudio donde se observaron diferencias entre los perfiles obtenidos con electroforesis en dos dimensiones de un paciente que falló en el tratamiento de FIV y 3 pacientes fértiles control, estudio en el que se identificaron proteínas correspondientes a 20 “spots” diferenciales entre el paciente y los controles (6 faltantes, 3 adicionales, 4 menos abundantes y 7 más abundantes). Dentro de las proteínas identificadas, se destacó a la proteína secretora de unión a actina cuyo incremento podría causar una mayor interacción con las células T, una interacción con proteínas claves del citoesqueleto o afectar a la unión con la *Zona Pellucida* produciendo fallas en la fertilidad. Otra proteína alterada fue la proteína de la fibra densa externa 2 (ODF2) que se localiza en las estructuras del citoesqueleto de la cola rodeando el axonema en la pieza media y principal del flagelo; la alteración en esta proteína podría resultar en espermatozoides morfológicamente anormales (129). Unos años más tarde, se compararon los perfiles proteómicos de 3 pacientes normozoospermicos según los criterios de la OMS o pacientes con parámetros espermáticos anormales pero compatibles con FIV que fracasaron en el primer ciclo de esta técnica (es decir, que no tuvieron unión de espermatozoides a la *Zona Pellucida* o hubo deficiencia en la misma), y 3 pacientes control con espermatozoides normales que lograron fecundar previamente al ovocito durante una FIV que se recomendó debido a factores tubáricos en la mujer. Se observaron 14 proteínas diferencialmente expresadas entre el grupo en estudio y el control, de las cuales 12 fueron identificadas por espectrometría de masas. Entre ellas, se identificó a la proteína ribosomal p40 involucrada en la adhesión celular, así como la L-xilulosa reductasa o p34H que ya se había demostrado que se presenta en tasas anormalmente bajas en pacientes que fallan en la FIV. De esta manera, a pesar de que los pacientes del estudio pudieron superar los problemas presentados en la FIV realizando ICSI, se lograron identificar proteínas que podrían comprometer el éxito de la FIV y pueden asociarse a fallos en esta técnica (130). Más recientemente, por medio de espectrometría de masas con marcación en *tandem* se obtuvieron los perfiles proteómicos de 6 donantes involucrados en TRMA (ya sea FIV o inseminación artificial, IA) resultando en 5 embarazos clínicos en menos de 8 ciclos de FIV o IA, y 6 donantes cuyos espermatozoides no lograron un embarazo clínico en más de 15 ciclos de FIV y IA. Se identificaron 21 proteínas diferencialmente expresadas en los donantes que no alcanzaron un embarazo clínico respecto de los que sí, y de éstas, 5 fueron validadas (A2LD1, CRISP2, ATP1B3, PGRMC1 y FBXO2). Las proteínas A2LD1, ATP1B3 y FBXO2 mostraron el mismo patrón diferencial observado en el análisis de espectrometría de masas mientras que la discordancia observada para CRISP2 y PGRMC1 sugiere que otros homólogos de las familias de estas proteínas podrían estar teniendo un rol importante (131). En otros estudios, la clusterina, la proteína secretora E1 del epidídimo y el PSA se han propuestos como biomarcadores seminales para el éxito de la FIV en parejas infértiles (132) y se correlacionó con la calidad, la motilidad y la viabilidad espermática (133).

Un estudio reciente recopiló un total de 17 estudios de proteómica que reportaron un total de 32 biomarcadores de proteínas del semen para predecir diferentes parámetros la calidad espermática, así como su funcionalidad y/o su capacidad fecundante, algunos de los que resultan de estudios de proteómica (134). Algunos candidatos a biomarcadores mostraron un alto valor de diagnóstico para trastornos como azoospermia, astenozoospermia y oligozoospermia, así como

por alteraciones de la fisiología espermática, tales como la actividad mitocondrial, la estabilidad del acrosoma y el ADN integridad, siendo así prometedores biomarcadores candidatos para la clínica diagnóstico de trastornos de la reproducción masculina. En particular, el trabajo reseña el estudio de Intasqui y col. (135), que realizó un análisis proteómico utilizando una cohorte de 156 hombres normozoospermicos y reveló algunas proteínas del plasma seminal capaces de identificar espermatozoides de baja actividad mitocondrial (proteómica perfil de Anexina A7 y CD63; AUC=0,993), integridad del acrosoma alterado (perfil proteómico de PLTP y COL12A1; AUC=0,972) y alta fragmentación del ADN (CRISPLD1; AUC=0,882). Otras proteínas espermáticas y de plasma seminal identificadas pueden predecir el potencial fértil del eyaculado. Así, la concentración espermática de BAG6 y HIST1H2BA (136), fue capaz de discriminar entre hombres fértiles y subfértiles/infértiles que muestran un análisis de semen anormal, con AUC de 0,921 y 0,935 respectivamente.

Los trabajos mencionados resaltan la utilidad de la proteómica como herramienta no sólo para la identificación de nuevos biomarcadores, sino también para la mejor comprensión a nivel molecular de la infertilidad. Más aún, el conocimiento de las diferencias entre los perfiles proteómicos de pacientes permitiría, en un futuro, podrá brindar un mejor diagnóstico de la infertilidad y elegir TRMA que tengan una mayor probabilidad de éxito según cada paciente, contribuyendo así a la medicina personalizada.

Metabolómica y otras ómicas

La metabolómica se define como el estudio de las células, tejidos o fluidos biológicos a través de sus metabolitos, siendo estos el producto final de los procesos celulares. De esta manera, la secuencia de metabolitos creados por una organización biológica comprende el metaboloma de la misma (137). Se considera que los metabolitos se encuentran en la última etapa de la jerarquía metabólica de la célula, y son los productos finales de la actividad celular, de los procesos reguladores y de los sistemas biológicos siguiendo cambios ambientales y genéticos, se encuentran más cercanos a replicar el estado fenotípico exacto de la célula que el transcriptoma y el proteoma (138).

Al igual que en otros sistemas, hay publicaciones que revelan que la metabolómica puede aplicarse al estudio de la salud reproductiva en el hombre. Uno de los primeros estudios que se realizaron en el plasma seminal utilizó la resonancia magnética nuclear (RMN)¹H para analizar la metabolómica de 14 pacientes con OA (vasectomizados) y 7 con oligoastenozoospermia severa y comparar los resultados con los correspondientes a 18 donantes normozoospermicos (control). Como resultado de la medición del área de los picos de los espectros de diferentes metabolitos, se observó que los correspondientes a glicerilfosforilcolina (GPC), citrato y lactato eran mayores en pacientes normozoospermicos cuando comparados con los de los pacientes azoospermicos o con oligoastenozoospermia. Además, se determinaron diferencias significativas entre los cocientes de los picos citrato:lactato y GPC:lactato en los tres grupos respecto del control, pero no en el cociente GPC:citrato. También se encontraron diferencias significativas en el cociente GPE:GPC (siendo GPE la gliceril fosforiletanolamina) entre hombres con fallas en la espermatogénesis y aquellos que presentaron azoospermia (vasectomizados). De esta manera los autores sugirieron que la combinación de métodos bioquímicos y de resonancia magnética nuclear en el plasma seminal podrían aportar a la determinación de las bases moleculares de patologías (139).

Años más tarde, se utilizó también la RMN para analizar los metabolitos del plasma seminal de 103 pacientes: 6 control, 17 con infertilidad idiopática, 20 con oligozoospermia, 20 con astenozoospermia, 20 con teratozoospermia y 20 con azoospermia. Como resultado del estudio, se encontraron diferencias entre los perfiles de los pacientes infértiles respecto del grupo control, destacándose en el estudio las diferencias entre los pacientes con infertilidad idiopática, resultados que revelan el impacto metabólico asociado a la infertilidad idiopática (140).

