

**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**FACULTAD DE MEDICINA**

Escuela de Tecnología Médica



## **TESIS PROFESIONAL**

**Para optar al título profesional de Tecnólogo Médico con mención en morfofisiopatología y citodiagnóstico**

**“Caracterización de la expresión del eje *LIN28B/let-7* en espermatozoides de hombres infértiles: correlación con parámetros hormonales y seminales”**

**Alumno: Cristóbal Espinoza Garrido**

**Tutor de tesis: Prof. María Cecilia Lardone**

**Co-tutor de tesis: Prof. María Andrea Castro Gálvez**

**Instituto de Investigaciones Materno Infantil (IDIMI) - Facultad de Medicina - Universidad de Chile**

**FECHA: 14 de diciembre de 2022**

**UNIVERSIDAD DE CHILE**

FACULTAD DE MEDICINA

Escuela de Tecnología Médica



## **TESIS PROFESIONAL**

**Para optar al título profesional de Tecnólogo Médico con mención en morfofisiopatología y citodiagnóstico**

**“Caracterización de la expresión del eje *LIN28B/let-7* en espermatozoides de hombres infértiles: correlación con parámetros hormonales y seminales”**

Cristóbal Espinoza Garrido

Prof. María Cecilia Lardone

Prof. María Andrea Castro Gálvez

**FECHA: 14 de diciembre de 2022**

Santiago, 17 de enero 2023

## ACTA CURSO TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

El **Sr. Cristóbal Andrés Espinoza Garrido**, estudiante de Tecnología Médica con Mención en Morfofisiopatología y Citodiagnóstico, cumpliendo con los requisitos establecidos en el plan de estudio, realizó durante el décimo semestre de la carrera, la Tesis Profesional titulada: **“Caracterización de la expresión del eje LIN28B/let-7 en espermatozoides de hombres infértiles: correlación con parámetros hormonales y seminales”**., dirigida por la **Prof. María Cecilia Lardone** y la **Prof. María Andrea Castro Gálvez**, ambas académicas del Instituto de Investigaciones Materno Infantil (IDIMI) Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

La Escuela de Tecnología Médica designó para su corrección una Comisión integrada por: **Prof. María Cecilia Johnson** y el **Prof. Alexis Parada Bustamante**, ambos académicos del IDIMI, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

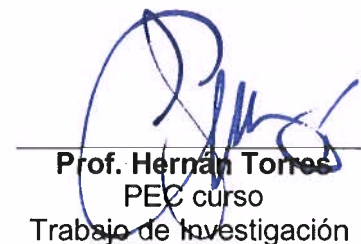
La calificación obtenida se detalla a continuación:

<b>Corrector 1 María Cecilia Johnson</b>	6.92	25%
<b>Corrector 2 Alexis Parada Bustamante</b>	6.94	25%
<b>Tutor(es) Guía:</b>		
<b>Evaluación intermedia</b>	5.70	25%
<b>Nota final tutor</b>	7.00	25%
<b>Nota final tesis profesional</b>	<b>6.64</b>	

En consecuencia el estudiante **Cristóbal Andrés Espinoza Garrido** aprueba satisfactoriamente la asignatura.



**Prof. Maroly Müller**  
Coordinadora curso  
Trabajo de Investigación



**Prof. Hernán Torres**  
PEC curso  
Trabajo de Investigación

## **Dedicatoria**

Quiero dedicar el presente trabajo a mi familia, especialmente a mi madre y abuela, quienes han sido un pilar fundamental a lo largo de mi vida, y me brindaron su apoyo y amor incondicional durante este proceso.

## **Agradecimientos**

Agradecer a la Dra. María Cecilia Lardone y a su ayudante de investigación Eliana Ortiz, quienes fueron una guía fundamental a lo largo de este proceso, brindándome su apoyo y conocimientos. También, agradecer a los equipos de la Unidad de Andrología Molecular y Reproductiva y del Laboratorio de Andrología Clínica del Instituto de Investigaciones Materno Infantil (IDIMI) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, por su amabilidad y colaboración durante el desarrollo de esta tesis. Finalmente, agradecer a mi familia y amigos por su comprensión, apoyo y cariño durante este proceso.

Esta tesis profesional fue financiada por el proyecto FONDECYT de iniciación N°11200898.

## Índice

<b>1.</b>	<b>Lista de abreviaturas .....</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>Resumen.....</b>	<b>2</b>
<b>3.</b>	<b>Introducción .....</b>	<b>3</b>
	3.1 Patrón de expresión transcripcional de <i>LIN28B</i> y <i>let-7</i> y localización testicular de la proteína LIN28B .....	5
	3.2 Pubertad y eje <i>LIN28B/let-7</i> .....	6
	3.3 <i>Let-7</i> e infertilidad masculina .....	9
<b>4.</b>	<b>Hipótesis.....</b>	<b>11</b>
<b>5.</b>	<b>Objetivo General.....</b>	<b>11</b>
<b>6.</b>	<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>11</b>
<b>7.</b>	<b>Materiales y métodos .....</b>	<b>12</b>
<b>8.</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>19</b>
	8.1 Antecedentes clínicos.....	19
	8.2 Pubertad auto-informada .....	20
	8.3 Parámetros seminales.....	21
	8.4 Parámetros hormonales.....	22
	8.5 Cuantificación del nivel de expresión del transcrito de <i>LIN28B</i> y miRNAs <i>let-7a</i> y <i>let-7c</i> en RNA de espermatozoides de casos y controles .....	23
	8.6 Correlaciones entre <i>LIN28B</i> , <i>let-7a</i> y <i>let-7c</i> y antecedentes clínicos, parámetros seminales y hormonales .....	29
<b>9.</b>	<b>Discusión .....</b>	<b>33</b>
<b>10.</b>	<b>Conclusión .....</b>	<b>41</b>
<b>11.</b>	<b>Bibliografía .....</b>	<b>42</b>
<b>12.</b>	<b>Anexos.....</b>	<b>46</b>

## 1. Lista de abreviaturas

- mRNA: RNA mensajero.
- miRNA: MicroRNA.
- *Lin28*: Gen lin28 en *C. elegans*.
- *Lin28a*: Gen Lin28a en mamíferos.
- *Lin28b*: Gen Lin28b en mamíferos.
- Lin28b: Proteína codificada por el gen Lin28b en mamíferos
- *LIN28B*: Gen LIN28B en humanos.
- LIN28B: Proteína codificada por el gen LIN28B en humanos.
- GWAS: Estudio de asociación del genoma completo.
- SNP: polimorfismo de un solo nucleótido.
- shRNA: *short hairpin* RNA.

## 2. Resumen

*Lin28* y *let-7* fueron identificados por primera vez en *Caenorhabditis elegans*. *Lin28* es un gen relacionado con la regulación de microRNAs (miRNAs) y *let-7* es un miRNA cuya función es la regulación de la expresión de RNAs mensajeros (mRNAs) involucrados en procesos de proliferación y diferenciación celular. En humanos, *let-7* es una familia compuesta por 9 miRNAs y *LIN28* comprende dos genes homólogos, *LIN28A* y *LIN28B*. En estudios del genoma completo se ha asociado a *LIN28B* con el inicio de la pubertad. Además, el retraso en el inicio de la pubertad se ha vinculado con la disminución de la calidad seminal y de los niveles séricos de testosterona. Por otra parte, en hombres infértiles se ha observado un aumento en la expresión de miembros de la familia *let-7* (*let-7a* y *let-7c*) en células germinales de los túbulos seminíferos. El objetivo principal fue caracterizar la expresión del eje *LIN28B/let-7* en espermatozoides de hombres infértiles con oligozoospermia secretora (n = 21) comparado con hombres con concentración espermática normal (n = 20), y correlacionar los niveles de expresión con parámetros hormonales y seminales. Se utilizó PCR en tiempo real para la determinación de los niveles de expresión del mRNA de *LIN28B* y de dos miRNAs de *let-7* (*let-7a* y *let-7c*). Además, se realizó la determinación de los niveles séricos de testosterona, FSH y LH, y el análisis de la calidad seminal. Los resultados muestran una disminución de la expresión del mRNA de *LIN28B* en los espermatozoides de hombres infértiles respecto de controles (p=0,0003), una correlación directa de la expresión de este gen con la concentración espermática (r=0,494; p=0,001) y la cantidad total de espermatozoides (r=0,517; p=0,0005), y se correlacionó inversamente con el nivel de testosterona (r=-0,323; p=0,042). Si bien la expresión de los miRNAs *let-7a* y *let-7c* no aumentó significativamente en casos respecto de controles (p=0,074) y (p=0,372) respectivamente, observamos correlaciones inversas con la concentración espermática (r=-0,331; p=0,035) y (r=-0,309; p=0,049). Estos resultados sugieren una desregulación del eje *LIN28B/let-7* en espermatozoides de hombres infértiles con oligozoospermia secretora y sugiere su rol en el control de la espermatogénesis.

**Palabras claves:** *LIN28B*, *let-7*, pubertad, oligozoospermia, espermatozoides.



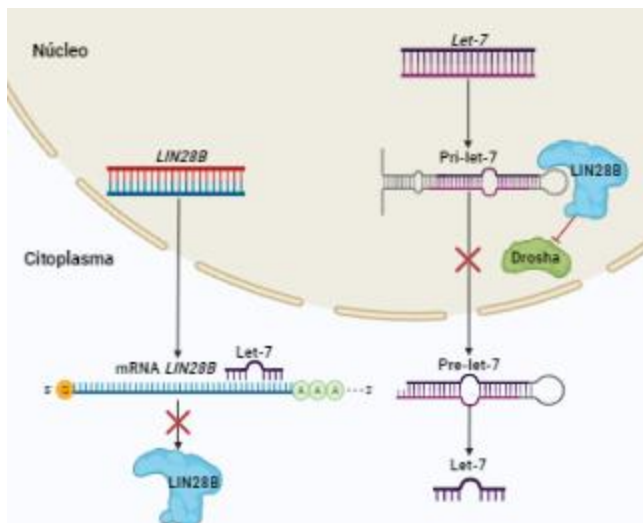
### 3. Introducción

*Lin28* fue identificado por primera vez en el nematodo *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), este gen se relaciona con la regulación de microRNAs (miRNAs), y con el control del tiempo del desarrollo de las larvas de *C. elegans*, por lo cual *Lin28* corresponde a un gen heterocrónico. El genoma de los mamíferos codifica para dos homólogos de *LIN28* que se denominan *LIN28A* y *LIN28B* (1, 2). Ambos codifican para una proteína de unión a RNA que se une al bucle terminal de los precursores de los miRNAs de la familia *let-7*, bloqueando así su procesamiento a miRNAs maduros (3).

*Let-7* fue uno de los primeros miRNAs descubiertos y al igual que los genes *Lin28* fue identificado por primera vez en *C. elegans* como regulador del tiempo del desarrollo larvario. Este miRNA ha sido conservado a lo largo de la evolución y también se encuentra presente en los mamíferos. En los seres humanos, *let-7* corresponde a una familia de 9 isoformas de miRNAs maduros, los cuales están codificados en 12 loci diferentes y algunos de estos se encuentran agrupados (4). Los miRNAs son RNAs no codificantes pequeños (~20 nucleótidos), los cuales regulan la expresión génica a nivel post-transcripcional reconociendo una secuencia complementaria en la región 3' no traducida (3'UTR) del mRNA blanco. Esta unión causa la inhibición de la expresión génica por dos mecanismos, la degradación del mRNA o la represión de la traducción del mRNA (5).

Diversos estudios sugieren que *LIN28B* y *let-7* interactúan a través de un ciclo de retroalimentación negativa doble, es decir, un aumento en la expresión de *LIN28B* implica una disminución de la expresión de miRNAs *let-7*, y de manera inversa un aumento en la expresión de miRNAs *let-7* implica una disminución de la expresión de *LIN28B* (2, 3, 6). La proteína *LIN28B* interactúa con residuos conservados de pri-*let-7* adyacentes al sitio de escisión de Dicer. Esta unión inhibe el procesamiento del precursor de *let-7* por Drosha y Dicer. Por el contrario, miRNAs *let-7* se unen a una secuencia

complementaria en el extremo 3' UTR del mRNA de *LIN28B*, inhibiendo la expresión proteica y en consecuencia la función de *LIN28B* (figura 1) (7).



