

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

en

Biología y Tecnología Aplicada a la Reproducción Humana Asistida

Descripción del perfil epigenómico de la infertilidad masculina

Autora: Leyre Serna Barrenechea

Tutora: María Cruz Palomino

Cotutora: Ana Isabel Castillo Varón

Alcobendas, septiembre 2023

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. INFERTILIDAD MASCULINA.....	3
1.2. BASES DE LA EPIGENÉTICA	3
1.3. FORMACIÓN DE LAS CÉLULAS GERMINALES PRIMORDIALES	4
1.4. MARCAS EPIGENÉTICAS	5
1.4.1. Metilación del ADN	5
1.4.2. Desmetilación del ADN	6
1.4.3. Modificaciones postraduccionales de histonas	7
1.4.4. ARN no-codificante	8
1.5. REPROGRAMACIÓN EPIGENÉTICA.....	9
1.5.1. DESMETILACIÓN GLOBAL DEL ADN	9
1.5.2. IMPRONTA GENÓMICA	10
1.6. TRANSMISIÓN TRANSGENERACIONAL	11
2. OBJETIVOS	12
3. MATERIALES Y MÉTODOS	13
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	15
4.1. METILOMA REFERENTE DEL ESPERMA NORMAL	15
4.2. DEFECTOS EN LA METILACIÓN DEL ADN NO IMPRONTADO.....	16
4.3. ESPERMATOZOIDES CON ERRORES DE IMPRONTA.....	19
4.4. MODIFICACIONES EN LAS HISTONAS	22
4.5. ARN NO-CODIFICANTE	24
4.6. FACTORES AMBIENTALES Y HERENCIA TRANSGENERACIONAL.....	25
4.6.1. Edad.....	26
4.6.2. Obesidad.....	26
4.6.3. Disruptores endocrinos.....	28
5. CONCLUSIONES	30
6. BIBLIOGRAFÍA	31

RESUMEN

Los patrones epigenéticos se refieren a cambios covalentes y hereditarios en la expresión génica que se producen sin alteraciones en la secuencia primaria de nucleótidos del ADN. Los cambios epigenéticos se llevan a cabo de manera muy orquestada por diferentes mecanismos como la metilación del ADN en dinucleótidos CpG, las modificaciones postraduccionales de las histonas y la presencia de ARN no codificante. Así, estos tipos de marcas epigenéticas facilitan el complejo patrón, necesario para el correcto desarrollo humano.

El epigenoma del espermatozoide es el resultado de dos periodos de reprogramación global durante la vida del individuo, los cuales conducen al borrado y restablecimiento de patrones epigenéticos correctos. Esto es esencial para conferir una expresión génica específica a la célula, siendo esencial para el correcto desarrollo embrionario en el caso de los espermatozoides. Asimismo, la reprogramación del epigenoma es fundamental para evitar la transmisión de epimutaciones. Durante el desarrollo temprano se establece un tipo de regulación epigenética específico denominado impronta genómica, la cual regula la expresión de los genes de forma monoalélica y específica del progenitor de origen. Esta marca epigenética específica es borrada y redefinida en las espermatogonias y espermatozoides tipo I. Sin embargo, se ha demostrado que hay varias regiones del epigenoma que no se borran durante la reprogramación, sugiriendo que existe una transmisión de información epigenética entre generaciones a través del espermatozoide. Además, se sugiere que existe una relación entre la firma epigenética del espermatozoide y los factores ambientales existentes durante el proceso de diferenciación de los gametos. Lo que está claro es que la formación de un patrón epigenético aberrante puede dar lugar a diversos trastornos, como la infertilidad.

Palabras clave: Epigenética, infertilidad masculina, metilación del ADN espermático, modificación de histona, ARN no codificante, herencia epigenética transgeneracional

ABSTRACT

Epigenetic patterns refer to covalent and heritable changes in gene expression that occur without alterations in the primary DNA nucleotide sequence. Epigenetic changes are carried out in a highly orchestrated manner by different mechanisms such as DNA methylation into CpG dinucleotides, histone post-translational modifications and the presence of non-coding RNA. Thus, these types of epigenetic marks facilitate the complex patterning necessary for proper human development.

The sperm epigenome is the result of three periods of global reprogramming during the life of the individual, which lead to the erasure and reestablishment of correct epigenetic patterns. This is essential for conferring cell-specific gene expression, which is essential for correct embryonic development in the case of spermatozoa. Likewise, the reprogramming of the epigenome is essential to avoid the transmission of epimutations. During early development, a specific type of epigenetic regulation called genomic imprinting is established, which regulates gene expression in a monoallelic and parent-of-origin-specific manner. This specific epigenetic mark is erased and redefined in spermatogonia and type I spermatocytes. However, it has been shown that there are several regions of the epigenome that are not deleted during reprogramming, suggesting that there is a transmission of epigenetic information between generations through the spermatogonium. Furthermore, it is suggested that there is a relationship between the epigenetic signature of the spermatozoon and the environmental factors that exist during the gamete differentiation process. What is clear is that the formation of an aberrant epigenetic pattern can lead to various disorders, such as infertility.

Key words: Epigenetics, male infertility, DNA methylation, histone modification, non-coding RNA, transgenerational epigenetic inheritance

1. INTRODUCCIÓN

1.1. INFERTILIDAD MASCULINA

La infertilidad afecta al 10-15% de la población en edad reproductiva, del cual el 85% de los casos es por una anormalidad identificable. El 15% restante no se ha podido esclarecer, y forma parte del denominado infertilidad de origen desconocido. Las causas más comunes de la infertilidad son la disfunción ovulatoria, infertilidad por factor masculino y enfermedad tubárica. Específicamente, 35% es debido a un factor masculino (Carson & Kallen, 2021).

Varios proyectos de investigación han querido elucidar la causa genética de la infertilidad masculina, ya que, aunque algunas mutaciones genéticas hayan sido identificadas, la mayoría de los responsables de los defectos en espermatozoides son desconocidos. Concretamente, sólo el 10% de la infertilidad masculina está asociada a causas genéticas (Boissonnas et al., 2013). Asimismo, características descriptivas como la concentración espermática, movilidad y morfología también han sido objeto de estudio en la infertilidad masculina. No obstante, aunque estos procedimientos siguen siendo de las únicas técnicas de rutina para diagnosticar esta condición, éstas no analizan todos los aspectos de la calidad espermática, la cual, siendo defectuosa puede afectar la capacidad de fecundación, divisiones en el desarrollo embrionario y está relacionado con un incremento en la aneuploidía y abortos. De esta manera, el desarrollo de las nuevas tecnologías-ómicas para la biomedicina ha permitido identificar nuevos marcadores para la infertilidad masculina: los cambios epigenéticos (Camprubí et al., 2017).

1.2. BASES DE LA EPIGENÉTICA

Todas las células nucleadas del cuerpo humano contienen la misma secuencia de ADN, denominada genoma, que codifica proteínas y otros productos de genes que se encargan del desarrollo desde la primera célula originada en la fecundación hasta la formación del organismo complejo multiorgánico (Inbar-Feigenberg et al., 2013). Asimismo, los espermatozoides tienen un papel fundamental en la reproducción, ya que aportan la información genética necesaria para el correcto desarrollo embrionario. No obstante, además de la secuencia de ADN, existen cambios reversibles tanto en el ADN como en ARN e histonas que también son esenciales en esta etapa, ya que modulan el momento y la localización de la expresión génica en cada célula. Esto se denomina información epigenética (Blanco Rodríguez & Camprubí Sánchez, 2019).

Los cambios epigenéticos se definen como los cambios covalentes y heredables en la función génica que se producen sin modificaciones en la secuencia de nucleótidos del ADN. Estos cambios se corresponden con diferentes mecanismos epigenéticos: la metilación del ADN, modificaciones postranscripcionales de histonas incluyendo acetilación, ubiquitinación, mono-, di- y trimetilación de lisinas (Lys; K), mono- y dimetilación de argininas (Arg; R) y fosforilación de serinas (Ser; S) y la presencia de ARN no codificante (*non-coding RNAs*; ncRNAs), siendo los ncRNAs largos (*long ncRNAs*; lncRNAs) los que más se adaptan a la definición actual de la epigenética.

La información epigenética regula la estructura de la cromatina mediante los descritos cambios para determinar en la célula una expresión génica específica, y, por lo tanto, regulan las diferencias morfológicas y funcionales de distintos tipos de células (Blanco Rodríguez & Camprubí Sánchez, 2019). Los estados activos o inactivos de la expresión génica se definen por patrones específicos determinados por modificaciones epigenéticas que dan lugar a una estructura de cromatina cerrada, que impide la transcripción, o una estructura que permite el acceso a los factores de transcripción. Esto es posible debido a que las marcas epigenéticas sirven como punto de interacción para proteínas de unión específicas como represores, complejos modeladores de cromatina y maquinaria de transcripción, entre otras (Breiling & Lyko, 2015).

Los patrones epigenéticos son dinámicos y específicos en cada tejido, y susceptibles a factores medioambientales, de tal manera que, cambios epigenéticos aberrantes son objetos de estudio en la infertilidad masculina (Rajender et al., 2011). Así, estos cambios epigenéticos podrían llegar a explicar las modificaciones fenotípicas influenciadas por el ambiente que no se demuestran por mutaciones de los genes asociadas comúnmente a diversas enfermedades.

1.3. FORMACIÓN DE LAS CÉLULAS GERMINALES PRIMORDIALES

Para poder comprender las olas de la reprogramación epigenética (*explicado en los próximos apartados*), debemos entender la formación y desarrollo de los espermatozoides desde su origen, ya que durante la gametogénesis se experimentan cambios altamente regulados en el patrón epigenético, aparte de darse cambios cromosómicos y morfológicos. Éstos son imprescindibles para la fecundación y posterior desarrollo del embrión, y transmitir la correcta información genética y epigenética a las siguientes generaciones.

