

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

en

Biología y Tecnología Aplicada a la Reproducción Humana Asistida

**Exosomas seminales y microRNAs: nueva
fuente de biomarcadores de azoospermia.**

Autor: Ana Vivas Gabas

Tutor: Dr. Alberto Pacheco Castro

Alcobendas, Septiembre 2023

Índice

Resumen	3
Introducción.....	5
Infertilidad Masculina.....	5
Vesículas extracelulares	8
Composición de los exosomas.....	9
Origen y función de las poblaciones de vesículas extracelulares seminales	11
Caracterización del contenido genético de los exosomas seminales.....	13
Objetivos.....	16
Métodos	17
Resultados y discusión.....	18
Relación con la azoospermia	19
Detección del origen de la azoospermia	21
Predicción de la presencia de espermatozoides en biopsias testiculares	23
Ventajas e inconvenientes	24
Implicaciones clínicas.....	27
Conclusión	30
Bibliografía.....	31

Resumen

Aunque la azoospermia afecte a una significativa proporción de la población masculina, es innegable que los métodos de diagnóstico actuales aún presentan importantes limitaciones, caracterizadas por su carácter invasivo y la falta de especificidad. La búsqueda de biomarcadores más específicos y menos invasivos se ha convertido en una prioridad en la investigación médica. En este contexto, los microRNAs presentes en los exosomas seminales, han emergido como posibles indicadores de azoospermia.

En este trabajo, se realiza una evaluación exhaustiva de la literatura científica disponible, enfocándose en cómo los perfiles y la expresión diferencial de los microRNAs exosomales difieren entre individuos con azoospermia y aquellos con función espermática normal. Algunos estudios indican que ciertos microRNAs exosomales podrían estar correlacionados con subtipos específicos de azoospermia y con la presencia de espermatozoides en muestras de biopsia testicular, lo que potencialmente permitiría una caracterización más precisa y un enfoque más personalizado en el diagnóstico y tratamiento.

A pesar de estos hallazgos prometedores, es importante destacar que la investigación en esta área aún está en desarrollo y enfrenta importantes desafíos metodológicos y de validación. Se requieren más estudios clínicos y experimentales para confirmar la eficacia y la especificidad de los microRNAs exosomales como biomarcadores de azoospermia, así como para establecer protocolos de análisis y estándares de interpretación.

Palabras clave: Exosomas, Epididimosomas, Prostatosomas, Biomarcadores, microRNAs, Azoospermia.

Abstract

Although azoospermia affects a significant proportion of the male population, it is undeniable that current diagnostic methods still present significant limitations, characterized by their invasive nature and lack of specificity. The pursuit of more specific and less invasive biomarkers has become a priority in medical research. In this context, microRNAs present in seminal exosomes have emerged as potential indicators of azoospermia.

This study undertakes a thorough assessment of the available scientific literature, focusing on how the profiles and differential expression of exosomal microRNAs differ between individuals with azoospermia and those with normal sperm function. Some studies indicate that certain exosomal microRNAs may be correlated with specific subtypes of azoospermia and with the presence of sperm in testicular biopsy samples, potentially allowing for a more precise characterization and a more personalized approach in diagnosis and treatment.

Despite these promising findings, it is important to emphasize that research in this area is still in progress and faces significant methodological and validation challenges. Further clinical and experimental studies are required to confirm the effectiveness and specificity of exosomal microRNAs as biomarkers of azoospermia, as well as to establish analysis protocols and interpretation standards.

Keywords: Exosomes, Epididymosomes, Prostatosomes, Biomarkers, microRNAs, Azoospermia.

Introducción

Infertilidad Masculina

La infertilidad masculina continúa siendo un problema común que afecta a una proporción significativa de la población. Un porcentaje estimado entre el 10% y 15% de las parejas que buscan concebir experimentan complicaciones relacionadas con la fertilidad, y se ha observado que alrededor del 30% de estas situaciones tienen relación con la subfertilidad masculina (1). Sin embargo, la prevalencia real de la infertilidad masculina varía según el país y la población estudiada.

La condición de azoospermia, caracterizada por la ausencia de espermatozoides en el semen eyaculado, afecta aproximadamente al 15% de los hombres que experimentan dificultades en su fertilidad (2). Esta condición puede ser clasificada en diferentes categorías según su origen:

- **Azoospermia Obstructiva (AO):** Representa aproximadamente el 40% de los casos de azoospermia y suele estar asociada con una función exocrina y endocrina normal, así como una espermatogénesis adecuada en los testículos, es decir, los valores hormonales permanecen dentro de los rangos de normalidad. Aunque la producción de espermatozoides es normal, su expulsión se ve impedida debido a una obstrucción física que puede ubicarse en cualquier punto entre la rete testicular y los conductos eyaculadores. En esta situación, los espermatozoides se acumulan en el testículo o epidídimo, lo que permite su obtención mediante una biopsia testicular (2).
- **Azoospermia Secretora o No Obstructiva (NOA):** Constituye la forma más severa y común de azoospermia, afectando aproximadamente al 60% de los hombres azoospermicos. En este caso, hay un fracaso, total o parcial, en la espermatogénesis, y los testículos no producen espermatozoides. El fallo de la espermatogénesis puede resultar en un incremento de los niveles de hormona

folículo estimulante (FSH) como una reacción del organismo para estimular esta función. Sin embargo, en ciertas condiciones patológicas hipofisarias, se ha observado una disminución de los niveles de FSH. Este tipo incluye causas no obstructivas de azoospermia, como la exposición a sustancias tóxicas y medicamentos, la presencia de infecciones o enfermedades crónicas, desequilibrios hormonales como el hipogonadismo hipogonadotrófico, defectos congénitos como la anorquia o la criptorquidia, y anomalías genéticas que a menudo están vinculadas al cromosoma Y (2).

