

## Factores moleculares de infertilidad en el espermatozoide más allá del Manual de la Organización Mundial de la Salud de 2010

### Spermatozoa infertility molecular factors beyond the World Health Organization 2010 manual

Mar Nohales<sup>1</sup>, José Remohí<sup>1</sup>, Antonio Pellicer<sup>1,2</sup>, Nicolás Garrido<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto Universitario IVI Valencia,

<sup>2</sup>Hospital Universitario y Politécnico La Fe

#### RESUMEN

**OBJETIVO:** El análisis básico de semen de la Organización Mundial de la Salud es la única herramienta globalmente aceptada para diagnosticar el potencial fértil de un varón. Sin embargo, dado su bajo nivel predictivo, se necesita una mejora en las herramientas diagnóstico con el fin de determinar de forma fiable y precisa la capacidad fecundante de un eyaculado. Por ello, el objetivo de la presente revisión es describir y evaluar los diferentes factores moleculares del espermatozoide implicados en la fertilidad masculina.

**MATERIAL Y MÉTODOS:** Se realizó una búsqueda bibliográfica mediante las bibliotecas PubMed y SCOPUS. Con los artículos seleccionados, publicados antes del 30 de junio de 2011, y con nuestra propia experiencia, se evaluaron los datos más relevantes sobre la fertilidad masculina.

**RESULTADOS Y CONCLUSIONES:** Tras evaluar objetivamente el potencial como marcadores de fertilidad de aquellos factores más relevantes, se concluye que no existe un único factor capaz de predecir la fertilidad e infertilidad masculina por sí mismo, y es que éste es un desorden de carácter multifactorial y complejo. Sin embargo, la bibliografía actual disponible nos muestra que distintas moléculas juegan un papel esencial en la funcionalidad del espermatozoide y podrían ser considerados como marcadores o factores de riesgo de infertilidad. Esta batería de moléculas, junto a aquella información que las tecnologías “-ómicas” está desvelando, podrían proporcionar la tan necesitada herramienta molecular capaz de predecir de manera fiable el potencial fértil de un varón.

(Rev Iberoam Fert Rep Hum, 2012; 29: 115-125 ©2011 Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana).

**Palabras clave:** *Infertilidad masculina, espermatozoide, gestación, infertilidad idiopática, potencial fecundante*

Aceptado 13 Marzo 2012

Dr. Nicolás Garrido Puchalt, Lab, Andrología y Banco de Semen, Inst. Universitario IVI Valencia, Plaza de la Policía Local, 3, 46015, Valencia, España.

SOLICITUD REIMPRESIÓN: Secretaría general: Luis A. Quintero. Apdo. Correos 87. 46110 Godella (Valencia) España. Email: contacto@editorialmedica.com

---

## SUMMARY

**OBJECTIVE:** Basic semen analysis stated by the World Health Organization manual is the only accepted tool to diagnose male infertility. However, because of its limited predictive value, improvements in the diagnostic tools are needed to determine reliably and accurately the fertilizing potential of an ejaculate. This review describe and evaluate different sperm molecular factors implicated in male fertility.

**MATERIAL AND METHODS:** This review comprised an online search of English language publications listed in PubMed and SCOPUS up to June 30th 2011. Using the papers that met our inclusion criteria and the authors' own experience, the relevant data on male fertility and sperm physiology were evaluated.

**RESULTS AND CONCLUSIONS:** There is no unique factor able to predict male fertility and infertility, due the complex and multifactorial features of this disorder. However, currently available evidences show us that several molecular factors are essential in sperm function and could be considered as infertility markers. This battery of molecules and the information that the scientific community is obtaining with the “-omic” technologies would provide a complex molecular tool able to predict the male fertilizing potential.

(Rev Iberoam Fert Rep Hum, 2012; 29: 115-125 ©2011 Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana).

**Key words:** *Male infertility, spermatozoa, gestation, idiopathic infertility, fertilizing potential*

## INTRODUCCIÓN

La infertilidad es un problema global que afecta en las sociedades occidentales aproximadamente a una de cada ocho parejas en edad reproductiva (1). Entre estas parejas, la infertilidad masculina, definida como la incapacidad de un hombre para lograr un embarazo viable en una mujer sana y fértil en edad reproductiva, es responsable de casi el 50% de los casos (2).

Actualmente, la única herramienta aceptada para estimar el potencial fértil de un varón es el análisis básico del semen de la Organización Mundial de la Salud (3). Si bien es cierto que los seminogramas de varones infértiles generalmente revelan algunas condiciones anormales, este análisis es descriptivo (4), ninguno de los parámetros permite conocer exactamente la capacidad fecundante del espermatozoide y su valor clínico predictivo es limitado y cuestionable (5). Por ello, un elevado porcentaje de varones catalogados como “normales” según los parámetros del manual de la OMS poseen espermatozoides disfuncionales que producen fallos en fecundación o embriones de mala calidad, diagnosticándose esta infertilidad sin causa aparente como idiopática (2, 6).

El mensaje común de todos los estudios consultados se centra en que los valores de referencia de la OMS no predicen el potencial fértil de un varón (5, 6, 7), y todo sugiere que la reciente 5ª edición de este manual tampoco lo conseguirá con los nuevos valores establecidos. Por este motivo se necesitan marcadores más precisos que complementen el estandarizado análisis del semen básico de la OMS, con el objetivo de poder predecir con éxito la capacidad fecun-

dante de un eyaculado, y con ello poder mejorar las tasas de gestación (8).

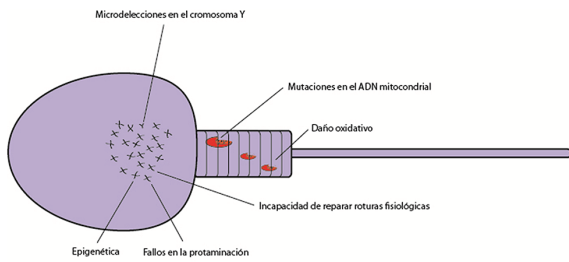
Con este fin, durante las pasadas décadas se desarrolló un gran número de tests, como la inducción de la capacitación y de la reacción acrosómica, el estudio de las interacciones espermatozoide-zona pelúcida y el análisis del ADN mitocondrial y nuclear (5, 9). No obstante, no predicen definitivamente la capacidad fecundante de un espermatozoide (4) y no son lo suficientemente reproducibles, económicos y sencillos de implementar en los laboratorios de reproducción, lo que unido a los excelentes resultados de la ICSI ha hecho que se pierda interés por ellos (1, 2).