En los mamíferos, las células que forman la línea germinal se denominan Células Germinales Primordiales (*Primordial Germ Cells*; PGCs), las cuales se segregan en una fase temprana del desarrollo, después de la implantación. Éstas son de origen endodérmico, y se forman desde un grupo de células epiblasticas (capa de la masa celular interna, junto al hipoblasto) en el saco vitelino durante la etapa de peri-gastrulación. Las células migran desde el saco vitelino y llegan a la cresta genital o gónadas en desarrollo, durante la sexta semana. Las PGCs gonadales, denominados gonocitos, proliferan hasta la décima semana hasta que entran en la quiescencia mitótica en la fase G1 (G0). La proliferación mitótica no se restablecerá hasta después del nacimiento. Así, mediante dos fases de meiosis y espermiogénesis se diferenciarán en espermatozoides. (López Serna, 2018).

1.4. MARCAS EPIGENÉTICAS

Las modificaciones epigenéticas más conocidas incluyen la metilación del ADN, modificaciones postraduccionales en los extremos N-terminales de las histonas y ARN no-codificantes (Inbar-Feigenberg et al., 2013):

1.4.1. Metilación del ADN

El cambio epigenético más estudiado es la metilación del ADN, por estar relacionado con la expresión y silenciamiento de genes, y a su vez por ser vital para el desarrollo de los mamíferos. La metilación ocurre, en su mayoría de veces, en la 5^o posición de las citosinas (5-metilcitosina, 5mC), en dinucleótidos 5'-CpG-3'. Alrededor del 4% de las citosinas en el genoma humano se han encontrado metiladas, es por ello que se le suele nombrar como “la quinta base” del código genético. Asimismo, han sido descritas otras modificaciones en la base C del ADN, 5-hidroximetilcitosina (5hmC), 5-formilcitosina (5fC) y 5-carboxilcitosina (5caC). También se ha visto que A, C o T se metilan fuera de los dinucleótidos CpG, en ovocitos, células madre embrionarias y células específicas del cerebro. No obstante, su función no está elucidada (Breiling & Lyko, 2015).

Los nucleótidos CpG están distribuidos de forma no aleatoria por todo el genoma, en regiones intragénicas e intergénicas, y se concentran en regiones llamadas *islas CpG* (CGI). La función biológica de las metilaciones fuera de estas islas es desconocida. Las CGIs se encuentran mayoritariamente dentro de los promotores de genes y controlan la expresión génica mediante su metilación: cuando están no-metiladas la transcripción de esos genes es activa, en cambio, cuando se metilan, el grupo metilo interacciona con diferentes proteínas de unión al ADN y evita la interacción con factores de transcripción e induce cambios en la cromatina, inactivando la transcripción (Inbar-Feigenberg et al., 2013).

La mayoría de las CGI que se encuentran en promotores fuertes no están metiladas, como, por ejemplo, los promotores de genes constitutivos y de los genes supresores del tumor. En cambio, estas islas se encuentran metiladas, es decir con función inactivadora, en genes que están silenciados y en regiones reguladoras de elementos transponibles para impedir su transposición, lo cual puede causar mutaciones en la secuencia del ADN, haciendo que un gen codificador se rompa o desaparezca (Boissonnas et al., 2013).

Las proteínas ADN metiltransferasas (*DNA Methyltransferases*; DNMTs) establecen y mantienen los patrones de metilaciones mediante la adición de grupo metilo (-CH₃) a la quinta posición del anillo de citosina obtenido del donador de grupos metilo S-adenosil-Metionina (SAM) (Figura 1).

Las proteínas que se encargan de la metilación *de novo* en las PGCs son DNMT3a y DNMT3b, las cuales establecen nuevos patrones de metilaciones; y la que se encarga de procesos de mantenimiento es DNMT1, la cual metila el ADN hemimetilado (5hmC) después de su replicación y en procesos de reparación denominados mantenimiento (Inbar-Feigenberg et al., 2013). La expresión de DNMT1 se activa durante la fase S, antes de la mitosis y es la DNMT más abundante en las células somáticas (Monk, 2015). Este DNMT es clave para la estabilidad de la información epigenética.

1.4.2. Desmetilación del ADN

La desmetilación del ADN es crucial durante el desarrollo de los PGCs y embriones, ya que mediante el borrado del perfil epigenético de las células somáticas de las que se originan las PGCs, obtienen la totipotencialidad, consiguiendo la capacidad de generar un organismo completo (Monk, 2015).

La desmetilación se basa en la eliminación del grupo metilo de las citosinas, y se da de forma activa o pasiva. En cuanto a la pasiva, sucede durante la replicación, cuando DNMT1 se silencia y no metila las cadenas de ADN recién sintetizadas, de modo que no se establece la metilación en la cadena hemimetilada. Después de varias rondas de replicación, en el cual esta enzima está inactiva, se eliminan los patrones de metilación de forma pasiva.

Por otro lado, la desmetilación activa del ADN ocurre mediante la directa eliminación del grupo metilo por la acción de las proteínas TET (*Ten Eleven Translocation proteins*). Estas proteínas reconocen 5mC y la convierten en 5hmC mediante la actividad oxidativa, la cual, a su vez, pueden ser procesadas a 5fC y 5caC (Figura 1).

Ambas modificaciones son reclutadoras de la maquinaria de reparación del ADN por escisión de bases denominada BER (*Base Excision Repair*), el cual modifica las bases y las sustituye por nuevas bases de C (Breiling & Lyko, 2015).

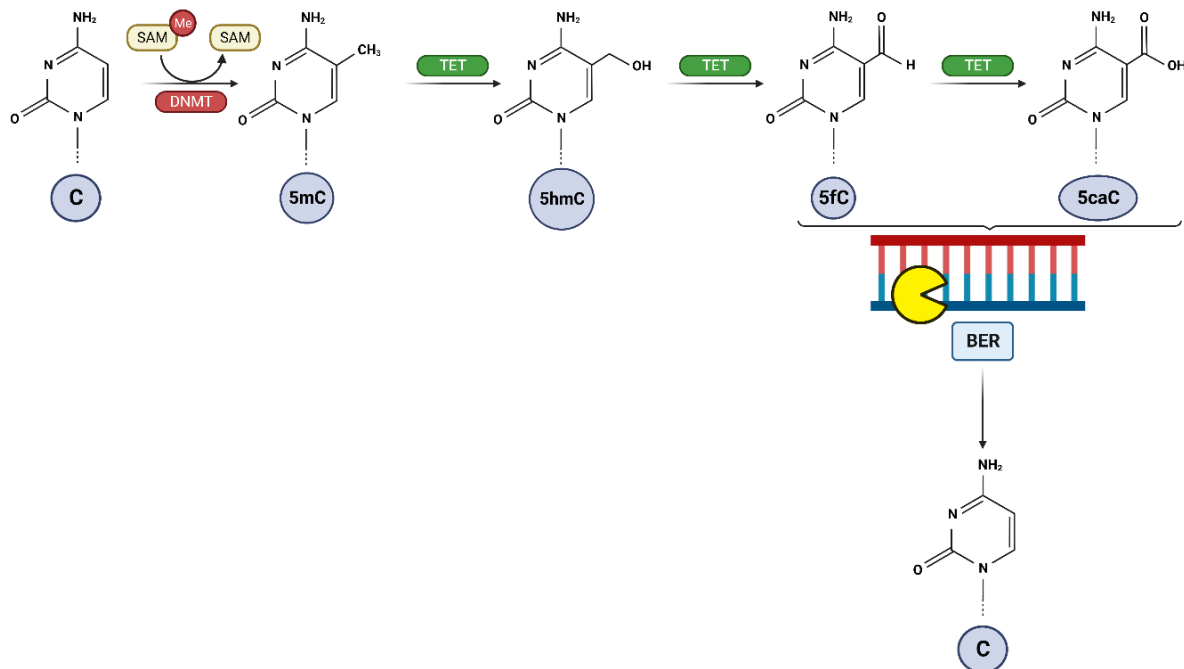


Figura 1 | Metilación y desmetilación del ADN. La citosina (C) es metilada a 5-metilcitosina (5mC) por ADN metiltransferasa (DNMT) obteniendo el metilo de S-Adenosil-Metionina (SAM), y posteriormente, oxidada a 5hmC, 5fC y 5caC por TET. 5fC y 5caC son reconocidas y convertidas a C por la maquinaria de reparación de ADN por escisión de bases (BER) (Elaboración propia con BioRender a partir de la información en Breiling & Lyko, 2015).

1.4.3. Modificaciones postraduccionales de histonas

La cromatina es un complejo formado por ADN y proteínas llamadas histonas (H1, H2A, H2B, H3 y H4). La unidad básica de la cromatina se denomina octámero de histona, y está formada por dos H2A, dos H2B, dos H3 y dos H4. Así, 146 pares de bases de ADN se enrollan alrededor del octámero, formando el *core* de un nucleosoma. La histona H1 no forma parte de los nucleosomas, sino que se encuentra en la parte externa de ésta, manteniendo estable el ADN que envuelve la estructura. Esta estructura estabiliza la cromatina y regula la expresión génica. Las histonas tienen colas que pueden presentar modificaciones postraduccionales, entre ellas, acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinación, sumoilación, ADP-ribosilación, isomerización de prolina, citrulinación, butirilación, propionilación y glicosilación (Inbar-Feigenberg et al., 2013). La suma de estas modificaciones y la coordinación entre ellas se denomina código de las histonas, ya que éstos activan o inactivan la expresión de genes mediante la descompactación o compactación de la cromatina, respectivamente (Rajender et al., 2011).