En otro estudio, se analizaron por RMN los perfiles metabolómicos del plasma seminal de 33 pacientes astenozoospermicos, y los resultados se compararon con los de 30 controles sanos, encontrándose 19 metabolitos alterados en los casos patológicos. Entre ellos, se observó un aumento o disminución de varios aminoácidos, cambios en el metabolismo de lípidos, de fosfolípidos (en particular, la colina), del colesterol, de los nucleósidos, de la energía y del ciclo de

Krebs en los pacientes con astenozoospermia. Según los autores, este análisis permitió describir las características metabólicas de la astenozoospermia desde un punto de vista integral, poniendo en evidencia las limitaciones de los análisis seminales de rutinas y destacando la importancia de la metabolómica para un mejor entendimiento de los mecanismos fisiopatológicos y eventualmente un mejor diagnóstico y tratamiento de la astenozoospermia (141).

También se ha utilizado otro enfoque para el estudio de la metabolómica de pacientes con astenozoospermia. Específicamente, se utilizó la espectroscopía de Raman, que se caracteriza por su bajo costo, así como por ser una metodología rápida y precisa sin ser sensible al agua como otras alternativas tales como la espectroscopia de infrarrojo cercano. Más aún, esta técnica permite una fácil preparación de las muestras y análisis del plasma seminal. Como resultado del análisis de los perfiles metabólicos de 13 pacientes normozoospermicos y 13 astenozoospermicos, se encontró 83% de predicciones correctas, por lo que esta tecnología puede identificar cambios significativos en el metaboloma del plasma seminal de pacientes astenozoospermicos respecto de los normozoospermicos (142). Además, el mismo grupo utilizó más adelante esta tecnología para evaluar el perfil metabólico del plasma seminal y predecir la espermatogénesis en pacientes con NOA a ser tratados con TRMA (143). El estudio comparó un grupo de 10 pacientes, de los cuales se logró una extracción de espermatozoides testiculares (TESE) positiva, 10 que fueron TESE negativos y un grupo de 15 donantes control. Como resultado del análisis, se lograron distinguir los pacientes TESE negativos de los positivos, presentando estos últimos una superposición con los perfiles del grupo control fértil.

Asimismo, posteriormente un estudio reveló niveles reducidos de metabolitos en plasma seminal, incluidos aminoácidos, lactato, citrato, creatinina, ácido alfa-cetoglutarico, espermina y putrescina, alteraciones que permitieron distinguir pacientes con oligoastenoteratozoospermia de controles normozoospermicos (144). Y en otro estudio, se identificaron 63 metabolitos, los que podrían constituirse en biomarcadores potenciales de la infertilidad masculina, pues 17 fueron correlacionados con los parámetros seminales (145).

En un estudio reciente, se analizó el perfil metabólico en pacientes afeos conjuntamente con los parámetros de rutina del semen y el índice de fragmentación del ADN. Como resultado, los autores identificaron que la edad masculina se correlacionó positivamente con concentración espermática, así como el índice de fragmentación de ADN, y negativamente con conteo progresivo de espermatozoides móviles, conteo total de espermatozoides, volumen de espermatozoides y motilidad progresiva de los espermatozoides. Los metabolitos diferenciales fueron significativamente enriquecidos en varias vías metabólicas, y cuatro de estos metabolitos diferenciales (pipamperona, 2,2-bis(hidroximetil)-2,2',2''-nitrilotrietanol, Arg-Pro y fosfato de trietilo) se utilizaron para establecer un panel de biomarcadores para identificar el envejecimiento del semen (146).

La metabolómica también se ha aplicado en el estudio del varicocele, donde se buscaron potenciales biomarcadores metabólicos para distinguir pacientes infértiles con varicocele de los pacientes fértiles sin varicocele. Para ello se estudió el perfil metabólico de un grupo de 35 hombres con varicocele y 24 donantes control por RMN en el plasma seminal. Al segregar los grupos se identificaron 19 metabolitos: caprato, 2-hidroxi-3-metilvalerato, leucina, valina, 3-hidroxibuirato, lactato, alanina, 4-aminobutirato, isoleucina, citrato, metanol, glucosa, glicósidos, glicerol-3-fosfocolina, n-acetil tirosina, glutamina, tirosina, arginina y uridina. De estos metabolitos, la mayoría se encuentran involucrados en el estrés oxidativo causado por el varicocele y su respuesta, por lo que se resalta la importancia de estos mecanismos en la patogénesis del varicocele (147).

Finalmente, es posible estudiar la fertilidad masculina no solo a través del metaboloma del plasma seminal, sino que también puede tenerse en cuenta el metaboloma urinario. Al comparar los perfiles obtenidos por cromatografía líquida y espectrometría de masas de 158 donantes fértiles y 135 pacientes oligozoospermicos infértiles, se identificaron 10 marcadores potenciales para la oligozoospermia. Entre ellos se observó la acilcarnitina, el ácido aspártico y la leucilprolina disminuidas, así como la adenina y metilxantina aumentadas (148). Otra alternativa, es el estudio del metaboloma sanguíneo, ya que se han comparado los perfiles obtenidos por cromatografía gaseosa y espectrometría de masa de 70 pacientes infértiles, de los cuales 26 presentaron disfunción eréctil y 44 anomalías seminales (oligozoospermia) y 61 pacientes control a fin de identificar potenciales marcadores. Entre ellos, el 1,5 anhidrosorbitol y el ácido α -hidroxi isovalérico permitirían distinguir a los pacientes sanos de los infértiles, mientras que el lactato, glutamato y colesterol a aquellos con disfunción eréctil de los que presentan anomalías en el semen (149).

Además de la metabolómica, debe destacarse el aporte de otros estudios globales, como la glicómica (estudio integral de azúcares libres o presentes en moléculas más complejas de un organismo), y la lipidómica (estudio a gran escala de vías y redes de lípidos celulares en sistemas biológicos), tecnologías de análisis con gran potencial para caracterizar procesos celulares e identificar biomarcadores de diagnóstico. En este sentido, se ha sugerido que el perfil de glicómica del plasma seminal puede estar asociado con el potencial reproductivo masculino (150). Asimismo, se han informado niveles elevados de ácido araquidónico y otros ácidos grasos en espermatozoides de pacientes con astenozoospermia (151). Para evaluar la relación entre los lípidos y el impacto en los resultados de ICSI, se analizaron los perfiles lipídicos mediante cromatografía líquida de ultra alta resolución acoplada a espectrometría de masas de muestras de espermatozoides utilizadas en ciclos de ICSI que dieron lugar a un embarazo con aquellas que no lo condujeron. Como resultado, se detectaron 151 lípidos diferentes en las muestras, 10 de los cuales aumentaron significativamente en las muestras del grupo que no dio embarazado, con un cambio de 1,10 a 1,30 veces. Estos lípidos fueron principalmente ceramidas, esfingomielinas y glicerofosfolípidos, una lisofosfatidilcolina y dos especies de plasmalógenos. Además, también se encontraron niveles más altos de 2-monoacilglicerofosfocolina en el grupo de las fallas de embarazo (152). Dado que los lípidos componen la mayor parte de la membrana plasmática de los espermatozoides, los estudios son de gran interés y abren las puertas a una caracterización de la composición lipídica del espermatozoide normal y a la identificación de nuevos biomarcadores.