Ambos subtipos tienen diferencias significativas en cuanto a su diagnóstico y tratamiento. En muchos casos, la azoospermia obstructiva puede ser corregida mediante cirugía para restaurar el flujo de espermatozoides y permitir la concepción. Por otro lado, la azoospermia no obstructiva, puede ser causada por factores genéticos, hormonales, ambientales o desconocidos lo que conlleva a una gran variabilidad en cuanto a las opciones de tratamiento disponibles. Entre el 12% al 41% de los casos de azoospermia son de etiología desconocida, lo que sugiere la presencia de factores no identificados (2). Identificar la causa específica puede ser más complicado debido a la diversidad de factores involucrados y el tratamiento variara en función de la causa subyacente por lo que la detección temprana y precisa de la causa subyacente de la azoospermia es crucial para el manejo y tratamiento adecuados de los pacientes.

El diagnóstico de la azoospermia se lleva a cabo en una serie de etapas:

- **Análisis de semen:** Se solicita una muestra de semen al paciente para realizar un análisis. Este análisis evalúa la concentración, motilidad y morfología de los espermatozoides.
- **Historia clínica y examen físico:** información sobre los antecedentes médicos del paciente, incluyendo cirugías previas, enfermedades crónicas, medicamentos utilizados y antecedentes familiares. Luego, se realiza un examen físico para evaluar los órganos sexuales en busca de posibles anomalías o signos de obstrucción.

- Análisis hormonal: Se realizan pruebas para evaluar los niveles hormonales, especialmente de hormona folículo estimulante (FSH), hormona luteinizante (LH), testosterona y prolactina.
- Análisis genético: En algunos casos, se puede recomendar un análisis genético para buscar posibles causas genéticas de la azoospermia (2,3).
- Biopsia testicular: En casos de azoospermia no obstructiva, se puede recomendar una biopsia testicular. Este procedimiento implica tomar una pequeña muestra de tejido testicular a través de una aguja o una incisión quirúrgica mínima.

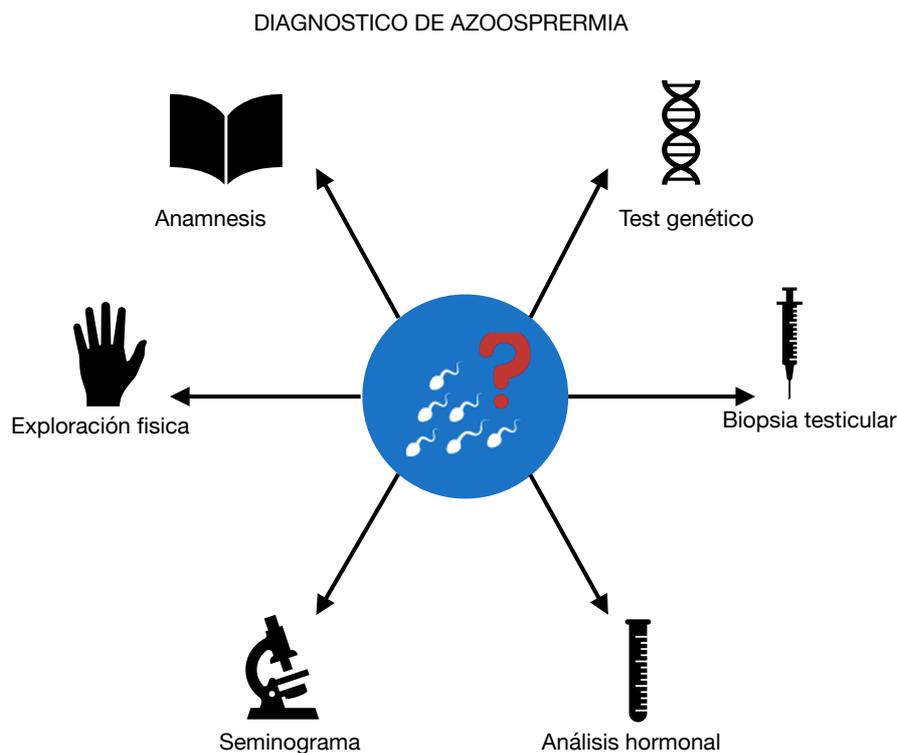


Figura 1. Diagnóstico de la azoospermia. Elaboración propia.