**Figura 1.** Mecanismo de regulación entre *LIN28B* y *let-7*. Modificado de Wang y cols.

Mol Cáncer 14,125 (2015)

Estudios en cáncer principalmente asocian el aumento en la expresión de LIN28A/LIN28B con aumento en la proliferación celular (7) y mantención de la pluripotencia en células madres y células progenitoras (8). Por el contrario, el aumento en la expresión de *let-7* se asocia con disminución de la proliferación y aumento en la diferenciación celular (9). LIN28B controla la división, el crecimiento y la diferenciación celular, principalmente a través de la interacción con los miRNAs de la familia *let-7* (10). Además, LIN28B puede interactuar directamente con mRNAs por ejemplo con los mRNA de genes reguladores del ciclo celular como CCNA2, CCND2, CDK4, entre otros (11). Demostrando así que *LIN28B* puede regular diferentes procesos celulares como son la proliferación y la pluripotencia a través de su interacción con miRNAs y mRNAs.

Uno de los importantes cambios de diferenciación celular a nivel endocrino y sexual corresponde a la pubertad, y en cuya ocurrencia *LIN28B* se identificó como uno de los primeros loci que se asocian con

la edad de menarquia como marcador de eventos puberales en estudios de genoma completo (GWAS) (12). Posteriormente, diversos estudios han demostrado que polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) cercanos o dentro de locus de *LIN28B* se asocian con el momento de la pubertad, a través de la correlación con eventos puberales como el engrosamiento de la voz (13), el desarrollo genital en varones (14) y el aumento de talla durante la adolescencia en hombres (15).

### **3.1 Patrón de expresión transcripcional de *LIN28B* y *let-7* y localización testicular de la proteína**

#### **LIN28B**

El gen *Lin28b* se expresa ampliamente durante el desarrollo embrionario murino, pero su expresión se restringe a ciertos tejidos específicos en la edad adulta (2, 3). En estos modelos, se ha observado que los transcritos de *Lin28b* presentan un patrón de expresión predominante en el eje hipotálamo–hipófisis–gonadal, el cual es tejido específico y varía de acuerdo con la etapa del desarrollo postnatal (2, 3). A nivel hipotalámico, el mRNA del gen *Lin28b* presenta su mayor nivel de expresión transcripcional en la etapa neonatal para disminuir significativamente en las etapas de desarrollo posteriores y alcanzar su menor nivel de expresión en la pubertad. En cambio, la expresión transcripcional hipotalámica de miembros de la familia *let-7* como *let-7a* y *let-7b* presentan su nivel de expresión más bajo en la etapa neonatal y aumenta progresivamente a medida que el individuo se desarrolla, siendo este aumento de expresión significativo solo para *let-7b* (3). A nivel testicular, la expresión transcripcional del gen *Lin28b* y los miRNAs de la familia *let-7* presentan patrones de expresión diferentes a los descritos a nivel del hipotálamo. En este sentido, la expresión del mRNA de *Lin28b* aumenta significativa y progresivamente desde la etapa neonatal alcanzando un máximo durante la pubertad. Por el contrario, *let-7a* y *let-7b* presentan su mayor nivel de expresión en la etapa neonatal e infantil respectivamente, y en etapas posteriores del desarrollo sus niveles de expresión disminuyen de manera significativa (6).

En relación a la localización de la proteína Lin28b a nivel testicular en modelo murino, se ha observado su presencia tanto en el compartimiento intersticial, en la células de Leydig, como en los túbulos seminíferos, en espermátidas redondas y elongadas. En las células de Leydig se ha mostrado un patrón de expresión citoplasmática, y en las espermátidas redondas y elongadas un patrón de expresión nuclear (2).

En resumen, la expresión transcripcional de *Lin28b* y miRNAs de la familia *let-7* en el eje hipotálamo-hipófisis-testículo presentan patrones de expresión opuestos entre sí y a su vez estos patrones son opuestos entre hipotálamo y testículo. Además, se han observado cambios significativos en la expresión de los componentes de este eje asociado al paso de la infancia a la pubertad o dicho de otra forma asociado al momento de la pubertad. La disminución de la expresión del mRNA de *Lin28b* a nivel hipotalámico descrita anteriormente coincide con la hipótesis de diversos autores sobre el rol no permisivo de este gen en el inicio de la pubertad (10).

### **3.2 Pubertad y eje *LIN28B/let-7***

La pubertad es una etapa importante dentro de la vida de cualquier individuo ya que se produce un conjunto de cambios que conducen a la madurez psicológica, física y reproductiva (16). En los varones, la espermatogénesis es esencial para la reproducción normal, dicho proceso de producción de gametos se completa por primera vez en la pubertad (17). En el momento del inicio puberal se activa el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal provocando la secreción de las hormonas folículo estimulante (FSH) y luteinizante (LH) desde la hipófisis. FSH se une a receptores en las células de Sertoli, las cuales tienen un rol importante de soporte y regulación de las células germinales; y LH actúa sobre las células de Leydig estimulando la producción de testosterona (16).

La testosterona es fundamental para que se complete la espermatogénesis. En ausencia de testosterona la espermatogénesis se detiene durante la meiosis y una escasa cantidad de células germinales se desarrollan solo hasta espermatidas redondas. En el caso de supresión de la expresión del receptor de andrógenos en las células de Sertoli, la espermatogénesis se detiene en la etapa de paquiteno o diploteno de la primera división meiótica de los espermatoцитos I (18).

Un grupo de investigadores probaron diferentes modelos de perturbación puberal en ratas con la finalidad de observar cómo esta perturbación afectaba la expresión hipotalámica de diversos genes y miRNAs, entre los cuales se encontraba *Lin28b*, *let-7a* y *let-7b* (3). Se destaca que, dentro de estos modelos de perturbación puberal, la estrogenización de ratas macho por administración de benzoato de estradiol el día siguiente a su nacimiento produce una alteración en la diferenciación sexual del cerebro. En este mismo modelo, se evaluó la expresión hipotalámica del mRNA de *Lin28b*, *let-7a* y *let-7b* en el periodo peripuberal (día 45 postnatal) y se observó una expresión significativamente mayor de mRNA de *Lin28b* en el modelo experimental con respecto al control. Respecto de la expresión de *let-7a* y *let-7b*, esta fue menor en el modelo experimental y solo alcanzó significancia para *let-7a*. Además de los efectos sobre la expresión génica y de miRNAs, se observaron otros efectos relacionados, como el retraso en el desarrollo puberal y la disminución de los niveles séricos de FSH y LH (3).

Leinonen y colaboradores (19), utilizaron la base de datos GTEx que contenía información de expresión génica de diferentes tejidos y genotipos de seres humanos para encontrar posibles asociaciones entre el genotipo y cambios relevantes en la expresión transcripcional de *LIN28B* en hipotálamo, hipófisis y testículo. Los autores identificaron que el polimorfismo de un solo nucleótido, rs7759938, cercano a *LIN28B*, asociado a cambios compatibles con retraso de la pubertad, muestra un aumento significativo en la expresión del mRNA de *LIN28B* en hipotálamo e hipófisis asociado al

genotipo CC para este SNP (19), sin cambios de expresión a nivel testicular, pero en una revisión posterior a este estudio de la base de datos GTEx se observó que existe una disminución significativa en la expresión del transcrito de *LIN28B* en tejido testicular asociado al mismo genotipo para rs7759938 (20). En un segundo estudio (10), estos investigadores decidieron estudiar si existía correlación entre la misma variante del SNP rs7759938 y los niveles séricos de testosterona utilizando para ello la base de datos del biobanco del Reino Unido. Los resultados mostraron que el alelo C en rs7759938 estaba fuertemente asociado con niveles séricos de testosterona significativamente más bajos (10). En conclusión, el alelo C en rs7759938 por una parte se asocia a un retraso en el inicio de la pubertad y a menores niveles séricos de testosterona (10) y por otra a un aumento en la expresión de *LIN28B* en hipotálamo e hipófisis (19) y disminución de su expresión a nivel testicular (20).

A diferencia de las mujeres que pueden reconocer con mayor exactitud el inicio de la pubertad a través de la menarquía, en los hombres esto es más difícil ya que los cambios producidos por la pubertad ocurren de manera progresiva. Esto ha dificultado los estudios masivos sobre el inicio de la pubertad y su relación con parámetros hormonales y seminales. Sin embargo, se han realizado dos estudios independientes en Dinamarca donde el inicio de la pubertad fue auto-informado por hombres jóvenes de la población general (21, 22). El inicio de la pubertad se determinó a través de encuestas en las cuales se les preguntaba por rasgos asociados al desarrollo puberal, como por ejemplo el engrosamiento de la voz y el desarrollo del vello púbico y el momento en que estos cambios habían ocurrido ya sea indicando una fecha exacta o en relación con sus pares. Además, junto con la aplicación de estas encuestas se realizó recolección de muestras de sangre para la determinación de los niveles de hormonas como FSH, LH y testosterona, y también de muestras seminales para medir parámetros como la concentración y la motilidad de los espermatozoides. Como resultado ambos estudios concluyeron que los hombres que reportaban un retraso en el inicio de la pubertad tenían menores niveles séricos de LH y testosterona, y peor calidad seminal dada por

una menor concentración espermática y cantidad total de espermatozoides (21, 22). Con respecto a otros parámetros seminales como el volumen seminal, morfología y motilidad espermática, en uno de los estudios no se observaron asociaciones significativas entre estos parámetros espermáticos y el retraso puberal (21). Sin embargo, en el otro estudio se observó una leve disminución de la cantidad de espermatozoides morfológicamente normales y motiles en hombres con retraso puberal auto-informado (22).

### **3.3 Let-7 e infertilidad masculina**

La infertilidad es un problema a nivel mundial por lo cual ha sido tema de interés para un gran número de investigadores. Para el estudio de la infertilidad masculina, el espermiograma es la primera aproximación de la calidad seminal y los parámetros principales son la concentración de espermatozoides, la cantidad total de espermatozoides en el semen eyaculado, la morfología y motilidad espermática. De acuerdo con estos factores la calidad seminal se puede clasificar en 4 grupos principales: Azoospermia (ausencia de espermatozoides en el líquido seminal), oligozoospermia (menos de 15 millones de espermatozoides por mL ó menos de 39 millones de espermatozoides por eyaculado), teratozoospermia (menos del 4% de espermatozoides morfológicamente normales), astenozoospermia (menos del 32% de los espermatozoides con motilidad progresiva) (23), y otras clasificaciones asociadas a dos o más combinaciones de los defectos descritos con anterioridad.

En relación con la infertilidad masculina se han realizado varios estudios con la finalidad de conocer la asociación entre ésta y la expresión de los miRNAs en tejido testicular y semen. Estos RNAs pequeños regulan la expresión génica y además, son fundamentales para el desarrollo y diferenciación de las células germinales masculinas. En este contexto, un análisis masivo de expresión de miRNAs en espermatozoides de 10 sujetos normozoospermicos mostró que miembros de la familia *let-7* de

miRNAs, como *let-7a-5p*, *let-7b-5p*, *let-7c*, *let-7d-5p* y *let-7g-5p* se encontraban consistentemente expresados en todas las muestras analizadas (24). Abu-Halima y cols. (25) habían previamente determinado el perfil de expresión de miRNAs en una cohorte de hombres oligoastenozoospermicos y normozoospermicos y observaron que 42 miRNAs aumentaban su expresión en espermatozoides de hombres oligoastenozoospermicos respecto de controles, entre los cuales se encontraba *let-7c* (25). Por otra parte, el estudio posterior de Mokánszki y cols. (26) detectó alteración de los perfiles de expresión de 11 diferentes miRNAs en hombres oligozoospermicos y astenozoospermicos respecto de controles, y observaron que *let-7a* estaba entre los 5 miRNAs que presentaban aumento de expresión en espermatozoides y plasma seminal, y correlacionaron de manera inversa su expresión con la concentración espermática (26). Pensamos que el estudio de variaciones en la expresión seminal de los miRNAs *let-7a* y *let-7c* en casos de infertilidad masculina debe continuar para validar su posible utilización clínica como biomarcadores no invasivos de infertilidad.

En síntesis, se expuso acerca del eje *LIN28B/let-7*, su patrón de expresión transcripcional (3, 6), diversas asociaciones entre *LIN28B*, el inicio puberal, parámetros hormonales y seminales tanto en humanos y modelos murinos (3, 10, 19, 20, 21,22). También revisamos literatura sobre los cambios en la expresión de la familia *let-7* de miRNAs en casos de infertilidad masculina (25, 26). Se hace necesario el estudio del eje *LIN28B/let-7* a nivel hormonal y en espermatozoides del eyaculado para conocer su relación con la infertilidad masculina.



#### 4. Hipótesis

La desregulación del eje *LIN28B/let-7*, evidenciada por la disminución de la expresión de *LIN28B* y el aumento de la expresión de *let-7a* y *let-7c*, se asocia con la disminución del recuento seminal y de los niveles séricos de testosterona.

#### 5. Objetivo General

- Estudiar los niveles de expresión del eje *LIN28B/let-7* en espermatozoides de hombres con oligozoospermia secretora respecto de hombres con concentración espermática normal, y correlacionar el nivel de expresión del mRNA de *LIN28B* y los miRNAs *let-7a* y *let-7c* con el recuento seminal, otros parámetros seminales y hormonales en ambos grupos.