Multiómicas

Mientras que las ómicas simples pueden reflejar principalmente un aspecto del sistema biológico, las multiómicas permiten la comprensión sistemática del flujo de información a través de diferentes capas ómicas. Los análisis multiómicos que aprovechan estas tecnologías de genómica, transcriptómica, epigenómica, proteómica, metabolómica y otras áreas ómicas, se consideran la clave para el avance de la medicina de precisión en la clínica. Las tecnologías ómicas de alto rendimiento permiten la recuperación de información biológica integral y holística, mientras que las capacidades computacionales permiten el modelado de datos de alta dimensión. Además, la bioinformática ha permitido la integración integral de datos clínicos y multiómicos para una interpretación perspicaz. El avance de las tecnologías de secuenciación global y de una sola célula, así como los métodos computacionales relacionados para la multiómica, han facilitado el desarrollo de la biología de sistemas y la medicina de precisión en numerosos órganos y en diversas patologías. Este abordaje innovador de la medicina tiene como objetivo proporcionar un diagnóstico y tratamiento eficaz e individualizado a través de un enfoque integral basado en datos obtenidos a partir de técnicas ómicas así como otros estudios de imágenes e historia clínica del paciente.

Los avances recientes en las tecnologías multiómicas han dado lugar a esfuerzos sin precedentes, al caracterizar cambios moleculares que subyacen en el desarrollo y la progresión de una amplia gama de enfermedades humanas complejas, incluyendo el cáncer, las infecciones y las enfermedades relacionadas con la edad (153). Específicamente, en lo que concierne a la salud reproductiva masculina, los avances en la secuenciación completa del genoma y amplificación del transcriptoma completo han acelerado la secuenciación de cantidades diminutas de ADN y ARN de una sola célula y han proporcionado un alcance más representativo de la naturaleza de heterogeneidad genómica y transcriptómica que ocurre tanto en pacientes normales como enfermos (154,155).

La identificación de biomarcadores moleculares fiables en el semen podría ayudar en el diagnóstico y tratamiento de afecciones causando trastornos en la calidad del semen y la fertilidad masculina. En este sentido, explorando biomarcadores de semen que muestran alto diagnóstico valor es de gran interés para determinar su potencial para convertirse en herramientas clínicas para el diagnóstico de disfunciones en la calidad del esperma y predecir la fertilidad masculina y el éxito de ART. La combinación de biomarcadores independientes para llegar a una biología de sistemas en el campo de la andrología está actualmente en su infancia.

Abordar la compleja etiología de la infertilidad masculina requiere un enfoque integral que combine todos los aspectos relevantes para lograr medicina de precisión para la infertilidad masculina, que incluya el análisis seminal, la cirugía robótica, la terapia celular, las TRMA, las tecnologías de análisis multiómico presentadas en este capítulo, y las pruebas/imágenes de células individuales. Además del valor agregado de las tecnologías de “*big data*” y visualización digital, se necesita enfatizar que la teranóstica de la infertilidad masculina también debe integrar el

análisis del estilo de vida individual, y los factores ambientales como determinantes clave que complementan los esfuerzos clínicos. Los factores ambientales pueden afectar los perfiles hormonales, la diferenciación de las células testiculares, la maduración de los espermatozoides, y transporte en el epidídimo. Los hábitos alimentarios también determinan la composición de la microbiota intestinal, que ofrece opciones preventivas y terapéuticas directas e indirectas adicionales, aunque el papel de la microbiota, tanto intestinal como urinaria y genital aún debe ser caracterizado.

Hasta el momento, se han publicado numerosos estudios enfocados a la comprensión de la infertilidad masculina donde se implementan las diferentes ómicas de manera individual. Sin embargo, se ha demostrado que la combinación de dos ómicas diferentes, pero biológicamente relacionadas entre sí, es un abordaje integral para estudiar la infertilidad masculina multifactorial (156). Este tipo de enfoques integrativos tienen un gran potencial para el entendimiento de las bases moleculares asociadas a la fertilidad, ya que las condiciones clínicas y fisiológicas de una célula son el resultado de la interacción entre diferentes componentes individuales del sistema biológico que pueden verse reflejados en las diferentes ómicas. Por otra parte, una única anotación no refleja de forma precisa la función de un gen y más aún, se puede obtener información a partir de falsos positivos, por estos motivos la investigación a partir de datos obtenidos por ómicas independientes no descifra de manera fiable la información como lo hacen las diferencias moleculares que se encuentran al estudiar múltiples módulos de ómicas.

El enfoque ómico integrado se ha utilizado para definir la microtubuloma de espermatozoide humano, combinando proteómica, transcriptómica e interactómica y los resultados de este análisis sugieren que CUL3 y CDC2C juegan un papel en el funcionamiento del flagelo del espermatozoide (157). Las tecnologías multiómicas también se están aplicando en modelos animales. En este contexto, Talluri et al (158) realizaron un extenso estudio multiómico integrado sobre la fertilidad del toro, identificando la desregulación de 4 766 ARNm, 785 proteínas y 33 metabolitos entre toros de alta y baja fertilidad.

Actualmente existen relativamente pocos estudios integrados ómicos sobre la infertilidad masculina, a pesar de sus prometedoras aplicaciones. Un enfoque multiómico para comprender los fenotipos de infertilidad puede generar una visión más holística de la enfermedad y contribuir al desarrollo de mejores métodos de detección y opciones de tratamiento. Por lo tanto, además de descubrir causas genéticas de infertilidad aún desconocidas, la integración de múltiples campos de estudio podría generar contribuciones valiosas para comprender el desarrollo de la enfermedad. Estudios futuros multiómicos permitirán integrar información fragmentada y facilitar el descubrimiento de biomarcadores y tratamientos en la infertilidad masculina.

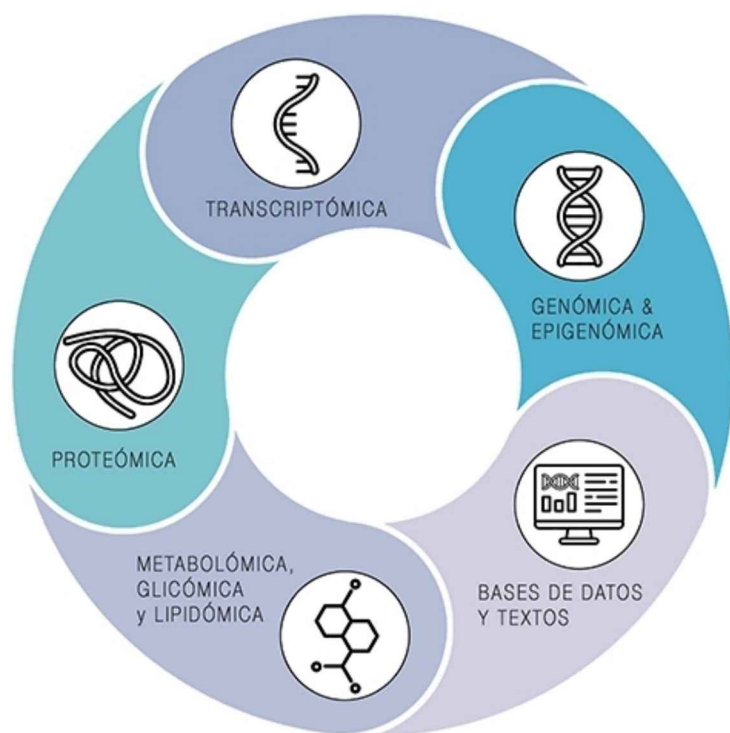


Figura. Esquema representativo que integra las tecnologías globales de genómica y epigenómica, transcriptómica, proteómica, metabolómica, glicómica y lipidómica, junto con los abordajes bioinformáticos sobre bases de datos y textos aplicadas al estudio de la Salud Reproductiva Masculina, reseñadas en este capítulo.