Los marcadores bioquímicos existentes en la actualidad presentan una utilidad clínica limitada ya que no permiten establecer el origen de la patología y aunque las diferentes pruebas pueden orientar el diagnóstico, actualmente solo la biopsia testicular puede proporcionar una confirmación definitiva sobre la existencia o ausencia de producción de

espermatozoides. Todo esto, hace necesario el estudio de nuevos marcadores que nos permitan identificar las deficiencias funcionales del aparato reproductor masculino.

Vesículas extracelulares

La comunicación intercelular es un proceso esencial para la integración y organización de muchos de los procesos que tienen lugar en el organismo, condicionando de esta manera la supervivencia celular. Clásicamente se describen tres tipos de comunicación intercelular: por contacto directo; autocrina o juxtacrina o bien por de manera indirecta; endocrina y paracrina.

Recientemente, se ha observado una nueva forma de comunicación celular indirecta, las vesículas extracelulares (EVs, *extracellular vesicles*), definidas como partículas cubiertas de membrana celular originadas en el interior de la célula emisora o por evaginación de su membrana plasmática y excretadas al medio extracelular para ser captadas posteriormente por células receptoras. Estas vehículas forman una población ampliamente heterogénea tanto por su tamaño y forma, como por su contenido y las funciones que desempeñan (4). Según su origen podemos diferenciar (Figura 2):

- Cuerpos apoptóticos – (1 - 5 μm) Se producen por gemación de células apoptóticas. Pueden contener fragmentos de orgánulos celulares y del núcleo. En la membrana muestra alteraciones propias de células apoptóticas como la presencia de fosfatidilserina.
- Microvesículas – (100 - 1000 nm) Se producen por gemación o fusión directa de la membrana plasmática.
- Exosomas – (30- 150 nm) A partir de la gemación interna de endosomas tardíos se producen los llamados cuerpos multivesiculares, conteniendo en su interior las vesículas intraluminares. La fusión de los cuerpos multivesiculares con la membrana plasmática permite la liberación de estas vesículas, que adoptan el nombre de exosomas.

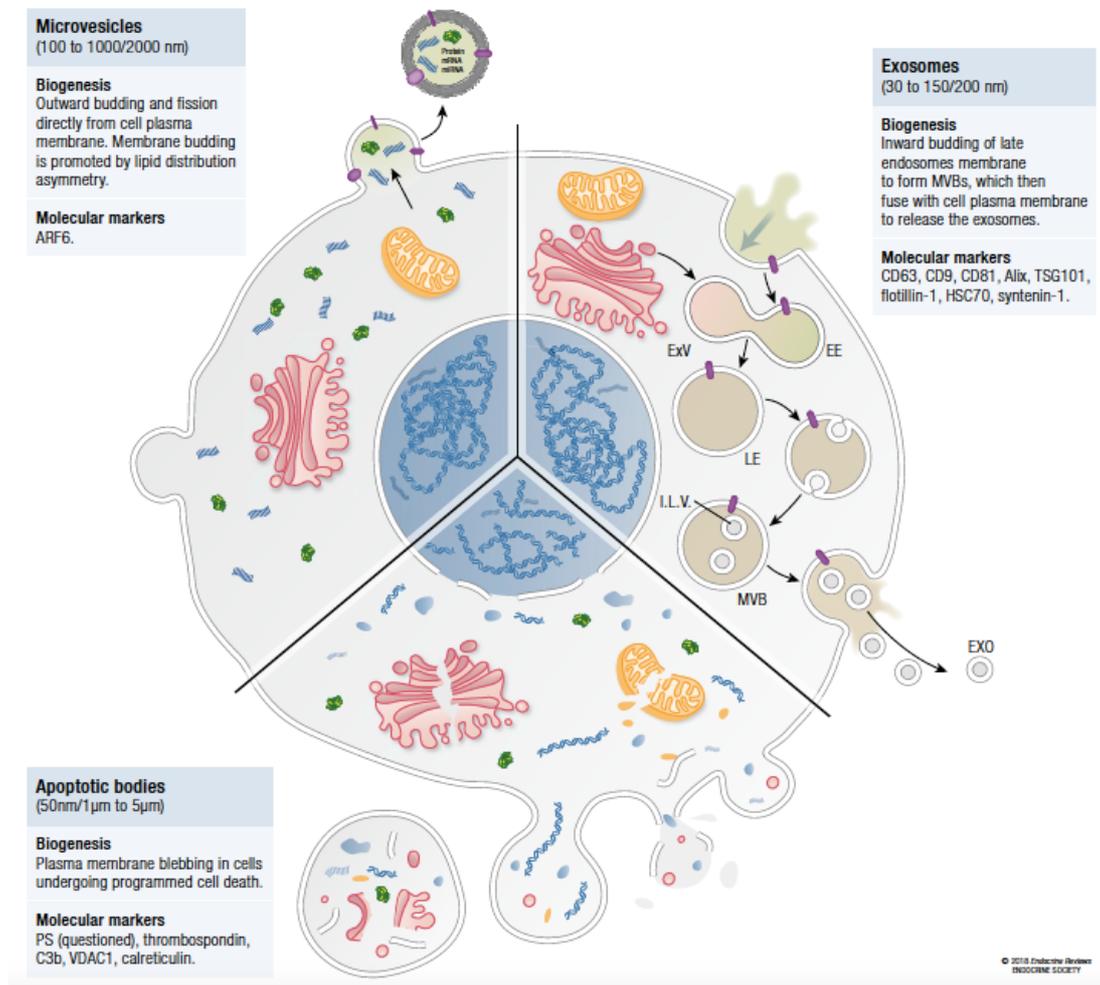


Figura 2. Tipos de vesículas extracelulares en función de su biogénesis. Adaptado de “Extracellular Vesicles in Human Reproduction in Health and Disease” (292-332), por C. Simon, 2018, *Endocrine Reviews*, 3 (4).