Una de las razones de la falta de poder de estos parámetros convencionales y el motivo de que todavía hoy no se disponga de ningún test capaz de predecir con éxito la capacidad fecundante de los espermatozoides se debe a la inherente heterogeneidad del semen humano que hace que diagnosticar a un varón como fértil o infértil sea extremadamente difícil (5, 6). Por eso, sería interesante no definir al hombre como fértil o no, si no a la muestra como capaz de fecundar y sostener desarrollo embrionario o no (6) en una mujer por otro lado sana y capaz de concebir.

Además, se han encontrado otras dificultades en el desarrollo de un buen test. Por una parte, las derivadas de dos errores cometidos en la mayoría de las investigaciones: la falta de validación en humanos de los marcadores propuestos en modelos animales (9) y sobre todo, el hecho de excluir el factor femenino de los estudios, olvidando que marcadores estudiados en uno de los cónyuges no predice los resultados obtenidos en la interacción de ambos gametos y el tracto

FIGURA 1

Causas más frecuentes daño ADN



genital femenino (6). Por otra parte, la falta de conocimientos del funcionamiento celular y molecular de un espermatozoide funcional y maduro, y la naturaleza destructiva de las investigaciones, que hacen que el espermatozoide estudiado no pueda ser utilizado, propicia que los estudios sean incompletos (1).

Sin embargo, durante los últimos años son muchos los investigadores que se han centrado en ampliar conocimientos sobre la funcionalidad del espermatozoide. En la presente revisión se realiza una recopilación y análisis de la información actual disponible más relevante sobre los factores moleculares del espermatozoide implicados en la infertilidad del varón y en su potencial uso en las herramientas diagnóstico para determinar el potencial fértil de un eyaculado. No obstante, no debe olvidarse que esta no es una tarea fácil: el espermatozoide es una célula compleja de características excepcionales, que además de su elevada polarización, ejerce su acción fuera del organismo en el que se crea y alcanza su competencia funcional a lo largo de su “viaje” por el tracto reproductor femenino.

**MATERIALES Y MÉTODOS**

Dos revisores independientes (N.G. y M. N.) realizaron una búsqueda bibliográfica mediante las bibliotecas electrónicas PubMed y SCOPUS. Para ello se utilizaron diferentes palabras clave relacionadas con la infertilidad masculina y la fisiología del espermatozoide (“male infertility”, “azoospermia”, “sperm biology”, “sperm-oocyte interactions”, “Y chromosome microdeletions”, “sperm oxidative stress”, “spermatogenesis”, “sperm mRNA”...).

Se seleccionaron aquellos trabajos de revisión y experimentales publicados en lengua inglesa que contenían datos importantes para esta revisión. Para incrementar las posibilidades de encontrar información relevante, se revisaron las listas de referencias contenidas en estos artículos, estudiando si estos otros trabajos podrían ser candidatos a ser incluidos en la presente revisión.

Finalmente, con la información procedente de 53 artículos, de revisión y experimentales, y con la experiencia de los autores se evaluaron los datos más relevantes sobre la fertilidad masculina y la fisiología del espermatozoide.

Marcadores moleculares de infertilidad en el varón

**1. Factores genéticos**

Se sabe que un significativo porcentaje de la infertilidad masculina es debida a factores genéticos (10, 11), habiéndose relacionado con las principales causas de infertilidad como oligozoospermia y azoospermia (2). Por ello, el origen, la dinámica y las consecuencias de los daños en el genoma han recibido desde hace algunos años una gran atención (7).

El genoma paterno en el espermatozoide está condensado de forma única para protegerlo desde su síntesis en los testículos hasta la fecundación del ovocito (12). Es esta misma compactación del ADN que lo hace tan particularmente resistente la que provoca que no se pueda reparar el daño que se produce en él. Por tanto, este daño en el ADN se acumula en estos gametos hasta que fecundan al ovocito (10).

Las causas de daño al ADN más frecuentes y relevantes se describen a continuación (Figura 1).

**Fallos en la protaminación**

Durante la espermatogénesis los nucleosomas son mayoritariamente reemplazados por protaminas, responsables de la elevada compactación que posee la cromatina del espermatozoide (13). Alteraciones en el reemplazo de histonas por protaminas provocan una mala compactación del ADN, creando un estado de vulnerabilidad del espermatozoide a sufrir daños, sobretodo oxidativos (7).

En la especie humana se expresan dos protaminas, P1 y P2, en cantidades iguales (14). La alteración de este ratio se ha relacionado con muestras globozoospermicas y una mayor fragmentación del ADN (14, 15). Además, espermatozoides menos móviles tienen un mayor nivel de transcritos de P1 (15). Respecto a los niveles de P2 existen datos controvertidos, aunque los estudios con mayor número poblacional relacionan perfiles infértiles con niveles muy bajos de esta proteína (14).

Durante la espermatogénesis, además, se crean roturas en el ADN para disminuir el estrés torsional que provoca su elevada compactación. Defectos en las enzimas que reparan estas roturas podrían ser una de las causas de la fragmentación en el ADN (10).

***Daño oxidativo***

El estrés oxidativo es una de las mayores causas de daño en el ADN del espermatozoide y por ello ha sido tema de interés en los últimos años. La forma más común de medir el daño que los radicales libres causan en el ADN es a través

TABLA 1	
Principales productores de agentes oxidantes que afectan al espermatozoide.	
<b>Espermatozoide no funcional</b>	Elevados niveles de ROS pueden ser indicador de un mal funcionamiento espermático, de espermatozoides inmaduros (19), de una excesiva cantidad de citoplasma y de una baja capacidad fecundante (27).
<b>Mitocondria</b>	Factores interferentes en la cadena de transporte de electrones y la fosforilación oxidativa son potenciales inductores de estrés oxidativo (19, 28).
<b>Falta de sistemas de protección</b>	Muestras infértiles presentan una carencia en estos sistemas (16). El sistema glutatión peroxidasa 4 está 10 veces menos expresado en varones infértiles (29).
<b>Leucocitos activados</b>	La presencia de leucocitos activados en el semen suele ser consecuencia de infecciones o inflamaciones en el tracto reproductivo (19). Los leucocitos pueden generar hasta 1000 veces más ROS que el espermatozoide como mecanismo de defensa para eliminar agentes patógenos (27).
<b>Fuentes exógenas</b>	El espermatozoide se tiene que enfrentar a ROS provenientes de diferentes fuentes exógenas como radiación electromagnética o xenobióticos (19), incluso algunos protocolos de preparación de semen del laboratorio de andrología provocan una excesiva producción de ROS (6).

de la formación de 8-hidroxideoguanosina (8-OHdG) (10, 16). Se ha visto que está claramente incrementado en muestras con baja movilidad espermática y se cree que no tiene relación con la concentración espermática, la morfología y el porcentaje de fecundación (16).