#### 6. Objetivos específicos

1. Determinar si la expresión transcripcional del gen *LIN28B* en espermatozoides de hombres oligozoospermicos está disminuida con respecto a la expresión en espermatozoides de hombres con concentración espermática normal.
2. Determinar si la expresión de dos miembros representativos de la familia de miRNAs *let-7* (*let-7a* y *let-7c*) se encuentra aumentada en espermatozoides de hombres oligozoospermicos, con respecto de espermatozoides de hombres con concentración espermática normal.
3. Evaluar si existe correlación entre los niveles de expresión transcripcional de *LIN28B*, de los miRNAs *let-7a* y *let-7c* y ciertos parámetros de la calidad seminal (concentración espermática, cantidad total de espermatozoides, morfología y motilidad espermática).
4. Evaluar si existe una correlación entre los niveles de expresión transcripcional de *LIN28B*, de los miRNAs *let-7a* y *let-7c* y los niveles séricos de testosterona, FSH y LH.

## **7. Materiales y métodos**

### **Diseño experimental**

La presente tesis corresponde a un estudio de casos y controles, el cual se llevó a cabo en la Unidad de Andrología Molecular y Reproductiva y el Laboratorio de Andrología Clínica del Instituto de Investigación Materno Infantil (IDIMI), Facultad de Medicina, Universidad de Chile. El proyecto de investigación del cual forma parte esta tesis se inserta en el marco del proyecto FONDECYT de iniciación N°11200898 y cuenta con la aprobación del Comité de Ética en Investigación en Seres Humanos (CEISH) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

### **1. Sujetos**

**1.1 Hombres adultos con concentración espermática normal y disminuida.** Se reclutaron hombres oligozoospermicos (casos) y hombres con concentración espermática normal (controles) que consultaron por diagnóstico andrológico de infertilidad masculina o infertilidad de la pareja en la Unidad de Andrología Molecular y Reproductiva y en el Laboratorio de Andrología Clínica del Instituto de Investigación Materno Infantil (IDIMI), Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Los pacientes firmaron un consentimiento informado al momento en que aceptaron participar del estudio.

### **1.2 Criterios de inclusión**

**A. Casos:** Pacientes con diagnóstico de oligozoospermia pura, concentración espermática  $\geq 2,5 \times 10^6$  y  $< 15 \times 10^6$  (espermatozoides/mL) ó cantidad total de espermatozoides  $< 39 \times 10^6$  (espermatozoides/eyaculado), o en combinación con astenozoospermia ( $< 32\%$  de motilidad progresiva) y/o teratozoospermia ( $< 4\%$  con forma normal) y sin sugerencia clínica de oligozoospermia obstructiva, evaluado mediante examen urológico y/o antecedentes clínicos reportados por el paciente. Pacientes con oligozoospermia más severa ( $< 2,5 \times 10^6$

espermatozoides/mL) fueron excluidos debido a la dificultad metodológica para aislar RNA en menos de  $2,5 \times 10^6$  espermatozoides.

**B. Controles:** Pacientes con concentración espermática  $\geq 15 \times 10^6$  espermatozoides/mL ó cantidad total de espermatozoides  $\geq 39 \times 10^6$  espermatozoides/eyaculado evaluados respecto de los límites de referencia espermáticos definidos por la Organización Mundial de la Salud para el análisis del semen (23), los cuales se resumen en la Tabla 1A presente en anexo extraída del manual de la OMS (23).

**1.3 Criterios de exclusión (casos y controles):** Se excluyeron sujetos con cariotipo anormal ó microdeleciones en el cromosoma Y. También fue motivo de exclusión la presencia o antecedente de varicocele grado III ó IV, hipogonadismo hipogonadotrofo, infección seminal reciente, traumatismo/lesión escrotal, oligozoospermia obstructiva, enfermedades crónicas (diabetes, insuficiencia hepática o renal), tratamiento hormonal concomitante, consumo excesivo de alcohol o drogas, cáncer testicular, quimioterapia y radioterapia. En relación con el consumo de alcohol o drogas aquellos pacientes que hubieran estado en un tratamiento de desintoxicación fueron eliminados.

## **2. Análisis de rutina.**

**2.1 Antecedentes clínicos y evaluación urológica-andrológica:** Los hombres adultos fueron entrevistados para obtener una historia general, urológica y andrológica con especial énfasis en la identificación de eventos previos y actuales de infección y/o inflamación del tracto reproductor, cirugías previas del escroto e ingle y signos físicos como ausencia de conductos deferentes e hipertrofia o engrosamiento epididimario con la finalidad de excluir causas de oligozoospermia obstructiva. El examen físico y el diagnóstico sugerente de obstrucción fueron realizados por un

urólogo con especial interés en detectar varicocele, palpación de conductos deferentes, estado de androgenización y medición del volumen testicular con orquidómetro.

**2.2 Cariotipo:** Basado en las directrices de la Asociación Americana de Urología (AUA) y la Academia Europea de Andrología (EAA) (27, 28), se realizó el análisis citogenético en pacientes con un recuento total de espermatozoides motiles  $< 5 \times 10^6$ . Este examen se llevó a cabo en el Laboratorio Endocrinología Molecular y Genética del IDIMI utilizando bandeo G contando 35 mitosis de leucocitos extraídos de sangre periférica.

**2.3 Análisis de microdeleciones del cromosoma Y:** La detección de microdeleciones del cromosoma Y se realizó en la Unidad de Andrología Molecular y Reproductiva a sujetos con  $< 5 \times 10^6$  espermatozoides/mL. Veintiún segmentos no polimórficos presentes entre los intervalos 3 y 7 del cromosoma Y, incluido los genes del factor de azoospermia a, b y c (AZF) en el cromosoma Y, se amplificaron mediante PCR multiplex utilizando DNA extraído de sangre periférica como se describió previamente (29).

**2.4. Análisis hormonal:** A los sujetos se les extrajo muestras de sangre obtenidas entre 9 - 11 a.m. para el análisis hormonal en suero. LH y FSH fueron medidas por ensayo inmunoradiométrico y testosterona total fue medida por ensayo radioinmunométrico, valores de referencia en anexo (tabla 2A). La medición en suero de LH, FSH y testosterona se realizó para evaluar la función testicular y además descartar eventuales alteraciones hormonales como el hipogonadismo hipogonadotropo.

**3. Análisis de semen:** Los análisis de semen se realizaron siguiendo las directrices del Manual de Laboratorio para la Examinación y Procesamiento de Semen Humano, OMS, 5ta ed. (23) en muestra seminal obtenida por masturbación con una abstinencia sexual mínima de 2 días y máxima de 7 días. El semen se recolectó en recipientes estériles y se dejó que ocurra la licuefacción a 37 °C por 30

minutos antes de la realización del análisis del semen. La evaluación incluyó la medición del volumen seminal, pH, concentración espermática en cámara de Neubauer, cantidad total de espermatozoides, motilidad, morfología y viabilidad. Se evaluó la motilidad progresiva rápida o motilidad grado A que corresponde a espermatozoides que se mueven activamente en forma lineal o en grandes círculos, motilidad no progresiva y espermatozoides inmóviles (23). La morfología espermática se evaluó según los criterios estrictos de Kruger. Los valores de referencia para los parámetros seminales se proporcionan en el manual de la OMS 2010 (23) (Anexo Tabla 1A). El análisis de semen fue realizado por el profesional capacitado de la Unidad de Andrología Molecular y Reproductiva o del Laboratorio de Andrología Clínica del IDIMI.

**4. Separación de espermatozoides:** El aislamiento de espermatozoides desde la muestra seminal se realizó a través de un gradiente de densidad utilizando PureSperm 40<sup>®</sup> (Nidacon) para separar los espermatozoides de las células somáticas (leucocitos y células epiteliales) obteniendo una muestra enriquecida en espermatozoides móviles. Brevemente, en un tubo tipo Falcón de 15 ml se agregó 1 mL de PureSperm 40<sup>®</sup> (Nidacon) y hasta 1,5 mL de semen, este tubo fue centrifugado a 300 x g por 20 minutos en centrífuga (Thermo Scientific). El pellet resultante se colocó en un nuevo tubo tipo Falcón de 15 mL para realizar un primer lavado con 5 mL de PBS 1X, centrifugando a 300 x g por 15 minutos en centrífuga (Thermo Scientific). Luego se descartó el sobrenadante, y se procedió a un segundo lavado con 1 mL PBS 1X, centrifugando a 300 x g por 15 minutos en centrífuga (Thermo Scientific).

**5. Extracción de RNA de espermático:** El RNA total se extrajo utilizando un método combinado de separación con tiocianato de guanidinio-fenol-cloroformo (Trizol<sup>®</sup>, Invitrogen) y purificación por columna de afinidad (RNeasy Mini Kit, Qiagen) de acuerdo a publicaciones previas con algunas modificaciones de nuestro laboratorio (30, 31). Brevemente, se procedió a la lisis de los espermatozoides en 0,5 mL buffer RLT (RNeasy Mini kit, Qiagen) suplementado con 7,5  $\mu$ L de  $\beta$ -

mercaptoetanol utilizando la velocidad media del homogeneizador (Pro Scientific 200) durante 4 minutos. Luego se realizó una segunda homogeneización con 500 µL de Trizol® durante 4 minutos a velocidad media. Al homogeneizado se le agregaron 200 µL de cloroformo, se agitó energéticamente por 15 segundos y se centrifugó a 12.000 x g por 20 minutos a 4 °C. La fase acuosa resultante se mezcló con igual volumen de etanol 100% con el fin de recuperar RNA mensajeros y RNA de pequeño tamaño. Los RNAs extraídos fueron tratados con 80 µL de solución RNase-Free DNase (Qiagen) para eliminar contaminación con DNA. Finalmente, la concentración y pureza del RNA se determinó por espectrofotometría (NanoDrop TM) o fluorometría (Qubit 3.0, Invitrogen) y el RNA extraído se almacenó a -80 °C hasta su uso. Se realizaron controles de pureza para comprobar la ausencia de contaminación con DNA (amplificación de fragmentos de DNA por PCR) y la ausencia de mRNA de células somáticas (amplificación del transcrito de *CD45*) en las muestras de DNA complementario (cDNA) de acuerdo con publicación previa (32).

#### **6. Cuantificación de la expresión del mRNA de *LIN28B* en espermatozoides por PCR en tiempo real y**

**transcripción reversa (qRT-PCR):** La abundancia del transcrito de *LIN28B* se cuantificó a través de PCR

en tiempo real utilizando SYBR green en el equipo StepOne Plus Real-Time PCR (Applied Biosystem).

Primero, el cDNA se sintetizó a partir del RNA total usando RevertAid H Minus Reverse Transcriptase

(Thermo Scientific) y oligo d(T)12-18 primer (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del proveedor,

para la síntesis del cDNA se utilizó alícuota de 500 ng de RNA total. La reacción de qPCR se realizó

utilizando Rox SYBR® MasterMix dTTP Blue (Takyon) y partidores específicamente diseñados para la

amplificación de mRNA (Primer-BLAST): *LIN28B*-forward, 5'-AGCACATTAGACCATGCGAGC-3' y *LIN28B*-

reverse, 5'-TTTGCTAGCCCCGCCTTCG-3' (tamaño del fragmento amplificado 156 pb) y *GADPHS*-

forward, 5'-CATGAACATTGTGAGCAACGC-3' y *GADPHS*-reverse, 5'-CAACCCTTCCACGATCCCAA-3'

(tamaño del fragmento amplificado 94 pb). El nivel de expresión del transcrito de *LIN28B* se normalizó

a la expresión del gen de referencia *GAPDH-S* (gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa específica de

espermatozoides) La expresión relativa al control endógeno se calculó utilizando el método  $2^{\Delta Ct}$ , donde  $\Delta Ct$  corresponde a la diferencia entre el valor Ct de *GAPDH-5* – el valor Ct de *LIN28B*. Cada muestra se midió en triplicado y se eliminaron los replicados cuya DE superó 0,5 del promedio. La eficiencia del PCR para cada gen se determinó utilizando diluciones seriadas de producto de PCR con cada par de partidores, durante la configuración de la condición experimental. El programa de PCR en tiempo real consistió en 1 ciclo a 50 °C por 2 minutos, 1 ciclo a 95 °C por 3 minutos, seguido de 40 ciclos de 5 segundos a 95 °C, 30 segundos a 60 °C y 30 segundos a 72 °C, y curva de melting de 60 °C a 95 °C.