Los exosomas son sintetizados y liberadas al medio por una gran variedad de células, incluyendo macrófagos, células placentarias, epiteliales, endometriales o cancerígenas. Podemos encontrarlas en abundancia en varios fluidos biológicos: saliva, plasma sanguíneo, orina, leche materna, líquido amniótico o semen (3,4).

Composición de los exosomas

Se ha demostrado que estas vesículas transportan selectivamente proteínas, metabolitos, lípidos y ácidos nucleicos, reflejando de esta manera el estado funcional de la célula de la que proceden (5). En función de su origen, las vesículas extracelulares tienen varios

marcadores y moléculas de adhesión que facilitan su interacción con la célula diana dando lugar a la integración de su carga.

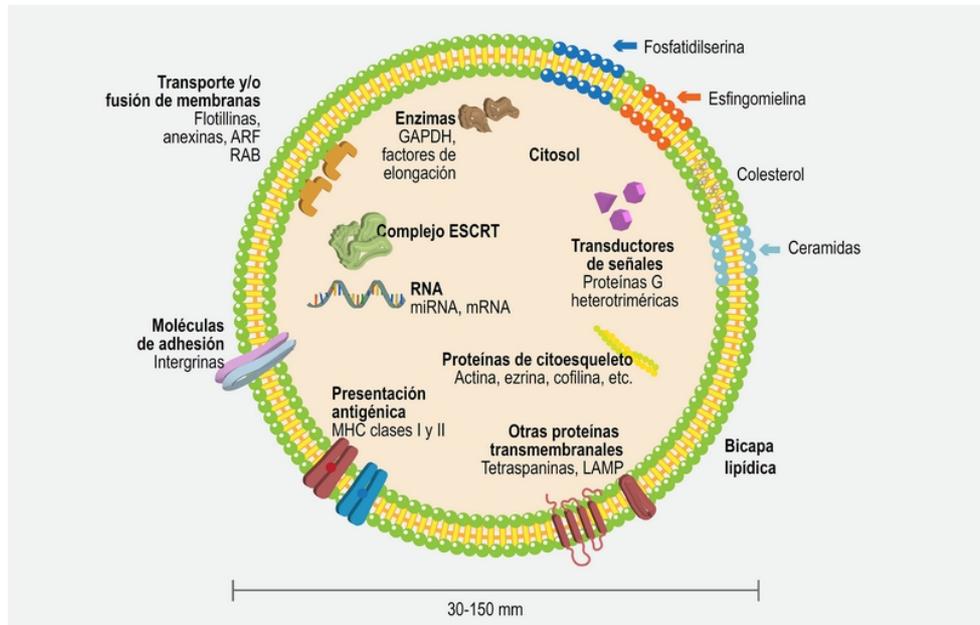


Figura 3. Contenido de los exosomas. *Adaptado de “Extracellular Vesicles in Human Reproduction in Health and Disease” (292-332), por C. Simon, 2018, Endocrine Reviews, 3 (4).*

Proteínas

En cuanto al contenido proteico podemos encontrar dos poblaciones, las proteínas propias del tejido de origen, diferente para cada subpoblación de exosomas, o bien proteínas que aparecen de manera constitutiva. Se ha demostrado que los exosomas están enriquecidos con proteínas citosólicas, proteínas de transporte, fusión y adhesión (tetraspaninas CD63, CD9, CD81) proteínas implicadas en la propia biogénesis de los exosomas (Alix, TSG101), *heat-shock protein* (HSP70) (6).

Lípidos

Los exosomas tienen un gran contenido en lípidos, principalmente colesterol, esfingolípidos, fosfolípidos y glicerolípidos. También podemos encontrar lípidos bioactivos como prostaglandinas o leucotrienos que ayudan a modular la respuesta inmune (4).

Ácidos nucleicos

Los exosomas también contienen varios tipos de ácidos nucleicos, incluyendo DNA y varios tipos de RNA: miRNA, piRNA, tRNA, mRNA y RNA. Los microRNAs (miRNAs) son moléculas de RNA no codificante de cadena simple formadas por 22-24 nucleótidos complementarias a regiones 3' *Untranslated región* (3' UTR) de determinados mRNA. De esta manera, los miRNAs pueden ser transferidos célula a célula y actúan como interruptores moleculares para inhibir o disminuir la expresión de ciertos genes (1). Aunque los miRNAs representan sólo el 2% del número total de genes humanos, los investigadores creen que estas pequeñas moléculas regulan cerca del 30% de los genes humanos (7).