Por un lado, la acetilación que ocurre en el residuo lisina (K), específicamente en la H3 y H4, está relacionada con la activación de la expresión génica. Las enzimas que se encargan de la acetilación se denominan Histona Acetiltransferasas (HAT), las cuales mediante la acetilación de K cambian la carga de las histonas a parcialmente negativas. La repulsión entre la carga negativa de la histona y ADN resulta en la descompactación de la cromatina que hace que los factores de transcripción puedan acceder, y, por consiguiente, activar la transcripción. En cambio, la eliminación del grupo acetilo está coordinada por las Deacetilasas de histonas (HDAC) y está asociada con el silenciamiento de genes. Por otro, la metilación de los residuos H3 y H4 está regulada por las Metiltransferasas (HMT) y Desmetilasas (HDM) de histonas y puede resultar en la activación o inactivación de la expresión génica. Por ejemplo, la metilación de H3K4 está generalmente relacionada con la activación, mientras que las metilaciones en H3K9, H3K27 y H4K20 con la compactación de la cromatina y el silenciamiento de genes (Boissonnas et al., 2013). Un único residuo puede recibir más de un grupo metilo, y la cantidad y su localización transmiten una señal determinada (Rajender et al., 2011).

Tanto el residuo de la histona como el tiempo en el que se establecen y se eliminan los cambios epigenéticos son críticos durante la espermatogénesis, ya que algunos de ellos son imprescindibles para la diferenciación de las espermatogonias y convertirse en espermatoцитos (Boissonnas et al., 2013).

1.4.4. ARN no-codificante

El genoma eucariota transcribe hasta un 75% del ADN genómico. No obstante, aproximadamente sólo el 3% de estos transcritos se codifica a proteínas. Por lo tanto, aunque la mayoría del genoma se transcribe a ARN, una gran parte no se traduce a ninguna proteína. Esa parte corresponde a los ncRNAs, moléculas funcionales necesarias para la regulación epigenética de la expresión génica.

Los ncRNA se pueden clasificar según su tamaño y función: *small interfering RNA* (siRNA), microRNA (miRNA) y los ncRNA largos (lncRNA). Teniendo en cuenta que los ncRNA pequeños y medianos tienen función reguladora de la expresión génica a nivel postranscripcional, y los lncRNA a nivel pretranscripcional mediante el reclutamiento de complejos proteicos, son estos últimos los que se consideran reguladores de la expresión génica mediante modificaciones epigenéticas (Inbar-Feigenberg et al., 2013).

1.5. REPROGRAMACIÓN EPIGENÉTICA

1.5.1. DESMETILACIÓN GLOBAL DEL ADN

Después de la fecundación, en los primeros estadios del desarrollo embrionario (8-13,5 días postcoital) el patrón epigenético del cigoto sufre una reprogramación, es decir un borrado de los patrones epigenéticos de los progenitores, que permite la diferenciación celular mediante la creación de células totipotentes. Estas células se desarrollarán en componentes embrionarios y extraembrionarios mediante el establecimiento de nuevos patrones epigenéticos que definirán cada linaje embrionario (endodermo, ectodermo y mesodermo), y finalmente, un organismo complejo (Blanco Rodríguez & Camprubí Sánchez, 2019). Existen excepciones, como los genes regulados por la impronta o retrotransposones que escapan de esa reprogramación, como veremos más adelante.

Asimismo, las PGCs también sufren una desmetilación global que previene la transmisión de epimutaciones a través del gameto. Los espermatozoides, como las demás células del organismo, presentan patrones epigenéticos específicos que les otorgan una identidad y función determinada. Si simplificamos estos patrones al metiloma, éste se determina durante la diferenciación de las PGCs a espermatozoide durante la reprogramación epigenética, y resulta esencial para la regulación del desarrollo del gameto (Blanco Rodríguez & Camprubí Sánchez, 2019).

Durante este proceso de reprogramación, el ADN de la PGC debe borrar el perfil epigenético de la célula somática de la que se origina mediante una desmetilación global del ADN, obteniendo así la totipotencia (Figura 2) (Boissonnas et al., 2013). Por un lado, en una primera ola de la reprogramación, ocurre la desmetilación pasiva, en la que DNMT1 es silenciada cuando las PGCs adquieren la totipotencia de camino a la cresta genital. Una vez alcanzada la cresta genital, hay una gran expansión mitótica de las PGCs que garantiza su desmetilación pasiva. Mediante esta primera desmetilación, promotores, regiones intergénicas e intragénicas son desmetilados. Una vez alcanzado el estadio de Espermatogonia tipo A, comienza el establecimiento de un nuevo patrón de metilación, el cual se dará de una manera progresiva, y se completa antes de iniciar la meiosis (Figura 2) (Boissonnas et al., 2013).

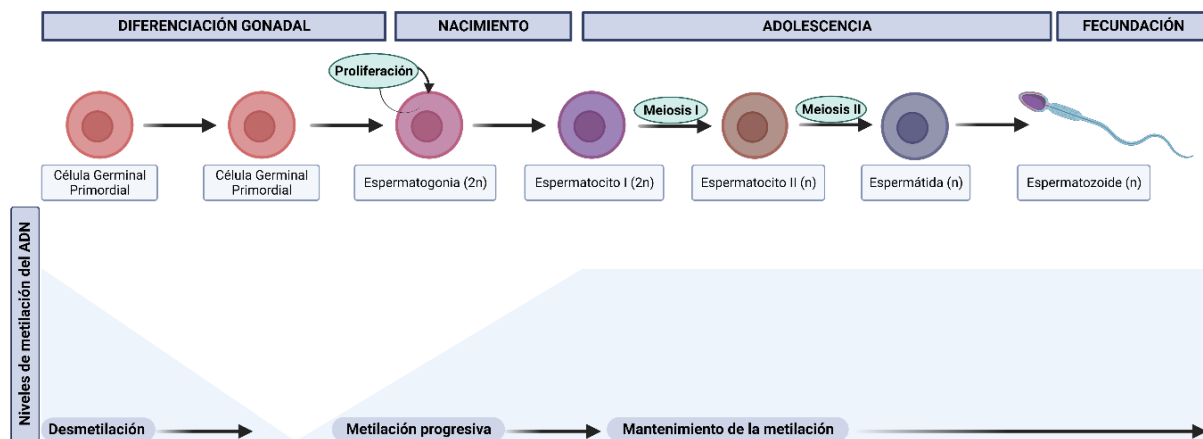


Figura 2 | Reprogramación epigenética del genoma en las Células Germinales Primordiales (PGCs). El genoma de la PGC sufre una desmetilación global durante la migración a la cresta genital. Posteriormente, el restablecimiento de los patrones de metilación del ADN se produce durante la gametogénesis: la metilación *de novo* se produce antes de la meiosis (Elaboración propia con BioRender a partir de la información de Boissonnas et al., 2013).

1.5.2. IMPRONTA GENÓMICA

Un tema de interés es el de la impronta genómica. Esto es un proceso epigenético mediante el cual un grupo pequeño de genes son marcados epigenéticamente en función de su origen parental, y así, sólo expresan el alelo materno o paterno. Es más, la marca epigenética activadora o represora de los alelos es común en todos los tipos celulares y de un individuo a otro. Más del 80% de los genes regulados por la impronta se encuentran agrupados en clústeres. Así, la expresión de los genes agrupados están regulados por regiones diferencialmente metiladas (*Differentially Methylated Region*, DMR), también conocido como secuencia corta de ADN denominado región de control de impronta genómica (*Imprinting Control Element*, ICE) (Barlow, 2011).

La impronta se hereda de célula a célula durante las divisiones mitóticas, esto es, el patrón epigenético que determina la expresión monoalélica de un determinado gen regulado por la impronta escapa de la mencionada reprogramación global del genoma que se da posfecundación. Esto es debido a que los genes regulados por la impronta, y su expresión monoalélica, son importantes para el correcto desarrollo embrionario, de tejidos extraembrionarios y neurológico. Asimismo, los alelos regulados por la impronta que no presentan metilaciones escapan de la metilación *de novo* que determinan los diferentes linajes celulares. El resultado de esta protección es el mantenimiento del estado de metilación específica de cada gen, asegurar su expresión monoalélica, y, por lo tanto, un correcto desarrollo embrionario (Barlow, 2011).

Sin embargo, esto no ocurre en las PGCs, en los cuales la impronta es borrada y redefinida en las espermatogonias y espermatoцитos tipo I, antes de su entrada en la meiosis. Para ello, se da una desmetilación activa durante una segunda ola de desmetilación, en la cual los principales protagonistas son los ADN deaminasas y resulta en la completa pérdida de la metilación del ADN (Monk, 2015). De esta manera, durante la formación de gametos haploides, todos serán portadores de las marcas activadoras y represoras. La mayoría de la metilación se adquiere durante el desarrollo fetal, pero la totalidad no se consigue hasta después del nacimiento, antes de la meiosis. Defectos en la metilación del ADN han sido asociados con la infertilidad masculina (Boissonnas et al., 2013)(Benchaib et al., 2005).