**7. Cuantificación de la expresión de los miRNAs *let-7* en espermatozoides por PCR en tiempo real y transcripción reversa (qRT-PCR):** Se cuantificó la expresión de *let-7a* y *let-7c* en RNA de espermatozoides como miembros representativos de la familia *let-7*. Una alícuota de RNA total de 60 ng se sometió a transcripción reversa para la obtención de cDNA utilizando TaqMan® Advanced MicroRNA cDNA synthesis Kit (Applied Biosystem), siguiendo las instrucciones del proveedor. La reacción de qPCR se llevó a cabo en el equipo StepOne Plus Real-Time PCR (Applied Biosystem) usando TaqMan Universal Master Mix II, no UNG (Applied Biosystem), y partidores y sondas previamente diseñadas (TaqMan® Advanced miRNA Assays, Applied Biosystem) (Tabla 1). Se seleccionaron como controles de expresión endógenos a dos miRNAs, hsa-miR-100-5p y hsa-miR-30a-5p basados en un estudio que propone miRNAs como normalizadores para qRT-PCR de miRNAs extraídos de espermatozoides (33). Cada muestra se midió en triplicado y se eliminaron los replicados cuya DE superó 0,5 del promedio. El programa de PCR en tiempo real consistió en 1 ciclo de 2 minutos a 50 °C, 1 ciclo de 2 minutos a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C y 60 segundos a 60 °C con lectura en este paso.

**Tabla 1.** Ensayos TaqMan® Advanced miRNA.

Nombre del ensayo	ID ensayo	Número de catalogo
hsa-let-7a-5p	478575_mir	A25576
hsa-let-7c-5p	478577_mir	A25576
hsa-100-5p	478224-mir	A25576
hsa-30a-5p	479448_mir	A25576

**8. Tamaño muestral y análisis estadístico.** El tamaño muestral para la cuantificación de la expresión transcripcional de *LIN28B* y de los miRNAs seleccionados se estimó en base a un estudio previo que evaluó la expresión de *let-7a* entre otros miRNAs en espermatozoides y plasma seminal de hombres oligozoospermicos y astenozoospermicos comparado con sujetos normozoospermicos (25). De acuerdo con los antecedentes aportados por este trabajo, y asumiendo un error  $\alpha$  igual 0,05, un error  $\beta$  igual a 0,20 (poder estadístico 80%) y esperando una diferencia de media entre los grupos de al menos 1 desviación estándar (DE), se calculó un tamaño muestral del 20 sujetos por grupo. El análisis estadístico se realizó a través del programa SPSS versión 21 y Graphpad Prism 8. La comparación de medias y proporciones se realizó utilizando la prueba de t (*T-test*) y la prueba de chi-cuadrado, respectivamente. Asimismo, las diferencias entre medias de niveles hormonales, parámetros seminales y niveles de expresión génica se probaron utilizando pruebas no paramétricas (U de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis). Para la correlación entre variables numéricas se calculó el coeficiente de correlación de Spearman. La significancia estadística se consideró con un valor de  $p < 0,05$ .



## 8. Resultados

### 8.1 Antecedentes clínicos

Para realizar este estudio se seleccionaron 21 hombres con concentración espermática menor a  $15 \times 10^6/\text{ml}$  (casos) y 20 hombres con concentración espermática  $\geq 15 \times 10^6/\text{ml}$  (controles) de parejas que consultaron por infertilidad. Los antecedentes clínicos de la población estudiada se muestran en la Tabla 2. Los casos presentaron una edad promedio de 38 años, y los controles presentaron una edad promedio de 36 años, no existiendo diferencia entre los grupos ( $p=0,402$ ). Asimismo, casos y controles presentaron un índice de masa corporal (IMC) promedio de  $30,7 \text{ Kg/m}^2$  y  $29,6 \text{ Kg/m}^2$ , respectivamente, siendo similar entre ambos grupos ( $p= 0,052$ ).

Con respecto al consumo de tabaco, drogas y alcohol se obtuvo respuesta de 20 casos y 17 controles. Se consideró como consumo de tabaco, el hábito de fumar por un periodo de al menos 2 años con una frecuencia diaria o semanal. En relación con el consumo de alcohol, los sujetos reportaron consumo por un periodo que varió entre 2 a 30 años, siendo el consumo principalmente de cerveza y en segundo lugar de vino. Con respecto al consumo de drogas, los sujetos reportaron un consumo de entre 0,5 a 5 gramos de droga con una frecuencia de consumo que varió de diaria a mensual correspondiendo principalmente a marihuana y, seguido en menor medida, por el consumo de cocaína. Solo un sujeto del grupo de casos reportó consumo de cocaína y refirió haber suspendido su consumo hace 2 meses al momento de la entrevista. No se observó diferencias en la proporción de sujetos que reportaron consumo de tabaco, alcohol o drogas entre ambos grupos.

En relación con patologías de la zona genital, tres sujetos del grupo de casos y un sujeto del grupo control reportaron haber padecido criptorquidia. De los tres sujetos del grupo de casos dos reportan haber sido operados a los 6 años y el tercer sujeto fue operado a la edad de un 1 año, y el sujeto del grupo control reportó haber sido operado a los 10 años de edad. También, tres sujetos del grupo de

casos y dos del grupo control reportaron padecer o haber padecido de varicocele de grado I (leve) y un sujeto del grupo de casos padeció varicocele grado III, el cual fue resuelto quirúrgicamente durante el mes en que fue diagnosticado. Dos sujetos del grupo de casos y un sujeto del grupo control padecieron de epididimitis, estos reportaron haber recibido tratamiento antiinflamatorio. No se observaron diferencias entre los grupos respecto del antecedente de estas patologías.

**Tabla 2.** Antecedentes clínicos

Parámetros	Controles	Casos	Valor p
Edad (Años)	36 [22-50]	38 [28-48]	0,402
Índice de masa corporal (Kg/m <sup>2</sup> )	29,59 [21,11-38,09]	30,66 [21,80-37,62]	0,052
Consumo de tabaco	47%	50%	0,858
Consumo de alcohol	82%	85%	0,828
Consumo de drogas	47%	25%	0,161
Criptorquidia	6%	15%	0,344
Varicocele	12%	20%	0,662
Epididimitis	6%	10%	0,686

Datos expresados como promedio [mínimo – máximo] y porcentaje.

## 8.2 Pubertad auto-informada

A los sujetos participantes se les consultó por la edad de inicio de su pubertad (edad de inicio de su pubertad aproximada y si el comienzo de su pubertad ocurrió a una edad similar a la de sus pares), obteniendo respuesta de 20 sujetos del grupo de casos y 16 del grupo control, las cuales se resumen en la Tabla 3. En relación a la edad de inicio de la pubertad no hubo diferencia estadística entre casos y controles ( $P=0,5581$ ). Al consultar por el inicio de la pubertad respecto a sus pares, la mayoría de los sujetos del grupo de casos informó que su pubertad fue al mismo ritmo que sus pares, solo el 20% de los hombres del grupo de casos encuestados refiere que su pubertad comenzó más atrasada y el 15%

manifestó un inicio adelantado respecto de sus pares. No se observaron diferencias entre casos y controles en la edad y percepción de inicio de la pubertad respecto a sus pares.

**Tabla 3.** Inicio de la pubertad auto-informada

		Controles	Casos	Valor p
<b>Edad de inicio de la pubertad (Años)</b>		13 [12-14]	14 [13-14]	0,5581
<b>Inicio de la pubertad respecto a sus pares (%)</b>	Al mismo ritmo	69%	65%	0,694
	Atrasada	25%	20%	
	Adelantada	6%	15%	

Datos expresados como mediana [percentil 25-percentil 75] y porcentajes.

### 8.3 Parámetros seminales

Los parámetros seminales obtenidos del informe de los espermogramas se resumen en la Tabla 4. De acuerdo a lo esperado, el grupo de casos presentó una concentración espermática ( $p < 0,0001$ ) y cantidad total de espermatozoides ( $p < 0,0001$ ) significativamente menor respecto del grupo control. Además, el grupo de casos presentó un porcentaje de espermatozoides con morfología normal significativamente menor en relación al grupo control ( $p = 0,0005$ ). Al contrario, no se observaron diferencias en el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva ( $p = 0,3612$ ), vitalidad ( $p = 0,2343$ ), días de abstinencia ( $p = 0,0988$ ) y volumen seminal ( $p = 0,8412$ ) entre casos y controles. Además del recuento espermático normal entre los controles, la motilidad y vitalidad espermática estuvo dentro de los rangos de referencia normal (motilidad grado A,  $> 32\%$  y vitalidad  $\geq 58\%$ ) y solo el 15% de los controles presentó un volumen seminal inferior a 1,5 mL y el 50% presentó espermatozoides con morfología normal menor al 4%.

**Tabla 4.** Parámetros seminales

	Controles	Casos	Valor p
<b>Concentración espermática (millones/mL)</b>	92,1 [66,4-153,5]	11,0 [7,0-13,1]	<0,0001
<b>Cantidad total de espermatozoides (millones/eyaculado)</b>	252,9 [222,0-328,4]	26,4 [16,8-39,0]	<0,0001
<b>Motilidad grado A (%)</b>	66,0 [44,5-72,0]	64,0 [33,0-70,0]	0,3612
<b>Morfología (%)</b>	3,5 [3,0-5,0]	1,0 [0,0-3,0]	0,0005
<b>Vitalidad (%)</b>	87,0 [83,5-89,5]	84,0 [76,0-90,0]	0,2343
<b>Días de abstinencia</b>	4,0 [3,0-5,0]	3,0 [3,0-4,0]	0,0988
<b>Volumen seminal (mL)</b>	2,7 [1,8-4,0]	2,6 [2,0-3,6]	0,8412

Datos expresados como mediana [percentil 25-percentil 75]

#### 8.4 Parámetros hormonales

Los niveles de FSH, LH, testosterona total y la razón testosterona/LH (T/LH) en 20 sujetos del grupo de casos y en los 20 sujetos del grupo control se muestran en la Tabla 5. Se observó aumento significativo para los niveles séricos de LH ( $p=0,024$ ) entre casos y controles y no hubo diferencia estadística en cuanto a los niveles séricos de FSH ( $p=0,7735$ ), testosterona total ( $p=0,2384$ ) y la razón T/LH ( $p=0,1143$ ) entre los grupos. En relación a los niveles hormonales, un 30% de los casos presentó un nivel sérico de FSH superior a los valores de referencia y, tanto para el nivel de LH como para el de testosterona total, un 5% de este grupo presentó niveles que sobrepasan los valores de referencia. Si bien, no se observaron diferencias significativas entre casos y controles en el nivel de FSH y Testosterona total, el 40%, 50% y 25% de los casos presentó niveles de FSH, LH y testosterona superiores al percentil 75 del valor de los controles, respectivamente.

**Tabla 5.** Parámetros hormonales

	<b>Controles</b>	<b>Casos</b>	<b>Valor p</b>
<b>FSH (mUI/mL)</b>	3,2 [2,6-3,8]	3,1 [2,1-8,3]	0,7735
<b>LH (mUI/mL)</b>	2,4 [1,7-3,9]	3,9 [2,9-5,2]	0,024
<b>Testosterona total (ng/mL)</b>	2,6 [1,9-3,6]	2,8 [2,4-3,8]	0,2384
<b>Razón T/LH</b>	3,5 [2,2-5,7]	2,7 [2,3-3,3]	0,1143

Datos expresados como mediana [percentil 25-percentil 75]. Valores de referencia. FSH 2-8 (mUI/mL), LH 1-8 (mUI/mL) y testosterona total 1-7 (ng/mL).

## **8.5 Cuantificación del nivel de expresión del transcrito de *LIN28B* y miRNAs *let-7a* y *let-7c* en RNA de espermatozoides de casos y controles**

### **8.5.1 Purificación de espermatozoides y extracción de RNA**

La cuantificación de la abundancia de transcritos de *LIN28B* se midió en RNA extraído de espermatozoides de los sujetos casos y controles. Con el fin de evitar la contaminación de transcritos de otros tipos celulares presentes en el semen se realizó una purificación de espermatozoides a través de un gradiente de densidad (PureSperm 40®, Nidacon) para separar los espermatozoides de las células somáticas (leucocitos y células epiteliales) obteniendo una muestra enriquecida en espermatozoides. El porcentaje de recuperación de espermatozoides posterior al gradiente fue del 68,6% [p25. 60,5% - p75. 75,8%] en las muestras de los casos y del 87,5% [80,3% - 95,3%] en las muestras de los controles. La disminución del recuento de células redondas posterior al gradiente fue 88,6% [80,7% - 95,4%] y del 90,7% [83,4% - 95,4%] para casos y controles, respectivamente, obteniéndose una relación de  $37,7 \times 10^{-4}$  [ $24,8 \times 10^{-4}$  -  $78,1 \times 10^{-4}$ ] y de  $3 \times 10^{-4}$  [ $2 \times 10^{-4}$  -  $6,5 \times 10^{-4}$ ] por millón de espermatozoides para casos y controles, respectivamente.