Origen y función de las poblaciones de vesículas extracelulares seminales

El semen humano está constituido por alrededor de un 5% de espermatozoides y de un 95% de plasma seminal, que se describe como una mezcla de fluidos producidos por los testículos, la próstata, las vesículas seminales y las glándulas de Cowper y Littre. Está compuesto por una gran variedad de azúcares, lípidos, iones inorgánicos, metabolitos y además contiene una población muy heterogénea de vesículas extracelulares que serán esenciales para la maduración y estabilidad genómica de los espermatozoides (8). La maduración espermática es un proceso complejo y continuo a lo largo del tracto reproductor masculino, en el que los espermatozoides experimentan una serie de cambios morfológicos y bioquímicos en los adquieren movilidad y capacidad para fecundar el ovulo. Se cree que los exosomas pueden desempeñar un papel importante en la regulación de la función celular y la transferencia de información genética, contribuyendo de esta manera a la fertilidad masculina.

Los exosomas seminales proceden de todos los tejidos asociados al reproductivo masculino, e incluso algunos de ellos pueden tener su origen en los propios espermatozoides (9). Los principales componentes de los exosomas seminales son los prostasomas y los epididimosomas, secretados por la próstata y el epidídimo, respectivamente (3).

Epididimosomas

Una vez formados, los espermatozoides atraviesan el epidídimo. El epidídimo se divide en tres segmentos y cada uno de ellos mantiene su propio microambiente (5):

- **Caput:** el segmento inicial, está conectado con los testículos y es donde se adquiere la movilidad espermática.
- **Corpus:** en este fragmento los espermatozoides experimentan cambios en la morfología y composición, lo que les permite adquirir la capacidad de fertilización.
- **Cauda:** es el segmento más grande y es donde se almacenan los espermatozoides maduros hasta que son eyaculados.

Las células del epidídimo secretan exosomas epididimarios o epididimosomas que son unidos y fusionados con los espermatozoides adquiriendo de esta manera un papel esencial en la maduración espermática. Los datos indican que hay una transferencia de lípidos, con un alto contenido en colesterol y esfingomielina, moléculas de adhesión (PH20), moléculas implicadas en la adquisición de la movilidad, como la aldo-keto reductasa familia I miembro I (AKRIBI), moléculas que regulan los canales de Ca^{2+} de la membrana espermática (la proteína secretora rica en cisteína 1, CRISP1) o el factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) y finalmente de material genético, incluyendo miRNAs asociados con la regulación de genes involucrados en la motilidad y la capacidad de penetración de los espermatozoides (5).

Prostasomas

Cuando se produce la eyaculación, los espermatozoides se mezclan con las secreciones provenientes de las vesículas seminales, la próstata y el resto de las glándulas accesorias. En este momento encontramos otra población de exosomas provenientes de las células epiteliales de la próstata, los prostasomas.

Mediante la detección de componentes únicos de origen prostático en los exosomas del semen, y al evidenciar un cambio mínimo en su cantidad al compararlos antes y después de la vasectomía, se ha confirmado la posibilidad de que la próstata sea la principal fuente de estos exosomas. En consecuencia, se ha establecido que los prostasomas constituyen la categoría predominante de exosomas en el plasma seminal (10). Estos contienen en su interior diversos lípidos, principalmente colesterol y esfingomiélinas que aportarán rigidez a la membrana espermática y prevendrán la capacitación y reacción acrosómica prematura. También encontramos un completo conjunto de proteínas incluyendo proteínas de traducción de la señal, enzimas, chaperonas, antígeno prostático específico (PSA), fosfatasa ácida prostática (PAP), proteínas de adhesión celular y proteínas relacionadas con la regulación inmunitaria como la prostatina y proteínas con propiedades antioxidantes y antimicrobianas. Finalmente encontramos material genético incluyendo miRNAs que pueden regular la proliferación celular, la angiogénesis o la respuesta inmune en el trato reproductor femenino durante la fecundación (4).

Caracterización del contenido genético de los exosomas seminales

A pesar de que en un principio se consideró que los exosomas eran residuos no específicos de las células, hay cada vez más evidencia que indica que los exosomas desempeñan un papel crucial en la comunicación celular (11). Se ha descrito que los exosomas seminales pueden transportar ARN mensajero, microRNA y otros tipos de ARN no codificante (12) que pueden tener funciones reguladoras en las células receptoras o en el propio sistema reproductor femenino.

A diferencia del plasma sanguíneo y de otros biofluidos, donde solo una pequeña cantidad de miRNAs está contenida en los exosomas, se ha observado que cerca del 50% del ARN extracelular del plasma seminal purificado pertenece a la fracción exosomal (12). Se han identificado numerosos miRNAs en los exosomas seminales, pero el número exacto puede variar entre diferentes estudios y métodos de análisis. Además, señalan que los miRNAs más expresados en el testículo solo se superponen en un 23% con los presentes en otros tejidos (14). Estos resultados nos brindan una visión clara de los miRNAs que

mantienen una consistencia significativa en el proceso de la espermatogénesis y maduración espermática.