1.6. TRANSMISIÓN TRANSGENERACIONAL

Como ya hemos mencionado, además de las regiones reguladas por la impronta genómica en las células somáticas, hay otras que no se borran durante la reprogramación en ninguna célula, como las secuencias repetitivas y algunas secuencias de copia única, estas regiones escapan del borrado epigenético. Las regiones que contienen secuencias repetitivas se mantienen hipermetiladas para evitar la activación de los elementos transponibles (Blanco Rodríguez & Camprubí Sánchez, 2019). También se ha demostrado la existencia de secuencias codificantes, no relacionadas con la impronta genómica, que son resistentes al borrado epigenético, y estas parecen estar enriquecidas en genes especialmente activos en el cerebro durante la vida adulta (Tang et al., 2015). Todo ello sugiere la existencia de una transmisión transgeneracional de cambios epigenéticos a través del espermatozoide (Monk, 2015).

Esta introducción a la transmisión de la epigenética nos abre un nuevo camino hacia las variaciones y epimutaciones relacionadas con la infertilidad masculina, puesto que ha sido demostrado que, por un lado, las regiones en las que no se da el borrado de los patrones epigenéticos pueden sufrir alteraciones epigenéticas tras la exposición a ciertos factores ambientales, y, por otro lado, esa misma exposición durante el proceso de reprogramación afecta al mecanismo de adquisición del nuevo epigenoma. Por lo que las epimutaciones podrían transmitirse a la siguiente generación y ser responsables de enfermedades de inicio en la edad adulta (Blanco Rodríguez & Camprubí Sánchez, 2019).

2. OBJETIVOS

El presente trabajo pretende realizar una revisión bibliográfica de la literatura disponible sobre los cambios epigenéticos en pacientes con infertilidad masculina previamente demostrada respecto a aquellos fértiles.

El desarrollo de las nuevas tecnologías ha permitido identificar nuevos marcadores de la infertilidad masculina: los cambios epigenéticos. Por consiguiente, el objetivo principal de este estudio es describir los cambios epigenéticos que podrían suceder en el gameto masculino, analizar su efecto sobre la infertilidad masculina y llevarlo a la validez clínica.

En último instante, también se abordará el tema la transmisión de los cambios epigenéticos influenciados por el ambiente y su relación con la infertilidad masculina.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Esta revisión se ha realizado a través de una búsqueda sistemática de literatura comprendida temporalmente entre los meses de enero y julio de 2023 en el motor de búsqueda bibliográfico PubMed. Para ello, se han seleccionado 22 artículos científicos que fueron publicados en los últimos años (2005-2023). La búsqueda se ha realizado en inglés en su totalidad, por ser principal idioma de la comunidad científica y publicarse el 98% de los resultados científicos en este idioma.

Para realizar la búsqueda, se utilizaron palabras claves sobre las principales características de la epigenética y su definición, la infertilidad masculina, el efecto de los cambios epigenéticos en la infertilidad masculina y la transmisión intergeneracional de los cambios epigenéticos. Asimismo, la base datos existente en la Biblioteca Digital CRAI Dulce Chacón de la Universidad Europea de Madrid ha sido de utilidad para consultar libros sobre las bases de la epigenética.

Para poder esclarecer el objetivo principal de este trabajo, primero se ha definido el término epigenética y se han descrito sus principales características. Para ello, en primer lugar, se hizo una primera búsqueda generalizada y se introdujeron palabras clave en inglés en el buscador de PubMed como “*Epigenetics*”, “*Genomic imprinting*” y “*DNA methylation*”.

Una vez obtenida una visión general del tema, con el fin de centralizar la búsqueda en la infertilidad masculina, se hizo uso de palabras clave más específicas como “*Spermatogenesis*”, “*Spermatozoal RNAs*” y operadores booleanos como “*Epigenetics AND male infertility*”, “*Imprinted genes AND sperm*” y “*Epigenetic changes AND environment*”, entre otras. Una vez leídos y analizados los artículos que aparecían en las primeras entradas, también se analizó la literatura de las referencias de estos mismos.

Los artículos y revisiones fueron seleccionados, por un lado, por su claridad al describir las características principales de la epigenética, y por otro, por su relevancia aportado al tema de discusión. Para una organización de la información obtenida se ha utilizado el gestor de referencias bibliográficas Zotero, que permite recopilar, organizar, citar y sincronizar los artículos seleccionados.

A continuación, se enumeran los criterios de inclusión y de exclusión:

<i>CRITERIOS DE INCLUSIÓN</i>	<i>CRITERIOS DE EXCLUSIÓN</i>
Artículos científicos en inglés	Artículos no disponibles
Publicaciones que tratan sobre epigenética, infertilidad masculina o ambas.	Comentarios, cartas al director
Artículos publicados para los resultados y discusión comprendidos temporalmente entre 2011-2023	Estudios con experimentación en animales
	Estudios no citados
	Resúmenes no publicados como manuscritos completos

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La contribución del espermatozoide va más allá de la transmisión del genoma paterno al ovocito. Así, entre los mencionados cambios epigenéticos, la metilación del ADN es uno de los mecanismos epigenéticos más estudiados. El metiloma del espermatozoide es el resultado de una serie de acontecimientos que ocurren durante la espermatogénesis y embriogénesis. Por lo que el perfil de metilación del esperma es una huella del gameto y está diseñado para el correcto desarrollo de ambos procesos.

La metilación del ADN está sujeta a alteraciones que pueden ser causadas por factores genéticos (variaciones en la secuencia de ADN de los factores involucrados en el establecimiento o eliminación de la marca epigenética), entorno intrauterino, exposición a toxinas, tratamientos hormonales, obesidad y dieta, entre otros. Los patrones de metilación del ADN ayudan a regular la expresión genética. No obstante, la plasticidad del metiloma se presta a una vulnerabilidad frente a posibles errores durante la reprogramación debido a influencias ambientales exógenas y endógenas. Por lo tanto, los espermatozoides pueden contener variaciones sustanciales del metiloma.

Hoy en día, con el fin de investigar la posible etiología de la infertilidad en pacientes con azoospermia y oligozoospermia, se realizan el cariotipo, el cribado de microdelección del cromosoma Y, y las pruebas de mutación del gen CFTR de manera rutinaria. Sin embargo, las pruebas actuales, tienen capacidad limitada para identificar gran variedad de alteraciones genéticas y epigenéticas que podrían estar implicadas en la infertilidad idiopática. Diagnosticar la causa de la infertilidad tiene una importancia clínica indiscutible, ya que podría tener implicaciones en la salud reproductiva del paciente y en la salud de la siguiente generación (Ma et al., 2023).

4.1. METILOMA REFERENTE DEL ESPERMA NORMAL

La correcta marca de metilación del genoma del espermatozoide es esencial para determinar la expresión o silenciamiento de los genes específicos que lleva al correcto desarrollo de éste. Aunque la tendencia sea estudiar las características diferenciales de pacientes infértiles, el conocimiento del epigenoma de referencia, basado en pacientes sanos, es crucial para identificar las variaciones epigenéticas y su relación con la patogenicidad.

Según un reciente estudio, el metiloma del esperma es específico y homogéneo, con una tendencia clara hacia la hipometilación, especialmente en los CpGs de los promotores (Camprubí et al., 2017). La hipermetilación en las regiones promotoras se correlaciona con una disminución en la expresión génica, mientras que la hipometilación la favorece. Por lo tanto, las funciones biológicas dependen del estado de metilación de los CpGs. Los autores observaron una asociación entre la hipometilación y procesos de transcripción, ciclo celular, organización cromosómica, metabolismo de los ácidos nucleicos y la diferenciación celular. Esto podría estar relacionado con la espermatogénesis y el desarrollo embrionario, y, por lo tanto, explicar por qué los patrones aberrantes del metiloma se asocian con la infertilidad masculina. En cambio, los promotores hipermetilados no parecen ser cruciales para estos procesos y se mantienen metilados durante la espermatogénesis. Dichos genes están relacionados con la respuesta del sistema inmunológico, percepción sensorial, señalización y adhesión celular.

También vieron que los CpGs de los cromosomas X, Y y 18 están más hipometilados comparando con aquellos de otros cromosomas. Los datos anteriores apoyan previos descubrimientos sobre la importancia de los genes del cromosoma sexual en la espermatogénesis. Los mismos autores observaron que una cuarta parte de los CpGs observados eran variables entre las muestras. No obstante, dicho estado de metilación de los CpGs variables no parece ser crítico para la funcionalidad del metiloma espermático, ya que para sacar esta conclusión se estudiaron los CpGs informativos de 19 pacientes normozoospermicos con fertilidad demostrada. Por lo tanto, las variaciones no pueden ser causa de infertilidad (Camprubí et al., 2017).

4.2. DEFECTOS EN LA METILACIÓN DEL ADN NO IMPRONTADO

La relación entre la metilación del ADN espermático y la fertilidad masculina ha sido estudiada tiempo atrás por diferentes estudios y todos relacionaron los defectos de la metilación con la infertilidad. Los estudios demuestran que los patrones de metilación del ADN espermático son fundamentales en la espermatogénesis para que el gameto sea funcional y se dé un correcto desarrollo embrionario. Es más, la disminución del potencial reproductivo podría deberse a una metilación anormal en los genes expresados en los testículos que repercute en la calidad seminal (Boissonnas et al., 2013; Laqqan et al., 2017; Ma et al., 2023; Santi et al., 2017).

Se observaron niveles anormalmente elevados de metilación en ADN de muestras de semen de pacientes con oligoastenoteratozoospermia (OAT). Se sugiere que, de acuerdo con la explicación más sencilla, esto sea debido a un inadecuado borrado de las marcas de metilación, y no a una metilación *de novo* defectuosa. Este defecto afecta a genes de copia única, genes improntados y elementos repetitivos. Más estudios de esta revisión están resumidos en la tabla 1 (Boissonnas et al., 2013).

Tabla 1. Resumen de los estudios recopilados en la revisión Boissonnas et al., 2013 para explorar la relación entre el nivel de metilación del ADN espermático y la fertilidad masculina.

