

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 559 515**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.06.2011 E 11382187 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.10.2015 EP 2532757**

54 Título: **Método in vitro para predecir la fecundidad del semen**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.02.2016

73 Titular/es:

**INSTITUT D'INVESTIGACIÓ BIOMÈDICA DE
BELLVITGE (IDIBELL) (50.0%)
Gran Via de l'Hospitalet 199
08908 l'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, ES y
FUNDACIÓ PUIGVERT (50.0%)**

72 Inventor/es:

**LARRIBA BARTOLOMÉ, SARA y
BASSAS ARNAU, LLUÍS**

74 Agente/Representante:

ILLESCAS TABOADA, Manuel

ES 2 559 515 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

MÉTODO IN VITRO PARA PREDECIR LA FECUNDIDAD DEL SEMEN**DESCRIPCIÓN****CAMPO DE LA INVENCION**

5 La presente invención puede incluirse en el campo de la medicina en general, más concretamente en el campo de la medicina reproductiva que comprende el estudio de los procesos involucrados en la reproducción, en particular, la infertilidad masculina y femenina.

10 Así, la presente invención está centrada en la evaluación y valoración del perfil de expresión génica de los espermatozoides, para identificar un grupo específico de genes cuyo perfil de expresión se correlacione con la capacidad fecundante de los espermatozoides. Este grupo de genes podría utilizarse como biomarcadores para discriminar aquellas muestras con la peor capacidad de fecundar los oocitos.

ESTADO DE LA TÉCNICA

15 Tradicionalmente, la selección de los donantes de esperma se basa en una evaluación microscópica para determinar la calidad del semen. La valoración de la fertilidad masculina se basa en la información descriptiva proporcionada por el análisis básico del semen, que incluye el recuento, la motilidad y la morfología de los espermatozoides. Recientemente, se han actualizado nuevos valores umbrales para los parámetros del semen (Cooper *et al.*, 2010) utilizando hombres que habían producido embarazos recientes como individuos de referencia. Sin embargo, estos parámetros básicos del semen no reflejan la función espermática y su valor clínico para la predicción de la fertilidad es cuestionable. Aunque hay una clara correlación entre la calidad del semen y la probabilidad de concepción (Guzick *et al.*, 2001), el amplio solapamiento de los parámetros entre los hombres fértiles e infértiles sugiere que este análisis básico del semen (basado principalmente en el recuento, la motilidad y la morfología del esperma) no siempre se correlaciona con una fecundidad exitosa y dificulta seriamente el valor diagnóstico del análisis del semen (Bartoov *et al.*, 1993). La proporción significativa de parejas que presentan una infertilidad inexplicable, a pesar de la buena calidad del semen, sugiere que la función espermática anormal puede deberse en algunos casos a defectos moleculares (Lewis, 2007). Se han dedicado muchos esfuerzos a desarrollar nuevos tests diagnósticos capaces de proporcionar una información más precisa sobre el potencial de fecundación de los espermatozoides humanos (Samplaski *et al.*, 2010) pero ninguno de ellos ha satisfecho aún los requisitos para ser adoptado con propósitos clínicos.

30 Los espermatozoides contienen, además del material genético haploide, un abundante número de transcritos funcionalmente viables (Krawetz, 2005). Las técnicas SAGE o los microarrays de ADNc sobre los espermatozoides han identificado entre 3000-7000 transcritos diferentes (Ostermeier *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2006), comúnmente considerados como restos de ARNm almacenado de los genes activos tras la meiosis reflejo de la correcta evolución de la espermatogénesis (revisado en (Miller & Ostermeier, 2006)). Existe, sin embargo, el potencial para una producción activa de transcritos post-meiótica: se ha descrito la persistencia de un nivel bajo, pero detectable, de transcripción en las células espermáticas maduras (Miteva *et al.*, 1995) y más recientemente, mediante la detección de actividad transcripcional y traduccional, determinada en esperma humano durante la capacitación y la reacción acrosómica (Gur & Breitbart, 2006; Naz, 1998). Además, se sugirió que estos ARNm almacenados podrían ser utilizados durante las primeras etapas tras la fecundación, en las que no son sensibles a los inhibidores transcripcionales, y contribuyen de este modo a la huella paterna (Braude *et al.*, 1988; Siffroi & Dadoune, 2001). Ostermeier *et al.* (Ostermeier *et al.*, 2004) divulgó por primera vez que los espermatozoides humanos pueden proporcionar sus ARNm al oocito durante la fecundación. Se ha descrito que algunos de estos ARNm son traducidos *de novo* en el oocito tras la fecundación, apoyando así la hipótesis de que, al menos algunos de estos transcritos, podrían tener una función durante o más allá del proceso de fecundación (Gur & Breitbart, 2006) y contribuirían adicionalmente al transcriptoma temprano del embrión (Boerke *et al.*, 2007).

45 Se ha sugerido que el ARNm espermático presente en los espermatozoides del eyaculado representa una huella genética, y puede ser considerado como un registro histórico de la expresión génica durante la espermatogénesis (Zhao *et al.*, 2006). Algunos estudios han encontrado diferencias en la cantidad de ciertos transcritos espermáticos entre diferentes grupos de hombres. Se observó una proporción reducida de *PRM1/PRM2* (Steger *et al.*, 2008), así como una reducción en los niveles de ARNm de *PSG1* y *HLA-E* (Avendano *et al.*, 2009) en hombres infértiles comparados con hombres fértiles. La expresión del ARNm de la caja DEAD (*DEAD box polypeptide 4 (VASA)*) fue mayor en hombres normozoospermicos que en oligospermicos (Guo *et al.*, 2007). Se determinó también una firma o huella de expresión diferente (relacionada con las diferencias en la motilidad espermática) entre hombres normozoospermicos y teratozoospermicos (Platts *et al.*, 2007). Curiosamente, se han descrito recientemente diferencias en la expresión de unos cuantos cientos de transcritos entre hombres fértiles e infértiles con parámetros de semen normales utilizando el análisis de microarrays (Garrido *et al.*, 2009).

Lalancette y colaboradores (Lalancette C. *et al.* Biol Reprod. 2008;78(4):618-35) evaluaron las diferencias en los perfiles de RNA entre espermatozoides obtenidos de toros fértiles con tasas de no retorno extremas (NRRs): un grupo de baja fertilidad y un grupo de alta fertilidad. Esta medida está definida por el porcentaje de vacas que fueron inseminadas y no re-inseminadas en un intervalo especificado, típicamente de 56 días. El valor NRR es el resultado de la concepción y por lo tanto se denomina la medida de fertilidad de campo. Usando la técnica de hibridación supresión-sustractiva en combinación con el análisis de microarrays, se identifican genes que se expresan diferencialmente (Tablas 1 y 2) y los datos obtenidos fueron validados por RT-PCR cuantitativa. Además, Feugang y colaboradores (Feugang JM. *et al.* Reprod Biomed Online. 2010;21(3):312-24) analizaron los perfiles de RNA de espermatozoides de toros Holstein de alta fertilidad y baja fertilidad mediante chips génicos bovinos de Affimetrix. Se utilizó RT-PCR cuantitativa para validar los datos de los microarrays y asociar transcritos específicos en los espermatozoides con la fertilidad en toros. Es importante destacar que estos documentos se refieren a toros, por lo que deben ser cuidadosamente interpretados y no extrapolarse a humanos y/u otros animales. Las técnicas de reproducción asistida (TRA) han revolucionado el tratamiento de las parejas infértiles. Entre ellas, la inseminación terapéutica con semen de donante (ITD) proporciona una primera aproximación ideal para lograr el embarazo en parejas con un claro factor de infertilidad masculina severa. Tras el tratamiento de inseminación artificial con donantes de esperma, se observan diferencias en las tasas de embarazo entre esos donantes, aunque todos ellos presentan parámetros normales de calidad seminal. Estudios adicionales sugieren que algunas características de las muestras descongeladas utilizadas en la inseminación, como la morfometría, el número de espermatozoides móviles, la velocidad curvilínea, la velocidad promedio de la trayectoria o la velocidad rectilínea de los mismos, muestran una buena correlación con las tasas de embarazo tras la IIU (inseminación intrauterina) (Macleod & Irvine, 1995; Marshburn *et al.*, 1992), aunque su uso para el diagnóstico no ha sido validado. El programa ITD representa, de este modo, un modelo adecuado para estudiar la subfertilidad masculina de etiología desconocida.

Teniendo en cuenta el estado de la técnica, parece que no se ha encontrado todavía un método preciso para predecir la fecundidad del semen. Este método podría servir también para confirmar los resultados obtenidos por los otros métodos conocidos que, como se dijo anteriormente, no son definitivos, por ejemplo, el análisis básico del semen que incluye el recuento, la motilidad y la morfología del espermatozoide.

El éxito de la ICSI (inyección intracitoplasmática de espermatozoides) para hombres con infertilidad masculina ha sido una de las razones del retraso en la implementación de marcadores apropiados de la función espermática. Cualquier espermatozoide, incluso aquel que no tendría normalmente la capacidad de fecundar, se inyecta dentro de los oocitos evitando las barreras de selección. Con el fin de tratar a las parejas con el tratamiento menos invasivo, se necesitan mejores tests pronósticos para esperma fértil, oocitos fértiles y embriones viables para mejorar los resultados del tratamiento y obtener mayores tasas de embarazo. Los hallazgos de la presente invención contribuyen a la búsqueda y selección de los marcadores genéticos más valiosos, potencialmente útiles como herramientas complementarias para predecir y/o mejorar el éxito de las técnicas de reproducción asistida, resultando en un incremento de las tasas de embarazo de dichas técnicas. La presente invención muestra una huella de expresión (perfil) relacionada con la capacidad fecundante del espermatozoide que puede complementar el análisis de semen llevado a cabo por los tests convencionales de fertilidad. Por medio del método de la presente invención es posible seleccionar aquellas muestras de los bancos de donantes de semen con las condiciones apropiadas para utilizarse en técnicas de reproducción asistida, así como dar información realista sobre las posibilidades de éxito del tratamiento de reproducción asistida conyugal a aquellas parejas con infertilidad de causa desconocida.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se centra en la evaluación y valoración del perfil de expresión génica del espermatozoide, con el fin de definir un grupo específico de genes cuya expresión es indicativa de la capacidad fecundante de los espermatozoides. Los valores de expresión de este grupo de genes podrían utilizarse como biomarcadores para predecir la capacidad fecundante de los hombres que presentan parámetros de calidad seminal normales, complementando por tanto los resultados obtenidos por los otros métodos conocidos de valoración de la fertilidad que, como se indica anteriormente, no son definitivos.

A pesar de que los parámetros de la calidad del semen en donantes de semen son normales y similares, se han observado diferencias entre donantes en las tasas de embarazo obtenidas tras las terapias de inseminación (Marshburn *et al.*, 1992). Las variables clásicas del espermatozoide en el momento de la evaluación de los donantes tienen, por tanto, un valor limitado para predecir su capacidad reproductiva. Así, una supervisión directa de los resultados clínicos obtenidos para cada donante es el único camino práctico para desestimar aquellos que muestran unas tasas de embarazo peores tras un número razonable de ciclos de inseminación (Johnston *et al.*, 1994). De este modo, el objetivo de la presente invención es definir un perfil de expresión génica específico capaz de reflejar la capacidad fecundante del donante de semen con una mejor eficiencia que los parámetros de calidad seminal clásicos o convencionales.

Para afrontar este objetivo, se estudió una cohorte de donantes de semen con una buena calidad de semen y con un detallado historial de resultados reproductivos utilizando preferiblemente IIU como técnica de reproducción en diferentes mujeres receptoras. El reclutamiento de donantes de semen se realizó entre jóvenes estudiantes

universitarios, que tenían un estado desconocido de fertilidad en el momento de la donación, siendo así representativos de la población general normozoospermica. Por lo tanto, el método de la invención es adecuado para investigar las características moleculares de la infertilidad masculina de causa desconocida, porque salva algunas de las deficiencias presentes en las parejas infértiles, como el papel de una proporción significativa de causas femeninas como factor de confusión ya que también contribuyen al fallo reproductivo de la pareja.

Por lo tanto, el primer paso de la presente invención se centra en buscar y averiguar los marcadores génicos más valiosos, entre un panel inicial de 87 genes diana que se expresan en los espermatozoides humanos (Ostermeier *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2006), los cuales podrían utilizarse eficientemente para predecir y/o mejorar los resultados de embarazo. Por consiguiente, en la presente invención se ha desarrollado un clasificador molecular del estado de fertilidad de los donantes de semen, preferiblemente para IIU, basado en el perfil de expresión génica de los espermatozoides. El panel de genes biomarcadores se seleccionó en una serie de prueba con donantes de semen con un historial detallado de resultados reproductivos por IIU en diferentes mujeres receptoras, obviando las causas femeninas como factor de confusión en el fallo reproductivo. El potencial como clasificador predictivo del panel de genes de la presente invención fue validado en una serie independiente de donantes.

Como puede observarse en los ejemplos que se describen a continuación, se encontró que el perfil de expresión génica de los genes *EIF5A*, *RPL13*, *RPL23A*, *RPS27A*, *RPS3*, *RPS8* y *TOMM7*, bien como valores independientes o en combinación, puede utilizarse eficientemente como una herramienta predictiva para la discriminación de las muestras con la peor tasa de embarazo (PR), mostrando mejores resultados que los obtenidos por la combinación de los parámetros de semen clásicos o convencionales. En un aspecto particularmente preferido de la invención, se definió un modelo multiplex con el grupo de cuatro genes que consisten en: *EIF5A*, *RPL13*, *RPL23A* y *RPS27A*, seleccionados del grupo de siete genes citado anteriormente.