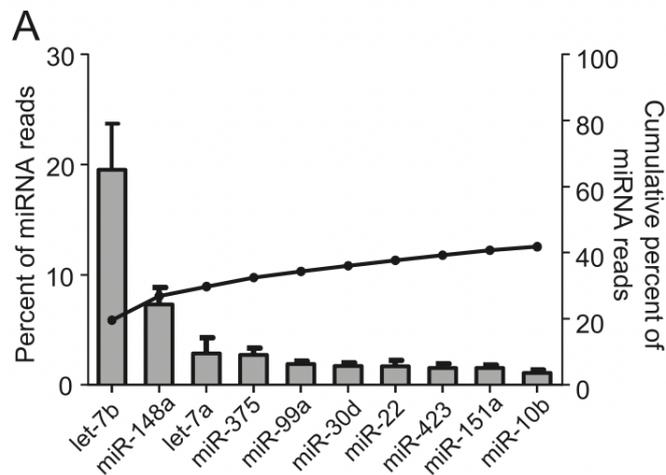


Figura 4. Los 15 miRNAs más expresados en los exosomas seminales. Adaptado de "Exosomes in human semen carry a distinctive repertoire of small non-coding RNAs with potential regulatory functions" por Vojtech L, 2014 (7290-7304), *Nucleic Acids Research*. (12)

Los exosomas seminales pueden transferir información genética y molecular a los espermatozoides y a las células femeninas, como los ovocitos (13). Algunos de los miRNAs identificados en los exosomas seminales están implicados en la regulación de la espermatogénesis, la maduración y la función espermática (4). También se ha demostrado que ciertos miRNAs contenidos en los exosomas seminales están involucrados en la comunicación entre los espermatozoides y las células del tracto reproductivo femenino durante la fecundación (4) o en la modulación de la respuesta inmune del tracto reproductivo femenino durante la implantación del embrión (6).

Durante los últimos años el estudio de sus componentes ha adquirido una gran importancia en el campo de la biología de la reproducción. Los exosomas son altamente específicos en cuanto a su origen y contenido molecular y reflejarán la información y las condiciones de su tejido de origen (5). Esto significa que, si hay alguna patología o condición fisiológica anormal en el tejido de origen, los exosomas liberados por ese tejido también llevarán marcadores que reflejen dicha patología. Los exosomas en el plasma seminal pueden llevar, además, marcadores moleculares que reflejen la actividad de las

células germinales y la espermatogénesis en el testículo. La detección de estos marcadores en el plasma seminal puede sugerir la presencia de espermatogénesis activa en el tejido testicular y permitiría tomar decisiones informadas sobre la necesidad y la viabilidad de la biopsia testicular. Todo esto sumado a la relativa facilidad con la que se pueden obtener muestras de plasma seminal confieren a los exosomas de unas excelentes características para ser considerados como posibles herramientas para el diagnóstico de la azoospermia.

Objetivos

El objetivo principal de este proyecto es realizar una revisión bibliográfica sobre la utilidad de los exosomas del plasma seminal como posibles biomarcadores de la infertilidad masculina, en concreto de azoospermia y determinar su utilidad como una posible nueva técnica de diagnóstico.

Para ello, se han propuesto los siguientes objetivos secundarios:

- Revisar y sintetizar la literatura disponible sobre la caracterización del contenido genético de los exosomas seminales y su posible uso como biomarcadores de azoospermia.
- Analizar los estudios existentes sobre la relación entre el perfil de expresión de los ácidos nucleicos de los exosomas seminales y diferentes tipos de azoospermia.
- Identificar las ventajas y limitaciones del uso de los exosomas seminales como biomarcadores de azoospermia en comparación con otros métodos de diagnóstico.
- Identificar las posibles implicaciones clínicas del uso de los miRNAs de los exosomas seminales como biomarcadores de azoospermia y las necesidades futuras de investigación en este campo.

Métodos

Para esta revisión se realizó una búsqueda bibliográfica online durante los meses de marzo, abril y mayo de 2023. Se utilizaron las bases de datos bases PubMed y *Google Scholar* como herramientas de búsqueda, utilizando palabras clave o términos MeSH: *Exosomes*, *azoospermia*, *biomarkers*, *seminal plasma* y *microRN*, así como diferentes combinaciones de los términos utilizando los operadores booleanos “AND” y “OR”.

Se filtraron los artículos publicados en los últimos 10 años, hasta 2013 y se seleccionaron estudios tanto en animales como en humanos. Se aplicaron los filtros de “idioma inglés” y “artículos completos”. Una vez que seleccionados los estudios relevantes, se procedió a realizar un análisis temático de los temas clave identificados en la literatura. Este análisis se realizó mediante la identificación de los temas recurrentes en los títulos, resúmenes y palabras clave de los estudios seleccionados. En base a estos criterios se trabajó con 8 artículos en total, 2 de ellos revisiones.

A partir de la lectura y análisis de estos trabajos, se ha elaborado una memoria con el propósito de recopilar los resultados y conclusiones desarrollados por deferentes autores con la intención de describir la situación actual de la técnica y su futuro próximo.