<i>Referencia</i>	Conclusiones
<i>Benchaiib et al., 2005</i>	Relacionaron altos niveles de metilación global del ADN espermático con alta tasa de embarazo, asociando los defectos de metilación a la infertilidad.
<i>Houshdaran et al., 2007</i>	Observaron niveles inadecuadamente elevados de metilación de ADN en genes no impresos en semen con OAT debido a un borrado inadecuado de marcas de metilación.
<i>Aston et al., 2012</i>	Describen un patrón de metilación alterado en pacientes con parámetros seminales alterados, relacionando niveles globales de metilación del esperma con la fertilidad.
<i>Poplinski et al., 2009</i>	Los errores de metilación, tanto hipermetilación como desmetilación, asociados a OAT son observados por más grupos, confirmando una asociación entre la infertilidad por factor masculino y las alteraciones en la metilación del ADN.
<i>Hammoud et al., 2010</i>	
<i>Aston et al., 2012</i>	
<i>Navarro-Costa et al., 2010</i>	Observaron una metilación anormal en el promotor de <i>CREM</i> y <i>DAZL</i> en pacientes con OAT.
<i>Nanassy & Carrell, 2011</i>	
<i>Jenkins et al., 2016</i>	Observaron una disminución de los niveles de metilación en dos genes, <i>HSPA1L</i> y <i>HSPA1B</i> .

Todos estos estudios apoyan la hipótesis de que los patrones de metilación de genes no impresos son esenciales para el funcionamiento normal de los espermatozoides. En efecto, la desregulación de su metilación está relacionada con anomalías de los diferentes parámetros seminales (tabla 2).

Tabla 2. Resumen de metilación aberrante de algunos genes no impresos asociada a anomalías de los parámetros seminales (adaptación de Rotondo et al., 2021).

Gen	Función	Parámetros seminales asociados	Referencias
<i>CREM</i>	Regulador de células germinales	No especificado	Nanassy and Carrell 2011
<i>DAZL</i>	Regulador de células germinales y gametogénesis	OAT	Navarro-Costa et al., 2010
<i>HSPAIL</i>	Chaperona molecular	Normozoospermia*	Jenkins et al., 2016b
<i>HSPAIB</i>	Chaperona molecular	Normozoospermia*	Jenkins et al., 2016b

*Asociada con menores tasas de embarazo: la acumulación de estas chaperonas hace que los espermatozoides sean más susceptibles a interacciones nocivas.

También se han detectado hipermetilaciones en los cromosomas 8, 9, 10, X e Y en el esperma de pacientes con aborto recurrente, y se identificaron secuencias específicas diferencialmente metiladas en *DYDC2* y *NXF3*, genes con rol importante en la espermatogénesis. Por un lado, *DYDC2* es una proteína que forma una subunidad de complejos moleculares implicados en la compensación de la dosis del cromosoma X, metilación de histonas, la red del trans-Golgi y carcinogénesis. Por otro, *NXF3* es necesario en la secreción de proteínas en las células de Sertoli y regulación transcripcional inducida por TGF- β de otros genes asociados con la maduración de las células de Sertoli y su reestructuración de la barrera hematotesticular (BTB) (Ma et al., 2023). La hipermetilación de estos genes provoca el descenso de su expresión e inhibición de la función de los genes, por lo que se sugiere su posible implicación en la infertilidad masculina.

En otro estudio (Laqqan et al., 2017) se analizó el nivel de metilación en tres CpG, cg23081194, cg25750688 and cg04807108, en pacientes oligozoospermicos y fértiles. Estos sitios están asociados con la concentración y función espermática, y, por lo tanto, la fertilidad. Éstos están localizados en el intrón 2 y secuencias intergénicas del gen *UBE2G2*, la cual codifica la enzima conjugadora de ubiquitina E2G2, integrante del proceso de degradación de las proteínas.

Se encontró un nivel particularmente alto de E2G2 en los espermatozoides de pacientes fértiles, ya que la ubiquitinación y la desubiquitinación desempeñan un papel fundamental en las fases posteriores de la espermatogénesis, y muchos estudios han indicado la importancia de este proceso en la fecundación. Una disfunción del sistema de ubiquitina ocasiona una alteración de la maduración espermática, dando lugar a espermatozoides con morfología y capacidad anormal, lo que está muy asociado a la infertilidad masculina.

Existe una correlación significativa entre el nivel de metilación en el CpG cg25750688 en el amplicón del gen *UBE2G2* y los parámetros del semen, incluyendo el porcentaje de espermatozoides de forma normal. También se ha descrito una correlación similar en el CpG cg04807108. Cabe mencionar que las mencionadas diferencias fueron corroboradas mediante un estudio de validación.

4.3. ESPERMATOZOIDEOS CON ERRORES DE IMPRONTA

Los genes improntados desempeñan un papel fundamental en el desarrollo embrionario, tejidos extraembrionarios y desarrollo neurológico. Las marcas epigenéticas que establecen la impronta genómica dan lugar a una expresión monoparental y se establece durante la línea germinal para permitir un desarrollo adecuado desde las primeras etapas de la embriogénesis. Para ello, es imprescindible la adecuada funcionalidad de DNMT y factores implicados en la reprogramación epigenética de la línea germinal masculina (Camprubí et al., 2012). No obstante, la metilación alterada de los genes improntados está relacionada con la fragmentación del ADN y abortos, así como la alteración neurológica, metabólica y de desarrollo fetal (Ma et al., 2023).

Recientemente, se ha descrito una relación entre la infertilidad masculina y las anomalías de la impronta en el esperma. Camprubí et al., 2012 estudió el perfil de metilación de los ICR de 11p15.5, 15q11-q13 y el IG-DMR y el MEG3-DMR de 14q32.2. Este análisis mostró que una gran proporción de pacientes presentaban anomalías en al menos 20% de los CpG estudiados respecto a aquellos sanos (Camprubí et al., 2012). Asimismo, la gran mayoría de los pacientes mostraba al menos un CpG alterado. Sin embargo, la importancia biológica de la presencia de la hipo- o hipermetilación de cada CpG específico puede ser irrelevante, si tenemos en cuenta que las regiones improntadas no muestran valores homogéneos de metilación y la mayoría se encuentran hipometilados. Por eso, se consideró que no todos los individuos infértiles que presentaban errores de metilación en al menos un CpG podían ser evaluados como individuos con anomalías. Estos errores, detectables en forma de un patrón específico de metilación, podrían indicar un funcionamiento deficiente de la maquinaria BER, el cual implicaría una eliminación insuficiente de las marcas de la impronta preexistentes en PGCs (Camprubí et al., 2017).

No obstante, el cúmulo de diferencias en los patrones de metilación de CpG específicos entre pacientes fértiles e infértiles puede ser debido a que los genes improntados paternos contribuyen al desarrollo de los tejidos extraembrionarios, por lo que la pérdida de las

metilaciones en los loci improntados pueden causar irregularidades en el desarrollo de la placenta o provocar un retraso del crecimiento intrauterino (IUGR) (Camprubí et al., 2012).

Asimismo, varios estudios indican que las anomalías de metilación en regiones reguladas por la impronta en individuos infértiles están relacionadas con oligozoospermia. Éstos indican que a medida que aumenta la gravedad de la oligozoospermia, aumenta la frecuencia de las alteraciones de metilación (Camprubí et al., 2017). La presencia de anomalías en la metilación podría provocar alteraciones en el emparejamiento meiótico de los cromosomas, y esto podría suponer el detenimiento del ciclo celular, reduciendo el número final de espermatozoide. Así, los individuos con problemas de fertilidad generan un porcentaje de espermatozoides con anomalías en la metilación de ADN en regiones reguladas por impronta superior al de los individuos control (Camprubí et al., 2012).

El metaanálisis de Santi et al., 2017 concluyó que la infertilidad masculina está relacionada con la reducción de metilación de *H19*, gen no codificante con impronta paterna que funciona como supresor tumoral, el aumento de metilación en los genes *MEST*, gen con impronta materna de la superfamilia de la hidrolasa, y *SNRPN*, gen con impronta materna que codifica un complemento del complejo de ribonucleoproteína (RNP). Confirmaron que hombres con infertilidad presentaron menor metilación en el gen *H19* y, por lo tanto, mayor expresión del alelo paterno comparado con aquellos que eran fértiles. Esto sugiere que la evaluación de la metilación aberrante en los genes improntados podría considerarse un marcador sugerente en el diagnóstico de la infertilidad masculina.

En el estudio de Laqqan et al., 2017, se describen más cambios en los patrones de metilación relacionados con infertilidad masculina. Todos ellos aparecen resumidos en la tabla 3.

Tabla 3. Resumen de estudios recopilados en Laqqan, Tierling, Alkhaled, LoPorto, et al., 2017 que describen los cambios de los patrones de metilación en genes de impronta que difieren significativamente en los varones infértiles frente a los normozoospermicos.

Referencia	Conclusiones
<i>Krausz et al., 2012</i>	La metilación del ADN espermático es crucial durante la espermatogénesis. La metilación en hombres normozoospermicos es muy uniforme, independientemente de la calidad estructural y morfológica de las subpoblaciones espermáticas.
<i>Xu et al., 2016</i>	Correlacionaron disminución en el nivel de metilación de los genes impresos <i>MEST</i> , <i>GNAS</i> , <i>FAM50B</i> y <i>H19</i> en espermatozoides de pacientes con astenozoospermia, con lo que podrían estar entre los mecanismos asociados a la baja motilidad espermática.