Referencias

1. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/infertility>
2. Evers JL. Female subfertility. *Lancet* (2002) 360:151-9.
3. Centola GM. Semen assessment. *Urol Clin North Am* (2014) 41:163-7.
4. Chu KY, Patel P, Ramasamy R. Consideration of gender differences in infertility evaluation. *Curr Opin Urol* (2019) 29:267-71.
5. Schlegel PN, Sigman M, Collura B, De Jonge CJ, Eisenberg ML, Lamb DJ, Mulhall JP, Niederberger C, Sandlow JI, Sokol RZ, Spandorfer SD, Tanrikut C, Treadwell JR, Oristaglio JT, Zini A. Diagnosis and treatment of infertility in men: AUA/ASRM guideline part I. *Fertil Steril.* (2021) 115:54-61.
6. Schlegel PN, Sigman M, Collura B, De Jonge CJ, Eisenberg ML, Lamb DJ, Mulhall JP, Niederberger C, Sandlow JI, Sokol RZ, Spandorfer SD, Tanrikut C, Treadwell JR, Oristaglio JT, Zini A. Diagnosis and treatment of infertility in men: AUA/ASRM guideline part II. *Fertil Steril* (2021) 115:62-69.
7. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. 5ta edición. Cambridge, UK. Cambridge University Press (2010).

8. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Electronic address: asrm@asrm.org. Management of nonobstructive azoospermia: a committee opinion. *Fertil Steril*. (2018) 110: 1239-1245.
9. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine in collaboration with the Society for Male Reproduction and Urology. Electronic address: asrm@asrm.org. The management of obstructive azoospermia: a committee opinion. *Fertil Steril*. (2019) 111:873-880.
10. Moghissi KS, Wallach EE. Unexplained infertility. *Fertil Steril*. (1983) 39:5-21.
11. Hamada A, Esteves SC, Agarwal A. Unexplained male infertility: potential causes and management. *Hum Androl* (2011) 1:2-16.
12. World Health Organization. (2021). WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, 6th ed. World Health Organization.
13. Nam CS, Mehta A. Advanced sperm tests and impact on clinical male factor management. *Curr Opin Urol*. (2023) 33:24-30.
14. NIH. A Brief Guide to Genomics. In National Human Genome Research Institute. 2021. Available online: <https://www.genome.gov/about-genomics/fact-sheets/A-Brief-Guide-to-Genomics> (accessed on 19 July 2021).
15. Melé M, Ferreira PG, Reverter F, DeLuca DS, Monlong J, Sammeth M, Young TR, Goldmann JM, Pervouchine DD, Sullivan TJ, Johnson R, Segrè AV, Djebali S, Niarchou A; GTEx Consortium; Wright FA, Lappalainen T, Calvo M, Getz G, Dermitzakis ET, Ardlie KG, Guigó R. Human genomics. The human transcriptome across tissues and individuals. *Science*. 2015 May 8;348(6235):660-5.
16. Blackstock WP, Weir MP. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends Biotechnol*. (1999) 17:121-7.
17. [Stratified, personalised or P4 medicine: a new direction for placing the patient at the centre of healthcare and health education](#) (Technical report). Academy of Medical Sciences. May 2015. Archived from the original on 27 October 2016. Retrieved 6 January 2016.
18. Collins FS, Morgan M, Patrinos A. The Human Genome Project: lessons from large-scale biology. *Science*. (2003) 300:286-90.
19. Bauer-Mehren A, Rautschka M, Sanz F, Furlong LI. DisGeNET: a Cytoscape plugin to visualize, integrate, search and analyze gene-disease networks. *Bioinformatics* (2010) 26:2924-2926.
20. Piñero J, Ramírez-Anguita JM, Saüch-Pitarch J, Ronzano F, Centeno E, Sanz F, Furlong LI. The DisGeNET knowledge platform for disease genomics: 2019 update. *Nucleic Acids Res* (2020) 48:D845-55.
21. Lussier YA, Li H. The rise of translational bioinformatics. *Genome Biol* (2012) 13:319.
22. Shameer K, Badgeley MA, Miotto R, Glicksberg BS, Morgan JW, Dudley JT. Translational bioinformatics in the era of real-time biomedical, health care and wellness data streams. *Brief Bioinform* (2017) 18:105-24.
23. Shen B, Teschendorff AE, Zhi D, Xia J. Biomedical data integration, modeling, and simulation in the era of big data and translational medicine. *Biomed Res Int* (2014) 2014:731546.
24. Sinha A, Singh V, Yadav S. Multi-omics and male infertility: status, integration and future prospects. *Front Biosci (Schol Ed)*. (2017) 9:375-394.

25. Garrido N, Hervás I. Personalized Medicine in Infertile Men. *Urol Clin North Am* (2020) 47:245-255.
26. Wagner AO, Turk A, Kunej T. Towards a Multi-Omics of Male Infertility. *World J Mens Health*. 2023 Jan 4. doi: 10.5534/wjmh.220186.
27. Krausz C, Riera-Escamilla A. Genetics of male infertility. *Nat Rev Urol*. (2018) 15:369-384.
28. Colaco S, Modi D. Genetics of the human Y chromosome and its association with male infertility. *Reprod Biol Endocrinol*. (2018) 16:14.
29. Verón GL, Tissera AD, Bello R, Beltramone F, Estofan G, Molina RI, Vazquez-Levin MH. Impact of age, clinical conditions, and lifestyle on routine semen parameters and sperm kinematics. *Fertil Steril*. (2018) 110:68-75.e4.
30. Verón GL, Tissera AD, Bello R, Estofan GM, Hernández M, Beltramone F, Molina RI, Vazquez-Levin MH. Association between meteorological variables and semen quality: a retrospective study. *Int J Biometeorol*. (2021) 65:1399-1414.
31. Jedidi I, Ouchari M, Yin Q. Autosomal single-gene disorders involved in human infertility. *Saudi J Biol Sci*. (2018) 25:881-7.
32. Witherspoon L, Dergham A, Flannigan R. Y-microdeletions: A review of the genetic basis for this common cause of male infertility. *Transl. Androl. Urol* (2021), 10:1383.
33. Douglas TC. The genetics of male infertility. New Jersey: Humana Press; 2007. pp. 99-99.
34. Groth KA, Skakkebaek A, Høst C, Gravholt CH, Bojesen A. Clinical review: Klinefelter syndrome--a clinical update. *J Clin Endocrinol Metab* (2013) 98:20-30.
35. Zitzmann M, Aksglaede L, Corona G, Isidori AM, Juul A, T'Sjoen G, Kliesch S, D'Hauwers K, Toppari J, Słowikowska-Hilczer J, Tüttelmann F, Ferlin A. European academy of andrology guidelines on Klinefelter Syndrome Endorsing Organization: European Society of Endocrinology. *Andrology* (2021) 9:145-167.
36. McLachlan RI, O'Bryan MK. Clinical Review#: State of the art for genetic testing of infertile men. *J Clin Endocrinol Metab* (2010) 95:1013-24.
37. Hotaling JM. Genetics of male infertility. *Urol Clin North Am*. (2014) 41:1-17.
38. Romo-Yáñez J, Sevilla-Montoya R, Pérez-González E, Flores-Reyes J, Laresgoiti-Servitje E, Espino-Sosa S, Domínguez-Castro M, Razo-Aguilera G, Hidalgo-Bravo A, Aguinaga-Ríos M. AZFa, AZFb, AZFc and gr/gr Y-chromosome microdeletions in azoospermic and severe oligozoospermic patients, analyzed from a neural network perspective. *Cir Cir* (2022) 90:202-209.
39. Cannarella R, Crafa A, Condorelli RA, Mongioì LM, La Vignera S, Calogero AE. Relevance of sperm imprinted gene methylation on assisted reproductive technique outcomes and pregnancy loss: a systematic review. *Syst Biol Reprod Med* (2021) 67:251-259.
40. Harper JC, Aittomäki K, Borry P, Cornel MC, de Wert G, Dondorp W, Geraedts J, Gianaroli L, Ketterson K, Liebaers I, Lundin K, Mertes H, Morris M, Pennings G, Sermon K, Spits C, Soini S, van Montfoort APA, Veiga A, Vermeesch JR, Viville S, Macek M Jr; on behalf of the European Society of Human Reproduction and Embryology and European Society of Human Genetics. Recent developments in genetics and medically