Resultados y discusión

Los exosomas seminales son pequeños subcomponentes celulares que se originan en las células germinales, en las células del estroma testicular y del epidídimo, y se liberan en el fluido seminal. Murdica y colaboradores (10) demostraron, además, que la producción de estas vesículas es independiente de la producción de espermatozoides. Aunque ambos se liberan juntos durante la eyaculación, la producción de exosomas no está directamente vinculada a la producción de espermatozoides en las células germinales, por lo que las células del estroma testicular y del epidídimo contribuyen a la producción de exosomas seminales de manera independiente (10).

Desde que se demostró la presencia de ácidos nucleicos en los exosomas del plasma seminal humano, ha habido un creciente interés en examinar su posible papel en la salud reproductiva (12). Desde entonces, se han realizado varios estudios para evaluar el perfil genético de los exosomas seminales en hombres infértiles y fértiles. Esta revisión se centra en determinar las diferencias significativas encontradas en los perfiles genéticos entre estos grupos, tanto en el plasma seminal como en exosomas y si realmente los ácidos nucleicos de los exosomas seminales podrían ser utilizados en un futuro como biomarcadores para la evaluación de la calidad del semen y el diagnóstico de la infertilidad masculina, en particular en el diagnóstico de azoospermia.

Es importante destacar que la mayoría de los estudios publicados hasta la fecha no hacen una distinción clara entre el contenido en miRNAs del plasma seminal o específicamente de los exosomas. Esto se debe a que la separación de los exosomas de otras vesículas extracelulares y proteínas es un proceso técnico desafiante y a menudo requiere equipos especializados y protocolos de aislamiento rigurosos. Por lo tanto, es posible que algunos estudios que afirmen haber detectado ciertos miRNAs en el plasma seminal en realidad estén midiendo una mezcla de diferentes tipos de vesículas extracelulares, en lugar de exosomas específicamente. Por otro lado, los diferentes estudios emplean distintos métodos de análisis de los miRNAs (microarrays, qRT-PCR y secuenciación de próxima

generación; NGS) lo que añade variabilidad a los resultados y dificulta una correcta interpretación de estos.

Relación con la azoospermia

La valoración de individuos con azoospermia representa un paso crucial para los profesionales de la medicina clínica. Es imperativo diferenciar entre azoospermia obstructiva y no obstructiva, ya que la forma obstructiva suele ser manejable con relativa facilidad, mientras que la variante no obstructiva plantea mayores desafíos al identificar y tratar la raíz del problema.

Barceló y colaboradores (9) llevaron a cabo un análisis mediante RT-qPCR que abarcó un conjunto de 623 miRNAs extraídos de los exosomas seminales, provenientes tanto 3 individuos con función reproductiva normal, 3 pacientes con azoospermia obstructiva y otros 3 azoospermia secretora. Dentro de este conjunto, se identificaron 60 miRNAs que presentaban variaciones en su nivel de expresión. De estos, 45 miRNAs mostraron una disminución en su expresión, mientras que 15 de ellos exhibieron una significativa sobreexpresión. Varios de estos miRNAs como miR-34c-5p, miR-449a y miR-122-5p también se encontraron expresados negativamente en muestras de tejido testicular de pacientes con una producción deficiente de espermatozoides (7) mientras que un estudio de Wu et al. (15) demostró que los miR-34b/c y miR-449 desempeñan un papel esencial en el contexto de la espermatogénesis y que su eliminación podría llevar a la infertilidad debido a una espermatogénesis anormal (16). Resulta interesante destacar que dos de los miRNAs con expresión disminuida (miR-202-5p y miR-34c-5p) han sido previamente descritos como tres de los 10 miRNAs más abundantes en los testículos humanos (14).

Algunos estudios han confirmado que la familia miR-34 (compuesta por miR-34b y miR-34c) se expresa en gran medida durante la meiosis espermática y también se vincula con la red de supresión tumoral p53, que desempeña un papel fundamental en la apoptosis (16). Además, en contraste con los testículos en etapas prepuberales, miR-34b muestra una marcada expresión en los testículos adultos, lo que sugiere su posible contribución en el proceso de diferenciación de las células germinales masculinas (7). La presencia de

expresiones alteradas de estos miRNAs tanto en los exosomas seminales como en el tejido testicular no solo sugiere una relación directa con la azoospermia, sino que también respalda la idea de que estos miRNAs pueden estar involucrados en procesos clave para la función y la viabilidad de los espermatozoides.

Los resultados obtenidos en estos estudios están en línea con los hallazgos presentados por Abu-Halima et al. (17). En el estudio identificó un grupo de miRNAs: miR-34b, miR-34c-5p y miR-122, regulados a la baja, en los espermatozoides de hombres con astenozoospermia y oligoastenozoospermia en comparación con los hombres con normozoospermia. Es interesante notar que el valor de expresión del miR-122-5p mostró una correlación estadísticamente significativa con la concentración de espermatozoides en el semen (9). La coincidencia entre los resultados de ambos estudios refuerza la idea de que estos miRNAs tienen un valor significativo en la identificación de la azoospermia y sugiere que podrían ser utilizados como indicadores confiables en futuras investigaciones. Su participación en este proceso sugiere que estos microRNAs podrían estar relacionados con la regulación de vías cruciales para la formación y maduración de los espermatozoides, aportando una sólida evidencia que sugiere su potencial utilidad en la identificación y evaluación de la azoospermia.