En relación a la extracción de RNA de los espermatozoides recuperados, se recuperó 712 ng de RNA [548 - 1304] en las muestras de casos y 2683 ng [1876 - 3646] en las muestras de controles.

### **8.5.2 Cuantificación del RNA mensajero de *LIN28B* en espermatozoides aislados del semen**

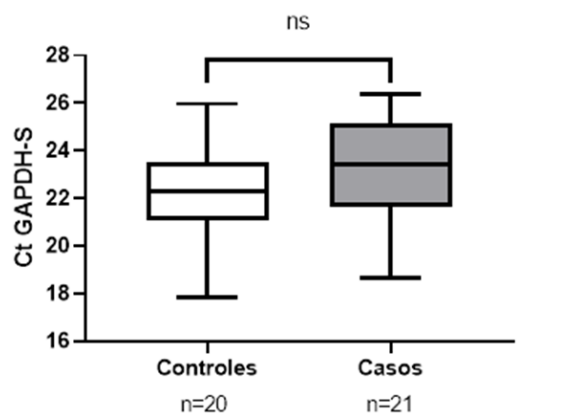
Previamente en la Unidad de Andrología Molecular y Reproductiva se determinaron las eficiencias de las reacciones de amplificación por qPCR para el transcrito de *LIN28B* y de *GAPDH-S* mediante la amplificación de cinco diluciones seriadas de cDNA (125 ng/ $\mu$ L - 7,81 ng/ $\mu$ L) obtenido a partir de RNA total de testículo con espermatogénesis conservada. Las eficiencias de las reacciones de amplificación fueron de 101,2% con un  $R^2$  de 0,983 para la amplificación del transcrito de *LIN28B*, y de 86,4% con un  $R^2$  de 0,93 para el transcrito de *GAPDH-S*. Por otra parte, se evaluó la expresión de los transcritos de *LIN28B* y *GAPDH-S* en cDNA de espermatozoides, cDNA de tejido testicular con espermatogénesis conservada, cDNA de leucocitos y DNA masculino de sangre periférica obteniéndose amplificación solo en cDNA de espermatozoides y cDNA de tejido testicular con espermatogénesis conservada.

La cuantificación del transcrito de *LIN28B* y del gen de referencia *GAPDH-S* se realizó por el método de PCR en tiempo real metodología con SYBR Green calculando la expresión relativa del transcrito de *LIN28B* de cada muestra respecto de la expresión de *GAPDH-S* mediante la fórmula  $2^{\Delta Ct}$ , donde 2 se deriva de asumir una eficiencia del 100% para la reacción tanto para el gen de referencia como para el gen de interés, y esto significa una duplicación de la cantidad de templado respecto al ciclo anterior, y  $\Delta Ct$  corresponde a la diferencia entre el valor de Ct del gen referencia y el valor de Ct del gen de interés (34). Finalmente, la expresión relativa del transcrito de *LIN28B* se calculó como  $2^{(Ct_{GAPDH-S} - Ct_{LIN28B})}$ .

Las reacciones se realizaron en triplicado para cada muestra. En cada experimento se utilizó igual número de casos y controles para la amplificación de *GAPDH-S*, y respecto a los experimentos de

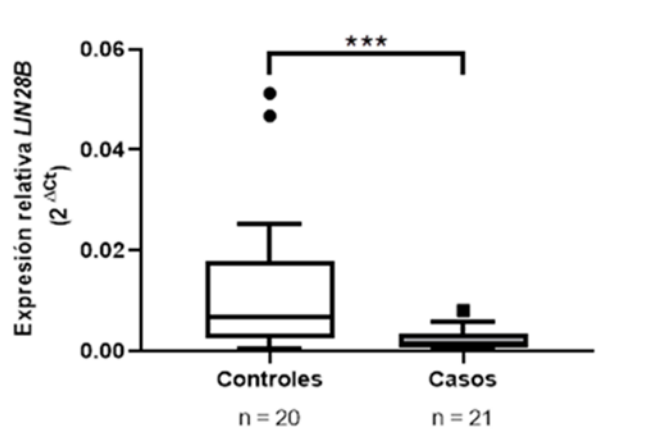
amplificación de *LIN28B* se utilizó un número similar de casos y controles cercano al 50%. En las reacciones de amplificación de *GAPDH-S* se eliminó un 1,6% de los replicados y el 19,2% de los replicados en las reacciones de amplificación de *LIN28B* debido a que presentaban una desviación estándar mayor a 0,5.

En relación a la amplificación del transcrito de *GAPDH-S*, se obtuvo un Ct promedio de 23,11 en casos y de 22,20 controles, respectivamente, no mostrando diferencias entre casos y controles ( $p=0,133$ ) (figura 2).



**Figura 2.** Valor de Ct de *GAPDH-S*. (ns:  $p=0,133$ )

Respecto a la amplificación del transcrito de *LIN28B*, se obtuvo un Ct promedio de 32,48 en casos y de 29,47 en controles. Los niveles de expresión relativa de *LIN28B* fueron determinados en 21 casos y 20 controles observándose una disminución significativa en el grupo de casos comparados con los controles ( $p=0,0003$ ) (figura 3).



**Figura 3.** Expresión relativa de *LIN28B*. (\*\*\*)  $p=0,0003$

### 8.5.3 Cuantificación de los miRNAs *let-7a* y *let-7c* en espermatozoides aislados de semen

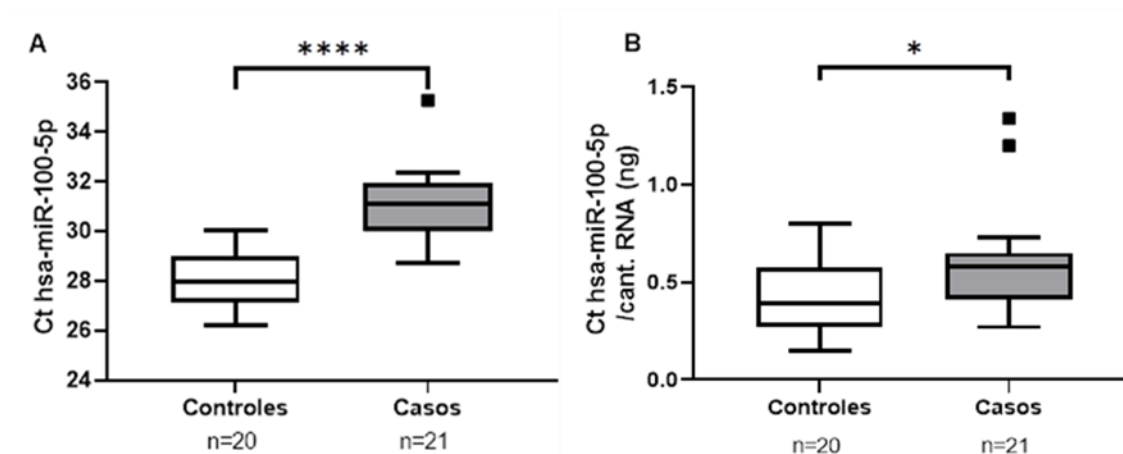
La cuantificación de los miRNAs *let-7a* y *let-7c* se realizó por PCR en tiempo real con ensayos TaqMan® en reacciones en triplicado para cada muestra y en cada experimento se utilizó un número similar de casos y controles cercano al 50% tanto para la amplificación de *let-7a* como para la de *let-7c*.

Se evaluó la especificidad de las sondas TaqMan® para la amplificación de los miRNAs *let-7a*, *let-7c* y hsa-miR-100-5p utilizando RNA espermático, DNA de leucocitos y cDNA sintetizado a partir de miRNA espermático, obteniéndose amplificación solo con cDNA de miRNA espermático.

De acuerdo a la bibliografía, se seleccionó a los miRNAs 100-5p y 30a-5p como controles internos para la corrección por posibles diferencias en la cantidad de RNA utilizado en la síntesis de cDNA o en la propia eficiencia de la reacción de transcripción reversa. El nivel de amplificación (Ct) de hsa-miR-100-5p y el valor de Ct corregido por la cantidad de RNA fue diferente entre casos y controles ( $p<0,0001$ ) y ( $p=0,025$ ), respectivamente (figura 4A y 4B). Por otra parte, se observó una correlación inversa entre la cantidad de RNA utilizada para la síntesis y el valor de Ct de hsa-miR-100-5p ( $r=-$



0,437;  $p=0,004$ ) sugiriendo que la reacción es cuantitativa. Dado estos resultados no se pudo utilizar la cuantificación de la expresión de hsa-miR-100-5p como control interno.

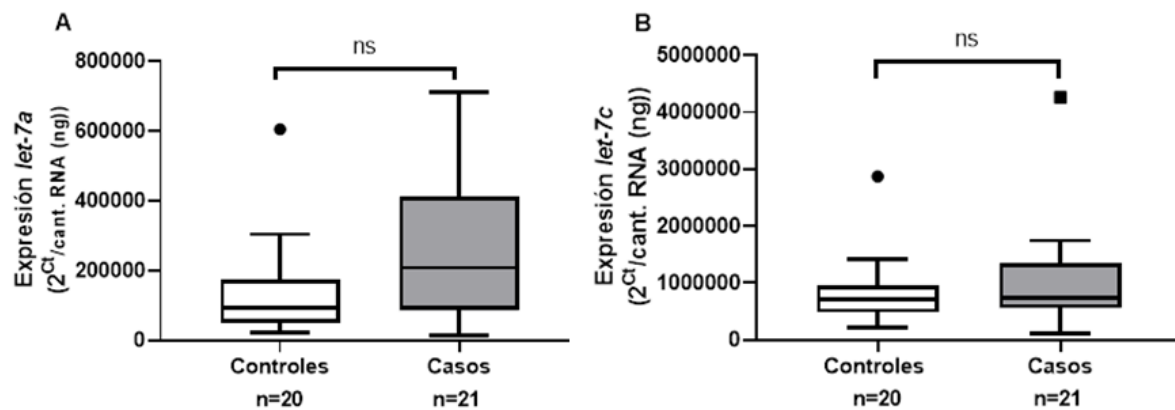


**Figura 4.** Valor de Ct de hsa-miR-100-5p. (A) valor de Ct de hsa-miR-100-5p y (B) valor de Ct de hsa-miR-100-5p corregido por la cantidad de RNA (ng). (\*  $p=0,025$  ; \*\*\*\*  $p<0,0001$ )

En el caso de la amplificación del miRNA 30a-5p no se observó amplificación ninguna de las muestras de casos y controles analizadas ( $n=14$ ). Dado que la expresión de este RNA está descrita en espermatozoides (24,25,33), especulamos que la falta de amplificación se debe a un defecto en la calidad del reactivo. Consecuentemente, se espera repetir estos experimentos con un nuevo lote del reactivo comercial (ensayo TaqMan® Advanced miRNA hsa-30a-5p, 479448\_mir).

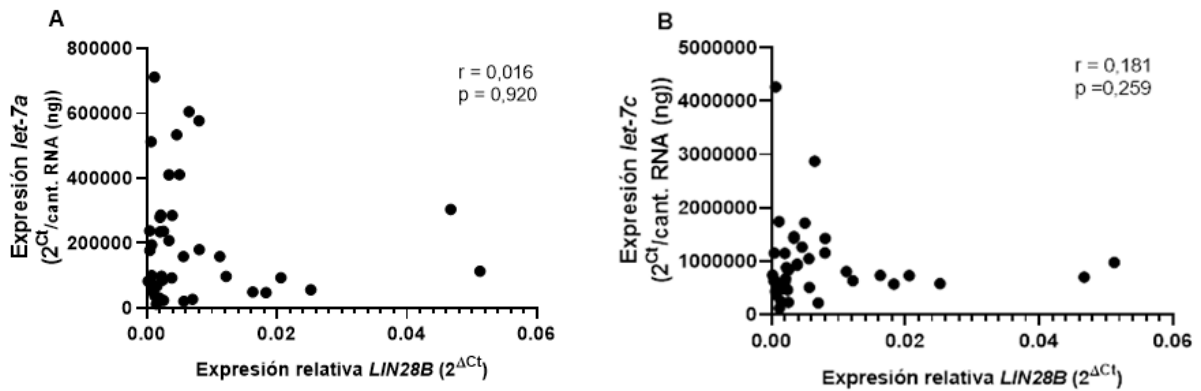
En relación a la amplificación de *let-7a*, se obtuvo un Ct promedio de 23,13 en casos y de 22,77 en controles. Además, se eliminó un 1,6% de los replicados debido a que presentaban una desviación estándar mayor a 0,5. Respecto a la amplificación de *let-7c*, se obtuvo un Ct promedio de 25,4 en casos y de 25,6 en controles, y se eliminó un 5,7% de los replicados debido a que presentaban una desviación estándar mayor a 0,5.