### **Mutaciones en el ADN mitocondrial**

Mutaciones en genes codificantes para elementos de la cadena de transporte electrónico provocan una alteración en la producción de ATP, disminuyendo por tanto la movilidad espermática (2, 17).

### **Epigenética**

El embrión hereda del espermatozoide distintos elementos reguladores epigenéticos que deben ser conservados en las técnicas de reproducción asistida (18). Estas señales epigenéticas indicarían qué genes silenciar, cuáles transcribir, y cómo llevar a cabo un correcto desarrollo embrionario (18, 19). Por ello, perfiles aberrantes epigenéticos están muy probablemente implicados en la infertilidad masculina.

Una de las regulaciones epigenéticas más estudiadas ha sido la metilación de las citosinas de la doble hélice. Alteraciones en el estado de metilación normal de las histonas y defectos en las ADN metilasas de novo resultan en distintos grados de infertilidad (20).

### **Microdelecciones en el cromosoma Y**

Las microdelecciones a lo largo del cromosoma Y (Figura 2) son relativamente habituales entre varones con recuentos espermáticos muy patológicos, y suponen una de las causas más frecuentes de infertilidad masculina (21, 22, 23):

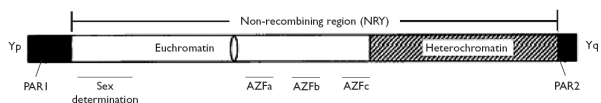
en torno a un 13% de varones azoospermicos, 5% oligozoospermicos, 5% con fallo testicular primario y con bajo recuento se ha visto que muestran microdelecciones en el cromosoma Y (2).

La región AZF (Factor de Azoospermia), localizada en el brazo largo del cromosoma Y (Yq), es donde más comúnmente ocurren estas delecciones asociadas a infertilidad (21). Este locus AZF está dividido en 4 subregiones recurrentemente deleccionadas, no solapantes, denominadas AZFa, AZFb, AZFc, AZFd. Las delecciones más frecuentes ocurren en la región AZFc (21, 22, 23). En concreto, aquellas en las que está involucrada la familia DAZ: aproximadamente un 15% de varones azoospermicos muestran una delección en esta zona génica. Este gen DAZ tiene un homólogo autosómico en el cromosoma 3 (DAZ-like) que podría operar de forma sinérgica con DAZ en la espermatogénesis, siendo en tal caso un posible gen causante de infertilidad de origen autosómico recesivo (2). Sin embargo, cabe destacar que las microdelecciones en esta región AZF no parecen estar relacionadas con el aborto de repetición de etiología desconocida (24).

Aunque con baja frecuencia, se ha relacionado con infertilidad masculina y con otras enfermedades mutaciones en el gen POLG, situado en Yq (25). Este gen codifica para la unidad catalítica de la ADN polimerasa gamma, la única involucrada en la elongación y reparación del ADN mitocondrial. Mutaciones en este gen afectan a la prueba de lectura de la enzima, lo que conlleva al aumento de mutaciones en el genoma mitocondrial y subsecuentemente afecta a la producción de ATP (2, 25).

**FIGURA 2**

Representación esquemática de la estructura del cromosoma Y (2). Las regiones PAR son regiones pseudoautosómicas que aparean



Hasta la fecha, hay disponibles distintas técnicas para el análisis de la calidad del ADN. Los ensayos COMET, TUNEL, SCDA o SCD miden la fragmentación del ADN, siendo esta última mucho más económica de implementar en la rutina del laboratorio (6). En cuanto a la utilidad clínica real de estos ensayos basados en la integridad del ADN, en la literatura se encuentran datos contradictorios. En muchos casos, no se ha hallado una correlación entre la tasa de fecundación y el daño medido en el ADN espermático probablemente debido a que, inmediatamente después de la fecundación, el ovocito comprueba la integridad del ADN espermático y en caso de estar dañado, inicia un programa de reparación genética. Sólo si el ovocito es incapaz de reparar el daño o comete algún error, pueden crearse mutaciones perjudiciales para el desarrollo del embrión (10). En lo referente a la fragmentación del ADN, pese a que hace algún tiempo la información disponible indicaba que porcentajes de fragmentación mayores del 30% eran incompatibles con la fecundación, aunque hoy en día esto no se considera cierto y por ello son muchos los autores que afirman que carecería de sentido clínico incluir este tipo de prueba en los análisis rutinarios de calidad seminal (6). En cambio, diversos autores (1, 2) coinciden en que, dada la relación existente entre las microdeleciones en el cromosoma Y y distintos patrones de infertilidad en el varón, el análisis de estas deleciones debería ser rutinariamente aplicado a todos los varones con perfil azoospermico y oligozoospermico severo (1).

## 2. Marcadores de estrés oxidativo

La producción de radicales libres durante el metabolismo celular normal del espermatozoide, es también relevante en su correcta funcionalidad.

Un determinado nivel de agentes oxidantes es esencial para la función fisiológica adecuada. Sin embargo, el estrés oxidativo, causado por un desequilibrio entre la producción de especies oxidantes y la capacidad del organismo de neutralizarlas, es una de las más importantes causas de un mal funcionamiento del espermatozoide (5, 26).

Estas especies oxidantes son los radicales libres, inter-

mediarios químicos que tienen uno o más electrones desapareados y, por tanto, muestran una elevada reactividad. Biológicamente importantes son los radicales derivados del oxígeno, denominados como especies reactivas del oxígeno (ROS), y del nitrógeno (27).

Los espermatozoides son especialmente susceptibles a esta forma de estrés debido a varios factores. Por una parte, poseen una gran cantidad de dianas a las que los radicales pueden atacar, como los ácidos grasos insaturados y el ADN mitocondrial y nuclear (comentado anteriormente). Por otra parte, son más vulnerables a este ataque debido al poco espacio citoplasmático que poseen (19). Como consecuencia, estas células carecen de la protección necesaria que poseen la mayoría de células: las enzimas citosólicas catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa; y moléculas no enzimáticas como las vitaminas C y E (10, 27).

El estrés oxidativo puede deberse a distintos motivos. Los más relevantes se muestran en la Tabla 1.

Independientemente de su origen, uno de los primeros daños que producen estos radicales es la peroxidación lipídica de la membrana plasmática, disminuyendo la fluidez y la integridad de la membrana. Esto conlleva fallos para realizar funciones esenciales dependientes de gradientes iónicos, transducción de señales, el movimiento flagelar o incluso la fusión de gametos (19). Así mismo, son muchos los autores que relacionan un aumento en ROS con una tendencia a iniciar rutas apoptóticas, cromatina mal remodelada con el consecuente aumento del daño en el ADN, pérdida de movilidad y, en suma, una menor capacidad fecundante (6, 10, 26, 27).