Por lo tanto, puede desarrollarse un clasificador molecular del estado de fertilidad de los donantes de semen, particularmente para IIU, basándose en el perfil de expresión de dicho grupo seleccionado de cuatro genes. En general, este modelo tiene un 97% de sensibilidad y un 90% de especificidad como herramienta predictiva para discriminar muestras con una tasa de embarazo por IIU <13.6%, mucho mejor que la obtenida mediante la valoración basada en la combinación de los parámetros de calidad de semen convencionales. Además, el método de la invención podría complementar los análisis de semen convencionales de pruebas de fertilidad conocidas, con el fin de seleccionar aquellas muestras de los bancos de donantes de semen con las condiciones apropiadas para utilizarse en reproducción asistida, así como sugerir una IIU conyugal o por donante en aquellas parejas con infertilidad de causa desconocida.

La sensibilidad y la especificidad son las medidas estadísticas de la ejecución de un test de clasificación binario, también conocido en estadística como función de clasificación. La sensibilidad mide la proporción de verdaderos positivos que se identifican correctamente como tales. La especificidad mide la proporción de negativos que son correctamente identificados. Una teórica predicción óptima, debería alcanzar el 100% de sensibilidad y el 100% de especificidad. Por lo tanto, el método de la invención que muestra un 97% de sensibilidad y un 90% de especificidad debería considerarse como una herramienta fuerte y sólida para la predicción de la capacidad fecundante de los espermatozoides.

La amplificación mediante PCR a tiempo real en 384-well TaqMan® Low Density Arrays (TLDA) se consideró un método apropiado para la implementación de la presente invención y para su potencial uso diagnóstico futuro, porque permite la amplificación cuantitativa simultánea de 48 reacciones con una mínima cantidad de ADNc y tiene una reducida variabilidad por pipeteado. Además, para mejorar la precisión experimental, los datos se normalizaron con unos genes de referencia adecuados, que mostraban unos niveles de expresión constitutiva y estable en las muestras de estudio.

Por lo tanto, el primer aspecto de la presente invención hace referencia a un método *in vitro* para predecir la capacidad fecundante de los espermatozoides comprendiendo el análisis del perfil de expresión de al menos uno de los siguientes siete genes: *EIF5A*, *RPL13*, *RPL23A*, *RPS27A*, *RPS3*, *RPS8* o *TOMM7*, o combinaciones de los mismos. Un aspecto preferido del método de la invención comprende el análisis del perfil de expresión de un grupo seleccionado de genes que comprende al menos uno de los siguientes cuatro genes: *EIF5A*, *RPL13*, *RPL23A* o *RPS27A*, o combinaciones de los mismos. Además, en un aspecto particularmente preferido, la presente invención comprende el análisis del perfil de expresión del grupo de genes que consiste en: *EIF5A*, *RPL13*, *RPL23A* y *RPS27A*.

El método de la invención se lleva a cabo teniendo en cuenta que los genes *EIF5A*, *RPL13*, *RPL23A*, *RPS27A*, *RPS3*, *RPS8* o *TOMM7* están infra-expresados en muestras con una baja capacidad fecundante si se comparan con los niveles de expresión en las muestras que presentaron una capacidad fecundante óptima (véase la **Figura 3**)

El método de la invención se centra particularmente en predecir la capacidad fecundante de los espermatozoides cuando se selecciona la inseminación intrauterina como técnica de reproducción asistida. Sin embargo, es igualmente adecuada para usarse cuando se utiliza una técnica de reproducción alternativa.

Por último, el método de la invención es capaz de predecir la capacidad fecundante tanto en donantes de semen procedentes de bancos de semen como en parejas con infertilidad de causa desconocida. Por lo tanto, el método de la presente invención podría complementar los análisis de semen convencionales, como los test de fertilidad, por ejemplo, con el fin de seleccionar de los bancos de donantes de semen aquellas muestras con las condiciones apropiadas para utilizarse en reproducción asistida, así como para sugerir la IIU conyugal o de donante para aquellas parejas con infertilidad de causa desconocida.

De este modo, siguiendo el método anteriormente explicado de la invención es posible predecir la tasa de embarazo.

Dado que los siete genes citados anteriormente están bien conservados entre las diferentes especies, el método de la invención puede utilizarse para predecir la capacidad fecundante no sólo de los espermatozoides humanos, sino también de espermatozoides de animales. La predicción de la fecundidad de los espermatozoides de animales es interesante en varios sentidos, por ejemplo, para controlar la capacidad fecundante de animales en peligro de extinción.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Diagrama de flujo que representa el número de muestras y los genes candidatos a través de las etapas de la fase I (fase de exploración) y II (fase de validación).

Figura 2. Valores de expresión relativa de los genes expresados diferencialmente (test de Kruskal-Wallis) en muestras de semen para IIU con las peores tasas de embarazo (<15.70%, grupo 1, barras negras), intermedias (15.71-23%, grupo 2, barras estriadas) y aquellas con las mejores tasas de embarazo (23.01%, grupo 3, barras blancas) utilizando *RPS17* como normalizador. Las diferencias significativas entre los grupos 1 ó 2 y grupo 3 (controles) se indican mediante asteriscos (*, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$; ***, $p \leq 0.001$). Datos con IC del 95%.

Figura 3. Ratio de expresión de *EIF5A*, *RPL13*, *RPL23A*, *RPS27A*, *RPS3*, *RPS8* y *TOMM7* del semen como un marcador de fecundidad de los espermatozoides. Las líneas horizontales indican el valor umbral del ratio de transcripción (*EIF5A*: 0.67; *RPL13*: 0.65; *RPL23A*: 0.85; *RPS27A*: 1.01, *RPS3*: 0.58, *RPS8*: 0.60 y *TOMM7*: 0.58) que predice una tasa de embarazo por IIU >13.5% (análisis de la curva de la característica operativa del receptor). Los valores de sensibilidad y especificidad se describen en la **Tabla 5**.

Figura 4.

A. Distribución de las muestras por su tasa de embarazo por IIU y la probabilidad predicha por las cuatro variables genéticas, mostrando el potencial del modelo para discriminar las muestras con una peor capacidad fecundante.

B. Distribución de las muestras por su tasa de embarazo por IIU y la probabilidad predicha por las cuatro variables clínicas, mostrando que este modelo es incapaz de discriminar las muestras con una peor capacidad fecundante.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Diseño experimental

El estudio se dividió en dos fases. En la primera fase o fase de ensayo, se obtuvo una perspectiva general del comportamiento de la expresión génica en relación con las tasas de embarazo obtenidas por donantes de esperma y se obtuvo una firma de expresión de un conjunto de genes. En la segunda fase, se validaron las huellas del conjunto de genes como herramientas predictivas de diagnóstico en una serie independiente de muestras de semen de donantes. El estudio se aprobó por el Consejo de Revisión Institucional del Centro.

Ejemplo 2. Selección de los donantes de semen

Se obtuvieron muestras de semen criopreservadas (cánulas de 0.5 ml) del banco de semen compuesto por donantes de semen enviados por el Servicio de Andrología de la Fundació Puigvert y utilizadas para ITD desde 1994 a 2006. El reclutamiento de donantes de semen se hizo entre estudiantes universitarios, la mayoría de ellos sin descendencia en el momento del reclutamiento. Los procedimientos clínicos para el cribado de los donantes de semen incluían una historia médica personal y familiar completa para descartar enfermedades hereditarias, un examen físico y un mínimo de dos tests de semen [llevado a cabo según las guías de la Organización Mundial de la Salud (OMS, 1999) excepto para la evaluación de la motilidad que se hizo a temperatura ambiente]. Los espermogramas incluyeron volumen, pH, concentración de esperma, motilidad, viabilidad, morfología y anticuerpos antispermatozoide. El análisis de semen asistido por ordenador (CASA) fue llevado a cabo con un sistema Hamilton-Thorn 2030 (versión de software 6.4). Se hicieron pruebas serológicas para el VIH-1 y VIH-2, hepatitis B y C, citomegalovirus y sífilis en el momento de inicio. Al final de las donaciones, tras seis meses de cuarentena, sólo

se utilizaron los donantes que dieron negativo. Se realizó el cariotipo en los donantes reclutados después del año 2000.

5 Todas las muestras de semen se congelaron durante las dos horas siguientes a su recogida, en un volumen igual de medio criopreservante de glicerol-yema de huevo-citrato (medio para Congelación de Esperma, Irvine Scientific, Santa Ana, CA, EE.UU.) en nitrógeno líquido, usando crioviales de 1.8 ml, y almacenados a -196°C hasta su utilización. La criosupervivencia se valoró como el porcentaje de los espermatozoides que presentaban motilidad progresiva después de descongelarlo en un baño a 37°C.

Ejemplo 3. Receptoras femeninas y procedimientos de inseminación

10 Se consideraron para el estudio mujeres que entraron en el programa de ITD (Inseminación Terapéutica con semen de Donante) de la Fundació Puigvert y que fueron inseminadas con muestras de los donantes seleccionados. Las indicaciones para la ITD incluyen graves factores masculinos en la mayoría de los casos, y alteraciones en la eyaculación o enfermedades hereditarias del marido. El estado ovulatorio se estudió mediante curvas de temperatura bifásica y progesterona en la fase lútea media, y una histerosalpingografía normal.

15 En todos los casos, se indujo una estimulación folicular suave con 75 UI/día de gonadotropinas (Neo-Fertinorm o Pergonal, Serono SA, España), y se monitorizó mediante análisis del estradiol y ultrasonografía transvaginal. La ovulación se indujo mediante 10000 UI de HCG (Profasi, HCG Lepori) cuando se observó al menos un folículo >18mm. Las muestras de semen descongeladas (0.5 ml) se diluyeron con 2 ml de medio Ham F-10 con 0.5% de HSA y se prepararon mediante centrifugación diferencial utilizando gradientes de densidad (Puregon). El volumen final se ajustó a 0.4 ml. Las inseminaciones se hicieron en dos días consecutivos tras 24 y 48 horas de la administración de HCG (Gonadotropina Coriónica Humana) utilizando un catéter de inseminación (#4220, Gynetics Medical, Lommel, Bélgica). Si se incrementaban los niveles de B-HCG de 2 a 4 semanas tras la inseminación, el embarazo era confirmado por ecografía. La selección de los donantes de semen para la inseminación se llevó a cabo por el personal médico sobre la base de que encajara con el fenotipo del marido. Los donantes de semen se cambiaron, tras 2 ó 3 ciclos de inseminación en una mujer en concreto, si no se había conseguido embarazo. Los donantes que fracasaron en la producción de embarazos se descartaron finalmente para su uso tras 20-25 ciclos de tratamiento.

Ejemplo 4. Selección de las muestras de semen

30 Se reclutaron un total de 68 muestras de donantes normozoospermicos para la presente invención. Los criterios de inclusión fueron los siguientes: tener al menos 4 alícuotas congeladas disponibles tras su utilización en IIU, concentración media de espermatozoides ≥ 40 millones/ml; motilidad A+B $\geq 30\%$, morfología normal $\geq 7\%$ en el momento de la valoración inicial, y >10 ciclos de inseminación por donante de esperma.

35 En la primera fase, aproximadamente 2/3 muestras (n=43) se eligieron aleatoriamente para el análisis de la expresión génica (**Figura 1**). Las muestras se clasificaron inicialmente en tres grupos (terciles) que diferían en su capacidad para producir un embarazo tras la ITD: las muestras con la peor tasa de embarazo (PR) (grupo 1), intermedia (grupo 2) y aquellas que lograron la mejor PR (grupo 3, como control de una PR apropiada (**Tabla 1**)). Las muestras de semen presentaron características similares entre los grupos de IIU basándose en la concentración, motilidad y morfología de los espermatozoides ($p=0.116$; $p=0.814$ y $p=0.936$ respectivamente), así como la motilidad post-descongelación de los espermatozoides ($p=0.245$) también considerada para el análisis (**Tabla 1.A**) (parámetros convencionales del semen). Se indican también otros factores clínicos del hombre y de las mujeres receptoras que pueden influir en el balance final de la tasa de gestación (**Tabla 1.B**)

Tabla 1. A

	n	Volumen de semen (ml)	Conc. esperma. (millones/ml)	Motilidad (%)	Morfología normal (%)	Motilidad post-descongelación (%)
IIU (>10 ciclos/muestra)						
Grupo 1 ($\leq 15.70\%$ pr)	14	3.50 \pm 0.51	79.21 \pm 19.28	59.17 \pm 5.99	23.53 \pm 5.50	33.71 \pm 5.52
Grupo 2 (15.71-23.00% pr)	14	3.82 \pm 0.43	101.75 \pm 20.93	58.35 \pm 5.41	26.30 \pm 6.03	38.33 \pm 5.44
Grupo 3 ($\geq 23.01\%$ pr)	15	3.71 \pm 0.75	87.23 \pm 17.62	57.06 \pm 5.33	24.60 \pm 4.47	39.95 \pm 4.62
Total	43					

IIU: inseminación intrauterina.

pr: tasa de embarazo.

45 *n: número de muestras del donante.*

conc: concentración.

Tabla 1. B

	n	Edad del hombre (años)	Índice de Masa Corporal del hombre	Mujeres receptoras por donante (n)	Edad de la mujer (años)	Índice de Masa Corporal de la mujer	Mujeres receptoras sin GPD por donante (%)	Tasa de aborto (%)
IIU (>10 ciclos/muestra)								
Grupo 1 (≤15.70% pr)	14	24.57 ± 2.53	23.03 ± 1.29	14.50 ± 4.37	34.69 ± 0.91	25.13 ± 1.07	72.64 ± 6.95	12.56 ± 14.20
Grupo 2 (15.71-23.00% pr)	14	25.71 ± 2.63	22.93 ± 1.25	14.29 ± 3.40	35.40 ± 0.75	24.64 ± 0.68	76.21 ± 7.12	11.58 ± 6.95
Grupo 3 (≥23.01% pr)	15	25.53 ± 2.63	23.23 ± 1.25	12.93 ± 2.70	34.79 ± 0.53	25.39 ± 0.80	75.93 ± 5.85	15.63 ± 5.66
Total	43							

IIU: inseminación intrauterina.

pr: tasa de embarazo.