<p><i>Laqqan, Tierling, Alkhaled, Lo Porto, et al., 2017</i></p>	<p>Disminución significativa del nivel de metilación en todos los CpGs para el amplicón <i>PRICKLE2</i> y el gen <i>ALS2CR12</i>. También se observó una disminución significativa de la metilación para los amplicones <i>ALDH3B2</i> y <i>PTGIR</i>. Todos estos genes son imprescindibles en la capacitación espermática y espermatogénesis.</p>
<p><i>Marques et al., 2008</i></p>	<p>Describen que pacientes con <10 M/mL de espermatozoides presentan metilación defectuosa de genes impresos. Hipometilación en <i>H19</i> y sitio de unión de <i>H19-CTCF</i>, e hipermetilación en <i>MEST</i>.</p>
<p><i>Poplinski et al., 2009</i></p>	<p>Pacientes con infertilidad de origen desconocido con bajo recuento de espermatozoides mostraron hipermetilación del DMR en <i>MEST</i> e hipometilación del ICR en <i>IGF2/H19</i> comparando con un grupo de control con parámetros seminales normales. La hipermetilación de <i>MEST</i> se asoció con alteraciones de la motilidad y morfología espermática.</p>
<p><i>Boissonnas et al., 2010</i></p>	<p>Confirman que la pérdida de metilación de los GpGs en DMR <i>IGF2</i> y <i>H19</i> se relaciona con pacientes oligozoospermicos. Concluyen que algunos DMRs son más sensibles que otros a la metilación y que podría depender del estado de compactación del ADN.</p>
<p><i>Aston et al., 2015</i></p>	<p>Patrones de metilación de ADN espermático son muy estables entre muestras de diferentes individuos, tal y como se manifiesta en Camprubí et al., 2017. También sugieren que los patrones de metilación son altamente predictivos del estado de fertilidad y de la calidad embrionaria de FIV, ya que el perfil de metilación genómica es diferente en los hombres con embriones de baja calidad.</p>
<p>Laqqan & Hammadeh, 2018</p>	<p>Observaron una disminución significativa en el nivel de metilación en varones subfértiles en todos los CpGs que se relacionan con los genes <i>TYRO3</i>, <i>CGβ</i>, y <i>FAM189A1</i>. Estos genes están relacionados con la espermatogénesis, proliferación, diferenciación y supervivencia celular.</p>

Parece ser que la metilación del ADN en los espermatozoides desempeña una función esencial en la espermatogénesis, y los estudios anteriores demuestran que una de las razones más comunes que conducen a la infertilidad puede estar relacionada con una metilación anormal en genes específicos que se expresan en los testículos. Es más, los estudios recopilados han observado una correlación entre el nivel de metilación del ADN y la infertilidad masculina.

En la tabla 4, se puede ver la recopilación de artículos que respaldan la correlación entre la metilación aberrante de algunos genes improntados y parámetro seminal afectado.

Tabla 4. Resumen de metilación aberrante de algunos genes impresos asociada a anomalías de los parámetros seminales (adaptación de Rotondo et al., 2021).

Gen	Alelo improntado	Función	Parámetros seminales asociados	Referencias
<i>GNAS</i>	Materno/ Paterno	Subunidad de G-proteína alfa	Oligozoospermia	Tang et al., 2018
			Oligoastenozoospermia	Zhang et al., 2019
<i>H19</i>	Paterno	Supresor tumoral (lncRNA)	Oligozoospermia	Tang et al., 2018; Marques et al., 2008; Li et al., 2016; Marques et al., 2004
			Oligoastenozoospermia	Dong et al., 2017; Peng et al., 2018
			OAT	Boissonas et al., 2010
<i>IGF2</i>	Materno	Factor de crecimiento	No especificado	Poplinski et al., 2010; Ni et al., 2019
<i>IGF2-H19</i>	Materno/ Paterno	Factor de crecimiento	Oligozoospermia	Rotondo et al., 2013; Bruno et al., 2018
			Astenozoospermia	Lou et al., 2019
<i>MEST</i>	Materno	Hidrolasa	Oligozoospermia	Houshdaran et al., 2007; Kläver et al., 2013; Marques et al., 2008; Marques et al., 2004; Kobayashi et al., 2007; Hammoud et al., 2010
			Oligoastenozoospermia	Zhang et al., 2019
<i>SNRPN</i>	Materno	Ribonucleoproteína Nuclear Pequeña	Oligozoospermia	Hammoud et al., 2010
			Oligoastenozoospermia	Botezatu et al., 2014; Peng et al., 2018
			Asteno- /teratozoospermia	Dong et al., 2017

Fallos en el mantenimiento de los patrones de metilación de los genes impresos de la línea germinal están asociados a una baja calidad espermática y tasa de embarazo, así como un desarrollo embrionario deficiente (Rotondo et al., 2021). Tal y como se ha podido observar, son varios los genes con metilación defectuosa asociados a anomalías en los parámetros seminales. No obstante, son necesarios ensayos clínicos prospectivos adecuados para identificar la utilidad del umbral de metilación de estos genes improntados durante los procesos de reproducción asistida.

4.4. MODIFICACIONES EN LAS HISTONAS

Durante la espermiogénesis, el núcleo de las espermátidas sustituye el 85% de las histonas canónicas por pequeñas proteínas nucleares, conocidas como protaminas 1 y 2 (P1

y P2) mediante un proceso de remodelación de la cromatina, el cual una vez finalizado, P1 y P2 están presentes en una proporción de 1:1, aproximadamente. Este intercambio es fundamental durante la maduración del gameto masculino y conversión en espermatozoide para promover una motilidad eficiente, y, por consiguiente, una correcta fecundación y protección del ADN frente al hostil entorno del tracto reproductor femenino (Boissonnas et al., 2013)

El ARN de los espermatozoides es marcador de la infertilidad masculina. La retención anormalmente elevada de ARNm de protamina y una ratio anormal de P1/P2 están asociadas con la desregulación de la traducción de la protamina, deficiencia de protamina en el esperma, y, por lo tanto, morfología espermática anormal, aumento del daño del ADN y reducción de las tasas de fecundación e implantación. Por ejemplo, la reducción de P2 provoca astenozoospermia (Boissonnas et al., 2013; Ma et al., 2023).

Este proceso permite el establecimiento de estructuras altamente ordenadas y compactas, y finalmente, la condensación nuclear del esperma, parámetro imprescindible para estimar la calidad del esperma humano. Todos los genes localizados en este locus se silencian, ya que la compactación es incompatible con la transcripción. Por lo tanto, es importante, por un lado, estabilizar los ARNm producidos para permitir su traducción en etapas posteriores por medio de proteínas de unión a ARN (RBPs), los cuales controlan el almacenamiento de los transcritos (Blanco Rodríguez & Camprubí Sánchez, 2019).

Por otro lado, el núcleo de los espermatozoides conserva un número limitado de histonas residuales, aproximadamente un 15%. Como la cromatina nucleosómica es estructuralmente más abierta que la cromatina empaquetada con protamina, esto permite que los genes de esos loci sean susceptibles a la maquinaria de transcripción, y, por consiguiente, su activación. Esto no es debido a una sustitución deficiente de las protaminas, sino que, las histonas empaquetan secuencias específicas que están implicados en procesos de desarrollo y espermatogénesis, como genes regulados por la impronta, genes *HOX* y factores de señalización. En concreto, se ha demostrado que los genes *HBE1* y *HBG1/2* (hemoglobina γ 1 y 2), que se expresan en el embrión, permanecen empaquetados por histonas, al contrario de los genes *HBB* (hemoglobina β) y *HBD* (hemoglobina δ), expresados en la vida fetal y adulta (Blanco Rodríguez & Camprubí Sánchez, 2019).

Las histonas tienen múltiples modificaciones postraduccionales activadores y silenciadoras, lo que sugiere que, por un lado, la expresión está altamente controlada

epigenéticamente en esta zona, mediante las mencionadas modificaciones covalentes como metilación o acetilación. La acetilación de las histonas relaja la cromatina y la hace accesible a los factores de transcripción. La acetilación de las lisinas de H3 y H4 es elevada en las células madre masculinas y se elimina durante la meiosis. No obstante, la reacetilación de H4 es esencial para el intercambio de histonas por protamina, de lo contrario resulta en una infertilidad masculina grave, tal y como se comprobó *in vitro* mediante el uso del inhibidor de la HDAC, Tricostatina A (Boissonnas et al., 2013).

Asimismo, las modificaciones mono-, di- y trimetilación de H3K4, H3K9 y H3K27 son esenciales para la progresión de la espermatogénesis. El nivel de metilación de H3K4 alcanza su máximo en las espermatogonias, y es necesario para que las células madre inicien la diferenciación y pasen a convertirse en espermatoцитos. Después, disminuye durante la meiosis. Por el contrario, el nivel de metilación de H3K9 y H3K27 aumenta durante la meiosis, pero la eliminación del metilo de H3K9 al final de la meiosis es esencial para el inicio de la espermiogénesis (Boissonnas et al., 2013).

Por otro lado, se sugiere que las histonas marcan conjuntos de genes que se activarán durante el desarrollo temprano. Para ello, las histonas se retienen en los promotores de genes del desarrollo, genes de microARNs y loci improntados. La desregulación en los patrones epigenéticos de estas proteínas se traduce en una anomalía de la maduración espermática, y por lo tanto, infertilidad (Blanco Rodríguez & Camprubí Sánchez, 2019). Sin embargo, se necesitan más estudios para evaluar el riesgo de la transmisión de anomalías epigenéticas por los gametos, para poder evaluar el riesgo real para el feto.