En cuanto a la utilidad de implementar su diagnóstico, aunque existen diferentes investigaciones al respecto, lo cierto es que no parece haberse encontrado un consenso entre la comunidad científica. Puede proporcionarse una terapia basada en la administración de antioxidantes indicada por la aparente disminución de ADN dañado que se produce en muestras infértiles (10, 30). Sin embargo, en varios trabajos se da una llamada de atención a los profesionales del campo de la reproducción advirtiendo de la administración indiscriminada de esta terapia sin estudiar previamente al paciente (27, 30).

## 3. Marcadores apoptóticos

La muerte celular programada es un proceso controlado por el que se eliminan células envejecidas y defectuosas, contribuyendo a la homeostasis de los tejidos. La apoptosis regula la espermatogénesis mediante la adecuada eliminación de gametos inmaduros o defectivos, que son reabsorbidos en el epidídimo (31). La disrupción de este proceso

está asociada con distintos desórdenes reproductivos en el varón.

Recientemente se ha observado que determinadas moléculas implicadas en la apoptosis podrían considerarse marcadores de infertilidad en el varón (10, 31). En varones infértiles, los espermatozoides maduros muestran varias características de apoptosis como la translocación de fosfatidilserina de la membrana (1, 2), la activación de caspasas (14) y la generación y activación mitocondrial de ROS (10). La culminación de esta cascada apoptótica sería la producción de daño en las membranas y en el ADN. Sin embargo, debido a la arquitectura de la célula y a la elevada condensación de la cromatina, la apoptosis en el espermatozoide difiere de la producida en las células somáticas. Así, la degradación del ADN se inicia por una digestión reversible de topoisomerasas II situadas en la matriz nuclear (23). A continuación, determinadas nucleasas inician una digestión más intensa. No obstante, por su elevada compactación, el ADN no llega a fragmentarse totalmente a raíz de esta cascada apoptótica y el espermatozoide puede no anular su capacidad fecundante. Por ello es posible que espermatozoides apoptóticos con niveles elevados de daño en el ADN puedan fecundar al ovocito (10).

Considerando lo anteriormente citado, junto con el hecho de que generalmente no se altera la morfología del espermatozoide (31), podría tratarse de una contraindicación para la ICSI.

Desde hace algunos años, numerosos estudios se han centrado en estudiar el papel de la ubiquitina en el correcto desarrollo de los espermatozoides (9). De forma rutinaria, células del epitelio del epidídimo secretan ubiquitina que se une a espermatozoides defectuosos (6), colaborando en su fagocitosis. Se ha visto que en varones con infertilidad idiopática existen elevados niveles de ubiquitina, lo que podría revelar alteraciones en el proceso de control de calidad (6). Sin embargo, existen datos controvertidos sobre la relación exacta entre el nivel de ubiquitinación y la calidad del espermatozoide (9) y por ello todavía no se ha podido determinar cómo pronosticar el potencial fértil de una muestra en función del grado de ubiquitinación.

Actualmente se están estudiando distintos marcadores apoptóticos del espermatozoide para realizar una selección inmunomagnética con el fin de eliminar espermatozoides defectivos o muertos y poder aumentar las tasas de fecundación (32), con unos resultados realmente alentadores. Prueba de ello son las diferentes investigaciones que muestran un incremento en las tasas de gestación en la inseminación intrauterina homóloga (33) y en la calidad embrionaria en ciclos de donación de ovocitos (34) al seleccionar magnéticamente los espermatozoides no apoptóticos.

## 4. Otras proteínas importantes en la funcionalidad del espermatozoide

Además de las anteriormente relacionadas, existe otra gran cantidad de moléculas involucradas en la funcionalidad del espermatozoide, de cuyo conocimiento y determinación de su implicación en la fertilidad son susceptibles de ser dianas de nuevas estrategias anticonceptivas y nuevos métodos de diagnóstico en el tratamiento de infertilidad.

### 4.1. Migración del espermatozoide en el tracto reproductor femenino

Los espermatozoides deben recorrer un largo camino por el tracto reproductor femenino hasta el oviducto (35). Por ello, una causa muy común de infertilidad espermática es la falta de movimiento (9) o la incapacidad para atravesar la unión útero-tubárica (36).

La semenogelina, por ejemplo, es un inhibidor de la movilidad espermática. Se han encontrado diferentes niveles de expresión e isoformas de esta proteína entre varones infértiles y fértiles (37).

Por otro lado, la oxido nítrico sintasa (NOS), implicada en la movilidad y en la capacitación del espermatozoide. Se sabe que el óxido nítrico (NO) es necesario para la adquisición de movilidad del espermatozoide, pero la presencia de altos niveles la inhibe. Se han encontrado elevados niveles de NOS, que producen elevadas concentraciones de NO, en espermatozoides menos móviles (15).

Las proteínas pertenecientes a la familia ADAM son metaloproteasas transmembrana, con un dominio proteasa y un dominio desintegrina (38). Se expresan en todos los tipos celulares y están localizadas en la cabeza del espermatozoide (39).

Aunque su papel no está totalmente determinado, sin duda son proteínas esenciales. A la luz de los datos existentes en la bibliografía podrían intervenir en la espermatogénesis, en la migración y adhesión del espermatozoide en el útero, y en la fusión ovocito-espermatozoide mediante la interacción con integrinas de membrana del ovocito (36, 40).

A pesar de que, como se ha citado, la contribución exacta de cada ADAM no se conoce, hasta la fecha se ha observado que la proteína ADAM3 es la más determinante en la fertilidad masculina (36, 38). También se ha visto que la subunidad fertilina de las proteínas ADAM no es esencial para la fecundación, aunque alteraciones en ella sí que dificultan el proceso provocando una incorrecta migración del espermatozoide por el útero y alterando la unión con el ovocito. Además, se ha visto que existe una compleja relación entre las distintas ADAMs ya que la disminución en una de ellas supone una disminución en otros tipos de proteínas ADAM (38, 39).

---

Dada la naturaleza fundamental de los procesos controlados por estas proteasas, una disregulación de las mismas o su ausencia desencadena mecanismos patogénicos y resulta en distintos patrones de infertilidad (39).

Los Factores de traducción son también un interesante conjunto de moléculas a tener en cuenta. Se cree que los espermatozoides utilizan maquinaria post-transcripcional para producir espermatozoides diferenciados y maduros (41). La traducción sincronizada parece ser un mecanismo de control temporal y espacial de la expresión génica.