- assisted reproduction: from research to clinical applications. *Eur J Hum Genet* (2018) 26:12-33.
41. Okutman O, Rhouma MB, Benkhalifa M, Muller J, Viville S. Genetic evaluation of patients with non-syndromic male infertility. *J Assist Reprod Genet* (2018) 35:1939-51.
 42. Guerri G, Maniscalchi T, Barati S, Dhuli K, Busetto GM, Del Giudice F, De Berardinis E, De Antoni L, Miertus J, Bertelli M. Syndromic infertility. *Acta Biomed* (2019) 90(10-S):75-82.
 43. Signore F, Gulià C, Votino R, De Leo V, Zaami S, Putignani L, Gigli S, Santini E, Bertacca L, Porrello A, Piergentili R. The Role of Number of Copies, Structure, Behavior and Copy Number Variations (CNV) of the Y Chromosome in Male Infertility. *Genes (Basel)*. (2019) 11:40.
 44. Vockel M, Riera-Escamilla A, Tüttelmann F, Krausz C. The X chromosome and male infertility. *Hum Genet*. (2021) 140:203-215.
 45. Kikas T, Punab AM, Kasak L, Poolamets O, Vihljajev V, Pomm K, Reiman M, Tjagur S, Korrovits P, Punab M, Laan M. Microdeletions and microduplications linked to severe congenital disorders in infertile men. *Sci Rep*. (2023)13:574.
 46. Ji J, Qin Y, Wang R, Huang Z, Zhang Y, Zhou R, Song L, Ling X, Hu Z, Miao D, Shen H, Xia Y, Wang X, Lu C. Copy number gain of VCX, X-linked multi-copy gene, leads to cell proliferation and apoptosis during spermatogenesis. *Oncotarget*. (2016) 7:78532-78540.
 47. Han LJ, He XF, Ye XH. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphisms and male infertility risk: An updated meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. (2020) 99:e23662.
 48. Mostafa T, Abdel-Hamid I, Taymour M, Ali O. Genetic variants in varicocele-related male infertility: a systematic review and future directions. *Hum Fertil (Camb)*. (2021):1-17.
 49. Gunes S, Agarwal A, Henkel R, Mahmutoglu AM, Sharma R, Esteves SC, Aljowair A, Emirzeoglu D, Alkhani A, Pelegrini L, Joumah A, Sabanegh E. Association between promoter methylation of MLH1 and MSH2 and reactive oxygen species in oligozoospermic men-A pilot study. *Andrologia*. (2018) 50(3).
 50. Kumar N, Singh AK. Trends of male factor infertility, an important cause of infertility: a review of literature. *J Hum Reprod Sci* (2015) 8:191-6.
 51. Malcher A, Stokowy T, Berman A, Olszewska M, Jedrzejczak P, Sielski D, Nowakowski A, Rozwadowska N, Yatsenko AN, Kurpisz MK. Whole-genome sequencing identifies new candidate genes for nonobstructive azoospermia. *Andrology* (2022)10:1605-1624.
 52. Bieth E, Hamdi SM, Mieusset R. Genetics of the congenital absence of the vas deferens. *Hum Genet*. (2021) 140:59-76.
 53. De Braekeleer M, Nguyen MH, Morel F, Perrin A. Genetic aspects of monomorphic teratozoospermia: a review. *J Assist Reprod Genet*. (2015) 32:615-23.
 54. Ortega V, Oyanedel J, Fleck-Lavergne D, Horta F, Mercado-Campero A, Palma-Ceppi C. Macrozoospermia associated with mutations of AURKC gene: First case report in Latin America and literature review. *Rev Int Androl*. (2020) 18:159-163.
 55. Beurois J, Cazin C, Kherraf ZE, Martinez G, Celse T, Touré A, Arnoult C, Ray PF, Coutton C. Genetics of teratozoospermia: Back to the head. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. (2020)

56. 34:101473.
57. Tu C, Wang W, Hu T, Lu G, Lin G, Tan YQ. Genetic underpinnings of asthenozoospermia. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* (2020) 34:101472.
58. Schubert M, Pérez Lanuza L, Wöste M, Dugas M, Carmona FD, Palomino-Morales RJ, Rassam Y, Heilmann-Heimbach S, Tüttelmann F, Kliesch S, Gromoll J. A GWAS in Idiopathic/Unexplained Infertile Men Detects a Genomic Region Determining Follicle-Stimulating Hormone Levels. *J Clin Endocrinol Metab.* (2022) 107:2350-2361.
59. Joseph S, Mahale SD. Male Infertility Knowledgebase: decoding the genetic and disease landscape. *Database (Oxford)* (2021) 2021:baab049.
60. Darde TA, Sallou O, Becker E, Evrard B, Monjeaud C, Le Bras Y, Jégou B, Collin O, Rolland AD, Chalmel F. The ReproGenomics Viewer: an integrative cross-species toolbox for the reproductive science community. *Nucleic Acids Res.* (2015) 43(W1):W109-16.
61. Russell PJ (2010). *iGenetics: A Molecular Approach (3rd ed.)*. San Francisco: Pearson Benjamin Cummings. ISBN 978-0-321-56976-9.
62. Kazimierczyk M, Wrzesinski J. Long Non-Coding RNA Epigenetics. *Int J Mol Sci.* (2021) 22:6166.
63. Alabert C, Groth A. Chromatin replication and epigenome maintenance. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2012) 13:153-67.
64. Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol.* (2010) 28:1057-68.
65. Santi D, De Vincentis S, Magnani E, Spaggiari G. Impairment of sperm DNA methylation in male infertility: a meta-analytic study. *Andrology.* (2017) 5:695-703.
66. Patel DP, Jenkins TG, Aston KI, Guo J, Pastuszak AW, Hanson HA, Hotaling JM. Harnessing the full potential of reproductive genetics and epigenetics for male infertility in the era of "big data". *Fertil Steril.* (2020) 113:478-488.
67. Oliva R. Protamines and male infertility. *Human Reprod update* (2006) 12:417-435.
68. Tahmasbpour Marzouni E, Ilkhani H, Beigi Harchegani A, Shafaghathian H, Layali I, Shahriary A. Epigenetic Modifications, A New Approach to Male Infertility Etiology: A Review. *Int J Fertil Steril.* (2022) 16:1-9.
69. Houshdaran S, Cortessis VK, Siegmund K, Yang A, Laird PW, Sokol RZ. Widespread epigenetic abnormalities suggest a broad DNA methylation erasure defect in abnormal human sperm. *PLoS One* (2007) 2:e1289.
70. Boissonnas CC, Abdalaoui HE, Haelewyn V, Fauque P, Dupont JM, Gut I, Vaiman D, Jouannet P, Tost J, Jammes H. Specific epigenetic alterations of IGF2-H19 locus in spermatozoa from infertile men. *Eur J Hum Genet* (2010) 18:73-80.
71. Vasco GC, Gil Villa AM, Piedrahita Ochoa C, Cardona Maya W, Cadavid Jaramillo A. Influencia de la impronta genómica masculina en la reproducción [Influence of the male genomic imprinting on the reproduction]. *Actas urológicas españolas* (2008). 32:1004-1012.
72. Hammoud SS, Nix DA, Hammoud AO, Gibson M, Cairns BR, Carrell DT. Genome-wide analysis identifies changes in histone retention and epigenetic modifications at developmental and imprinted gene loci in the sperm of infertile men. *Hum Reprod.* (2011) 26:2558-69.