5 **n:** número de muestras del donante.

GPD: diagnóstico ginecológico patológico.

En la segunda fase, se validó la huella de la expresión génica como una herramienta diagnóstica predictiva sobre 25 muestras adicionales (**Figura 1**).

10 **Ejemplo 5. Extracción de ARN y síntesis de ADNc**

Con el fin de enriquecer la muestra de los espermatozoides fértiles y eliminar los contaminantes somáticos del análisis de la expresión génica del esperma, las muestras de semen congeladas-descongeladas se purificaron individualmente mediante centrifugación a través de un gradiente discontinuo de Percoll (65%–90%). Esta técnica de centrifugación se utiliza de forma rutinaria en TRA y se basa en el fraccionamiento de las células de acuerdo a su velocidad de sedimentación (Gandini *et al.*, 1999). Las muestras de semen (0.5 ml) se estratificaron por encima de la capa del gradiente del 65% y se procesaron a continuación mediante centrifugación a 175 × g durante 30 minutos. Esto da lugar a la formación de una fracción de sedimento constituida principalmente por espermatozoides de morfología normal, y a una fracción interfase de sobrenadante enriquecida en células germinales defectuosas (espermatozoides con anomalías morfológicas, así como otros tipos celulares inmaduros) (Chen & Bongso, 1999; Gil-Guzman *et al.*, 2001). El sedimento obtenido se resuspendió en medio enriquecido de HamF10 y se procesó de nuevo mediante centrifugación a 400 × g durante 5 minutos.

El ARN total se obtuvo a partir de los espermatozoides purificados por Percoll utilizando el Kit NucleoSpin® RNA II (Macherey-Nagel, Duren, Alemania), siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante con modificaciones menores. Brevemente, el tampón de lisis se añadió a las muestras a 600 µl/10⁷ células. Los lisados se homogeneizaron con una aguja de calibre 20 y se calentó durante 30 minutos a 60°C. Después, se procedió con el paso 4 del kit, incluyendo un paso de digestión con ADNasa. El ARN se eluyó en 40µl de agua libre de ARNasa. La pureza de la muestra y la integridad del ARN se valoró mediante PCR de transcripción inversa (RT) utilizando los cebadores *PRM2* descritos previamente (Ostermeier *et al.*, 2005).

Para el estudio de la expresión génica, se obtuvo un ADNc de cadena simple mediante RT de 200 ng de ARN, utilizando cebadores aleatorios y la Transcriptasa Inversa MultiScribe™ del Kit de Transcripción Inversa de ADNc de Alta Capacidad (AB, Foster City, California, EE.UU.) a 37°C durante 120 minutos. Se llevaron a cabo dos reacciones independientes de RT para cada muestra de ARN. La solución resultante con ADNc se almacenó a –20°C hasta su uso.

Ejemplo 6. Cuantificación de la expresión génica

Los ensayos de PCR cuantitativa en tiempo real se llevaron a cabo mediante arrays de PCR sobre tarjetas microfluídicas (MFC), utilizando los Arrays de Baja Densidad TaqMan® de 384 pocillos (TLDA) sobre el Sistema Rápido de PCR en Tiempo Real 7900HT de Applied Biosystems (AB, Foster City, California, EE.UU.). La mitad de la reacción RT se aplicó en cada puerto, cada uno conectado a 48 pocillos de reacción. Un primer experimento (TLDA1) (**Figura 1**) se llevó a cabo sobre MFC formato 96 –genes (95 ensayos experimentales y 1 control de amplificación de TLDA) permitiendo la medición simultánea de 87 genes diana que se seleccionaron en base a su localización celular en los espermatozoides humanos a partir de microarrays de ADNc (Ostermeier *et al.*, 2002; Zhao

et al., 2006), y 8 genes expresados de forma ubicua, como potenciales genes de referencia. Los genes y sus correspondientes ensayos utilizados para el montaje de los TLDA se presentan en la **tabla 2**.

Tabla 2

Simbolo del gen	Nombre del gen	ID del ensayo	Papel
<u>PRM-1+</u>	Protamina-1	Hs00358158_g1	Condensación nuclear
<u>PRM-2+</u>	Protamina-2	Hs00172518_m1	Condensación nuclear
<u>RERE+</u>	Proteína de repeticiones del dipéptido arginina-ácido glutámico (RE)	Hs00201558_m1	Regulación transcripcional
<u>FOXG1/FOXG1B +</u>	Factor de transcripción Forkhead G1B	Hs01850784_s1	Regulación transcripcional (patrón embrionario temprano)
<u>TEAD1/TEF1</u>	Miembro 1 de la familia de dominio TEA (Factor potenciador transcripcional SV40) Factor potenciador transcripcional TEF-1	Hs00744253_s1	Regulación transcripcional. (patrón embrionario temprano)
<u>RBM9+</u>	Proteína 9 con motivo de unión al ARN	Hs00329214_s1	Regulación transcripcional (relacionada con la unión al ARN)
LRRFIP1	Proteína 1 que interacciona con repeticiones ricas en leucina	Hs00190993_m1	Regulación transcripcional (relacionada con la unión al ARN)
<u>IREB2</u>	Proteína 2 de unión al elemento de respuesta a hierro	Hs00386293_m1	Regulación transcripcional y traduccional (relacionada con la unión al ARN y proteína)
<u>EIF3G</u>	Subunidad delta del factor de inicio de traducción eucariota 3	Hs00186772_m1	Regulación transcripcional, inicio
<u>EIF3J/EIF3SI</u>	Subunidad J (subunidad I) del factor de inicio de traducción 3	Hs00825842_g1	Regulación traduccional, inicio
<u>EIF3M/GA17</u>	Subunidad M del factor de inicio de traducción eucariota 3	Hs00272235_m1	Regulación traduccional, inicio. Proteína fusogénica (interacción espermatozoide-oocito ?)
<u>EIF5A+</u>	Factor de inicio de traducción eucariota 5A	Hs00744729_s1	Regulación traduccional, inicio
<u>EIF5</u>	Factor de inicio de traducción eucariota 5	Hs00820472_m1	Regulación traduccional, inicio

Tabla 2 (cont.)

Símbolo del gen	Nombre del gen	ID del ensayo	Papel
<u>RPS3+</u>	Proteína ribosomal S3	Hs02385124_g1	Biosíntesis de proteínas (proteína ribosomal). Reparación del ADN.
<u>RPS6+</u>	Proteína ribosomal S6	Hs02339423_g1	Biosíntesis de proteínas (proteína ribosomal)
<u>RPS8+</u>	Proteína ribosomal S8	Hs01374307_g1	Biosíntesis de proteínas (proteína ribosomal)
<u>RPS13+</u>	Proteína ribosomal S13	Hs01945436_u1	Biosíntesis de proteínas (proteína ribosomal)
<u>RPS16</u>	Proteína ribosomal S16	Hs01598518_gH	Biosíntesis de proteínas (proteína ribosomal)
<u>RPS17#</u>	Proteína ribosomal S17	Hs00734303_g1	Biosíntesis de proteínas (proteína ribosomal)
<u>RPS18+</u>	Proteína ribosomal S18	Hs02387368_g1	Biosíntesis de proteínas (proteína ribosomal)
<u>RPS26</u>	Proteína ribosomal S26	Hs00955682_g1	Biosíntesis de proteínas (proteína ribosomal)
<u>RPS27+</u>	Proteína ribosomal S27	Hs01378332_g1	Biosíntesis de proteínas (proteína ribosomal)
<u>RPS27A / S27a+</u>	Proteína ribosomal S27a	Hs01923841_uH	Biosíntesis de proteínas (proteína ribosomal)
<u>RPS29+</u>	Proteína ribosomal S29	Hs03004310_g1	Biosíntesis de proteínas (proteína ribosomal)
<u>RPL4+</u>	Proteína ribosomal L4	Hs03044647_g1	Biosíntesis de proteínas (proteína ribosomal)
<u>RPL5</u>	Proteína ribosomal L5	Hs00851991_u1	Biosíntesis de proteínas (proteína ribosomal)
<u>RPL7+</u>	Proteína ribosomal L7	Hs02596927_g1	Biosíntesis de proteínas (proteína ribosomal)
<u>RPL10A+</u>	Proteína ribosomal L10a	Hs01912344_uH	Biosíntesis de proteínas (proteína ribosomal)
<u>RPL13+</u>	Proteína ribosomal L13	Hs00761672_s1	Biosíntesis de proteínas (proteína ribosomal)
<u>RPL17</u>	Proteína ribosomal L17, transcrito variante 2	Hs01597859_m1	Biosíntesis de proteínas (proteína ribosomal)

Tabla 2 (cont.)

Símbolo del gen	Nombre del gen	ID del ensayo	Papel
<u>RPL17</u>	Proteína ribosomal L17, transcrito variante 1	Hs00748900_s1	Biosíntesis de proteínas (proteína ribosomal)
<u>RPL23A+</u>	Proteína ribosomal L23a	Hs01921329_g1	Biosíntesis de proteínas (proteína ribosomal)
<u>RPL24</u>	Proteína ribosomal L24	Hs02338570_gH	Biosíntesis de proteínas (proteína ribosomal)
<u>RPL27A</u>	Proteína ribosomal L27a	Hs00741143_s1	Biosíntesis de proteínas (proteína ribosomal)
<u>RPL29#</u>	Proteína ribosomal L29	Hs00988959_gH	Biosíntesis de proteínas (proteína ribosomal)
<u>RPL30</u>	Proteína ribosomal L30	Hs00265497_m1	Biosíntesis de proteínas (proteína ribosomal)
<u>RPL35</u>	Proteína ribosomal L35	Hs00855441_gH	Biosíntesis de proteínas (proteína ribosomal)
<u>RPLP2</u>	Proteína ribosomal, grande, P2	Hs01115130_g1	Biosíntesis de proteínas (proteína ribosomal)
<u>FAU</u>	Virus del sarcoma murino Finkel-Biskis-Reilly (FBR-MuSV) expresado de forma ubicua	Hs00609872_g1	Biosíntesis de proteínas (proteína ribosomal)
RSL1D1	Proteína 1 que contiene el dominio ribosomal L1	Hs00378363_g1	Biosíntesis de proteínas (proteína ribosomal)
<u>EEF2</u>	Factor 2 de elongación de la traducción de eucariotas	Hs01012839_g1	Biosíntesis de proteínas (proteína ribosomal)
<u>RPS4Y1</u>	Isoforma Y de la proteína S4 de la subunidad ribosomal 40S (Y-linked 1)	Hs00606158_m1	Biosíntesis de proteínas (proteína ribosomal)
<u>MRPL40</u>	Proteína L40 del ribosoma mitocondrial	Hs00186843_m1	Biosíntesis de proteínas (proteína ribosomal de la mitocondria)
<u>MRPS18B</u>	Proteína S18B del ribosoma mitocondrial	Hs00204096_m1	Biosíntesis de proteínas (proteína ribosomal de la mitocondria)
<u>FARSB</u>	Subunidad beta citoplasmática del enzima Fenilalanil-ARNt sintetasa	Hs00271714_m1	Biosíntesis de proteínas (proteína citoplasmática)
<u>COPS5</u>	Subunidad 5 del homólogo fotomorfogénico constitutivo COP9 (Arabidopsis)	Hs00272789_m1	Biosíntesis de proteínas (proteína nuclear)

Tabla 2 (cont.)

Símbolo del gen	Nombre del gen	ID del ensayo	Papel
RPS6KA2	Proteína quinasa S6 ribosomal alfa 2	Hs00179731_m1	Modificación de los aminoácidos de la proteína (fosforilación)
ST6GALNAC4	ST6 (alfa-N-acetil-neuraminil-2,3-beta-galactosil-1,3)-N-acetilgalactosaminida alfa-2,6-sialiltransferasa 4	Hs00205241_m1	Modificación de los aminoácidos de la proteína (glicosilación en el aparato de Golgi)
NARS	Sintetasa asparaginil-ARNt	Hs00189846_m1	Relacionado con la unión a proteína (aspartil-ARNt aminoacilación)
QARS	Sintetasa glutaminil-ARNt	Hs00192530_m1	Relacionado con la unión a proteína (glutaminil-ARNt aminoacilación)
UBC	Ubiquitina C	Hs00824723_m1	Modificación de los aminoácidos de la proteína (sistema conjugado con ubiquitina)
TMED2/RNP24	Proteína 2 transmembrana que contiene el dominio emp24 / proteína de la membrana vesicular citoplasmática (Homo sapiens)	Hs00607277_m1	Transporte de proteína (proteína citoplasmática)
SCAMP1	Proteína 1 de membrana de vesículas secretoras	Hs00792736_m1	Transporte de proteína (proteína citoplasmática)
VTI1B	Transporte por vesículas a través de la interacción con el homólogo t-SNAREs 1B (levadura)	Hs00762282_s1	Transporte de proteína (proteína citoplasmática)
SLC29A2	Miembro 2 de la familia 29 de transportadores de soluto (transportadores de nucleósidos)	Hs00155426_m1	Transporte de proteína (proteína citoplasmática)
SLC25A19	Variante 2, miembro 19 de la familia 25 de transportadores de soluto (transportador mitocondrial de tiamina pirofosfato)	Hs00222265_m1	Transporte de proteínas (proteína mitocondrial)
SLC25A25	Miembro 25 de la familia 25 de transportadores de soluto (transportador mitocondrial de fosfato)	Hs01595832_m1	Transporte de proteínas (proteína mitocondrial)
SLC25A39	Miembro 39 de la familia 25 de transportadores de soluto	Hs00255405_m1	Transporte de proteínas (proteína mitocondrial)
TOMM7+	Homólogo de la translocasa 7 de la membrana mitocondrial externa (levadura)	Hs01628668_s1	Transporte de proteínas (proteína mitocondrial)

Tabla 2 (cont.)