El factor de traducción PABP se une a la cola poliA del ARNm y estimula el reclutamiento de ribosomas en 5'. Las proteínas que interactúan con PABP, Paips, regulan la actividad de este factor PABP, regulando la activación de la traducción y la homeostasis proteica. Se ha visto que los ratones sin estas proteínas son infértiles y tienen una espermatogénesis aberrante (41).

## 4.2. Integridad de membrana y capacitación

La elevada polarización del espermatozoide y su correcta funcionalidad precisan de una membrana plasmática con una composición y arquitectura determinadas, diferente a la del resto de células del organismo (27). Además, el medio que rodea al espermatozoide durante su tránsito por el tracto reproductor femenino afecta a la composición y organización de las moléculas de superficie, donde la membrana plasmática debe permitir determinadas actividades como la redistribución de proteínas en su superficie, la pérdida controlada de determinadas moléculas y finalmente, presentar las características de capacitación (27).

La capacitación es un proceso complejo por el cual el espermatozoide se vuelve capaz de fecundar un ovocito. A pesar del esfuerzo realizado por numerosos estudios para tratar de conocer este proceso, no se sabe todavía con exactitud qué es lo que ocurre (9). La hipótesis más apoyada señala que la adquisición de esta competencia funcional se debe a modificaciones post-traduccionales proteicas (4).

### Ácidos grasos insaturados

Se sabe que la composición de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) es mucho mayor en la membrana del espermatozoide que en cualquier otra célula, siendo particularmente alto el porcentaje de ácido docosahexanoico (DHA) (27). Aunque se encuentran resultados controvertidos en la bibliografía, lo que sí parece claro es que la cantidad de PUFA en pacientes oligozoospermicos y astenozoospermicos está alterado. Los últimos estudios apuntan a que las muestras con peor movilidad tienen elevado contenido en PUFA, especialmente de DHA. Debido a este elevado contenido en DHA, los espermatozoides inmaduros experimentarían una morfogénesis aberrante y una excesiva producción de ROS (27).

## Colesterol

Además de ser es el elemento de partida en la síntesis de las hormonas esteroideas, juega un importante papel en la regulación de la fluidez de la membrana plasmática.

El mayor aporte de colesterol para los tejidos son las lipoproteínas de baja densidad (LDL) circulantes, que se unen a su correspondiente receptor de LDL de la membrana plasmática. A continuación, las LDL son endocitadas y entran en una compleja red de tráfico endosomal. Fallos en estos receptores de LDL, como en el receptor apoER2, conllevan una espermatogénesis anormal (35).

Durante la maduración de los espermatozoides en el epidídimo, disminuyen los niveles de colesterol aumentando la permeabilidad de membrana. Por lo tanto, un desequilibrio en los niveles de colesterol afectaría particularmente a los eventos de maduración post-testicular (35).

El colesterol tiene un efecto inhibitorio sobre la capacitación (42). Una vez iniciada la capacitación, se produce una dramática y esencial pérdida de colesterol y de otros esteroles de membrana, produciéndose un aumento en la fluidez de la membrana. Por tanto alteraciones en estos niveles alteran dicho proceso (35). Así mismo, distintos autores han observado una correlación positiva entre los niveles de colesterol de membrana y la morfología del espermatozoide (27, 35).

## Canales iónicos

Los canales iónicos son proteínas transmembrana que permiten el paso selectivo de iones, regulando el gradiente electroquímico de la célula y distintas rutas de activación celular. Los niveles de calcio intracelulares aumentan durante la capacitación (43). Aunque su papel es controvertido, se cree que interviene de forma esencial en la hiperactivación del espermatozoide (9).

Se ha observado que los niveles de calcio intracelular son menores en varones infértiles (28) y que mutaciones en canales de calcio, como Catsper, están relacionadas con infertilidad (42).

## Factores inhibidores de la capacitación

Se ha comprobado que sobre la superficie espermática existen factores que impiden la capacitación y la reacción acrosómica, como el factor decapacitante (FD), que impide que las células sufran una capacitación prematura (42, 43). Conforme los espermatozoides ascienden por el tracto genital femenino, estos factores inhibidores de la capacitación son eliminados. Este es un paso esencial que debe producirse para que distintas señales extracelulares interac-

túen con receptores superficiales espermáticos y se inicien oportunas rutas de señalización (43).

#### ***Aglutinación de proteínas en dominios de membrana lipid rafts.***

Se ha demostrado que los dominios de membrana lipid rafts aglutinan proteínas intracelulares, principalmente receptores de la zona pelúcida. Se ha visto en modelos animales que la ausencia de enzimas glicosil como GalT1, un hipotético receptor de la proteína oocitaria ZP3 (43), disminuye el potencial fecundante (9).

#### ***Transducción de señales: Nivel de fosforilación***

Los acontecimientos anteriormente citados y otros menos conocidos inician complejas rutas de señalización que finalizan con la fosforilación de tirosinas en distintas proteínas diana como canales iónicos o enzimas. Este aumento global en la fosforilación de tirosinas lleva a importantes acontecimientos en la capacitación (9, 42). Se ha visto que en muestras con peor pronóstico el nivel de fosforilación de las distintas proteínas es menor (9).

#### ***Factor Activador de Plaquetas (PAF)***

Aunque se desconoce con exactitud el papel que juega, se cree que podría estar implicado en capacitación y en la reacción acrosómica. Se ha registrado un menor número en hombres infértiles (9, 44).

### **4.3. Interacción ovocito-espermatozoide**

#### ***Hialuronidasas***

Dentro del proceso de interacción entre los dos gametos, se cree que la atracción quimiotáctica está implicada en la migración del espermatozoide hacia las células del cúmulo. Tras contactar con el complejo cúmulo-corona, el espermatozoide penetra su matriz, rica en proteínas y carbohidratos como el ácido hialurónico y glicosaminoglicanos. Se ha visto que el espermatozoide tiene más de un tipo de enzima con actividad hialuronidasa en el acrosoma. Destacables hasta el momento son la molécula de adhesión Spam1 y la hialuronoglucosaminidasa Hyal5. Se ha comprobado que eliminar sólo algunas de ellas no provoca infertilidad (42), aunque podría ser interesante estudiar qué sucede cuando ambas son defectuosas.

#### ***Zonadhesina***

Es importante destacar que moléculas relevantes en la interacción con la zona pelúcida (ZP) permanecen desconocidas o poco estudiadas (9).

La zonadhesina es una proteína intracrosomal, y sería una firme candidata, ya que es la única proteína que ha mostrado especificidad de especie. Tras la capacitación, la exposición en la membrana de la zonadhesina es casi nula en espermatozoides fecundantes y alta en no fecundantes. Además, espermatozoides incapaces de llevar a cabo una

adecuada capacitación presentan niveles menores de los adecuados de esta proteína (42).