Debido a la falta de amplificación confiable de un normalizador de la expresión de *let-7a* y *let-7c*, se decidió normalizar el nivel de amplificación ( $2^{Ct}$ ) por la cantidad de RNA utilizado en la reacción de síntesis del cDNA para comparar entre casos y controles. Los niveles de expresión de *let-7a* fueron determinados en ambos grupos observándose un aumento en la expresión en casos comparados con controles que no alcanzó significancia ( $p=0,074$ ) (figura 5A). En cuanto a los niveles de expresión de *let-7c*, se observó una tendencia al aumento en la expresión en el grupo de casos respecto al grupo control que no alcanzó significancia estadística ( $p=0,372$ ) (figura 5B).



**Figura 5.** Expresión de *let-7a* y *let-7c*. (A) expresión de *let-7a* normalizada por la cantidad de RNA ( $p=0,074$ ) y (B) expresión de *let-7c* normalizada por la cantidad de RNA ( $p=0,372$ ) (ns:  $p>0,05$ ).

Con el fin de evaluar la retroalimentación del eje *LIN28B/let-7* se analizó la correlación entre los niveles de expresión del transcrito de *LIN28B*, y la expresión de *let-7a* y *let-7c*, mediante la prueba de correlación de Spearman. Contrario a lo esperado no existió una correlación entre los niveles de expresión *LIN28B* y *let-7a* ( $r=-0,016$ ;  $p=0,920$ ) (figura 6A), y tampoco entre la expresión del transcrito de *LIN28B* y *let-7c* ( $r=-0,181$ ;  $p=0,259$ ) (figura 6B).



**Figura 6.** Correlaciones entre la expresión del transcrito de *LIN28B*, y la expresión *let-7a* y *let-7c*. (A) Correlación entre la expresión de *LIN28B* y *let-7a* y (B) correlación entre la expresión de *LIN28B* y *let-7c*.

## 8.6 Correlaciones entre *LIN28B*, *let-7a* y *let-7c* y antecedentes clínicos, parámetros seminales y hormonales

### 8.6.1 Correlación entre *LIN28B*, *let-7a* y *let-7c* y antecedentes clínicos

Se analizó la correlación entre el nivel de expresión del transcrito de *LIN28B* y los antecedentes clínicos, edad e índice de masa corporal (IMC), en el total de sujetos, los cuales se muestran en la Tabla 6. No se observó correlación entre el nivel de expresión de este gen y la edad e IMC de los sujetos.

Se analizó la correlación entre la expresión de *let-7a* y *let-7c* y la edad e IMC, las cuales se muestran en la Tabla 6. No se observó correlación entre la expresión de *let-7a* y *let-7c* y la edad e IMC de los sujetos.

**Tabla 6.** Correlaciones entre *LIN28B*, *let-7a* y *let-7c* y antecedentes clínicos

		Edad (Años)	Índice de masa corporal (Kg/m <sup>2</sup> )
<b><i>LIN28B</i></b>	Coefficiente de correlación (r)	0,064	-0,104
	Valor p	0,691	0,523
<b><i>Let-7a</i></b>	Coefficiente de correlación (r)	0,102	0,172
	Valor p	0,528	0,289
<b><i>Let-7c</i></b>	Coefficiente de correlación (r)	0,124	-0,005
	Valor p	0,438	0,973

### 8.6.2 Correlación entre *LIN28B*, *let-7a* y *let-7c* y parámetros de la calidad seminal

Se analizó la correlación entre el nivel de expresión del transcrito de *LIN28B* y los principales parámetros de la calidad seminal, cuyos resultados se muestran en la Tabla 7. Se observó una correlación directa entre el nivel de expresión de *LIN28B*, la concentración espermática ( $r=0,494$ ;  $p=0,001$ ), la cantidad total de espermatozoides ( $r=0,517$ ;  $p=0,0005$ ) y la morfología ( $r=0,540$ ;  $p=0,0003$ ).

Las correlaciones entre los niveles de expresión de *let-7a* y *let-7c* y los principales parámetros de la calidad seminal se muestran en la Tabla 7. Se observó una correlación inversa entre la expresión de *let-7a*, la concentración espermática ( $r=-0,331$ ;  $p=0,035$ ) y la cantidad total de espermatozoides ( $r=-0,410$ ;  $p=0,008$ ), y se observó una correlación inversa entre la expresión de *let-7c* y la concentración espermática ( $r=-0,309$ ;  $p=0,049$ ).

**Tabla 7.** Correlaciones entre *LIN28B*, *let-7a* y *let-7c* y parámetros seminales

		Concentración espermática (millones/mL)	Cantidad total de espermatozoides (millones/eyaculado)	Motilidad grado A (%)	Morfología (%)
<i>LIN28B</i>	Coefficiente de correlación (r)	0,494	0,517	0,187	0,540
	Valor p	0,0010	0,0005	0,243	0,0003
<i>Let-7a</i>	Coefficiente de correlación (r)	-0,331	-0,410	-0,045	-0,007
	Valor p	0,035	0,008	0,782	0,966
<i>Let-7c</i>	Coefficiente de correlación (r)	-0,309	-0,276	0,076	0,043
	Valor p	0,049	0,081	0,635	0,791

### **8.6.3 Correlación entre *LIN28B*, *let-7a* y *let-7c* y niveles hormonales**

Se analizó la correlación entre la expresión del transcrito de *LIN28B*, los niveles séricos de las hormonas implicadas en la espermatogénesis y la razón T/LH, los cuales se muestran en la Tabla 8. Se observó una correlación inversa entre la expresión de este gen y el nivel sérico de testosterona total ( $r=-0,323$ ;  $p=0,042$ ).

Se analizó la correlación entre la expresión de *let-7a* y *let-7c* y los niveles séricos de FSH, LH, testosterona total y la razón T/LH, los cuales se muestran en la Tabla 8. No se observó correlación entre la expresión de *let-7a* y *let-7c*, y los niveles séricos de FSH, LH, testosterona total y la razón T/LH.

**Tabla 8.** Correlaciones entre *LIN28B*, *let-7a* y *let-7c* y parámetros hormonales

		FSH (mUI/mL)	LH (mUI/mL)	Testosterona total (ng/mL)	Razón T/LH
<b><i>LIN28B</i></b>	Coefficiente de correlación (r)	0,108	-0,268	-0,323	0,135
	Valor p	0,507	0,095	0,042	0,407
<b><i>Let-7a</i></b>	Coefficiente de correlación (r)	-0,048	0,135	0,074	-0,025
	Valor p	0,767	0,406	0,650	0,879
<b><i>Let-7c</i></b>	Coefficiente de correlación (r)	0,175	0,244	0,118	-0,103
	Valor p	0,281	0,130	0,467	0,526

Se analizó la existencia de correlaciones entre la expresión del transcrito de *LIN28B*, testosterona total y razón T/LH de forma independiente entre casos y controles, los cuales se muestran en la Tabla 9. No se observó correlación entre la expresión del transcrito de *LIN28B*, testosterona total y razón T/LH en casos, y tampoco se observó correlación en controles entre la expresión del transcrito de *LIN28B*, testosterona total y razón T/LH.

**Tabla 9.** Correlaciones entre *LIN28B*, testosterona total y razón T/LH separado por casos y controles

		Testosterona total (ng/mL)	Razón T/LH
<b><i>LIN28B</i> casos</b>	Coefficiente de correlación (r)	-0,225	0,276
	Valor p	0,341	0,239
<b><i>LIN28B</i> controles</b>	Coefficiente de correlación (r)	-0,295	-0,146
	Valor p	0,207	0,540

## 9. Discusión

El objetivo principal de esta tesis fue estudiar los niveles de expresión del eje *LIN28B/let-7* en espermatozoides de sujetos con concentración espermática disminuida y sujetos con concentración normal que consultan por infertilidad masculina, y correlacionar el nivel de expresión del mRNA de *LIN28B* y los miRNAs *let-7a* y *let-7c* con los parámetros hormonales y seminales en los mismos sujetos. Los resultados muestran una menor expresión relativa de *LIN28B* en espermatozoides de hombres con baja concentración espermática comparado con controles con concentración normal, y correlaciones directas entre la expresión de este gen y parámetros de la calidad seminal como la concentración espermática y la cantidad total de espermatozoides. Respecto a la expresión de *let-7a* se observaron niveles más altos en casos comparado a controles que no alcanzaron la significancia estadística. En este sentido se observaron correlaciones inversas entre la concentración espermática y la expresión de *let-7a* y *let-7c*, al igual que entre *let-7a* y la cantidad total de espermatozoides.

En relación al inicio de la pubertad auto-informada, no se observaron diferencias significativas entre casos y controles respecto a la edad a la cual ocurrió su pubertad, ni en relación a sus pares. Esto contrasta con los resultados de estudios realizados en Dinamarca, donde un retraso en el momento de la pubertad se asoció con una disminución de la calidad seminal principalmente relacionado con una menor concentración espermática y cantidad total de espermatozoides (21,22). A diferencia de nuestros sujetos, los hombres estudiados en los trabajos citados son jóvenes de alrededor de 20 años de edad, lo cual hace más probable que recuerden con mayor precisión la edad de los primeros eventos puberales como aumento del tamaño testicular, aparición del vello púbico y edad de quebramiento de la voz, entre otros.

Como era de esperar, se observaron diferencias significativas respecto a la concentración espermática y la cantidad total de espermatozoides entre casos y controles, ya que estos parámetros fueron

utilizados para clasificar a los sujetos participantes. También, se obtuvo una diferencia significativa respecto al porcentaje de morfología espermática normal entre grupos. Debido a que los sujetos del grupo de casos ya presentan una alteración en la espermatogénesis evidenciada por la disminución de espermatozoides es probable que también afecte otros parámetros de la calidad seminal como la morfología.

En relación a los parámetros hormonales, solo se obtuvo un aumento significativo en el nivel sérico de LH en los casos respecto de los controles, a pesar de ello como se mencionó en la sección anterior una alta proporción de los casos tienen niveles de FSH y LH mayores al percentil 75 del grupo control. Esta observación apoya el origen secretor de la oligozoospermia en nuestros casos. Respecto a la razón T/LH se obtuvieron cocientes menores en casos respecto de controles que si bien no alcanzan la significancia sugiere un grado de disfunción compensada de la célula de Leydig, característica que se ha descrito en pacientes con falla espermatogénica comprobada por biopsia testicular (35). También, el grupo de casos presenta una tendencia hacia niveles más altos de FSH que el grupo control, sugiriendo que la disminución de la concentración y/o cantidad total de espermatozoides observada en este grupo tendría un origen secretor y no obstructivo. En este sentido, trabajos previos de nuestro laboratorio han demostrado que los sujetos con falla espermatogénica menos severa, como la hipoespermatogénesis y la detención de la maduración, presentan niveles de gonadotrofinas levemente mayores que sujetos con espermatogénesis normal (35).

Como se mencionó anteriormente, *Lin28b* se expresa ampliamente durante el desarrollo embrionario murino y su expresión se restringe a tejidos específicos en la etapa adulta. En roedores se ha demostrado su expresión en hipotálamo, hipófisis, testículo y músculo esquelético, entre otros (2,3) y en humanos *LIN28B* se expresa principalmente en hipotálamo, hipófisis y testículo (19). Respecto a la localización de la proteína Lin28b en testículo de ratón adulto se observó en espermátidas redondas y



elongadas, y en las células de Leydig (2). Por el contrario no se encontraron reportes que permitan conocer la localización de la proteína LIN28B en testículo humano. En relación a la expresión en otros tejidos humanos se ha documentado la expresión tanto del transcrito como de la proteína de LIN28B en placenta (36). Asimismo, *LIN28B* se expresa en el sistema hematopoyético, específicamente en células madre hematopoyéticas de origen fetal (HSC), pero no se expresa en HSC adultas (37).

En relación al rol de *LIN28B*, se ha estudiado en líneas de trofoblasto humano a través de los cambios de expresión de LIN28B. En la línea celular HTR8/Svneo se indujo una sobreexpresión transitoria de LIN28B luego de transfectar las células con un plásmido, obteniéndose un aumento en la migración y proliferación celular respecto al grupo control (36). En la línea celular ACH-3P se indujo una disminución LIN28B mediante RNA de interferencia (shRNA) y se demostró que la expresión LIN28B es necesaria para mantener un estado de menor diferenciación en dicha células (38). Al igual que en humanos *Lin28b* también se expresa solamente en HSC fetales de ratón, y se demostró que este gen es capaz de reprogramar HSC de medula ósea adulta de ratón para que adquieran características de tipo fetal (37). Estos resultados apoyan el rol de *LIN28B* como regulador de diferentes procesos celulares como la proliferación y la pluripotencia a través de su interacción con miRNAs y mRNAs.