Símbolo del gen	Nombre del gen	ID del ensayo	Papel
SFXN3	Sideroflexina 3	Hs00229616_m1	Transporte de proteínas (proteína mitocondrial)
CSE1L	Similar a CSE1 (segregación del cromosoma 1) (levadura)	Hs00354853_m1	Entrada de proteína al núcleo (complejo del poro nuclear)
IPO5	Importina 5	Hs00267008_m1	Entrada de proteína al núcleo (complejo del poro nuclear)
XPO1	Exportina 1 (homólogo a CRM1, levadura)	Hs00185645_m1	Entrada de proteína al núcleo (complejo del poro nuclear)
XPO7	Exportina 7	Hs00209262_m1	Entrada de proteína al núcleo (complejo del poro nuclear)
KPNA2	Carioferina alfa 2 (RAG cohorte 1, importina alfa 1)	Hs00818252_g1	Entrada de proteína al núcleo (complejo del poro nuclear)
RANBP2	Proteína 2 de unión a RAN	Hs00397898_g1	Entrada de proteína al núcleo (complejo del poro nuclear)
PDIA3	Miembro 3 de la familia A de las proteínas disulfido isomerasas	Hs00607126_m1	Plegamiento de la proteína (retículo endoplasmático)
WBSCR21/ABHD11	Proteína 11 que contiene el dominio Abhidrolasa	Hs00541033_g1	Actividad catalítica (característica metabólica del espermatozoide?)
RNF144B/ IBRDC2	Proteína Ring finger 144B / proteína 2 que contiene el dominio IBR	Hs00403456_m1	Actividad catalítica, ubiquitinación de la proteína (característica metabólica del espermatozoide?)
<u>CCNB1IP1</u>	Proteína 1 que interacciona con la ciclina B1	Hs00820463_g1	Actividad catalítica (característica metabólica del espermatozoide?)
<u>ENO1+</u>	Enolasa 1 (alfa)	Hs00361415_m1	Actividad catalítica (característica metabólica del espermatozoide?)
COX5B	Subunidad Vb de la citocromo c oxidasa	Hs00426948_m1	Actividad catalítica (característica metabólica del espermatozoide?)
FADS1	Desaturasa de los ácidos grasos 1	Hs00203685_m1	Actividad catalítica (característica metabólica del espermatozoide?)

Tabla 2 (cont.)

Símbolo del gen	Nombre del gen	ID del ensayo	Papel
AKAP-4	Proteína 4 con dominios de fijación a PKA	Hs00275849_m1	Transducción de señal. Implicado en la motilidad del espermatozoide (fecundación y activación del oocito)
FGFR1	Receptor 1 del factor de crecimiento de fibroblastos	Hs00241111_m1	Transducción de señal (espermatogénesis y fecundación?)
TM4SF6	Tetraspanina 6	Hs00170288_m1	Transducción de señal (espermatogénesis y fecundación?)
GRIN2C	Receptor de glutamato, ionotrópico, N-metil D-aspartato 2C	Hs01016626_m1	Transducción de señal (espermatogénesis y fecundación?)
IL6ST	Transductor de señal Interleuquina 6	Hs00174360_m1	Transducción de señal (espermatogénesis y fecundación?)
VAV2	Oncogén Vav 2	Hs00610104_m1	Transducción de señal (espermatogénesis y fecundación?)
WNT5A	Miembro 5A de la familia del sitio de la integración de MMTV tipo <i>wingless</i>	Hs00998537_m1	Transducción de señal. Desarrollo embrionario. Diferenciación celular y establecimiento del patrón morfométrico.
HLA-E	Complejo mayor de histocompatibilidad, clase 1, E	Hs00428366_m1	Transducción de señal. Proteína de respuesta inmune (espermatogénesis y fecundación?)
eNOS/NOS3	Sintasa de óxido nítrico endotelial, sintasa de óxido nítrico 3 (célula endotelial)	Hs00167166_m1	Capacitación
nNOS/NOS1	Sintasa de óxido nítrico neuronal, sintasa de óxido nítrico 1 (neuronal)	Hs00167223_m1	Capacitación

Tabla 2 (cont.)

Símbolo del gen	Nombre del gen	ID del ensayo	Papel
CLGN	Variante 1 del precursor de calmegina	Hs00189073_m1	Proteína de la chaperona del retículo endoplasmático específica de testículo (interacción espermatozoide-oocito, fecundación)
CLU	Clusterina	Hs00156548_m1	Interacción de proteínas. Interacción célula-célula; procesos celulares para el desarrollo embrionario
PTHLH	Hormona similar a la hormona paratiroidea	Hs00174969_m1	Regulación de la expresión génica. Actividad hormonal (embarazo)
CRHBP	Proteína de unión a la hormona liberadora de corticotropina	Hs00181810_m1	Proteína de transducción de señal. Actividad hormonal (embarazo)
HPRT	Hipoxantina fosforibosiltransferasa 1 (síndrome de Lesch-Nyhan)	Hs99999909_m1	
HMBS	Hidroximetilbilano sintasa	Hs00609297_m1	
PPIA	Ciclofilina A, peptidilprolil isomerasa A	Hs99999904_m1	
PGM1	Fosfoglucomutasa 1	Hs00160062_m1	
GUSB	Glucuronidasa, beta	Hs99999908_m1	
PGK1	Fosfoglicerato quinasa 1	Hs99999906_m1	
TBP	Proteína de unión a cajas TATA	Hs00427620_m1	
KIAA0999/ L19	Proteína KIAA0999	Hs00228549_m1	

- 5 Los símbolos de los genes en **negrita** y subrayados representan aquellos genes que mostraron amplificaciones por PCR positivas en todas las muestras. Aquellos genes incluidos en TLDA2 se indican con los símbolos + (genes diana) o # (genes de referencia).

Un segundo experimento posterior (TLDA2) (**Figura 1**) se llevó a cabo sobre MFC formato 24 genes, que incluyó 21 genes diana, 2 genes de referencia y un control de la amplificación (**Tabla 2**). En la TLDA2 se utilizó una reacción RT diferente de la misma muestra que en el experimento TLDA1.

- 10 Las muestras de pacientes y grupo control se analizaron siempre como muestras apareadas en la misma serie analítica para excluir posibles variaciones entre los grupos. Los datos de la PCR en tiempo real se pre-procesaron y almacenaron en el software SDS 2.2 (AB, Foster City, California, EE.UU.).

- 15 Para confirmar la reproducibilidad y precisión de los experimentos de PCR en tiempo real, se determinó la variación inter-ensayo de las muestras amplificadas en ambos experimentos. La variación se midió como el coeficiente de variación (CV) de Ct a partir del valor medio de Ct de ambas aproximaciones TLDA. En las series de RT-PCR mencionadas más arriba, la variación inter-ensayo varió entre .63% a 1.60% con la excepción *PRM1* (2.40%), *PRM2* (2.04%), *ENO1* (4.13%) y *RERE* (3.42%), confirmando la alta reproducibilidad y precisión de la mayoría de los 23 genes incluidos en los experimentos TLDA1 y TLDA2.

Ejemplo 7. Análisis de datos

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo usando el software SPSS versión 12 (Lead Technologies, Chicago, EE.UU.).

5 El test no paramétrico de Kruskal-Wallis se utilizó en primer lugar para analizar las diferencias en los datos clínicos entre los grupos de estudio de IIU de la fase I.

La selección del/los gen/es de referencia, que mostraron la expresión más estable y la menor variación entre muestras, se calculó con los programas GeNorm (Vandesompele *et al.*, 2002) y el SPSS versión 12 (Lead Technologies, Chicago, EE.UU.).

10 Las diferencias en los niveles de expresión absolutos de los genes de referencia entre los grupos de estudio 1, 2 y 3 se analizaron mediante el test de Kruskal-Wallis. Para seleccionar los genes diana para ser incluidos en el experimento TLDA2, se evaluaron las diferencias en la expresión absoluta de los genes diana de TLDA1 en el grupo 1 comparados con el grupo 3 mediante el test no paramétrico de la U de Mann-Whitney.

15 La normalización de los datos en bruto se llevó a cabo con el programa qBase (Hellemans *et al.*, 2007) utilizando un solo gen de referencia, así como, en paralelo, aplicando la media geométrica de dos genes de referencia. Los valores de cuantificación relativa (RQ) se expresaron utilizando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ como número de veces sobre o infra-representado del gen diana normalizado respecto al gen de referencia con la expresión normalizada del mismo gen de una muestra control. En la Fase I, el valor medio de los valores normalizados por $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para TLDA1 y TLDA2 para cada muestra se sometió entonces a evaluación de la significación estadística de la expresión diferencial entre grupos. El test no paramétrico de Kruskal-Wallis se utilizó para analizar las diferencias en la expresión relativa de genes diana entre los grupos de estudio de IIU. El test de la U de Mann-Whitney se usó para evaluar las diferencias en la expresión relativa de los genes diana en el grupo de pacientes 1 ó 2 comparado con el grupo 3.

20 Los coeficientes de correlación (momento-producto) de Pearson se calcularon para determinar la correlación entre las tasas de expresión de los genes diana y la PR por IIU. El análisis de la curva de la Característica Operativa del Receptor (ROC) de los valores de expresión relativa se utilizó para distinguir aquellos individuos con PR $\leq 13.6\%$ por IIU. La precisión se midió como el área bajo la curva ROC (AUC). El valor umbral se determinó mediante el índice de Youden, calculado como sensibilidad más especificidad - 1 (Skendzel & Youden, 1970).

25 Las regresiones logísticas binarias multivariantes se utilizaron para la selección de la combinación óptima de genes asociada con el estado de fecundidad de las muestras de la fase I y para la validación de la combinación de genes como una herramienta predictiva en las muestras de la fase II. Se utilizó un método de eliminación regresiva (Condicional) para eliminar los términos insignificantes. El modelo de regresión multivariable incluyó los genes que distinguían significativamente una PR por IIU $\leq 13.6\%$. El modelo de regresión logística binaria proporciona las siguientes estimaciones de la función logit: $\text{Logit}(p) = B_0 + B_1X_1 + B_2X_2 + \dots$ donde $p=P$ (potencial de fecundación adecuado para la inseminación), $\text{Logit}(p) = \log(p/(1-p)) = \log(\text{Odds})$, $B = \log \text{OR}$ y $X_n =$ el valor de expresión de los genes seleccionados. Por lo tanto, si utilizamos este modelo de estimación como un modelo de predicción, con el corte de clasificación estándar de 0.5 (esto es, predécimos que un individuo “tiene un potencial fecundante adecuado para la inseminación” si su probabilidad de fecundación estimada es mayor que 0.5), podríamos clasificar a los individuos con una estimación de la función Logit positiva como “adecuados para la inseminación” e individuos con una estimación de la función Logit negativa como “inadecuados para la inseminación”.

30 Se calcularon las regresiones logísticas binarias de una única variante genética, así como las de un único parámetro clínico o de una combinación de los mismos, para comparar los valores predictivos del modelo.

Un valor de $p < 0.05$ se consideró significativo.

Ejemplo 8. Selección de genes para el experimento TLDA2

35 La presencia de ARNm en espermatozoides humanos del eyaculado se confirmó mediante RT-PCR para 74 de los 95 genes del estudio TLDA1 (genes en negrita de la **Tabla 2**). El resto de los genes ($n=21$) no pudo ser amplificado (valor $Ct > 33$) bajo las condiciones del estudio, sugiriendo que los niveles de transcripción estaban por debajo del límite de detección de la técnica. De los 74 genes amplificados, 35 fueron excluidos de posteriores análisis debido a la baja eficiencia de amplificación entre muestras (valores de pérdida de expresión $> 80\%$). Los niveles de ARNm de los genes amplificados en todas las muestras del estudio (**Tabla 2**) se evaluaron en más profundidad ($n=39$) (**Figura 1**).

50 Con el fin de lograr resultados de expresión cuantitativos precisos y fiables de los genes en estudio, la medida de la expresión génica mediante RT-PCR en tiempo real requiere al menos de un gen de control interno adecuado para la normalización de los resultados. Ninguno de los ocho genes que se habían descrito que se expresaban de forma

5 ubicua tiene valores de expresión cuantificables, por lo que se excluyeron como genes normalizadores. Por lo tanto, entre los 39 genes restantes, aquellos que muestran unos niveles de expresión estables en las muestras investigadas se seleccionaron y utilizaron como normalizadores o genes de referencia. Para este fin, se utilizó el programa Genorm y este programa seleccionó a *RPS17* y *RPL29* como los genes expresados de forma más estable ($M= 0.038$ para ambos genes). Además, se valoró que estos genes no se expresaran de forma significativamente diferente entre los grupos del estudio ($p>0.05$). Estos dos genes se incluyeron en el experimento TLDA2 como genes de referencia.

La selección de los genes diana incluidos en el experimento TLDA2 (**Tabla 2**) se llevó a cabo teniendo en cuenta aquellos genes que presentaban diferencias estadísticas en los valores Ct entre el grupo de IIU 1 y 3.