73. Rotondo JC, Lanzillotti C, Mazziotta C, Tognon M, Martini F. Epigenetics of Male Infertility: The Role of DNA Methylation. *Front Cell Dev Biol.* (2021) 9:689624.
74. Chan SY, Wan CWT, Law TYS, Chan DYL, Fok EKL. The Sperm Small RNA Transcriptome: Implications beyond Reproductive Disorder. *Int J Mol Sci.* (2022) 23:15716.
75. Milward EA, Shahandeh A, Heidari M, Johnstone D, Daneshi N, Hondermarck H. *Transcriptomics* (2015) 10.1016/B978-0-12-394447-4.40029-5.
76. Wright CJ, Smith CWJ, Jiggins CD. Alternative splicing as a source of phenotypic diversity. *Nat Rev Genet.* (2022) 23:697-710.
77. Chalmel F, Lardenois A, Evrard B, Mathieu R, Feig C, Demougin P, Gattiker A, Schulze W, Jégou B, Kirchhoff C, Primig M. Global human tissue profiling and protein network analysis reveals distinct levels of transcriptional germline-specificity and identifies target genes for male infertility. *Hum Reprod.* (2012) 27:3233-48. 22926843.
78. Fagerberg L, Hallström BM, Oksvold P, Kampf C, Djureinovic D, Odeberg J, Habuka M, Tahmasebpour S, Danielsson A, Edlund K, Asplund A, Sjöstedt E, Lundberg E, Szigartyo CA, Skogs M, Takanen JO, Berling H, Tegel H, Mulder J, Nilsson P, Schwenk JM, Lindskog C, Danielsson F, Mardinoglu A, Sivertsson A, von Feilitzen K, Forsberg M, Zwahlen M, Olsson I, Navani S, Huss M, Nielsen J, Ponten F, Uhlén M. Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. *Mol Cell Proteomics.* (2014) 13:397-406.
79. Kouadjo KE, Nishida Y, Cadrin-Girard JF, Yoshioka M, St-Amand J. Housekeeping and tissue-specific genes in mouse tissues. *BMC Genomics.* (2007) 8:127.
80. de la Grange P, Gratadou L, Delord M, Dutertre M, Auboeuf D. Splicing factor and exon profiling across human tissues. *Nucleic Acids Res.* (2010) 38:2825-38.
81. Kan Z, Garrett-Engle PW, Johnson JM, Castle JC. Evolutionarily conserved and diverged alternative splicing events show different expression and functional profiles. *Nucleic Acids Res* (2005) 33:5659-66.
82. Xu Q, Modrek B, Lee C. Genome-wide detection of tissue-specific alternative splicing in the human transcriptome. *Nucleic Acids Res* (2002) 30:3754-66.
83. Yeo G, Holste D, Kreiman G, Burge CB. Variation in alternative splicing across human tissues. *Genome Biol.* (2004) 5:R74.
84. Voolstra C, Tautz D, Farbrother P, Eichinger L, Harr B. Contrasting evolution of expression differences in the testis between species and subspecies of the house mouse. *Genome Res* (2007) 17:42-9.
85. Chalmel F, Rolland AD. Linking transcriptomics and proteomics in spermatogenesis. *Reproduction* (2015) 150:R149-57.
86. Solari AJ. The behavior of the XY pair in mammals. *International review of cytology* (1974). 38: 273-317.
87. McKee BD, Handel MA. Sex chromosomes, recombination, and chromatin conformation. *Chromosoma* (1993) 102:71-80.
88. Turner JM. Meiotic sex chromosome inactivation. *Development (Cambridge, England)* (2007). 134:1823-1831.

89. Namekawa SH, Park PJ, Zhang LF, Shima JE, McCarrey JR, Griswold MD, Lee JT. Postmeiotic sex chromatin in the male germline of mice. *Curr Biol* (2006) 16:660-7.
90. Mueller JL, Mahadevaiah SK, Park PJ, Warburton PE, Page DC, Turner JM. The mouse X chromosome is enriched for multicopy testis genes showing postmeiotic expression. *Nat Genet.* (2008) 40:794-9.
91. Khil PP, Smirnova NA, Romanienko PJ, Camerini-Otero RD. The mouse X chromosome is enriched for sex-biased genes not subject to selection by meiotic sex chromosome inactivation. *Nat Genet* (2004) 36:642-6.
92. He Z, Chan WY, Dym M. Microarray technology offers a novel tool for the diagnosis and identification of therapeutic targets for male infertility. *Reproduction* (2006) 132:11-9.
93. Wacławska A, Kurpisz M. Key functional genes of spermatogenesis identified by microarray analysis. *Syst Biol Reprod Med* (2012) 58:229-35
94. Lardone MC, Parodi DA, Valdevenito R, Ebensperger M, Piottante A, Madariaga M, et al. Quantification of DDX3Y, RBMY1, DAZ and TSPY mRNAs in testes of patients with severe impairment of spermatogenesis. *Mol Hum Reprod* (2007) 13:705-12
95. Montjean D, De La Grange P, Gentien D, Rapinat A, Belloc S, Cohen-Bacrie P, et al. Sperm transcriptome profiling in oligozoospermia. *J Assist Reprod Genet* (2012) 29:3-10.
96. Jodar M, Kalko S, Castillo J, Ballescà JL, Oliva R. Differential RNAs in the sperm cells of asthenozoospermic patients. *Hum Reprod* (2012) 27:1431-8.
97. Hashemi MS, Mozdarani H, Ghaedi K, Nasr-Esfahani MH. Among seven testis-specific molecular markers, SPEM1 appears to have a significant clinical value for prediction of sperm retrieval in azoospermic men. *Andrology* (2018) 6:890-895.
98. García-Herrero S, Meseguer M, Martínez-Conejero JA, Remohí J, Pellicer A, Garrido N. The transcriptome of spermatozoa used in homologous intrauterine insemination varies considerably between samples that achieve pregnancy and those that do not. *Fertil Steril.* (2010) 94:1360-1373.
99. García-Herrero S, Garrido N, Martínez-Conejero JA, Remohí J, Pellicer A, Meseguer M. Differential transcriptomic profile in spermatozoa achieving pregnancy or not via ICSI. *Reprod Biomed Online* (2011) 22:25-36.
100. Jodar M, Sandler E, Moskovtsev SI, Librach CL, Goodrich R, Swanson S, Hauser R, Diamond MP, Krawetz SA. Absence of sperm RNA elements correlates with idiopathic male infertility. *Sci Transl Med.* (2015) 7:295re6.
101. Burl RB, Clough S, Sandler E, Estill M, Krawetz SA. Sperm RNA elements as markers of health. *Syst Biol Reprod Med.* (2018) 64:25-38.
102. Holt JE, Stanger SJ, Nixon B, McLaughlin EA. Non-coding RNA in Spermatogenesis and epididymal maturation. In: Wilhelm D, Bernard P, editors. *Noncoding RNA and the Reproductive System*. Dordrecht: Springer Netherlands; 2016:95-120.
103. Rastetter RH, Smith CA, Wilhelm D. The role of non-coding RNAs in male sex determination and differentiation. *Reproduction.* (2015) 150:R93-107.