4.5. ARN NO-CODIFICANTE

Es bien sabido que el ARN tiene un papel dinámico y que una gran fracción de los ARN no se traducen a proteínas. En los espermatozoides, los ARN contribuyen a estabilizar la envoltura nuclear y la interacción entre las histonas del ADN durante la transición protamínica (Boissonnas et al., 2013). Éstos se denominan ARN no codificantes (ARNnc) y sirven como controladores de la expresión génica. El ARN espermático ha sido estudiado debido a su gran complejidad y diversidad. En la última década, se han caracterizado diferentes poblaciones de ARNnc, demostrando su contribución en procesos relacionados con la espermatogénesis, fertilización y embriogénesis (Blanco Rodríguez & Camprubí Sánchez, 2019).

Dependiendo de su longitud, se diferencian entre los largos, lncARN, y cortos, sncARN. Dado que los primeros son los únicos que funcionan a nivel pretranscripcional, son los que más se adaptan a la definición de modificación epigenética. Son especialmente abundantes en el transcriptoma del esperma, por lo que se piensa que tiene papel fundamental en la fertilidad masculina. En cambio, la familia de sncRNA controla la expresión de reguladores epigenéticos, como DNMTs, y promueven la modificación de la cromatina, mediante modificaciones postranscripcionales como la formación de estructuras complementarias en el 3' UTR que conduce a la degradación de mRNAs o represión traslacional (Blanco Rodríguez & Camprubí Sánchez, 2019). Sin embargo, la desregulación de la metilación de los sncRNA está relacionado con la infertilidad. Por ejemplo, un tipo son los piRNAs, los cuales participan en el silenciamiento de elementos repetidos de ADN y son indispensables para el desarrollo de las células germinales. La hipermetilación de los genes de procesamiento piRNA, *PIWIL2* y *TDRD1*, se ha observado en pacientes con fallo espermatogénico, y la hipermetilación en *INSL6*, *MAEL*, *SLC25A31* y *SPO11* relacionado con un bajo recuento de espermatozoides (Camprubí et al., 2016).

4.6. FACTORES AMBIENTALES Y HERENCIA TRANSGENERACIONAL

Uno de los aspectos más preocupantes de las anomalías epigenéticas es que estos defectos pueden transmitirse a la descendencia e influir en la susceptibilidad a las enfermedades. El estado de metilación de los CpGs asociados a regiones resistentes a la reprogramación epigenética son objeto de estudio cuando hablamos de la memoria epigenética y herencia transgeneracional en humanos (Laqqan et al., 2017).

Existen regiones génicas del genoma espermático resistentes a la desmetilación y metilación *de novo*, por lo que son candidatos para la herencia transgeneracional. Encontraron que la mayoría de estos candidatos corresponden a regiones relacionados con la regulación de los mecanismos de transcripción y splicing, regiones no codificantes repetitivas y regiones codificantes (Laqqan et al., 2017).

Así, la herencia transgeneracional está asociada a la transmisión de ADN, ARN y proteínas a través de la línea germinal. No obstante, para poder hablar de herencia epigenética, la variación debe ser resistente a los periodos de reprogramación a los que se enfrenta el epigenoma, puesto que esto garantizaría una transmisión estable a través de las generaciones.

También está demostrado que la epigenética está influenciada por factores ambientales como la edad u obesidad o sustancias producidas naturalmente (micotoxinas y fitoestrógenos), producidas sintéticamente (metales pesados, furanos, alquilfenoles, benzofenonas, bisfenoles...), y que ésta afecta a generaciones futuras. Sin embargo, las bases moleculares de este fenómeno no se conocen bien y parecen variar según los inductores (Camprubí et al., 2017). Varios estudios han determinado que la exposición a factores ambientales determinados durante el proceso de diferenciación de los gametos afecta a los mecanismos que establecen el epigenoma espermático. Así, la regulación epigenética cambia en función de los estímulos ambientales, y, por lo tanto, se establece la plasticidad de los patrones epigenéticos según las circunstancias de la vida del individuo. En efecto, algunas de estas epimutaciones podrían transmitirse a través de los espermatozoides a la descendencia (Blanco Rodríguez & Camprubí Sánchez, 2019; Rajender et al., 2011).

Es necesario mencionar que las alteraciones epigenéticas asociadas a factores ambientales afectan principalmente a las espermatogonias, ya que la cromatina en los espermatozoides es una estructura compacta y condensada, por lo que es resistente a las perturbaciones inducidas por el medio ambiente.

4.6.1. Edad

Algunos autores han encontrado una correlación entre la edad y aumento de metilación de ADN en genes asociados con fertilidad masculina (Camprubí et al., 2016). Se ha descrito un genoma más heterogéneo e hipometilado en el ADN de personas de edad avanzadas comparando con el de recién nacidos.

Las variaciones asociadas a la edad avanzada están generalmente implicadas en enfermedades neuropsiquiátricas como el autismo y la esquizofrenia. Esto sugiere la transmisión de epimutaciones asociadas a trastornos cerebrales. Los mecanismos que provocan este tipo de alteraciones relacionadas con la edad no están determinados. Sin embargo, parece ser que la tasa de proliferación celular tiene influencia, ya que las células altamente proliferativas, como lo son las células germinales masculinas, exhiben una mayor magnitud de cambios en el metiloma (Blanco Rodríguez & Camprubí Sánchez, 2019).

4.6.2. Obesidad

La obesidad puede inducir infertilidad masculina por diferentes factores que, en última instancia, afectan la espermatogénesis. Los hombres obesos presentan una mayor incidencia

de epimutaciones espermáticas. Por un lado, se han descrito diferencias de metilación del ADN espermático en CpG específicos de genes impresos entre hombres con sobrepeso y peso normal, ya que la obesidad trae consigo aumento del aporte energético, con la consiguiente inflamación, alteración del metabolismo y señalización endocrina. Así, los cambios en la composición molecular del esperma pueden afectar a la metilación del ADN. La obesidad reduce la producción de testosterona y aumenta la proporción de estrógenos, produciendo alteraciones funcionales en los testículos. Esta alteración puede influir en la fase proliferativa de las espermatogonias, donde se expresan las DNMT1 en abundancia, dando lugar a errores de metilación que provocan infertilidad. Otros autores, en cambio, mencionan que la obesidad produce un aumento de la temperatura escrotal provocando la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Éstas causan daños en el ADN perturbando la funcionalidad de DNMT, y finalmente, resulta en variaciones en el metiloma (Keyhan et al., 2021).

El semen de aquellos con sobrepeso presenta un porcentaje de metilación inferior en los DMRs de *MEG3*, *NDN*, *SNRPN* y *SGCE/PEG10*, e hipermetilación en los DMRs de *MEG3-IG* y *H19*. Muchos de los genes identificados tienen funciones reguladoras en procesos de desarrollo y metabólico. Más estudios son necesarios para elucidar el efecto y origen de estas alteraciones. Asimismo, se observó que los perfiles de metilación del ADN espermático cambiaban tras la cirugía bariátrica, sobre todo en localizaciones implicadas en el control central del apetito. Esto demuestra que el perfil epigenético tiene plasticidad y es vulnerable a los cambios ambientales, y que, los cambios epigenéticos relacionados con la obesidad pueden ser reversibles con la pérdida de peso y la consiguiente mejora de la salud metabólica paterna. Por otro lado, un estudio exhaustivo del epigenoma reveló un posicionamiento similar de histonas, pero expresión de sncRNA diferente en pacientes obesos (Blanco Rodríguez & Camprubí Sánchez, 2019).

Si los cambios en el metiloma se mantienen después de la fecundación, esto podría tener consecuencias durante el desarrollo del feto debido a una expresión anómala. Keyhan et al., 2021 demostró que los bebés nacidos de padres obesos tienen alterada la metilación del ADN en varias regiones de genes impresos, lo que sugiere la existencia de la herencia epigenética.

4.6.3. Disruptores endocrinos

Los disruptores endocrinos (EDC, de sus siglas en inglés) son sustancias químicas capaces de alterar la regulación del sistema endocrino, y se caracterizan por su capacidad de imitar los efectos de las hormonas endógenas, afectando así al desarrollo neurológico, cardiovascular y reproductor. Entre estas sustancias, podemos mencionar los pesticidas, compuestos usados en la fabricación de plásticos, residuos industriales, fitoestrógenos... Los humanos estamos continuamente expuestos a EDCs naturales y sintéticos a través de la dieta, contacto e inhalación (Cescon et al., 2020).

En cuanto al aparato reproductor, pueden afectar en la regulación del eje hipotálamo-hipófisis-gónada, y, por tanto, alterar la diferenciación sexual gonadal y la gametogénesis, lo que resulta en infertilidad. Los EDCs pueden imitar y antagonizar las acciones de hormonas endógenas, alterar la expresión y actividad de las enzimas esteroideogénicas e inducir alteraciones en el microambiente testicular, aumentando los daños en el ADN espermático que alteran los patrones de metilación (Blanco Rodríguez & Camprubí Sánchez, 2019). En la tabla 5, se describen compuestos con función disruptora endocrina sobre el sistema reproductivo masculino (extraído del tema “Efecto de los factores ambientales en la fertilidad” de la Dra. Irene Rubio).

Tabla 5. Ejemplos de contaminantes de diferentes clases de compuestos químicos vinculados con efectos adversos sobre la salud reproductiva masculina (extraído de los apuntes de Dra. Irene Rubio).