10 **Ejemplo 9. Perfil de expresión génica relativa del esperma de donante**

Una vez que se obtuvieron los datos Ct de TLDA1 y TLDA2 de las muestras de la fase I, la cuantificación de los niveles de ARNm de los 21 genes diana fue, por tanto, expresada como los niveles relativos de transcritos usando *RPS17* como gen único de referencia, así como usando la combinación de los genes *RPS17* y *RPL29* como valor de referencia para ambos experimentos TLDA.

15 Cuando las muestras se clasificaron teniendo en cuenta la PR que resultaba cuando se utilizaron en IIU, se encontró un grupo que comprendía ocho genes expresados diferencialmente entre los tres grupos: *RPL23A*, *RPS27A*, *RPS8* ($p\leq 0.01$), *RBM9*, *RPS27*, *RPS3*, *TOMM7* y *RPS18* ($p\leq 0.05$), cuando se normalizaron con los genes de referencia, tanto con el gen único como con la combinación de genes (**Figura 2**). Todos ellos presentaban valores con pequeñas desviaciones estándar intra-grupos (0.08-0.30).

20 Un grupo de genes seleccionado que comprendía los genes *RPL23A*, *RPS27A*, *RPS3*, *RPS8* y *TOMM7* mostró una disminución significativa en el Grupo 1 de 1.22, 1.39, 1.22, 1.13, y 1.26 veces respectivamente, cuando se comparaba con el Grupo 3 ($p\leq 0.05$).

25 Dado que los datos de normalización obtenidos con los genes de referencia, tanto con el gen único como con la combinación de genes, dieron lugar al mismo resultado estadístico, para los análisis posteriores se utilizó la expresión génica normalizada con *RPS17* para dar más simplicidad al modelo.

Ejemplo 10. Estudio de correlación entre los perfiles de expresión génica y los parámetros convencionales de fecundidad del semen o las tasas de embarazo

30 No se encontró una correlación significativa entre los parámetros de concentración de esperma o la motilidad del semen y los niveles de expresión relativos del ARNm de ninguno de los 21 genes analizados. Sin embargo, se encontró que la morfología de los espermatozoides estaba positivamente correlacionada con los niveles de transcritos de *FOXP1* ($r:0.341$; $p=0.025$) y *RPS8* ($r:0.371$; $p=0.014$).

35 Para analizar si hay una asociación entre la expresión génica y la PR tras la reproducción asistida y para confirmar si los resultados podrían tener importancia fisiológica, se llevó a cabo un estudio de correlación entre los ratios de expresión génica normalizados y el valor medio de PR de los ciclos de inseminación en los que se utilizó la muestra. Se encontraron coeficientes de correlación positivos y significativos entre la PR por IIU y los niveles de transcripción de seis genes: *RPL23A*, *RPL4*, *RPS27A*, *RPS3*, *RPS8* y *TOMM7* ($p<0.05$). La **Tabla 3** muestra los coeficientes de correlación de Pearson y los valores ajustados de p (r ; p) entre los ratios de expresión de los genes diana y las tasas de embarazo tras la reproducción asistida para todas las muestras analizadas. La correlación entre los parámetros clínicos del esperma y las PR se muestran también para su comparación. Las diferencias significativas ($p\leq 0.05$) se indican en negrita. PR: tasa de embarazo. IIU: inseminación intrauterina.

40

Tabla 3

	Expresión génica		Parámetros clínicos del esperma		
	PR por IIU	Tasa de aborto		PR por IIU	Tasa de aborto
<i>RPL23A</i>	0.467; $p=0.002$	0.110; $p=0.483$	Concentración del esperma	0.032; $p=0.837$	-0.043; $p=0.783$
<i>RPL4</i>	0.419; $p=0.005$	0.055; $p=0.726$	Motilidad A + B	- 0.024; $p=0.878$	0.050; $p=0.751$
<i>RPS27A</i>	0.530; $p=0.000$	0.206; $p=0.185$	Morfología del esperma	0.154; $p=0.323$	-0.035; $p=0.826$
<i>RPS3</i>	0.463; $p=0.002$	0.103; $p=0.509$			
<i>RPS8</i>	0.450; $p=0.002$	-0.014; $p=0.930$			
<i>TOMM7</i>	0.308; $p=0.044$	0.189; $p=0.225$			
<i>RPL10A</i>	0.283; $p=0.066$	0.403; $p=0.007$			
<i>RPS6</i>	0.086; $p=0.584$	0.326; $p=0.033$			
<i>RBM9</i>	0.145; $p=0.352$	-0.301; $p=0.050$			

5 El mismo tipo de análisis se llevó a cabo para los otros parámetros clínicos derivados de la IIU, como la tasa de viabilidad y la tasa de aborto. Se encontró que los valores de expresión de tres genes adicionales: *RPL10A*, *RPS6* y *RBM9* estaban correlacionados significativamente con la tasa de aborto en el estudio de la IIU ($p \leq 0.05$) (**Tabla 3**).

10 Se planteó la hipótesis de que existe un nivel umbral de transcritos con el potencial de discriminar aquellas muestras con la peor capacidad de fecundar el oocito. Seleccionamos como variable de estado el percentil 25 de las muestras, esto es $\leq 13.6\%$ de PR para la IIU. El análisis de la curva ROC de los niveles de expresión génica en la IIU dio como resultado una buena precisión en la predicción ($AUC > 0.720$) de los valores de expresión de siete genes: *EIF5A*, *RPL13*, *RPL23A*, *RPS27A*, *RPS3*, *RPS8* y *TOMM7* ($p < 0.01$). Estos se seleccionaron como potenciales biomarcadores genéticos del estado de fecundidad del semen. La **Tabla 4** muestra el análisis ROC con las probabilidades predictivas de las variables clínicas y genéticas para discriminar aquellas muestras con la peor capacidad fecundante. IIU: tasas de embarazo $< 13.6\%$. AUC: área bajo la curva. IC: intervalo de confianza.

Tabla 4

Variables	AUC	95% IC	p-valor
Estudio de IIU			
Concentración de semen	0.588	0.363-0.813	0.404
Motilidad	0.348	0.141-0.556	0.151
Morfología normal	0.615	0.399-0.831	0.275
Motilidad post-descongelación	0.598	0.416-0.781	0.350
<i>EIF5A</i>	0.827	0.691-0.964	0.002
<i>RPL13</i>	0.859	0.724-0.994	0.001
<i>RPL23A</i>	0.882	0.752-1.000	0.000
<i>RPS27A</i>	0.894	0.798-0.990	0.000
<i>RPS3</i>	0.788	0.642-0.934	0.006
<i>RPS8</i>	0.770	0.586-0.954	0.011
<i>TOMM7</i>	0.870	0.748-0.992	0.000

15 Además, la **Tabla 5** muestra un análisis de regresión logística univariable, donde se observa que cada uno de los siete genes comprendidos en la **Tabla 5** podría usarse eficientemente para predecir la capacidad fecundante de los

espermatozoides (validado en las muestras de la fase II). Se describe para cada gen la especificidad (Sp) y la sensibilidad (Sn) para predecir una PR por IIU ≤13.6%.

Tabla 5

Variables	Fase I Sp; Sn	Fase II Sp; Sn	p-valor
<i>EIF5A</i>	50; 91	43; 94.5	0.008
<i>RPL13</i>	60; 97	0; 100	0.004
<i>RPL23A</i>	70; 94	14; 94.4	0.003
<i>RPS27A</i>	60; 91	43; 72	0.003
<i>RPS3</i>	20; 91	14; 94.4	0.013
<i>RPS8</i>	0; 100	14; 94.4	0.119
<i>TOMM7</i>	70; 88	28; 83	0.004

5 Ejemplo 11. Modelo multiplex: análisis de regresión logística multivariable

Para determinar si el modelo multiplex podría mejorar los resultados sobre biomarcadores únicos, se analizaron los biomarcadores genéticos anteriormente seleccionados con un análisis de regresión multivariable. Se utilizó un método de eliminación regresiva (condicional) para eliminar los elementos insignificantes del modelo en las muestras de la fase I.

10 En referencia al estudio de IIU, este análisis dio como resultado un modelo que incluía los genes *EIF5A*, *RPL13*, *RPL23A* y *RPS27A* (Tabla 6). La Tabla 6 muestra los análisis de regresión logística multivariable de las variables genéticas en comparación con las variables clínicas en las diferentes fases del estudio. IIU: inseminación intrauterina. SC: concentración de espermatozoides. MT: motilidad. MPh: morfología. MT-C: motilidad post-descongelación. Sp: especificidad. Sn: sensibilidad. OR: odds ratio. IC: intervalo de confianza. Nota: para el análisis multivariable, se utilizó un método de eliminación regresiva (condicional) para eliminar los elementos insignificantes en las muestras de la fase I. El clasificador resultante se utilizó en las muestras de la fase II para su validación.

Tabla 6

Variables	Fase I Sp; Sn	Fase II Sp; Sn	OR	95% IC para OR	p-valor
Estudio de IIU					
<i>EIF5A + RPL13 + RPL23A + RPS27A</i>	90; 97	71.5; 78			
<i>EIF5A</i>			1.176	0.918-1.505	0.200
<i>RPL13</i>			0.907	0.720-1.143	0.410
<i>RPL23A</i>			1.164	0.975-1.390	0.093
<i>RPS27A</i>			1.113	1.018-1.217	0.018
SC + MT + MPh+ MT-C	20; 100	14; 94			
SC			1.018	0.987-1.051	0.259
MT			0.870	0.764-0.990	0.035
MPh			1.028	0.936-1.129	0.560
MT-C			1.095	0.987-1.215	0.087

20 La sensibilidad y la especificidad para predecir una PR por IIU ≤13.6% fue del 97% y 90%, respectivamente. El AUC calculada fue de 0.955 ($p=0.000$) y el valor de p del test de Hosmer y Lemeshow fue de 0.554 corroborando la precisión del test. Como comparación, la combinación de las cuatro variables clínicas del espermatozoides dio como resultado una sensibilidad del 100%, pero una especificidad del 20% (AUC:0.761; $p=0.013$).

25 El clasificador basado en los valores de expresión génica de las muestras de la fase I se validó en las muestras de la fase II, dando como resultado una sensibilidad del 78% y una especificidad del 71.5% (Tabla 6). Para esta distribución de muestras, la clasificación de los donantes de semen se predice con la fórmula:

$$\text{Log-odds (individual)}=B_0 + B_1X_1 + B_2X_2 + B_3X_3 + B_4X_4$$

Si el log-odds del individuo da como resultado un número negativo, entonces la muestra es clasificada como poseedora de un inadecuado potencial de fertilización para la IIU, si es positivo se clasifica como adecuado.

REFERENCIAS

- 5 Avendano, C., Franchi, A., Jones, E. & Oehninger, S. (2009) Pregnancy-specific {beta}-1-glycoprotein 1 and human leukocyte antigen-E mRNA in human sperm: differential expression in fertile and infertile men and evidence of a possible functional role during early development. *Hum Reprod*, **24**, 270-277.
- Bartoov, B., Eltes, F., Pansky, M., Lederman, H., Caspi, E. & Soffer Y. (1993) Estimating fertility potential via semen analysis data. *Hum Reprod*, **8**, 65-70.
- 10 Boerke, A., Dieleman, S. J. & Gadella, B. M. (2007) A possible role for sperm RNA in early embryo development. *Theriogenology*, **68 Suppl 1**, S147-155.
- Braude, P., Bolton, V. & Moore, S. (1988) Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development. *Nature*, **332**, 459-461.
- 15 Cooper, T. G., Noonan, E., von Eckardstein, S., Auger, J., Baker, H. W., Behre, H. M., Haugen, T. B., Kruger, T., Wang, C., Mbizvo, M. T. & Vogelsong, K. M. (2010) World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Hum Reprod Update*, **16**, 231-245.
- Chen, M. J. & Bongso, A. (1999) Comparative evaluation of two density gradient preparations for sperm separation for medically assisted conception. *Hum Reprod*, **14**, 759-764.
- Gandini, L., Lenzi, A., Lombardo, F., Pacifici, R. & Dondero, F. (1999) Immature germ cell separation using a modified discontinuous Percoll gradient technique in human semen. *Hum Reprod*, **14**, 1022-1027.
- 20 Garrido, N., Martinez-Conejero, J. A., Jauregui, J., Horcajadas, J. A., Simon, C., Remohi, J. & Meseguer, M. (2009) Microarray analysis in sperm from fertile and infertile men without basic sperm analysis abnormalities reveals a significantly different transcriptome. *Fertil Steril*, **91**, 1307-1310.
- Gil-Guzman, E., Ollero, M., Lopez, M. C., Sharma, R. K., Alvarez, J. G., Thomas, A. J., Jr. & Agarwal, A. (2001) Differential production of reactive oxygen species by subsets of human spermatozoa at different stages of maturation. *Hum Reprod*, **16**, 1922-1930.
- 25 Guo, X., Gui, Y. T., Tang, A. F., Lu, L. H., Gao, X. & Cai, Z. M. (2007) Differential expression of VASA gene in ejaculated spermatozoa from normozoospermic men and patients with oligozoospermia. *Asian J Androl*, **9**, 339-344.
- Gur, Y. & Breitbart, H. (2006) Mammalian sperm translate nuclear-encoded proteins by mitochondrial-type ribosomes. *Genes Dev*, **20**, 411-416.
- 30 Guzick, D. S., Overstreet, J. W., Factor-Litvak, P., Brazil, C. K., Nakajima, S. T., Coutifaris, C., Carson, S. A., Cisneros, P., Steinkampf, M. P., Hill, J. A., Xu, D. & Vogel, D. L. (2001) Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. *N Engl J Med*, **345**, 1388-1393.
- Hellemans, J., Mortier, G., De Paepe, A., Speleman, F. & Vandesompele, J. (2007) qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol*, **8**, R19.
- 35 Johnston, R. C., Kovacs, G. T., Lording, D. H. & Baker, H. W. (1994) Correlation of semen variables and pregnancy rates for donor insemination: a 15-year retrospective. *Fertil Steril*, **61**, 355-359.
- Krawetz, S. A. (2005) Paternal contribution: new insights and future challenges. *Nat Rev Genet*, **6**, 633-642.
- Lewis, S. E. (2007) Is sperm evaluation useful in predicting human fertility? *Reproduction*, **134**, 31-40.
- 40 Macleod, I. C. & Irvine, D. S. (1995) The predictive value of computer-assisted semen analysis in the context of a donor insemination programme. *Hum Reprod*, **10**, 580-586.
- Marshburn, P. B., McIntire, D., Carr, B. R. & Byrd, W. (1992) Spermatozoal characteristics from fresh and frozen donor semen and their correlation with fertility outcome after intrauterine insemination. *Fertil Steril*, **58**, 179-186.
- 45 Miller, D. & Ostermeier, G. C. (2006) Towards a better understanding of RNA carriage by ejaculate spermatozoa. *Hum Reprod Update*, **12**, 757-767.
- Miteva, K., Valkov, N., Goncharova-Peinoval, J., Kovachev, K., Zlatarev, S., Pironcheva, G. & Russev, G. (1995) Electron microscopic data for the presence of post-meiotic gene expression in isolated ram sperm chromatin. *Cytobios*, **83**, 85-90.
- Naz, R. K. (1998) Effect of actinomycin D and cycloheximide on human sperm function. *Arch Androl*, **41**, 135-142.
- 50 Ostermeier, G. C., Dix, D. J., Miller, D., Khatri, P. & Krawetz, S. A. (2002) Spermatozoal RNA profiles of normal fertile men. *Lancet*, **360**, 772-777.