Nuestros resultados de expresión relativa del transcrito de *LIN28B* en espermatozoides muestran una disminución significativa de su expresión en el grupo de casos respecto al grupo control. En este sentido se demostró que la disminución de la expresión del mRNA *LIN28B* en la línea celular JEG-3 derivada de coriocarcinoma disminuyó significativamente la proliferación celular (36). Además, esto concuerda con múltiples estudios en cáncer que han demostrado que el aumento de expresión de *LIN28B* promueve la proliferación celular (7). Basado en los resultados, una disminución en la expresión de *LIN28B* en las células germinales del testículo se asociaría con la disminución de la

proliferación de las células espermatogénicas y en consecuencia podría disminuir la cantidad de espermatozoides producidos.

Dado el grado de compactación de la cromatina se piensa que los espermatozoides son transcripcionalmente inactivos y que los mRNAs presentes son remanentes de los mRNAs provenientes de las células germinales espermatogénicas. Sin embargo, se ha demostrado que existen zonas en el DNA donde se mantienen las proteínas histonas, lo que da lugar a zonas de cromatina más laxa, a la cual se pueden unir factores de transcripción (39, 40). Por lo tanto se requiere de investigación para dilucidar si los RNAs presentes en los espermatozoides provienen exclusivamente de células precursoras o también pueden haber sido transcritos en los espermatozoides.

Como era de esperar se obtuvieron correlaciones directas entre el nivel de expresión de *LIN28B*, la concentración espermática y la cantidad total de espermatozoides. Estos resultados, coinciden con la asociación entre la expresión de *LIN28B* y el aumento en la proliferación mencionado anteriormente (7). Además, se obtuvo una correlación directa entre la expresión de *LIN28B* y la morfología espermática, este hallazgo debe ser estudiado ya que no existe información sobre la asociación entre la morfología y el nivel de expresión de *LIN28B* en espermatozoides. Alternativamente, el significado de esta correlación puede entenderse como un hallazgo indirecto dado que las muestras de semen con baja concentración espermática presentan en una alta frecuencia deficiencias en los otros parámetros seminales como la morfología (41).

Se evaluó la existencia de correlaciones entre el nivel de expresión transcripcional de *LIN28B* y los niveles séricos de testosterona, FSH, LH y razón T/LH. En lo que respecta al nivel de expresión del transcrito de *LIN28B* en espermatozoides, se obtuvo una correlación inversa entre este y el nivel de testosterona. De acuerdo con lo reportado en la literatura, Leinonen y cols., en un primer estudio

identificaron que el SNP, rs7759938, cercano a *LIN28B*, asociado a cambios compatibles con el retraso de la pubertad, muestra un aumento significativo en la expresión del mRNA de *LIN28B* en hipotálamo e hipófisis asociado al genotipo CC para este SNP (19). En una revisión posterior a este estudio de la base de datos GTEx se observó una disminución significativa del mRNA de *LIN28B* en testículo asociado al genotipo CC para rs7759938 (20). En un segundo estudio, Leinonen y cols. utilizaron los datos del biobanco del Reino Unido para estudiar la correlación entre el SNP rs7759938 y los niveles séricos de testosterona, los resultados mostraron que el alelo C en rs7759938 estaba fuertemente asociado con niveles séricos de testosterona significativamente más bajos, y a partir de resultados vinculan un mayor expresión de *LIN28B* en hipotálamo e hipófisis con niveles más bajos de testosterona (10). De igual forma se puede vincular una menor expresión de *LIN28B* en testículo con niveles más bajos de testosterona, es decir, una asociación directa entre la expresión testicular de *LIN28B* y el nivel de testosterona, lo que difiere de la correlación inversa observada en este estudio.

Si bien no se conoce el rol de *LIN28B* en la esteroidogénesis, Leinonen y cols. utilizando los datos de GTEx buscaron correlaciones entre la expresión de *LIN28B* y genes relacionados a hormonas en hipotálamo e hipófisis, y observaron que la expresión de *LIN28B* se correlaciona directamente con la expresión del receptor de andrógenos (AR) y el receptor de estrógeno 1 (ESR1) en hipotálamo, genes que promueven la maduración sexual (10). Además, en modelos de ratas adultas hipofisectomizadas se observó una disminución significativa de la expresión de *Lin28b* respecto a ratas control. Posteriormente, el tratamiento de las ratas hipofisectomizadas con FSH o FSH y gonadotropina coriónica humana (hGC) recupera parcialmente la expresión de *Lin28b* (6), sugiriendo algún tipo de control de la expresión *Lin28b* por las gonadotrofinas. En este sentido, Gaytan y cols. (2) a través de la administración de hGC y FSH a ratones machos con hipogonadismo hipogonadotrópico (*Gpr54* KO) lograron recuperar la expresión de la proteína *Lin28b* a nivel testicular proponiendo que la expresión de *Lin28b* en testículo estaría regulada por gonadotrofinas.

LIN28B se ha descrito como una proteína de unión al RNA que tendría un rol como supresor de la biogénesis de miRNAs de la familia *let-7* y posiblemente otros RNAs. Con el fin de determinar el estado de la expresión del eje *LIN28B/let-7* en sujetos con disminución de la calidad seminal se propuso cuantificar la expresión de dos miRNAs representativos de esa familia, *let-7a* y *let-7c* en espermatozoides de sujetos con oligozoospermia y en sujetos con concentración espermática normal. Estudios anteriores como el de, Mokánszki y cols. (26) observaron un aumento en la expresión de *let-7a* en espermatozoides de sujetos oligozoospermicos respecto de normozoospermicos y Abu-Halima y cols. (25) un aumento en la expresión de *let-7c* en los espermatozoides de hombres oligoastenoospermicos con respecto a controles. En la presente tesis se observó una tendencia a mayor expresión de *let-7a* en casos respecto a controles que a pesar de no alcanzar la significancia coincide con lo reportado por los investigadores mencionados.

Una limitación de este resultado es la falta de un miRNA control interno para normalizar la expresión de los miRNAs de estudio. Dado que miR-100-5p, mostró diferencias significativas en su expresión entre casos y controles no pudo ser utilizado para la normalización. De acuerdo con la revisión bibliográfica realizada hsa-miR-100-5p se expresó consistentemente en todas las muestras analizadas (n=10) por Salas-Huetos y cols. (24). Abu-Halima y cols. (25) reportaron la expresión de hsa-mir-100-5p en espermatozoides de hombres astenoospermicos y oligoastenoospermicos (n=18), sin diferencias significativas en su expresión. Principalmente la selección de hsa-miR-100-5p y hsa-30a-5p se basó en lo expuesto por Corral-Vazquez y cols. (33), quienes buscaban normalizadores para experimentos de qRT-PCR de miRNAs en espermatozoides humanos. Para ello utilizaron los datos de expresión de miRNAs de espermatozoides de 48 sujetos, donde se incluyeron sujetos fértiles y sujetos con diferentes alteraciones de la calidad seminal. Estos investigadores probaron 4 miRNAs como normalizadores comparándolos con su método de normalización de referencia *Mean-Centering Restricted* (MCR), obteniendo resultados confiables utilizando hsa-miR-100-5p o hsa-miR-30a-5p, sin

embargo mencionan que la utilización simultanea de estos miRNAs corresponde a la mejor forma de normalización.

Debido a las dificultades presentadas para normalizar la expresión de *let-7a* y *let-7c*, nos propusimos buscar un nuevo miRNA que pueda cumplir esta función. De acuerdo con los resultados de Mokánszki y cols. (26), no se observaron diferencias significativas para la expresión normalizada de miR-16, miR-181a y miR-449a en espermatozoides entre grupos, además miR-16 fue el único de estos tres miRNAs que no presentó una correlación significativa entre su expresión y la concentración espermática. Respecto a miR-16 se expresó consistentemente en todas las muestras analizadas (n=10) por Salas-Huetos y cols. (24). En un segundo estudio del mismo grupo donde se amplió el número de sujetos (n=40), se incluyeron sujetos con oligozoospermia, astenozoospermia y teratozoospermia pura y se evaluó la expresión diferencial de miRNAs entre estos grupos respecto al grupo control, miR-16-5p no se expresó diferencialmente (42). Sin embargo, Abu-Halima y cols. (25) utilizando un *microarray* para perfiles de miRNAs observaron que miR-16-5p presentaba una expresión disminuida en hombres oligoastenozoospermicos respecto de controles, la cual fue confirmada mediante qPCR. A pesar de la discordancia presente en la literatura sobre si existe diferencias en la expresión de miR-16 entre sujetos fértiles e infértiles, y debido a la dificultad que presenta la búsqueda de miRNAs que puedan ser utilizados como normalizadores de expresión, pensamos que miR-16-5p podría ser utilizado como normalizador pero esto deberá comprobarse experimentalmente.

Al evaluar la correlación entre la expresión del transcrito de *LIN28B* y la expresión de *let-7a* y *let-7c*, no se observaron correlaciones significativas entre la expresión de *LIN28B* y *let-7a*, y tampoco entre la expresión de *LIN28B* y *let-7c*, esto difiere de la correlación inversa esperada entre estas variables que se sustenta en la retroalimentación negativa del eje *LIN28B* /*let-7* descrita previamente (7, 43) y del estudio de McWorther y cols. (44), quienes estudiaron los efectos de la disminución de la expresión

del transcrito *LIN28B* en la línea celular de trofoblasto humano ACH-3P y obtuvieron un aumento significativo en la expresión de *let-7c*, corroborando la regulación de *LIN28B* sobre la expresión de estos miRNAs.

Se observó una correlación inversa entre la concentración espermática, cantidad total de espermatozoides y la expresión de *let-7a*, esto coincide con el hallazgo de Mokánszki y cols. de una correlación inversa entre la expresión de *let-7a* y la concentración espermática (26). También observamos una correlación inversa entre *let-7c* y la concentración espermática, si bien no existen reportes previos que permitan contrastar esta correlación, esta coincide con las correlaciones entre *let-7a* y los parámetros de la calidad seminal observadas en esta tesis, y también con Krsnik y colaboradores (43) que asocian un aumento en la expresión de *let-7* con una disminución de la expresión de genes asociados a la proliferación celular.

Respecto a la correlación entre los parámetros hormonales y la expresión de *let-7a* y *let-7c*, no se observaron correlaciones significativas. Así como la expresión de *Lin28b* se vio afectada en modelo de ratas hipofisectomizadas con tratamiento de gonadotropinas, estudios previos reportan un aumento significativo en la expresión de *let-7a* y *let-7b* a nivel testicular en aquellas ratas hipofisectomizadas que recibieron tratamiento con FSH, hGC o en conjunto FSH y hGC respecto al grupo control y a ratas hipofisectomizadas sin reemplazo hormonal (6). Esto permite sugerir que existe una regulación de la expresión de los miembros de la familia *let-7* por gonadotrofinas. Basados en la retroalimentación negativa del eje *LIN28B/let-7* y a la correlación inversa entre la expresión de *LIN28B* y los niveles de testosterona, era al menos esperable una correlación directa entre la expresión de *let-7a* y *let-7c* y los niveles de esta hormona.

## 10. Conclusión

En el presente estudio, pudimos determinar una disminución de la expresión transcripcional del gen *LIN28B* en espermatozoides de hombres oligozoospermicos respecto a la expresión en espermatozoides de hombres con concentración espermática normal, y establecer correlaciones directas entre la expresión de este gen, la concentración espermática y la cantidad total de espermatozoides. Debido a la falta de un normalizador confiable para evaluar la expresión de *let-7a* y *let-7c* se decidió normalizar el nivel de amplificación ( $2^{Ct}$ ) por la cantidad de RNA utilizado en la reacción de síntesis del cDNA y así comprobar los objetivos planteados que tienen relación con la expresión de *let-7a* y *let-7c*. Se destacan que si bien la expresión de *let-7a* y *let-7c* en espermatozoides de hombres oligozoospermicos respecto a la expresión en espermatozoides de hombres con concentración espermática normal no alcanzaron la significancia estadística, se establecieron correlaciones inversas entre la expresión de *let-7a* y *let-7c* y parámetros del semen como concentración espermática y cantidad total de espermatozoides. En síntesis se evidenció una desregulación de la expresión del eje *LIN28B/let-7* mediante la disminución en la expresión del transcrito de *LIN28B* en sujetos con oligozoospermia pura o combinada, se correlacionó la expresión de *LIN28B* y la expresión de *let-7a* y *let-7c* con parámetros seminales como la concentración espermática y la cantidad total de espermatozoides, y se evaluó la existencia de correlaciones con hormonas involucrada en la espermatogénesis, existiendo solo correlación entre la expresión de *LIN28B* y el nivel sérico de testosterona.