104. Luk AC, Chan WY, Rennert OM, Lee TL. Long noncoding RNAs in spermatogenesis: insights from recent high-throughput transcriptome studies. *Reproduction* (2014) 147:R131-41.
105. Wang KC, Chang HY. Molecular mechanisms of long noncoding RNAs. *Mol Cell* (2011) 43:904-14.
106. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* (2009) 136:215-33.
107. Siomi MC, Sato K, Pezic D, Aravin AA. PIWI-interacting small RNAs: the vanguard of genome defence. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2011) 12:246-58.
108. Robles V, Valcarce DG, Riesco MF. Non-coding RNA research non-coding rna regulation in reproduction: their potential use as biomarkers. *Non-coding RNA Res* (2019) 4:54-62.
109. Cui L, Fang L, Shi B, Qiu S, Ye Y. Spermatozoa micro ribonucleic acid-34c level is correlated with intracytoplasmic sperm injection outcomes. *Fertil Steril* (2015) 104:312-7.
110. Abu-Halima M, Hammadeh M, Backes C, Fischer U, Leidinger P, Lubbad AM, et al. Panel of five microRNAs as potential biomarkers for the diagnosis and assessment of male infertility. *Fertil Steril* (2014) 102: 989-97.
111. Wang C, Yang C, Chen X, Yao B, Yang C, Zhu C, et al. Altered profile of seminal plasma microRNAs in the molecular diagnosis of male infertility. *Clin Chem* (2011) 57:1722-31.
112. Wu W, Qin Y, Li Z, Dong J, Dai J, Lu C, et al. Genome-wide microRNA expression profiling in idiopathic non-obstructive azoospermia: significant up-regulation of miR-141, miR-429 and miR-7-1-3p. *Hum Reprod* (2013) 28:1827-36.
113. Xu Y, Zhang Y, Yang Y, Liu X, Chen Y. Seminal plasma miR-210-3p is a biomarker for screening dyszoospermia caused by varicocele. *Andrologia* (2019) 51:1-8.
114. Hong Y, Wang C, Fu Z, Liang H, Zhang S, Lu M, et al. Systematic characterization of seminal plasma piRNAs as molecular biomarkers for male infertility. *Sci Rep* (2016) 6:1-10.
115. Barcelo M, Mata A, Bassas L, Larriba S. Exosomal microRNAs in seminal plasma are markers of the origin of azoospermia and can predict the presence of sperm in testicular tissue. *Hum Reprod* (2018) 33:1087-98.
116. Blackstock WP, Weir MP. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends Biotechnol* (1999) 17:121-7.
117. Rogers S, Girolami M, Kolch W, Waters KM, Liu T, Thrall B, Wiley HS. Investigating the correspondence between transcriptomic and proteomic expression profiles using coupled cluster models. *Bioinformatics* (2008) 24:2894-900.
118. Egea RR, Puchalt NG, Escrivá MM, Varghese AC. OMICS: Current and future perspectives in reproductive medicine and technology. *J Hum Reprod Sci* (2014) 7:73-92.
119. Assidi M. Infertility in Men: Advances towards a Comprehensive and Integrative Strategy for Precision Theranostics. *Cells* (2022) 11:1711.
120. Wang J, Wang J, Zhang HR, Shi HJ, Ma D, Zhao HX, et al. Proteomic analysis of seminal plasma from asthenozoospermia patients reveals proteins that affect oxidative stress responses and semen quality. *Asian J Androl* (2009) 11:484-91.

121. Parte PP, Rao P, Redij S, Lobo V, D'Souza SJ, Gajbhiye R, Kulkarni V. Sperm phosphoproteome profiling by ultra performance liquid chromatography followed by data independent analysis (LC-MS(E)) reveals altered proteomic signatures in asthenozoospermia. *J Proteomics* (2012) 75:5861-71.
122. Hashemitabar M, Sabbagh S, Orazizadeh M, Ghadiri A, Bahmanzadeh M. A proteomic analysis on human sperm tail: comparison between normozoospermia and asthenozoospermia. *J Assist Reprod Genet* (2015) 32:853-63.
123. Liu Y, Guo Y, Song N, Fan Y, Li K, Teng X, Guo Q, Ding Z. Proteomic pattern changes associated with obesity-induced asthenozoospermia. *Andrology* (2015) 3:247-59.
124. Liu X, Wang W, Zhu P, Wang J, Wang Y, Wang X, Liu J, Li N, Wang X, Lin C, Liu F. In-depth quantitative proteome analysis of seminal plasma from men with oligoasthenozoospermia and normozoospermia. *Reprod Biomed Online* (2018) 37:467-479.
125. Panner Selvam MK, Agarwal A, Pushparaj PN, Baskaran S, Bendou H. Sperm Proteome Analysis and Identification of Fertility-Associated Biomarkers in Unexplained Male Infertility. *Genes (Basel)* (2019) 10:522.
126. Hosseinfar H, Gourabi H, Salekdeh GH, Alikhani M, Mirshahvaladi S, Sabbaghian M, Modarresi T, Gilani MA. Study of sperm protein profile in men with and without varicocele using two-dimensional gel electrophoresis. *Urology* (2013) 81:293-300.
127. Hosseinfar H, Sabbaghian M, Nasrabadi D, Modarresi T, Dizaj AV, Gourabi H, Gilani MA. Study of the effect of varicocelectomy on sperm proteins expression in patients with varicocele and poor sperm quality by using two-dimensional gel electrophoresis. *J Assist Reprod Genet* (2014) 31:725-9.
128. Agarwal A, Sharma R, Durairajanayagam D, Ayaz A, Cui Z, Willard B, Gopalan B, Sabanegh E. Major protein alterations in spermatozoa from infertile men with unilateral varicocele. *Reprod Biol Endocrinol* (2015) 13:8.
129. Zylbersztejn DS, Andreoni C, Del Giudice PT, Spaine DM, Borsari L, Souza GHMF, Bertolla RP, Fraietta R. Proteomic analysis of seminal plasma in adolescents with and without varicocele. *Fertil Steril* (2013) 99:92-98.
130. Pixton KL, Deeks ED, Flesch FM, Moseley FL, Björndahl L, Ashton PR, Barratt CL, Brewis IA. Sperm proteome mapping of a patient who experienced failed fertilization at IVF reveals altered expression of at least 20 proteins compared with fertile donors: case report. *Hum Reprod.* (2004) 19:1438-47.
131. Frapsauce C, Pionneau C, Bouley J, de Larouzière V, Berthaut I, Ravel C, Antoine JM, Soubrier F, Mandelbaum J. Infertilité masculine chez les patients normospermiques : analyse protéomique des spermatozoaires normaux non fécondants en fécondation in vitro classique [Unexpected in vitro fertilization failure in patients with normal sperm: a proteomic analysis]. *Gynecol Obstet Fertil* (2009) 37:796-802. French.
132. Zhu Y, Wu Y, Jin K, Lu H, Liu F, Guo Y, Yan F, Shi W, Liu Y, Cao X, Hu H, Zhu H, Guo X, Sha J, Li Z, Zhou Z. Differential proteomic profiling in human spermatozoa that did or did not result in pregnancy via IVF and AID. *Proteomics Clin Appl.* (2013) 7:850-8.