- Ostermeier, G. C., Goodrich, R. J., Diamond, M. P., Dix, D. J. & Krawetz, S. A. (2005) Toward using stable spermatozoal RNAs for prognostic assessment of male factor fertility. *Fertil Steril*, **83**, 1687-1694.
- Ostermeier, G. C., Miller, D., Huntriss, J. D., Diamond, M. P. & Krawetz, S. A. (2004) Reproductive biology: delivering spermatozoan RNA to the oocyte. *Nature*, **429**, 154.
- 5 Platts, A. E., Dix, D. J., Chemes, H. E., Thompson, K. E., Goodrich, R., Rockett, J. C., Rawe, V. Y., Quintana, S., Diamond, M. P., Strader, L. F. & Krawetz, S. A. (2007) Success and failure in human spermatogenesis as revealed by teratozoospermic RNAs. *Hum Mol Genet*, **16**, 763-773.
- Samplaski, M. K., Agarwal, A., Sharma, R. & Sabanegh, E. (2010) New generation of diagnostic tests for infertility: review of specialized semen tests. *Int J Urol*, **17**, 839-847.
- 10 Siffroi, J. P. & Dadoune, J. P. (2001) Accumulation of transcripts in the mature human sperm nucleus: implication of the haploid genome in a functional role. *Ital J Anat Embryol*, **106**, 189-197.
- Skendzel, L. P. & Youden, W. J. (1970) Systematic versus random error in laboratory surveys. *Am J Clin Pathol*, **54**, 448-450.
- 15 Steger, K., Wilhelm, J., Konrad, L., Stalf, T., Greb, R., Diemer, T., Kliesch, S., Bergmann, M. & Weidner, W. (2008) Both protamine-1 to protamine-2 mRNA ratio and Bcl2 mRNA content in testicular spermatids and ejaculated spermatozoa discriminate between fertile and infertile men. *Hum Reprod*, **23**, 11-16.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A. & Speleman, F. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*, **3**, RESEARCH0034.
- 20 World Health Organization (1999) *Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction*, p. Cambridge University Press, New York.
- Zhao, Y., Li, Q., Yao, C., Wang, Z., Zhou, Y., Wang, Y., Liu, L., Wang, Y., Wang, L. & Qiao, Z. (2006) Characterization and quantification of mRNA transcripts in ejaculated spermatozoa of fertile men by serial analysis of gene expression. *Hum Reprod*, **21**, 1583-1590.

REIVINDICACIONES

1. Método *in vitro* para predecir la capacidad fecundante de los espermatozoides que comprende el análisis del perfil de expresión de ARNm de al menos uno de los siguientes genes: *EIF5A*, *RPL13*, *RPL23A*, *RPS27A*, *RPS3*, *RPS8* o *TOMM7*, o combinaciones de los mismos.
- 5 2. Método *in vitro*, según la reivindicación 1, que comprende el análisis del perfil de expresión de ARNm de al menos uno de los siguientes genes: *EIF5A*, *RPL13*, *RPL23A* o *RPS27A*, o combinaciones de los mismos.
3. Método *in vitro*, según la reivindicación 1, que comprende el análisis del perfil de expresión de ARNm del grupo de genes que consiste en: *EIF5A*, *RPL13*, *RPL23A* y *RPS27A*.
- 10 4. Método *in vitro*, según las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque los genes *EIF5A*, *RPL13*, *RPL23A*, *RPS27A*, *RPS3*, *RPS8* o *TOMM7* están infra-expresados en las muestras con baja capacidad fecundante en comparación con sus correspondientes umbrales de expresión en las muestras con una capacidad fecundante óptima.
- 15 5. Método *in vitro*, según las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque es capaz de predecir la capacidad fecundante de los espermatozoides cuando se elige la inseminación intrauterina como técnica de fertilización.
6. Método *in vitro*, según las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque es capaz de predecir la capacidad fecundante tanto en donantes de semen procedentes de bancos de semen como en semen procedente de varones de parejas con infertilidad de causa desconocida.
- 20 7. Método *in vitro*, según las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque es capaz de predecir la capacidad fecundante de los espermatozoides tanto de humanos como de animales.
8. Método *in vitro* para predecir la tasa de embarazo que comprende la predicción de la capacidad fecundante de los espermatozoides por medio del método de las reivindicaciones 1 a 4.

Figura 1

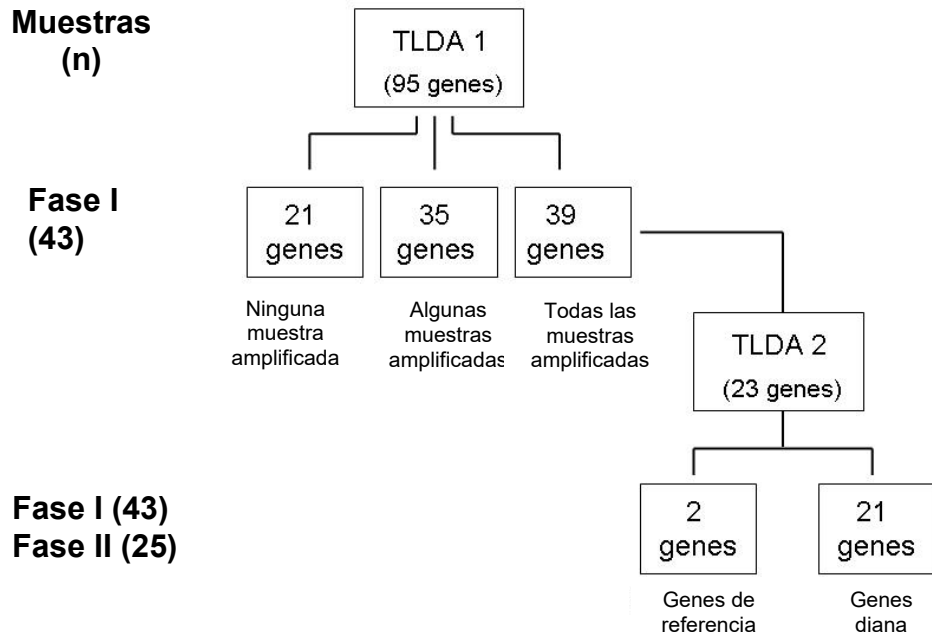


Figura 2

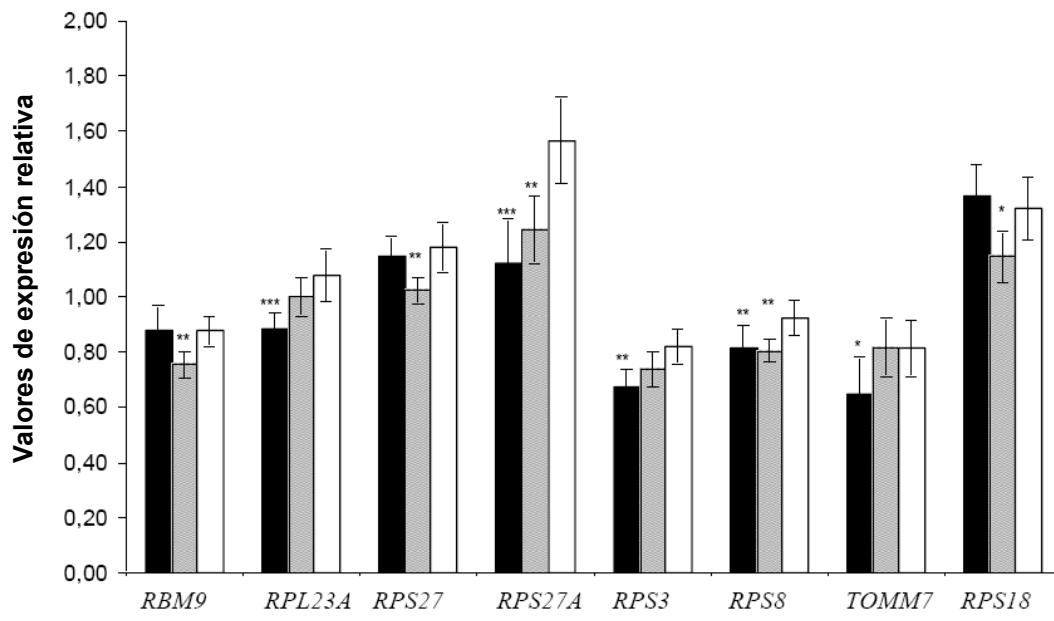
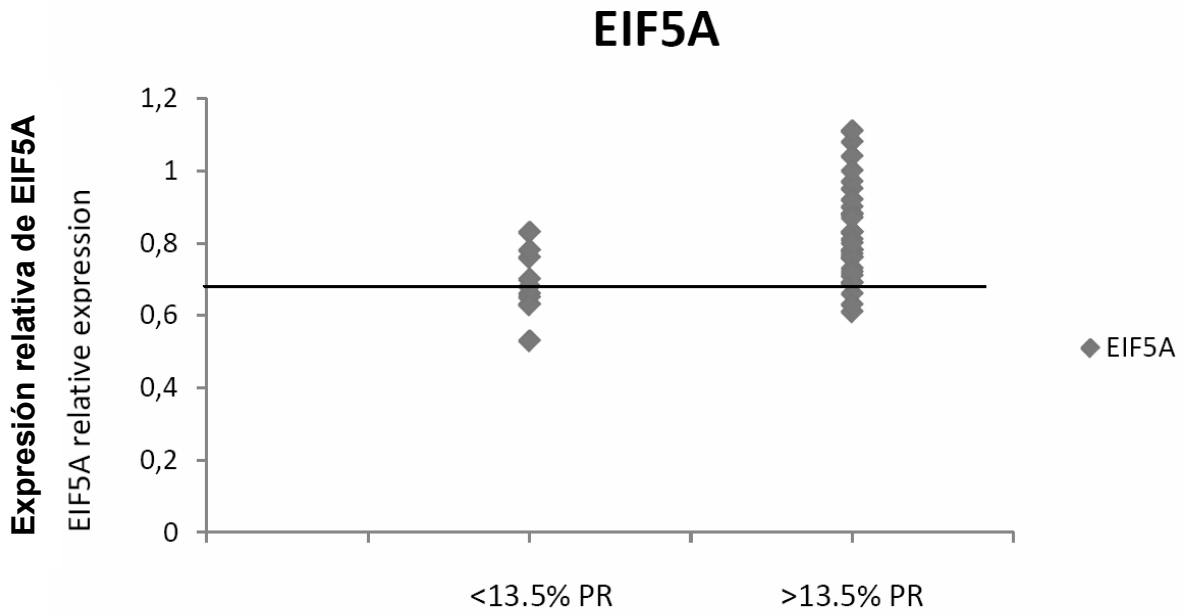