Esperamos que el estudio de la expresión génica de *LIN28B* y de la familia *let-7* en espermatozoides continúe para un mejor entendimiento de su interacción con los parámetros de la calidad seminal y la hormonas implicadas en la espermatogénesis, y asimismo este contribuya a validar su posible utilización en clínica como biomarcadores no invasivos de infertilidad.

## 11. Bibliografía

1. Piskounova E, Polytarchou C, Thornton James E, LaPierre Robert J, Pothoulakis C, Hagan John P, et al. Lin28A and Lin28B Inhibit let-7 MicroRNA Biogenesis by Distinct Mechanisms. *Cell*. 2011; 147(5):1066–79.
2. Gaytan F, Sangiao-Alvarellos S, Manfredi-Lozano M, García-Galiano D, Ruiz-Pino F, Romero-Ruiz A, et al. Distinct Expression Patterns Predict Differential Roles of the miRNA-Binding Proteins, Lin28 and Lin28b, in the Mouse Testis: Studies During Postnatal Development and in a Model of Hypogonadotropic Hypogonadism. *Endocrinology*. 2013; 154(3):1321–36.
3. Sangiao-Alvarellos S, Manfredi-Lozano M, Ruiz-Pino F, Navarro VM, Sánchez-Garrido MA, Leon S, et al. Changes in Hypothalamic Expression of the Lin28/let-7 System and Related MicroRNAs During Postnatal Maturation and After Experimental Manipulations of Puberty. *Endocrinology*. 2013; 154(2):942–55.
4. Lee H, Han S, Kwon CS, Lee D. Biogenesis and regulation of the let-7 miRNAs and their functional implications. *Protein & Cell*. 2015; 7(2):100–13.
5. Saebnia N, Neshati Z, Bahrami AR. Role of microRNAs in etiology of azoospermia and their application as non-invasive biomarkers in diagnosis of azoospermic patients. *J Gynecol Obstet Hum Reprod*. 2021; 50(10):102207.
6. Sangiao-Alvarellos S, Manfredi-Lozano M, Ruiz-Pino F, León S, Morales C, Cordido F, et al. Testicular expression of the Lin28/let-7 system: Hormonal regulation and changes during postnatal maturation and after manipulations of puberty. *Sci Rep*. 2015; 5(1).
7. Wang T, Wang G, Hao D, Liu X, Wang D, Ning N, et al. Aberrant regulation of the LIN28A/LIN28B and let-7 loop in human malignant tumors and its effects on the hallmarks of cancer. *Mol Cancer*. 2015; 14(1).
8. Hennchen M, Stubbusch J, Abarchan-El Makhfi I, Kramer M, Deller T, Pierre-Eugene C, et al. Lin28B and Let-7 in the Control of Sympathetic Neurogenesis and Neuroblastoma Development. *J Neurosci*. 2015;35(50):16531–44.
9. McDaniel K, Hall C, Sato K, Lairmore T, Marzioni M, Glaser S, et al. Lin28 and let-7: roles and regulation in liver diseases. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2016;310(10):G757–65.
10. Leinonen J, Chen Y-C, Pennonen J, Lehtonen L, Junna N, Tukiainen T, et al. LIN28B affects gene expression at the hypothalamic-pituitary axis and serum testosterone levels. *Sci Rep*. 2019;9(1).



11. Graf R, Munschauer M, Mastrobuoni G, Mayr F, Heinemann U, Kempa S, et al. Identification of LIN28B-bound mRNAs reveals features of target recognition and regulation. *RNA Biol.* 2013;10(7):1146–59.
12. Sulem P, Gudbjartsson D, Rafnar T, Holm H, Olafsdottir E, Olafsdottir G, et al. Genome-wide association study identifies sequence variants on 6q21 associated with age at menarche. *Nat Genet.* 2009;41(6):734–8.
13. Day F, Bulik-Sullivan B, Hinds D, Finucane H, Murabito J, Tung J, et al. Shared genetic aetiology of puberty timing between sexes and with health-related outcomes. *Nat Commun.* 2015;6(1).
14. Cousminer D, Stergiakouli E, Berry D, Ang W, Groen-Blokhuis M, Körner A, et al. Genome-wide association study of sexual maturation in males and females highlights a role for body mass and menarche loci in male puberty. *Hum Mol Genet.* 2014;23(16):4452–64.
15. Widén E, Ripatti S, Cousminer D, Surakka I, Lappalainen T, Järvelin M-R, et al. Distinct Variants at LIN28B Influence Growth in Height from Birth to Adulthood. *Am J Hum Genet.* 2010;86(5):773–82.
16. Spaziani M, Tarantino C, Tahani N, Gianfrilli D, Sbardella E, Lenzi A, et al. Hypothalamo-Pituitary axis and puberty. *Mol Cell Endocrinol.* 2021; 520:111094.
17. de Kretser D, Loveland K, O'Bryan M. Chapter 136 Spermatogenesis. En: *Endocrinology: Adult and Pediatric.* Elsevier; 2016. p. 2325-2353.e9.
18. Smith, L. B., & Walker, W. H. (2014). The regulation of spermatogenesis by androgens. *Seminars in cell & developmental biology*, 30, 2–13. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.02.012>
19. Leinonen J, Chen Y-C, Tukiainen T, Panula P, Widén E. Transient modification of lin28b expression - permanent effects on zebrafish growth. *Mol Cell Endocrinol.* 2019; 479:61–70.
20. The Genotype-Tissue Expression Project. GTEx Portal [Internet]. [gtexportal.org](http://gtexportal.org). 2022 [consultado el 16 de noviembre de 2022]. Disponible en: <https://gtexportal.org/home/snp/rs7759938>
21. Lauridsen L, Arendt L, Støvring H, Olsen J, Ramlau-Hansen C. Is age at puberty associated with semen quality and reproductive hormones in young adult life? *Asian J Androl.* 2017; 19(6):625.
22. Jensen T, Finne K, Skakkebak N, Andersson A-M, Olesen I, Joensen U, et al. Self-reported onset of puberty and subsequent semen quality and reproductive hormones in healthy young men. *Hum Reprod.* 2016; 31(8):1886–94.

23. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5ta ed. World Health Organization; 2010.
24. Salas-Huetos A, Blanco J, Vidal F, Mercader J, Garrido N, Anton E. New insights into the expression profile and function of micro-ribonucleic acid in human spermatozoa. *Fertil Steril*. 2014;102(1):213-222.e4.
25. Abu-Halima M, Hammadeh M, Schmitt J, Leidinger P, Keller A, Meese E, et al. Altered microRNA expression profiles of human spermatozoa in patients with different spermatogenic impairments. *Fertil Steril*. 2013;99(5):1249-1255.e16.
26. Mokánszki A, Molnár Z, Varga Tóthné E, Bodnár B, Jakab A, Bálint B, et al. Altered microRNAs expression levels of sperm and seminal plasma in patients with infertile ejaculates compared with normozoospermic males. *Hum Fertil (Camb)*. 2020;23(4):246–55.
27. Schlegel P, Sigman M, Collura B, De Jonge C, Eisenberg M, Lamb D, et al. Diagnosis and treatment of infertility in men: AUA/ASRM guideline part II. *J Urol*. 2021;115(1):62–9.
28. Colpi G, Francavilla S, Haidl G, Link K, Behre H, Goulis D, et al. European Academy of Andrology guideline Management of oligo-astheno-teratozoospermia. *Andrology*. 2018;6(4):513–24.
29. Lardone MC, Ortega V, Ortiz E, Flórez M, Piottante A, Ebensperger M, et al. Partial-AZFc deletions in Chilean men with primary spermatogenic impairment: gene dosage and Y-chromosome haplogroups. *J Assist Reprod Genet*. 2020;37:3109–19.
30. Goodrich R, Anton E, Krawetz S. Isolating mRNA and Small Noncoding RNAs from Human Sperm. *Methods Mol Biol*. 2012;927:385–96.
31. Goodrich R, Johnson G, Krawetz S. The Preparation of Human Spermatozoal RNA for Clinical Analysis. *Arch Androl*. 2007;53(3):161–7.
32. Georgiadis A, Kishore A, Zorrilla M, Jaffe T, Sanfilippo J, Volk E, et al. High quality RNA in semen and sperm: isolation, analysis and potential application in clinical testing. *J Urol*. 2015;193(1):352-9.
33. Corral-Vazquez C, Blanco J, Salas-Huetos A, Vidal F, Anton E. Normalization matters: tracking the best strategy for sperm miRNA quantification. *Mol Hum Reprod*. 2017;23(1):45-53.
34. Bio-Rad. Applications Guide Real-Time PCR Applications Guide. 2006.
35. Lardone MC, Piottante A, Valdevenito R, Ebensperger M, Castro A. Histological and hormonal testicular function in oligo/azoospermic infertile men. *Andrologia*. 2013;45(6):379-85.

36. Canfield J, Arlier S, Mong E, Lockhart J, VanWye J, Guzeloglu-Kayisli O, et al. Decreased LIN28B in preeclampsia impairs human trophoblast differentiation and migration. *FASEB J*. 2019;33(2):2759-2769.
37. Yuan J, Nguyen CK, Liu X, Kanellopoulou C, Muljo SA. Lin28b reprograms adult bone marrow hematopoietic progenitors to mediate fetal-like lymphopoiesis. *Science*. 2012;335(6073):1195-200.
38. West R, McWhorter E, Ali A, Goetzman LN, Russ JE, Gonzalez-Berrios CL, et al. HMGA2 is regulated by LIN28 and BRCA1 in human placental cells. *Biol Reprod*. 2018;100(1):227-238.
39. Ren X, Chen X, Wang Z, Wang D. Is transcription in sperm stationary or dynamic? *J Reprod Dev*. 2017;63(5):439-443.
40. Santiago J, Silva J, Howl J, Santos M, Fardilha M. All you need to know about sperm RNAs. *Hum Reprod Update*. 2021;28(1):67-91.
41. Anawalt B, Page S. Approach to the male with infertility. En: Post TW, Snyder P, Matsumoto A, Martin K, editors. *UpToDate* [Internet]. 2022 [consultado el 11 de diciembre de 2022 ]. Disponible en: [https://www-uptodate-com.uchile.idm.oclc.org/contents/approach-to-the-male-with-infertility?search=Approach%20to%20the%20male%20with%20infertility&source=search\\_result&selectedTitle=1~150&usage\\_type=default&display\\_rank=1#H3041926272](https://www-uptodate-com.uchile.idm.oclc.org/contents/approach-to-the-male-with-infertility?search=Approach%20to%20the%20male%20with%20infertility&source=search_result&selectedTitle=1~150&usage_type=default&display_rank=1#H3041926272)
42. Salas-Huetos A, Blanco J, Vidal F, Godo A, Grossmann M, Pons C, et al. Spermatozoa from patients with seminal alterations exhibit a differential micro-ribonucleic acid profile. *Fertil Steril*. 2015;104(3):591-601.
43. Krsnik D, Marić T, Bulić-Jakuš F, Sinčić N, Bojanac AK. LIN28 Family in Testis: Control of Cell Renewal, Maturation, Fertility and Aging. *Int J Mol Sci*. 2022 ;23(13):7245.
44. McWhorter E, West R, Russ J, Ali A, Winger Q, Bouma G. LIN28B regulates androgen receptor in human trophoblast cells through Let-7c. *Mol Reprod Dev*. 2019;86(9):1086-1093.

## 12. Anexos

**Tabla 1A.** Límites de referencia inferior para las características del semen.

Parameter	Lower reference limit
Semen volume (ml)	1.5 (1.4–1.7)
Total sperm number (10 <sup>6</sup> per ejaculate)	39 (33–46)
Sperm concentration (10 <sup>6</sup> per ml)	15 (12–16)
Total motility (PR + NP, %)	40 (38–42)
Progressive motility (PR, %)	32 (31–34)
Vitality (live spermatozoa, %)	58 (55–63)
Sperm morphology (normal forms, %)	4 (3.0–4.0)
Other consensus threshold values	
pH	≥7.2
Peroxidase-positive leukocytes (10 <sup>6</sup> per ml)	<1.0
MAR test (motile spermatozoa with bound particles, %)	<50
Immunobead test (motile spermatozoa with bound beads, %)	<50
Seminal zinc (μmol/ejaculate)	≥2.4
Seminal fructose (μmol/ejaculate)	≥13
Seminal neutral glucosidase (mU/ejaculate)	≥20

Extraído del Manual de Laboratorio para la Examinación y Procesamiento de Semen Humano, OMS, 5ta ed. (23).

**Tabla 2A.** Valores hormonales de referencia

Hormona	Valor de referencia
FSH	2-8 (mUI/mL)
LH	1-8 (mUI/mL)
Testosterona total	1-7 (ng/mL)