#### ***Calmegina***

En ausencia de esta proteína perteneciente a la familia de las chaperonas la unión a la ZP no se realiza (42). Se ha comprobado que no está presente en el espermatozoide maduro, sino que se ocupa del plegamiento de proteínas de nueva síntesis. Por ello, se cree que esta chaperona facilita la maduración de proteínas del espermatozoide requeridas para la unión con la ZP (36, 42).

Otra chaperona de relevancia en la bibliografía consultada es la proteína de choque térmico HspA2, que a pesar de jugar un papel incierto se ha visto que presenta altos niveles en hombres infértiles (6).

#### ***Acrosina***

Enzima acrosomal que digiere la ZP (42), se ha determinado que niveles bajos de esta enzima implican una menor capacidad penetrante de la ZP (6). En otros trabajos se ha visto que alteraciones en la activación de la acrosina se relacionan con muestras con peor potencial fértil a causa de una disminución en la movilidad (9). Sin embargo, mediante modelos animales se ha visto que su carencia no provoca infertilidad, por lo que deben haber otras proteínas involucradas con actividad proteolítica (42).

#### ***Izumo***

La proteína más importante en este paso tan decisivo parece ser Izumo, una proteína de membrana que interaccionaría con la proteína del ovocito CD9 (42). Modelos animales carentes de esta proteína son completamente estériles, aunque sí tienen capacidad de penetrar la ZP. También se ha visto que varones infértiles tienen esta proteína defectuosa, sin embargo, cuando se evita la unión entre gametos por ICSI sí se consigue un embarazo viable (45).

#### ***Familia CRISP***

Se trata de proteínas de secreción ricas en cisteína (36, 40). Se localizan en la región dorsal del acrosoma hasta que se produce la RA, momento en que parte de ellas migran al segmento ecuatorial. Podrían participar en la fusión de gametos a través de sitios complementarios en la superficie del ovocito. La eliminación de distintas proteínas de esta familia dan distintos patrones de infertilidad en ratón y caballo (46).

### **5. La información obtenida por las “-ómicas”**

Los grandes avances en las técnicas moleculares están transformando el panorama científico consiguiendo avances sin precedentes en la bioquímica analítica. Los esper-



---

matozooides son una diana perfecta para estas nuevas tecnologías debido a que pueden ser obtenidos en gran cantidad, fácilmente, en estado puro y pueden ser inducidos *in vitro* a realizar su función biológica, la fecundación.

### **Transcriptómica**

La existencia de una compleja población de ARNm en los espermatozoides humanos ha sido bien documentada (20, 47). Aunque su papel exacto no se conoce todavía, se cree que podría jugar un papel importante en los primeros pasos tras la fecundación (47). Por otra parte, además de los mencionados mecanismos de regulación epigenética del ADN, también se ha sugerido que el ARN podría contribuir a mantener la unión ADN-nucleosoma y prevenir la protaminación de determinadas regiones (20).

Existen varias hipótesis que intentan explicar la generación de este ARNm en el espermatozoide. La más aceptada considera que esos transcritos son remanentes de genes activos tras la meiosis (15).

Dado que se han encontrado sets de transcritos diferencialmente expresados entre muestras de donantes y pacientes infértiles (48, 49, 50), entre muestras que fecundaron y muestras que no mediante inseminación intrauterina (37), e incluso entre muestras que consiguieron gestación y aquellas que no tras realizar ICSI (51), las variaciones en los niveles de transcritos presentes en el espermatozoide podrían utilizarse como un indicador de la fertilidad del varón (1, 5, 20, 48). Aunque los datos para apoyar esto están todavía en su “infancia”, parece ser un área de rápido desarrollo que promete.

Gracias al proyecto Ontología Génica (Gene Ontology, GO), que describe cada gen y las características de sus productos génicos mediante un identificador llamado término GO, se está averiguando qué procesos biológicos están más activos en los espermatozoides de muestras que consiguieron gestación. Así, analizando los términos GO asociados a los genes diferencialmente expresados, en el grupo de donantes aparecieron enriquecidos términos relacionados con la espermatogénesis y con la obtención de energía, como componentes celulares relacionados con la mitocondria y funciones moleculares involucradas en la cadena de transporte electrónico (48). Así, estos procesos biológicos parecen estar más operativos en el grupo de donantes, y esto podría explicar sus mayores posibilidades reproductivas. Es bien sabido que el espermatozoide requiere una gran cantidad de energía para su movilidad, por lo que los términos GO relacionados con la ganancia de energía están necesariamente más activos en los espermatozoides de mayor calidad. Además, la maquinaria mitocondrial juega un importante papel en la regulación *in vitro* de las rutas de

apoptosis y reciclado de proteínas en los gametos mediante la ubiquitinación (48).

También en otras rutas de obtención de energía (glicólisis, metabolismo del piruvato) se hallaron diferencias (48). La necesidad de mantener la movilidad espermática y las modificaciones proteicas, como la fosforilación, podría ser la razón de por qué el espermatozoide requiere más ATP que las demás células.

Estos hallazgos apoyan la hipótesis de que las herramientas de diagnóstico basadas en microarrays pueden ser utilizadas para predecir el potencial de un espermatozoide para conseguir una gestación viable y también para contribuir a un mejor conocimiento de la infertilidad masculina (37, 49).

### **Proteómica**

Aunque los microarrays de expresión génica han sido muy importantes, la principal limitación que argumentan los detractores de esta tecnología es que solo representa el nivel de transcripción y no revelan nada sobre el nivel de expresión proteica, las isoformas o la existencia de modificaciones post-traduccionales. Por ello, la proteómica se ha convertido en una de las tecnologías líderes disponibles para los investigadores en la era post-genómica, debido al papel central que juegan las proteínas y sus interacciones en la funcionalidad celular. Esta área ha experimentado un gran desarrollo en los últimos años. Junto con los avances en espectrometría de masas, están siendo muy útiles para la identificación proteica, lo que ha provocado grandes avances en el campo de la investigación (4, 52). A esto se le suma el hecho de que los espermatozoides son una diana perfecta para la proteómica dado que las transformaciones funcionales que experimentan durante su “viaje” aparentemente se producen sin transcripción génica (53).

El desafío clave y pendiente en este campo es migrar de listas de proteínas identificadas a la obtención de información biológica y funcional de tales proteínas. Por ello el objetivo en los próximos años es, por una parte, conocer el proteoma espermático y llegar a comprender como funciona esta célula (1, 37, 53). Por otra parte, conociendo los principios moleculares de la espermatogénesis se podrán establecer marcadores de la capacidad fecundante de un espermatozoide (1) y con ello identificar, cuantificar y caracterizar los marcadores de la alta o baja calidad espermática.