Figura 3

A



B

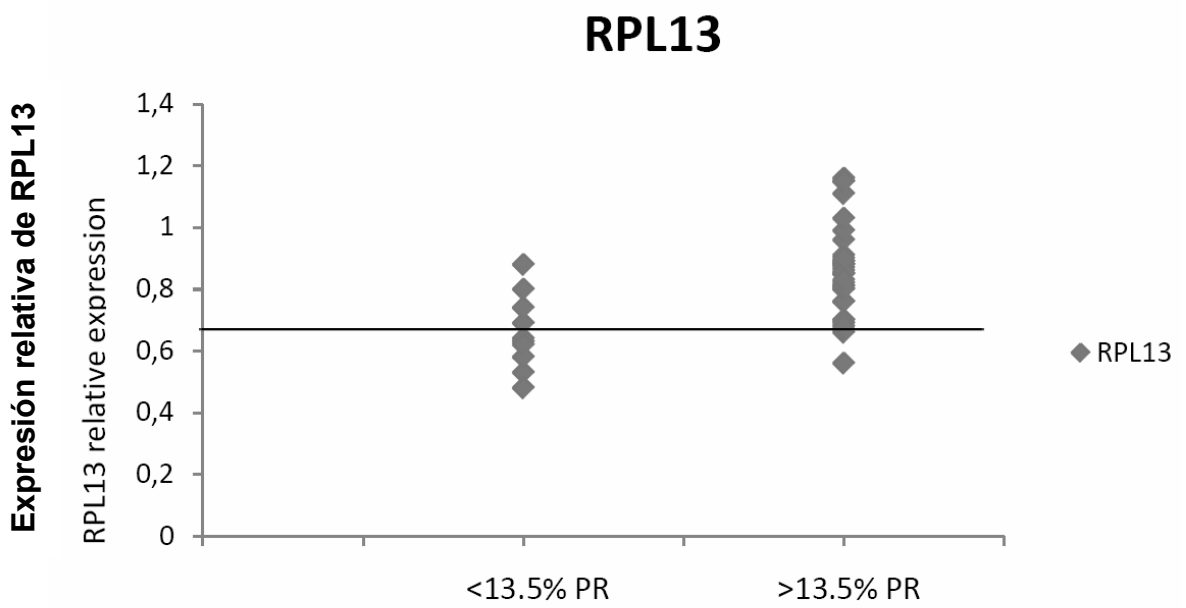
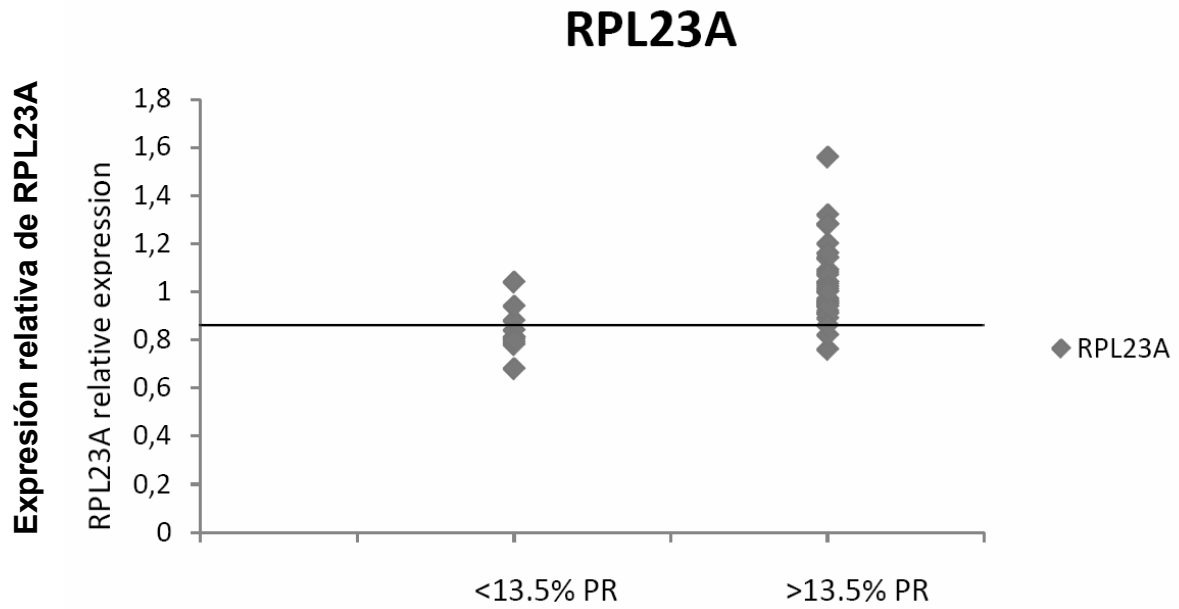


Figura 3 (Cont.)

C



D

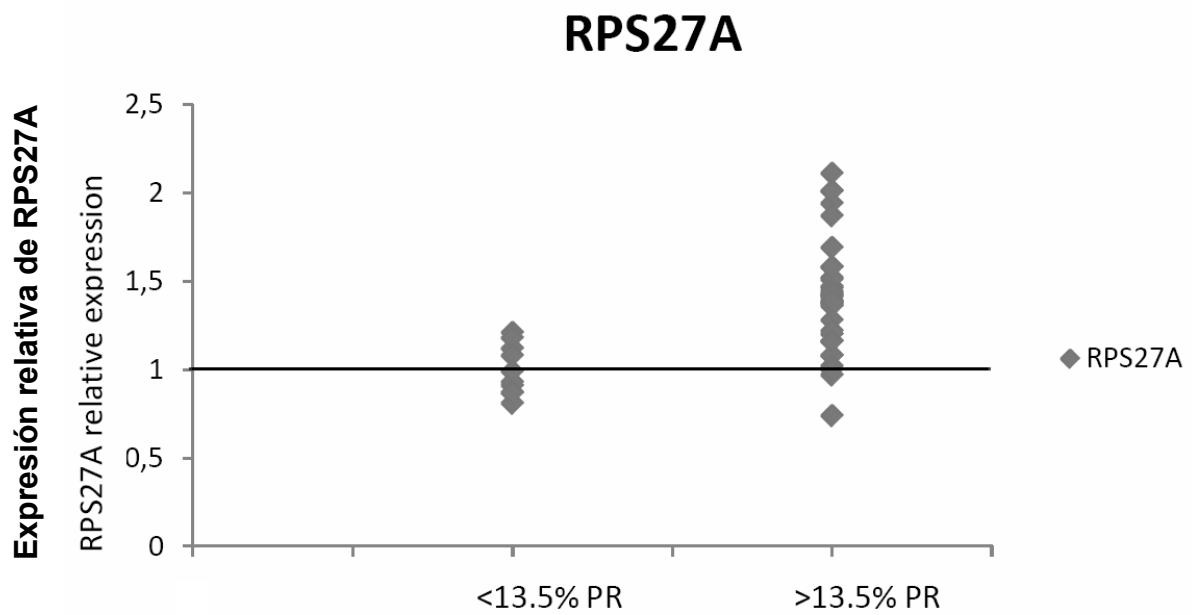
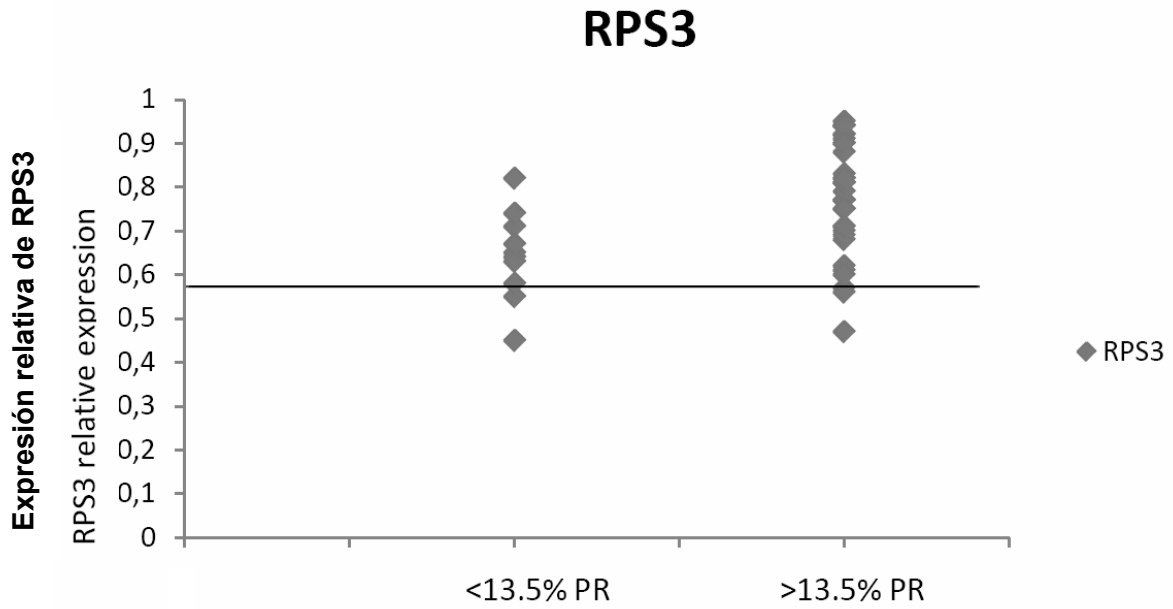


Figura 3 (Cont.)

F



F

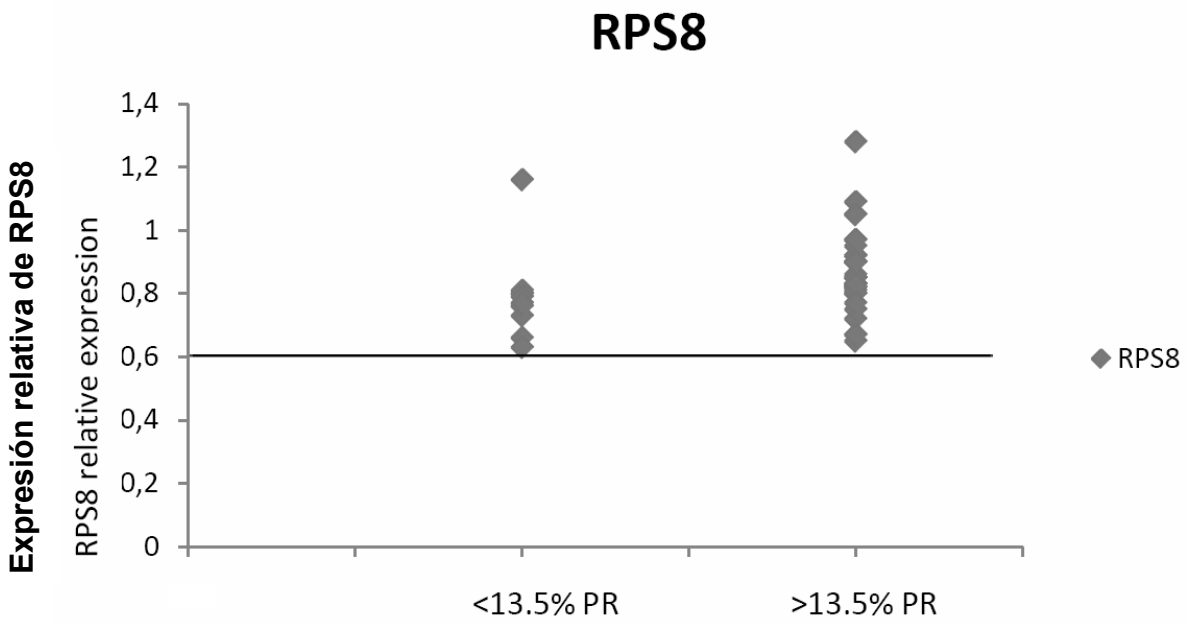


Figura 3 (Cont.)

