

A. SALAS-HUETOS<sup>1</sup>, J. BLANCO<sup>1</sup>, F. VIDAL<sup>1</sup>, JM. MERCADER<sup>2</sup>, N. GARRIDO<sup>3</sup> y E. ANTON<sup>1</sup>

1. Unitat de Biologia Cel·lular, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona. 08193-Bellaterra. 2. Joint IRB-BSC program on Computational Biology, Barcelona Supercomputing Center. 08034-Barcelona. 3. Laboratorio de Andrología y Banco de Semen, Instituto Valenciano de Infertilidad. 46015-Valencia.

## INTRODUCCIÓN

Los microRNAs (miRNAs) regulan la expresión génica de numerosos procesos biológicos [1-3]. Recientemente se han identificado perfiles alterados de expresión de miRNAs asociados a diferentes casos de infertilidad masculina [4-7]. Sin embargo, todavía no se ha realizado una caracterización completa del perfil de miRNAs presentes en espermatozoides de individuos fértiles.

## OBJETIVOS

Determinar el contenido y la abundancia relativa de los miRNAs presentes en espermatozoides de individuos fértiles. Identificar parejas de miRNAs estables. Evaluar el grado de homogeneidad de la población analizada y la existencia de correlación entre los perfiles de miRNAs y los parámetros seminales y la edad de los individuos. Identificar las funciones biológicas enriquecidas entre los genes diana de los miRNAs identificados.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Análisis de expresión de miRNAs



### Análisis estadístico

Clasificación de los valores de Ct: *Determined* (Ct 15-35), *Undetermined* (Ct ≥ 35) y *Unreliable*. Normalización mediante método *Mean-Centering Restricted*. Análisis estadístico mediante *R* y *HTqPCR* considerando los miRNAs presentes (*Determined*) en los 10 individuos (*P*-valor < 0.05 con corrección de Bonferroni).

### Análisis de genes diana

*DIANA microT Software*: Identificación de los genes diana de 168 de los 221 miRNAs presentes en todas las muestras. *DAVID Bioinformatic Resources*: Identificación de los procesos biológicos enriquecidos de los genes diana seleccionados (criterio de selección estricto miTG > 19).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Contenido y abundancia relativa de 736 miRNAs analizados (Figura 1)

- 221 fueron detectados en todos los individuos.
- 452 solo se detectaron en algunas muestras.
- 63 no fueron detectados en ninguna muestra.

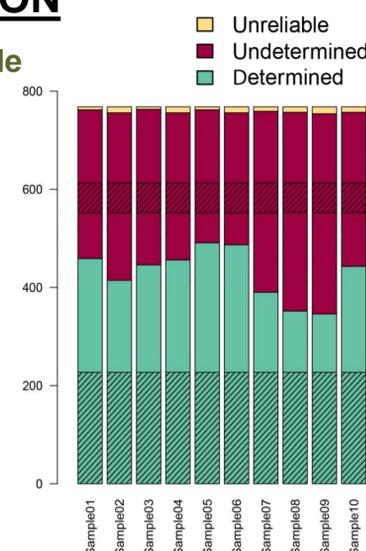


Figura 1. Valores de expresión de miRNAs (Ct). La fracción de miRNAs coincidente en cada categoría para todos los individuos se indica con un sombreado.

Los 10 miRNAs con mayor expresión y su función asociada se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1. Top 10 miRNAs expresados y sus funciones asociadas.

miRNA	Media ΔCt	Función asociada
hsa-miR-34b-3p	-7.551	Control ciclo celular
hsa-miR-375	-6.134	Supresión tumores
hsa-miR-191-5p	-6.024	Morfología espermática
hsa-miR-19b-3p	-5.328	Regulación cáncer
hsa-miR-200c-3p	-5.309	Supresión tumores
hsa-miR-132-3p	-5.138	Progresión ciclo celular
hsa-miR-30c-5p	-4.940	Diferenciación osteoblasto y epitelio
hsa-miR-891a	-4.625	No determinada
hsa-miR-30b-5p	-4.421	Diferenciación osteoblasto y epitelio
hsa-miR-1233-3p	-4.143	No determinada

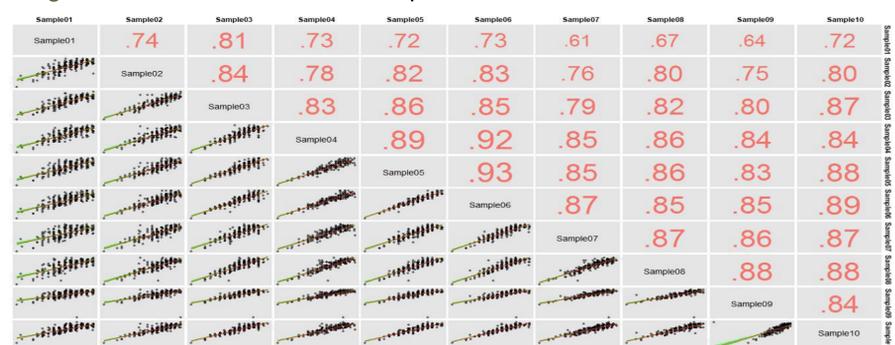
### Parejas de miRNAs estables

Las correlaciones entre miRNAs mostraron 48 parejas de miRNAs significativas ( $\rho > 0.9$ ). Las tres parejas más estables fueron: miR-20a-5p/miR-106a-5p, miR-152/miR-218-5p y miR-512-3p/miR-517a-3p.

### Homogeneidad de la población

El análisis de correlación entre muestras reveló resultados significativos entre todas ellas (rangos  $\rho = 0.611-0.932$ ; Figura 2).

Figura 2. Correlaciones de la expresión normalizada muestra-muestra.



No se encontró ninguna correlación entre los niveles de expresión de miRNAs y los parámetros seminales y/o la edad.

### Funciones biológicas

Se detectaron un total de 2357 genes diana. El análisis ontológico mostró un enriquecimiento de procesos biológicos relacionados con el desarrollo y la diferenciación celular, la morfogénesis y la embriogénesis (Tabla 2).

Tabla 2. Top 10 procesos biológicos.

Procesos biológicos	Valor Bonferroni
Regulación del desarrollo celular	$3.1 \times 10^{-10}$
Regulación del destino celular	$2.1 \times 10^{-8}$
Morfogénesis embrionaria	$9.6 \times 10^{-7}$
Morfogénesis celular	$1.1 \times 10^{-6}$
Organización de la proyección celular	$1.3 \times 10^{-6}$
Regulación positiva del proceso de desarrollo	$1.5 \times 10^{-6}$
Morfogénesis celular involucrada en diferenciación	$2.2 \times 10^{-6}$
Morfogénesis de la proyección celular	$2.7 \times 10^{-6}$
Morfogénesis de los componentes celulares	$3.6 \times 10^{-6}$
Morfogénesis de las estructuras celulares	$7.8 \times 10^{-6}$

## CONCLUSIONES

- Los espermatozoides humanos presentan un población estable de miRNAs, entre los que se encuentran 48 parejas estables.
- El contenido de miRNAs no está influenciado por los parámetros seminales o la edad de los individuos.
- Los genes diana de los miRNAs identificados están relacionados con funciones biológicas relevantes para la fertilidad humana.