Hasta la fecha, de la extensiva lista de candidatos proteicos identificados por proteómica, la mayoría se estima que no determinan el potencial fértil del espermatozoide y solo unos pocos parecen estar implicados de forma probada y determinante en fertilidad (53). Las proteínas diferencialmente expresadas entre muestras de semen normales y astenozoospermicas participan principalmente en estos tres

grupos funcionales: “producción de energía”, “estructura y movimiento” y “señalización celular y regulación” (13).

## CONCLUSIONES

El elevado porcentaje de casos de infertilidad masculina de origen desconocido y la necesidad de caracterizarla, mejorar la capacidad diagnóstica para aumentar las probabilidades de éxito, probablemente gracias a seleccionar al espermatozoide con mayor potencial fecundante según su patrón molecular, es una realidad en la clínica diaria. Por ello, y como se ha visto en la presente revisión, se ha realizado un gran número de estudios con el fin de identificar aquellas moléculas del espermatozoide que pudiesen estar relacionadas con el potencial fértil del varón, a las que podríamos denominar factores de fertilidad, muchos de ellos muy prometedores.

Lamentablemente, a pesar de la enorme cantidad de investigaciones llevadas a cabo, con el consecuente aporte económico y de esfuerzo que ello ha requerido, ninguno de los posibles marcadores estudiados parece ser lo suficientemente relevante por sí mismo para ser implementado en la práctica clínica o como una herramienta diagnóstico independiente. Sobre todo a consecuencia de 1) el origen de la disfunción espermática es complejo y multifactorial, 2) la falta de vinculación con estudios clínicos donde validar la importancia de la determinación de cada molécula como prueba diagnóstica, y 3) donde sí se ha hecho, en la mayoría de estudios la influencia de la contribución femenina es obviada.

## BIBLIOGRAFÍA

1. **Barratt C, Mansell S, Beaton C, Tardif S, Oxenham S.** Diagnostic tools in male infertility—the question of sperm dysfunction. *Asian J Androl.* 2011; 13: 53–58.
2. **Poongothai J, Gopenath T S, Manonayaki S.** Genetics of human male infertility. *Singapore Med J.* 2009; 50(4): 336-347.
3. World Health Organization 2010. WHO Laboratory manual for the examination and processing of human semen.
4. **Oliva R, Castillo J.** Proteomics and the genetics of sperm chromatin condensation. *Asian J Androl.* 2011; 13: 24–30.
5. **Lewis S.** Focus on Determinants of Male Fertility Is sperm evaluation useful in predicting human fertility? *Reprod.* 2007; 134: 31–40.
6. **Garrido N, Remohí J, Matínez-Conejero JA, García-Herrero S, Pellicer A, Meseguer M.** Contribution of sperm molecular features to embryo quality and assisted reproduction success. *Reprod Biomed Online.* 2008; 17 (6): 855-865.
7. **Barratt C.** Male infertility joins the translational medicine revolution. Sperm DNA: from basic science to clinical reality. *Mol Hum Reprod.* 2010; 16 (1): 1–2.
8. **Steger K, Cavalcanti MCO, Schuppe HC.** Prognostic markers for competent human spermatozoa: fertilizing capacity and contribution to the embryo. The authors. *Int J Androl. European Academy of Andrology.* 2010; 1–15.
9. **Muratori M, Luconi M, Marchiani S, Forti G, Baldi E.** Molecular markers on sperm functions. *Int J Androl.* 2008; 32: 25-45.
10. **Aitken RJ, Koppers AJ.** Apoptosis and DNA damage in human spermatozoa. *Asian J Androl* 2011; 13: 36–42.
11. **Jamsai D, O'Bryan M.** Mouse models in male fertility research. *Asian J Androl.* 2001; 13: 139–151.
12. **Ward WS.** Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development. *Mol Hum Reprod.* 2010; 16 (1): 30–36.
13. **Oliva R, de Mateo S, Estanyol JM.** Sperm cell proteomics. *Proteomics.* 2009; 9: 1004–1017.
14. **Carrell DG, Emery BR, Hammoud S.** Altered protamine expression and diminished spermatogenesis: what is the link? *Hum Reprod Update.* 2007; 13 (3): 313–327.
15. **Lambard S, Galeraud-Denis I, Martin G, Levy R, Chocat A, Carreau S.** Analysis and significance of mRNA in human ejaculated sperm from normozoospermic donors: relationship to sperm motility and capacitation. *Mol Hum Reprod.* 2004; 10 (7): 535–541.
16. **Meseguer M, Martínez-Conejero JA, O'Connor E, Pellicer A, Remohí J, Garrido N.** The significance of sperm DNA oxidation in embryo development and reproductive outcome in an oocyte donation program: a new model to study a male infertility prognostic factor. *Fertil Steril.* 2008; 89 (5): 1191-1199.
17. **Holyoake AJ, Mc Hugh P, Wu M, O'Carroll S, Sin IL, Sin FY.** High incidence of single nucleotide substitutions in the mitochondrial genome is associated with poor semen parameters in men. *Int J Androl.* 2001; 24 (3): 175-182.
18. **Yamauchi Y, Shaman J, Ward W.** Non-genetic contributions of the sperm nucleus to embryonic development. *Asian J Androl.* 2011; 13: 31–35.
19. **Aitken RJ, Baker M, De Iuliis G, Nixon B.** New Insights into Sperm Physiology and Pathology. *Handbook of Experimental Pharmacology, Springer-Verlag Berlin Heidelberg* 2010; 198: 99-115.
20. **Jenkins T, Carrell D.** The paternal epigenome and embryogenesis: poisoning mechanisms for development. *Asian J Androl.* 2011; 13: 76–80.
21. **Navarro-Costa P, Gonçalves J, Plancha C.** The AZFc region of the Y chromosome: at the crossroads between genetic diversity and male infertility. *Hum Reprod Update.* 2010; 16 (5): 525–542.
22. **Li Z, Haines C, Han Y.** “Micro-deletions” of the human Y chromosome and their relationship with male infertility. *J Genet Genomics.* 2008; 35: 193–199.
23. **Foresta C, Moro E, Ferlin A.** Y Chromosome microdeletions and alterations of spermatogenesis. *Endocr Rev.* 2001; 22 (2): 226-239.
24. **Bellver J, Meseguer M, Muriel L, García-Herrero S, Barreto MA, Garda AL et al.** Y chromosome microdeletions, sperm DNA fragmentation and sperm oxidative stress as causes of recurrent spontaneous abortion of unknown etiology. *Hum Reprod.* 2010; 25 (7): 1713-1721.