133. Kanannejad Z, Gharesi-Fard B. Difference in the seminal plasma protein expression in unexplained infertile men with successful and unsuccessful in vitro fertilisation outcome. *Andrologia* (2019) 51:e13158.
134. Salehi M, Akbari H, Heidari MH, Molouki A, Murulitharan K, Moeini H, Novin MG, Aabed F, Taheri H, Fadaei F, Mohsenzadeh M, Jafari M, Pirouzi A, Heidari R. Correlation between human clusterin in seminal plasma with sperm protamine deficiency and DNA fragmentation. *Mol Reprod Dev* (2013) 80:718-24.
135. Llavanera M, Delgado-Bermúdez A, Ribas-Maynou J, Salas-Huetos A, Yeste M. A systematic review identifying fertility biomarkers in semen: a clinical approach through Omics to diagnose male infertility. *Fertil Steril* (2022) 118:291-313.
136. Intasqui P, Camargo M, Antoniassi MP, Cedenho AP, Carvalho VM, Cardozo KHM, et al. Association between the seminal plasma proteome and sperm functional traits. *Fertil Steril* (2016) 105:617-28.
137. Intasqui P, Agarwal A, Sharma R, Samanta L, Bertolla RP. Towards the identification of reliable sperm biomarkers for male infertility: a sperm proteomic approach. *Andrologia* (2017) 50:1-11.
138. Salehi M, Akbari H, Heidari MH, Molouki A, Murulitharan K, Moeini H, Novin MG, Aabed F, Taheri H, Fadaei F, Mohsenzadeh M, Jafari M, Pirouzi A, Heidari R. Correlation between human clusterin in seminal plasma with sperm protamine deficiency and DNA fragmentation. *Mol Reprod Dev* (2013) 80:718-24.
139. Guijas C, Montenegro-Burke JR, Warth B, Spilker ME, Siuzdak G. Metabolomics activity screening for identifying metabolites that modulate phenotype. *Nat Biotechnol* (2018) 36:316-20.
140. Hamamah S, Seguin F, Barthelemy C, Akoka S, Le Pape A, Lansac J, Royere D. ¹H nuclear magnetic resonance studies of seminal plasma from fertile and infertile men. *J Reprod Fertil* (1993) 97 51-5.
141. Jayaraman V, Ghosh S, Sengupta A, Srivastava S, Sonawat HM, Narayan PK. Identification of biochemical differences between different forms of male infertility by nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. *J Assist Reprod Genet* (2014) 31:1195-204.
142. Zhang X, Diao R, Zhu X, Li Z, Cai Z. Metabolic characterization of asthenozoospermia using nontargeted seminal plasma metabolomics. *Clin Chim Acta* (2015) 450:254-61.
143. Gilany K, Moazeni-Pourasil RS, Jafarzadeh N, Savadi-Shiraz E. Metabolomics fingerprinting of the human seminal plasma of asthenozoospermic patients. *Mol Reprod Dev* (2014) 81:84-6.
144. Gilany K, Jafarzadeh N, Mani-Varnosfaderani A, Minai-Tehrani A, Sadeghi MR, Darbandi M, Darbandi S, Amini M, Arjmand B, Pahlevanzadeh Z. Metabolic Fingerprinting of Seminal Plasma from Non-obstructive Azoospermia Patients: Positive Versus Negative Sperm Retrieval. *J Reprod Infertil*. (2018) 19:109-114.
145. Mumcu A, Karaer A, Dogan B, Tuncay G. Metabolomics analysis of seminal plasma in patients with idiopathic oligoasthenoteratozoospermia using highresolution NMR spectroscopy. *Andrology* (2020) 8:450-6.
146. Xu Y, Lu H, Wang Y, Zhang Z, Wu Q. Comprehensive metabolic profiles of seminal plasma with different forms of male infertility and their

- correlation with sperm parameters. *J Pharm BioMed Anal* (2020) 177:112888.
147. Guo Y, Li J, Hao F, Yang Y, Yang H, Chang Q, Kong P, Liu W, Jiao X, Teng X. A new perspective on semen quality of aged male: The characteristics of metabolomics and proteomics. *Front Endocrinol (Lausanne)*. (2023) 13:1058250.
 148. Neto FTL, Marques RA, de Freitas Cavalcanti Filho A, Araujo LCN, Lima SVC, Pinto L, Silva RO. ¹H NMR-based metabolomics for infertility diagnosis in men with varicocele. *J Assist Reprod Genet* (2020) 37:2233-2247.
 149. Zhang J, Huang Z, Chen M, Xia Y, Martin FL, Hang W, Shen H. Urinary metabolome identifies signatures of oligozoospermic infertile men. *Fertil Steril* (2014) 102:44-53.e12.
 150. Zhou X, Wang Y, Yun Y, Xia Z, Lu H, Luo J, Liang Y. A potential tool for diagnosis of male infertility: Plasma metabolomics based on GC-MS. *Talanta* (2016) 147:82-9.
 151. Kołodziejczyk J, Blixt O, Olejnik B, Zimmer M, Ferens-Sieczkowska M. Application of lectin microarrays for the analysis of seminal plasma glycome. *Andrologia* (2018)50:e13018.
 152. Walters JLH, Gadella BM, Sutherland JM, Nixon B, Bromfield EG. Male infertility: shining a light on lipids and lipid-modulating enzymes in the male germline. *J Clin Med* (2020) 9:327.
 153. Rivera-Egea R, Garrido N, Sota N, Meseguer M, Remohí J, Dominguez F. Sperm lipidic profiles differ significantly between ejaculates resulting in pregnancy or not following intracytoplasmic sperm injection. *J Assist Reprod Genet* (2018) 35:1973-1985.
 154. Misra BB, Langefeld CD, Olivier M, Cox LA. Integrated omics: tools, advances, and future approaches. *J Mol Endocrinol* (2019) 62:R21-45.
 155. Wang M, Liu X, Chang G, Chen Y, An G, Yan L, Gao S, Xu Y, Cui Y, Dong J, Chen Y, Fan X, Hu Y, Song K, Zhu X, Gao Y, Yao Z, Bian S, Hou Y, Lu J, Wang R, Fan Y, Lian Y, Tang W, Wang Y, Liu J, Zhao L, Wang L, Liu Z, Yuan R, Shi Y, Hu B, Ren X, Tang F, Zhao XY, Qiao J. Single-Cell RNA Sequencing Analysis Reveals Sequential Cell Fate Transition during Human Spermatogenesis. *Cell Stem Cell*. (2018) 23:599-614.e4.
 156. La H, Yoo H, Lee EJ, Thang NX, Choi HJ, Oh J, Park JH, Hong K. Insights from the Applications of Single-Cell Transcriptomic Analysis in Germ Cell Development and Reproductive Medicine. *Int J Mol Sci*. (2021) 22:823.
 157. Sinha A, Singh V, Yadav S. Multi-omics and male infertility: status, integration and future prospects. *Front Biosci (Schol Ed)*. (2017) 9:375-394.
 158. Jumeau F, Chalmel F, Fernandez-Gomez FJ, Carpentier C, Obriot H, Tardivel M, et al. Defining the human sperm microtubulome: an integrated genomics approach. *Biol Reprod* (2017) 96:93-106.
 159. Talluri TR, Kumaresan A, Sinha MK, Paul N, Ebenezer Samuel King JP, Datta TK. Integrated multi-omics analyses reveals molecules governing sperm metabolism potentially influence bull fertility. *Sci Rep* (2022) 12:10692.