Compuesto químico	Fuentes	Efectos	Referencias
<i>Hexaclorobenceno</i>	Pesticidas, fungicidas	Anomalías en el desarrollo del tracto reproductivo masculino	Jarrell et al., 1998; Hosie et al., 2000
<i>Pesticidas en general</i>	Herbicidas usados conjuntamente	Reducción de la calidad seminal y potencial fecundante	Savitz et al., 1997; Arbuckle et al., 1999, Arbuckle et al., 2001; Abell et al., 2000
<i>DDT/DDEa (Dicloro Difenil Tricloroetano/Dicloro Difenildicloro Etileno)</i>		Calidad seminal reducida y fertilidad reducida	Kostyniak et al., 1999; Longnecker et al., 2001; Younglai et al., 2002
<i>Dibromocloropropano</i>		Reducción en el recuento espermático e infertilidad	Whorton et al., 1979; Potashnik and Porath, 1995; Slutsky et al., 1999
<i>Plomo</i>	Metales	Calidad seminal reducida	Telisman et al., 2000; De Rosa et al., 2003; Tang and Zhu, 2003

Se ha demostrado que estos compuestos afectan la función reproductora masculina, mediante la alteración de patrones epigenéticos. Por ejemplo, la atrazina, un herbicida artificial presente en aguas subterráneas, aguas superficiales e incluso en la lluvia de algunas regiones, afecta la meiosis y la espermatogénesis, y esto podría estar relacionado con la desregulación observada en la transcripción del ARNm en los testículos y la disminución global de H3K4me3. Estos cambios podrían haber comenzado en la espermatogonia y haber conducido a la mala calidad espermática. Por otro lado, DDE, conocido como antagonista del receptor androgénico, deteriora la histología de los testículos mediante la inducción de la hipometilación en *IgF-2*, factor de crecimiento insulínico tipo 2. Asimismo, también promueve la hipometilación del gen improntado *H19* (Cescon et al., 2020).

5. CONCLUSIONES

Durante años, han sido muchos los estudios que han analizado el papel de la mujer en la salud de la descendencia, ya que el dogma era que el papel del espermatozoide consistía únicamente en entregar un complemento haploide de ADN al ovocito. No obstante, durante los últimos años se ha abordado el tema de la firma epigenética específica del espermatozoide. Estudios recientes han destacado el potencial del epigenoma del espermatozoide en la fertilidad masculina. La red epigenética de diferentes mecanismos epigenéticos, como la metilación del ADN, modificaciones de histonas y ARNnc, desempeña un papel imprescindible en el correcto funcionamiento de las células, incluidos los gametos masculinos.

Parámetros como la concentración, la motilidad y la morfología espermáticas, así como los procesos fisiológicos que llevan a cabo los espermatozoides, dependen de su carga genética y epigenética. Así, durante las últimas décadas este análisis de semen estándar ha sido el pilar del diagnóstico de la infertilidad masculina. El seminograma ha cambiado muy poco en las últimas décadas (Aston et al., 2015). Sin embargo, por un lado, aunque el seminograma es útil para clasificar a los hombres como subfértiles, es poco eficaz para diagnosticar la infertilidad, ya que, en cierto modo, estos parámetros son subjetivos y están sujetos a errores técnicos, con variaciones entre 20% y 30% entre laboratorios (Aston et al., 2015). Por otro lado, el hecho de que la infertilidad masculina sea una enfermedad compleja, multifactorial y poligénica, dificulta la identificación de la causa, y la necesidad de herramientas diagnósticas adicionales para la evaluación de la infertilidad masculina está ampliamente reconocida. Así, los avances de las herramientas de diagnóstico molecular junto a la identificación de marcadores genéticos y epigenéticos de la infertilidad masculina han abierto un nuevo camino. La influencia de la metilación del ADN espermático no improntado e improntado, modificaciones de histonas y la presencia de ARNnc, entre otros cambios epigenéticos, se han postulado como posibles marcadores epigenéticos.

En última instancia, podrían identificarse terapias que modifiquen la metilación en loci relacionados con la infertilidad masculina, lo que se prevé que mejoraría la fertilidad. No obstante, aún queda mucho por hacer para determinar el papel exacto de las variaciones epigenéticas, y su posible consecuencia en caso de modificación.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Aston, K. I., Uren, P. J., Jenkins, T. G., Horsager, A., Cairns, B. R., Smith, A. D., & Carrell, D. T. (2015). Aberrant sperm DNA methylation predicts male fertility status and embryo quality. *Fertility and Sterility*, *104*(6), 1388-1397. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.08.019>
- Barlow, D. P. (2011). Genomic Imprinting: A Mammalian Epigenetic Discovery Model. *Annual Review of Genetics*, *45*(1), 379-403. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110410-132459>
- Benchaib, M., Braun, V., Ressnikof, D., Lornage, J., Durand, P., Niveleau, A., & Guérin, J. F. (2005). Influence of global sperm DNA methylation on IVF results. *Human Reproduction*, *20*(3), 768-773. <https://doi.org/10.1093/humrep/deh684>
- Blanco Rodríguez, J., & Camprubí Sánchez, C. (2019). Epigenetic Transgenerational Inheritance. En E. Baldi & M. Muratori (Eds.), *Genetic Damage in Human Spermatozoa* (Vol. 1166, pp. 57-74). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-21664-1_4
- Boissonnas, C. C., Jouannet, P., & Jammes, H. (2013). Epigenetic disorders and male subfertility. *Fertility and Sterility*, *99*(3), 624-631. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.01.124>
- Breiling, A., & Lyko, F. (2015). Epigenetic regulatory functions of DNA modifications: 5-methylcytosine and beyond. *Epigenetics & Chromatin*, *8*(1), 24. <https://doi.org/10.1186/s13072-015-0016-6>
- Camprubí, C., Cigliano, R. A., Salas-Huetos, A., Garrido, N., & Blanco, J. (2017). What the human sperm methylome tells us. *Epigenomics*, *9*(10), 1299-1315. <https://doi.org/10.2217/epi-2017-0049>
- Camprubí, C., Pladevall, M., Grossmann, M., Garrido, N., Pons, M., & Blanco, J. (2012). Semen samples showing an increased rate of spermatozoa with imprinting errors have a negligible effect in the outcome of assisted reproduction techniques. *Epigenetics*, *7*(10), 1115-1124. <https://doi.org/10.4161/epi.21743>
- Camprubí, C., Salas-Huetos, A., Aiese-Cigliano, R., Godo, A., Pons, M.-C., Castellano, G., Grossmann, M., Sanseverino, W., Martin-Subero, J. I., Garrido, N., & Blanco, J. (2016). Spermatozoa from infertile patients exhibit differences of DNA methylation associated with spermatogenesis-related processes: An array-based analysis. *Reproductive BioMedicine Online*, *33*(6), 709-719. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2016.09.001>
- Carson, S. A., & Kallen, A. N. (2021). Diagnosis and Management of Infertility: A Review. *JAMA*, *326*(1), 65. <https://doi.org/10.1001/jama.2021.4788>
- Cescon, M., Chianese, R., & Tavares, R. S. (2020). Environmental Impact on Male (In)Fertility via Epigenetic Route. *Journal of Clinical Medicine*, *9*(8), 2520. <https://doi.org/10.3390/jcm9082520>

- Inbar-Feigenberg, M., Choufani, S., Butcher, D. T., Roifman, M., & Weksberg, R. (2013). Basic concepts of epigenetics. *Fertility and Sterility*, 99(3), 607-615. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.01.117>
- Jodar, M., Selvaraju, S., Sendler, E., Diamond, M. P., Krawetz, S. A., & for the Reproductive Medicine Network. (2013). The presence, role and clinical use of spermatozoal RNAs. *Human Reproduction Update*, 19(6), 604-624. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmt031>
- Keyhan, S., Burke, E., Schrott, R., Huang, Z., Grenier, C., Price, T., Raburn, D., Corcoran, D. L., Soubry, A., Hoyo, C., & Murphy, S. K. (2021). Male obesity impacts DNA methylation reprogramming in sperm. *Clinical Epigenetics*, 13(1), 17. <https://doi.org/10.1186/s13148-020-00997-0>
- Laqqan, M., Tierling, S., Alkhaled, Y., LoPorto, C., & Hammadeh, M. E. (2017). Alterations in sperm DNA methylation patterns of oligospermic males. *Reproductive Biology*, 17(4), 396-400. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2017.10.007>
- López Serna, N. (2018). *Biología del desarrollo: Cuaderno de trabajo*. McGraw-Hill Interamericana.
- Ma, R.-H., Zhang, Z.-G., Zhang, Y.-T., Jian, S.-Y., & Li, B.-Y. (2023). Detection of aberrant DNA methylation patterns in sperm of male recurrent spontaneous abortion patients. *Zygote*, 31(2), 163-172. <https://doi.org/10.1017/S0967199422000648>
- Monk, D. (2015). Germline-derived DNA methylation and early embryo epigenetic reprogramming: The selected survival of imprints. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 67, 128-138. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2015.04.014>
- Rajender, S., Avery, K., & Agarwal, A. (2011). Epigenetics, spermatogenesis and male infertility. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 727(3), 62-71. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2011.04.002>
- Rotondo, J. C., Lanzillotti, C., Mazziotta, C., Tognon, M., & Martini, F. (2021). Epigenetics of Male Infertility: The Role of DNA Methylation. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 689624. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.689624>
- Santi, D., De Vincentis, S., Magnani, E., & Spaggiari, G. (2017). Impairment of sperm DNA methylation in male infertility: A meta-analytic study. *Andrology*, 5(4), 695-703. <https://doi.org/10.1111/andr.12379>
- Tang, W. W. C., Dietmann, S., Irie, N., Leitch, H. G., Floros, V. I., Bradshaw, C. R., Hackett, J. A., Chinnery, P. F., & Surani, M. A. (2015). A Unique Gene Regulatory Network Resets the Human Germline Epigenome for Development. *Cell*, 161(6), 1453-1467. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.04.053>