25. **Rovio AT, Marchington DR, Donat S, Schuppe HC, Abel J et al.** Mutations at the mitochondrial DNA polymerase (POLG) locus associated with male infertility. *Nat Genet.* 2001; 29 (3): 261-262.
26. **Tremellen K.** Oxidative stress and male infertility- a clinical perspective. *Hum Reprod Update.* 2008; 14 (3): 243-258.
27. **Henkel R.** Leukocytes and oxidative stress: dilemma for sperm function and male fertility. *Asian J Androl.* 2011; 13: 43-52.
28. **Koppers AJ, De Iuliis GN, Finnie JM, McLaughlin EA, Aitken RJ.** Significance of Mitochondrial Reactive Oxygen Species in the Generation of Oxidative Stress in Spermatozoa. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008; 93 (8): 3199-3207.
29. **Meseguer M, Garrido N, Simón C, Pellicer A, Remohí J.** Concentration of glutathione and expression of glutathione peroxidases 1 and 4 in fresh sperm provide a forecast of the outcome of cryopreservation of human spermatozoa. *J Androl.* 2004; 25 (5): 773-80.
30. **Ross C, Morriss A, Khairy, Khalaf Y, Braude P, Coomarasamy A et al.** A systematic review of the effect of oral antioxidants on male infertility. *Reprod Biomed Online.* 2010; 20 (6): 711-723.
31. **Chen Z, Hauser R, Trbovich AM, Shifren JL, Dorer DJ, Godfrey-Bailey L et al.** The Relationship Between Human Semen Characteristics and Sperm Apoptosis: A Pilot Study. *J Androl.* 2006; 27 (1): 112-120.
32. **Lee TH, Liu CH, Shih YT, Tsao HM, Huang CC, Chen HH.** Magnetic activated cell sorting for sperm preparation reduces spermatozoa with apoptotic markers and improves the acrosome reaction in couples with unexplained infertility. *Hum Reprod* 2010; 25(4):839-846.
33. **Romany L, Meseguer M, García-Herrero S, Pellicer A, Garrido N.** Magnetic activated sorting selection (MACS) of non-apoptotic sperm (NAS) improves pregnancy rates in homologous intrauterine insemination (IUI). Preliminary data. 65th Annual Meeting American Society for Reproductive Medicine. Supplement to *Fertil Steril* 2010; 94(4).
34. **Romany L, Meseguer M, García-Herrero S, Romero JL, Pellicer A, Garrido N.** Magnetic activated sorting of non apoptotic sperm result in improved embryo quality in ovum donation cycles with intracytoplasmic sperm injection. 26th Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE), 27-30 Junio 2010. Abstract Book.
35. **Saez F, Ouvrier A, Drevet J.** Epididymis cholesterol homeostasis and sperm fertilizing ability. *Asian J Androl.* 2011; 13: 11-17.
36. **Edwards DR, Handsley MM, Pennington CJ.** The ADAM Metalloproteinases. *Mol Asp Med.* 2008; 29: 258-289.
37. **García-Herrero S, Meseguer M, 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.* 2010b; 94 (4): 1360-1373.
38. **Alfandari D, McCusker C, Cousin H.** ADAM function in embryogenesis. *Semin Cell Dev Biol.* 2009; 20: 153-163.
39. **Han C, Kwon JT, Park I, Lee B, Jin S, Choi H.** et al. Impaired sperm aggregation in Adam2 and Adam3 null mice. *Fertil Steril.* 2010; 93 (8): 2754-2756.
40. **Cuasnicú PS, Elleman DA, Cohen DJ, Busso D, Morgenfeld MM, Da Ros VG.** Molecular mechanisms involved in mammalian gamete fusion. *Archives of Medical Research.* 2001; 32 (6): 614-618.
41. **McLaughlin E, Hime G.** Spermatids do it differently! Paip2a—the essential regulator of spermiogenesis? *Asian J Androl.* 2011; 13: 122-124.
42. **Ikawa M, Inoue N, Benham A, Okabe M.** Fertilization: a sperm's journey to and interaction with the oocyte. *J Clin Invest.* 2010; 120 (4): 1-11.
43. **Reid AT, Redgrove K, Aitken RJ, Nixon B.** Cellular mechanisms regulating sperm-zona pellucida interaction. *Asian J Androl.* 2011; 13: 88-96.
44. **Toledo AA, Mitchell-Leef D, Elsner CW, Slayden SM, Roubush WE.** Fertilization potential of human sperm is correlated with endogenous platelet activating factor content. *J Assist Reprod Genet* 2003; 20(5):192-195.
45. **Cayli S, Jakab A, Ovari L, Delpiano E.** Markers of sperm function: male fertility and sperm selection for ICSI". *Reprod Biomed Online.* 2003; 7(4): 462-468.
46. **Cohen DJ, Busso D, Da Ros V, Elleman DA, Maldera JA, Goldweir N et al.** Participation of cysteine-rich secretory proteins (CRISP) in mammalian sperm-egg interaction. *Int J Dev Biol.* 2008; 52 (5-6): 737-742.
47. **Miller D, Ostermeier GC, Krawetz SA.** The controversy, potential and roles of spermatozoa RNA. *Trends Mol Med.* 2005; 11 (4): 156-163.
48. **García-Herrero S, Garrido N, Martínez-Conejero JA, Remohí J, Pellicer A, Meseguer M.** Ontological evaluation of transcriptional differences between sperm of infertile males and fertile donors using microarray analysis. *J Assist Reprod Genet.* 2010a; 27: 111-120.
49. **Garrido N, Martínez-Conejero JA, Jauregui J, Horcajadas JA, Simón C, Remohí J et al.** Microarray analysis in sperm from fertile and infertile men without basic sperm analysis abnormalities reveals a significantly different transcriptome. *Fertil Steril.* 2009; 91 (4): 1307-1310.
50. **Moldenhauer JS, Ostermeier GC, Johnson A, Diamond MP, Krawetz SA.** Diagnosing male factor infertility using microarrays. *J Androl* 2003; 24(6):783-789.
51. **García-Herrero S, Garrido N, Martínez-Conejero JA, Remohí J, Pellicer A, Meseguer M.** Differential transcriptome profile in spermatozoa achieving pregnancy or not via ICSI. *Reprod Biomed Online* 2011; 22 (1): 25-36.
52. **Huang X, Sha J.** Proteomics of spermatogenesis: from protein lists to understanding the regulation of male fertility and infertility. *Asian J Androl.* 2011; 13: 18-23.
53. **Brewis I, Gadella BM.** Sperm surface proteomics: from protein lists to biological function. *Mol Hum Reprod.* 2010; 16 (2): 68-79.