G

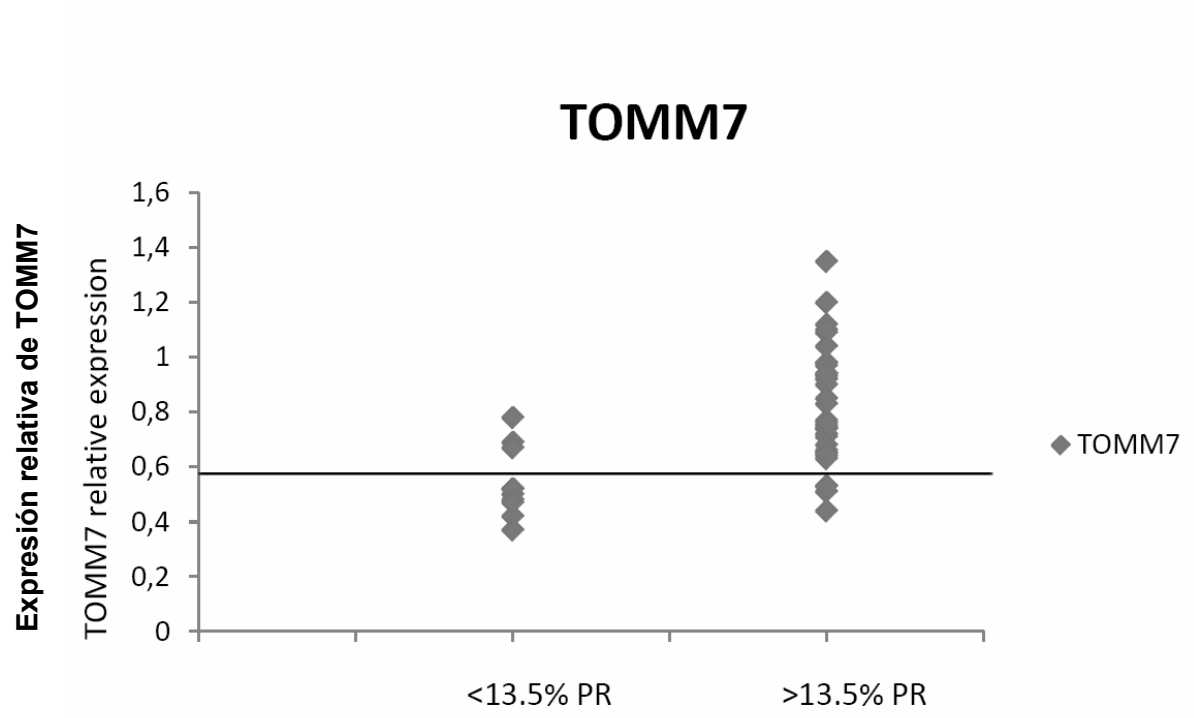
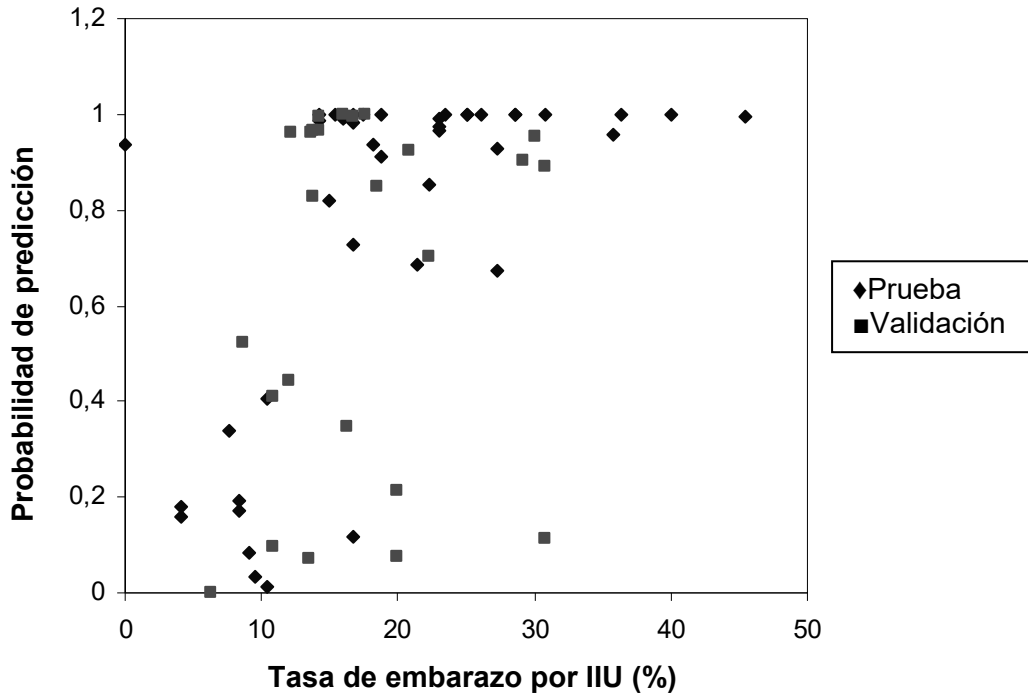
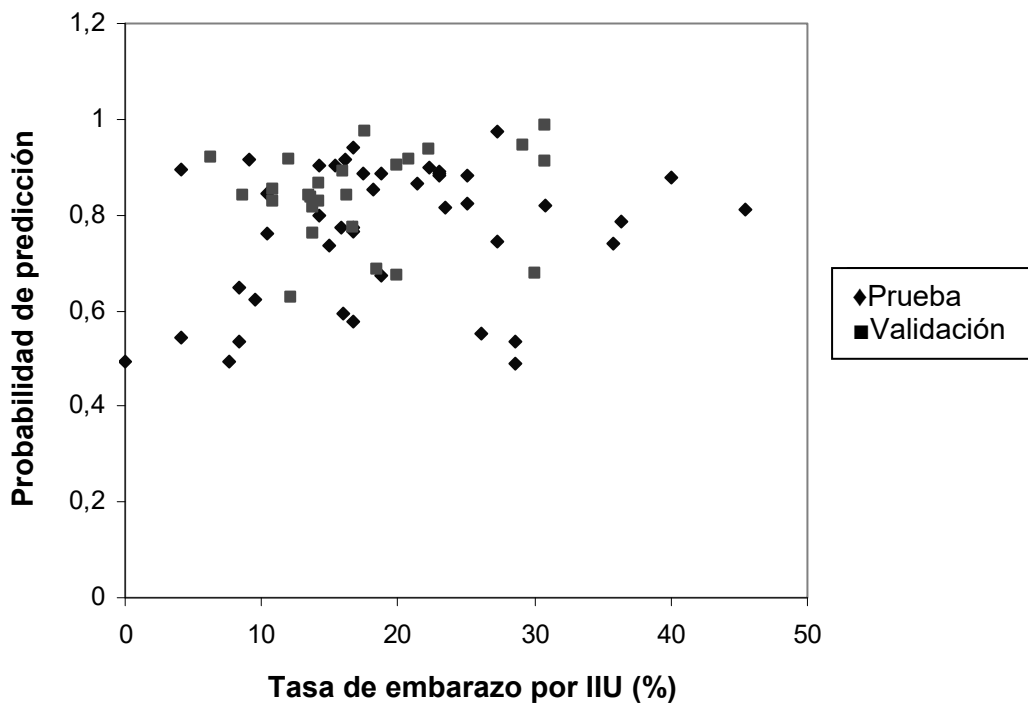


Figura 4

A.



B.



REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

La lista de referencias citadas por el solicitante es, únicamente, para conveniencia del lector. No forma parte del documento de patente europea. Si bien se ha tenido gran cuidado al compilar las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones y la OEP declina toda responsabilidad a este respecto.

5

Non-patent literature cited in the description

- LALANCETTE C. et al. *Biol Reprod.*, 2008, vol. 78 (4), 618-35 [0067]
- FEUGANG JM. et al. *Reprod Biomed Online*, 2010, vol. 21 (3), 312-24 [0067]
- AVENDANO, C. ; FRANCHI, A. ; JONES, E. ; OEHNINGER, S. Pregnancy-specific {beta}-1-glycoprotein 1 and human leukocyte antigen-E mRNA in human sperm: differential expression in fertile and infertile men and evidence of a possible functional role during early development. *Hum Reprod*, 2009, vol. 24, 270-277 [0067]
- BARTOOV, B. ; ELTES, F. ; PANSKY, M. ; LEDERMAN, H. ; CASPI, E. ; SOFFERY Y. Estimating fertility potential via semen analysis data. *Hum Reprod.*, 1993, vol. 8, 65-70 [0067]
- BOERKE, A. ; DIELEMAN, S. J. ; GADELLA, B. M. A possible role for sperm RNA in early embryo development. *Theriogenology*, 2007, vol. 68 (1), 147-155 [0067]
- BRAUDE, P. ; BOLTON, V. ; MOORE, S. Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development. *Nature*, 1988, vol. 332, 459-461 [0067]
- COOPER, T. G. ; NOONAN, E. ; VON ECKARDSTEIN, S. ; AUGER, J. ; BAKER, H. W. ; BEHRE, H. M. ; HAUGEN, T. B. ; KRUGER, T. ; WANG, C. ; MBIZVO, M. T. World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Hum Reprod Update*, 2010, vol. 16, 231-245 [0067]
- CHEN, M. J. ; BONGSO, A. Comparative evaluation of two density gradient preparations for sperm separation for medically assisted conception. *Hum Reprod*, 1999, vol. 14, 759-764 [0067]
- GANDINI, L. ; LENZI, A. ; LOMBARDO, F. ; PACIFICI, R. ; DONDERO, F. Immature germ cell separation using a modified discontinuous Percoll gradient technique in human semen. *Hum Reprod*, 1999, vol. 14, 1022-1027 [0067]
- GARRIDO, N. ; MARTINEZ-CONEJERO, J. A. ; JAUREGUI, J. ; HORCAJADAS, J. A. ; SIMON, C. ; REMOHI, J. ; MESEGUER, M. Microarray analysis in sperm from fertile and infertile men without basic sperm analysis abnormalities reveals a significantly different transcriptome. *Fertil Steril*, 2009, vol. 91, 1307-1310 [0067]
- GIL-GUZMAN, E. ; OLLERO, M. ; LOPEZ, M. C. ; SHARMA, R. K. ; ALVAREZ, J. G. ; THOMAS, A. J., JR. ; AGARWAL, A. Differential production of reactive oxygen species by subsets of human spermatozoa at different stages of maturation. *Hum Reprod*, 2001, vol. 16, 1922-1930 [0067]
- GUO, X. ; GUI, Y. T. ; TANG, A. F. ; LU, L. H. ; GAO, X. ; CAI, Z. M. Differential expression of VASA gene in ejaculated spermatozoa from normozoospermic men and patients with oligozoospermia. *Asian J Androl*, 2007, vol. 9, 339-344 [0067]
- GUR, Y. ; BREITBART, H. Mammalian sperm translate nuclear-encoded proteins by mitochondrial-type ribosomes. *Genes Dev*, 2006, vol. 20, 411-416 [0067]
- GUZICK, D. S. ; OVERSTREET, J. W. ; FACTOR-LITVAK, P. ; BRAZIL, C. K. ; NAKAJIMA, S. T. ; COUTIFARIS, C. ; CARSON, S. A. ; CISNEROS, P. ; STEINKAMPF, M. P. ; HILL, J. A. Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. *N Engl J Med*, 2001, vol. 345, 1388-1393 [0067]
- HELLEMANS, J. ; MORTIER, G. ; DE PAEPE, A. ; SPELEMAN, F. ; VANDESOMPELE, J. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol*, 2007, vol. 8, R19 [0067]
- JOHNSTON, R. C. ; KOVACS, G. T. ; LORDING, D. H. ; BAKER, H. W. Correlation of semen variables and pregnancy rates for donor insemination: a 15-year retrospective. *Fertil Steril*, 1994, vol. 61, 355-359 [0067]
- KRAWETZ, S. A. Paternal contribution: new insights and future challenges. *Nat Rev Genet*, 2005, vol. 6, 633-642 [0067]
- LEWIS, S. E. Is sperm evaluation useful in predicting human fertility?. *Reproduction*, 2007, vol. 134, 31-40 [0067]
- MACLEOD, I. C. ; IRVINE, D. S. The predictive value of computer-assisted semen analysis in the context of a donor insemination programme. *Hum Reprod*, 1995, vol. 10, 580-586 [0067]
- MARSHBURN, P. B. ; MCINTIRE, D. ; CARR, B. R. ; BYRD, W. Spermatozoal characteristics from fresh and frozen donor semen and their correlation with fertility outcome after intrauterine insemination. *Fertil Steril*, 1992, vol. 58, 179-186 [0067]

- **MILLER, D. ; OSTERMEIER, G. C.** Towards a better understanding of RNA carriage by ejaculate spermatozoa. *Hum Reprod Update*, 2006, vol. 12, 757-767 [0067]
- **MITEVA, K. ; VALKOV, N. ; GONCHAROVA-PEINOVAL, J. ; KOVACHEV, K. ; ZLATAREV, S. ; PIRONCHEVA, G. ; RUSSEV, G.** Electron microscopic data for the presence of post-meiotic gene expression in isolated ram sperm chromatin. *Cytobios*, 1995, vol. 83, 85-90 [0067]
- **NAZ, R. K.** Effect of actinomycin D and cycloheximide on human sperm function. *Arch Androl*, 1998, vol. 41, 135-142 [0067]
- **OSTERMEIER, G. C. ; DIX, D. J. ; MILLER, D. ; KHATRI, P. ; KRAWETZ, S. A.** Spermatozoal RNA profiles of normal fertile men. *Lancet*, 2002, vol. 360, 772-777 [0067]
- **OSTERMEIER, G. C. ; GOODRICH, R. J. ; DIAMOND, M. P. ; DIX, D. J. ; KRAWETZ, S. A.** Toward using stable spermatozoal RNAs for prognostic assessment of male factor fertility. *Fertil Steril*, 2005, vol. 83, 1687-1694 [0067]
- **OSTERMEIER, G. C. ; MILLER, D. ; HUNTRISS, J. D. ; DIAMOND, M. P. ; KRAWETZ, S. A.** Reproductive biology: delivering spermatozoan RNA to the oocyte. *Nature*, 2004, vol. 429, 154 [0067]
- **PLATTS, A. E. ; DIX, D. J. ; CHEMES, H. E. ; THOMPSON, K. E. ; GOODRICH, R. ; ROCKETT, J. C. ; RAWE, V. Y. ; QUINTANA, S. ; DIAMOND, M. P. ; STRADER, L. F.** Success and failure in human spermatogenesis as revealed by teratozoospermic RNAs. *Hum Mol Genet*, 2007, vol. 16, 763-773 [0067]
- **SAMPLASKI, M. K. ; AGARWAL, A. ; SHARMA, R. ; SABANEKH, E.** New generation of diagnostic tests for infertility: review of specialized semen tests. *Int J Urol*, 2010, vol. 17, 839-847 [0067]
- **SIFFROI, J. P. ; DADOUNE, J. P.** Accumulation of transcripts in the mature human sperm nucleus: implication of the haploid genome in a functional role. *Ital J Anat Embryol*, 2001, vol. 106, 189-197 [0067]
- **SKENDZEL, L. P. ; YODEN, W. J.** Systematic versus random error in laboratory surveys. *Am J Clin Pathol*, 1970, vol. 54, 448-450 [0067]
- **STEGER, K. ; WILHELM, J. ; KONRAD, L. ; STALF, T. ; GREB, R. ; DIEMER, T. ; KLIESCH, S. ; BERGMANN, M. ; WEIDNER, W.** Both protamine-1 to protamine-2 mRNA ratio and Bcl2 mRNA content in testicular spermatids and ejaculated spermatozoa discriminate between fertile and infertile men. *Hum Reprod*, 2008, vol. 23, 11-16 [0067]
- **VANDESOMPELE, J. ; DE PRETER, K. ; PATTYN, F. ; POPPE, B. ; VAN ROY, N. ; DE PAEPE, A. ; SPELEMAN, F.** Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*, 2002, vol. 3 [0067]
- **Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction.** Cambridge University Press, 1999 [0067]
- **ZHAO, Y. ; LI, Q. ; YAO, C. ; WANG, Z. ; ZHOU, Y. ; WANG, Y. ; LIU, L. ; WANG, Y. ; WANG, L. ; QIAO, Z.** Characterization and quantification of mRNA transcripts in ejaculated spermatozoa of fertile men by serial analysis of gene expression. *Hum Reprod*, 2006, vol. 21, 1583-1590 [0067]