Otro estudio de Zhang et al. (7) identifica mediante microarrays 129 miRNAs desregulados en 77 muestras de biopsias de tejido testicular de pacientes con azoospermia no obstructiva, 46 de ellos estar regulados a la baja y 83 sobre expresados. Además, los genes con regulación al alza presentaban una correlación positiva con los niveles FSH, excepto por la relación observada entre miR-31-5p y los niveles de FSH. Estos resultados sugieren que estos miRNAs podrían reflejar cambios en la función testicular y la regulación hormonal, lo que agrega un nivel adicional de información diagnóstica.

Tras la validación mediante RT-qPCR, se eligieron y sometieron a análisis dos de los miRNAs regulados a la baja: miR-10b-3p, el cual presenta una expresión significativa en los testículos y se cree que desempeña un papel crucial en la espermatogénesis (14), y miR-34b-5, mencionado anteriormente. Estos miRNAs fueron utilizados para desarrollar

un modelo de predicción de azoospermia mediante regresión logística multivariante. La sensibilidad y especificidad de este modelo para predecir la azoospermia fueron del 76,3% y 89,5% para miR-10b-3p, y del 82,1% y 76,9% para miR-34b-5p. Sin embargo, lo más destacado fue la combinación de ambos miRNAs en el modelo, ya que esta estrategia logró aumentar significativamente tanto la sensibilidad como la especificidad. En particular, la combinación de los dos parámetros resultó en una sensibilidad del 97,4% y una especificidad del 87,2% en la predicción de la azoospermia (7).

Tabla 1. Sensibilidad y especificidad de los modelos de predicción de azoospermia según Zhang et al. (7)

	Sensibilidad	Especificidad
miR-10b-3p	76,3%	89,5%
miR-34b-5p	82,1%	76,9%
miR-10b-3p + miR-34b-5p	97,4%	87,2%

Estos resultados subrayan el potencial de miR-10b-3p y miR-34b-5p como prometedores biomarcadores en la detección de la azoospermia y, en última instancia, para mejorar la precisión diagnóstica de esta condición. La notable sensibilidad y especificidad logradas en la predicción de la azoospermia presentan una perspectiva alentadora para el desarrollo de herramientas de diagnóstico más eficaces y para respaldar decisiones clínicas informadas en el abordaje de la infertilidad masculina.

DetECCIÓN DEL ORIGEN DE LA AZOOSPERMIA

En relación con la diferenciación entre los tipos de azoospermia, Bellaneee et al. (18) investigaron cómo la vasectomía, que representa una forma de azoospermia obstructiva, puede modificar la expresión de los miRNAs. Sus resultados indican una modificación en la expresión de 118 miRNAs en el epidídimo y vesículas extracelulares después de someterse a una vasectomía. Se observaron cambios importantes en la zona caudal del epidídimo, ya que el 61% de los miRNAs de esta región no se encontraron en el epidídimo de pacientes vasectomizados. Por el contrario, se detectaron 71 miRNAs en la cauda del

epidídimo que se expresaban únicamente en pacientes vasectomizados. Esto sugiere que la vasectomía tiene un impacto directo en la expresión de miRNAs en esta región particular del epidídimo, lo cual se puede ver reflejado en alteraciones de la maduración espermática y fertilidad masculina.

Por otro lado, la investigación llevada a cabo por Barceló y su equipo (9) detectó una variación significativa en la expresión de 12 microRNAs entre los pacientes con azoospermia obstructiva y azoospermia no obstructiva. Se eligieron cinco microRNAs (miR-182-3p, miR-205-5p, miR-31-5p, miR-539-5p, miR-941) que presentaban una diferencia significativa en los niveles de expresión entre los subtipos para ser validados. Además, para dicha validación se incluyeron tres miRNAs adicionales, miR-122-5p, miR-34c-5p, miR-449a, que tenían una expresión diferencial en los exosomas del plasma seminal entre individuos con azoospermia y aquellos con espermia normal. Los resultados sugieren que miR-205-5p y miR-31-5p se encuentran regulados a la baja en pacientes con azoospermia obstructiva en comparación con aquellos que padecen azoospermia no obstructiva. Los valores de expresión de estos dos miRNAs dieron lugar a una buena precisión predictiva [miR-205-5p (AUC 0,843; P = 0,005); miR-31-5p (AUC: 0,957; P <0,0001), lo que sugiere que tienen un uso potencial como indicadores del origen de la azoospermia.

El estudio desarrolla un modelo de regresión logística multivariable en el que los niveles de miR-31-5p tiene la capacidad de determinar el origen de la azoospermia con una sensibilidad y especificidad del 92.9 y 90% respectivamente. Si a este modelo se le añade la determinación de FSH sérica los niveles de sensibilidad alcanzaban el 100%.

Tabla 2. Sensibilidad y especificidad de los modelos de detección del origen de la azoospermia según Barcelo et al. (9).

	Sensibilidad	Especificidad
miR-31-5p	92,9%	90%
miR-31-5p + niveles de FSH	100%	100%

También se investigan las diferencias en el perfil de expresión de los miRNAs en cuanto a los diferentes tipos de azoospermia obstructiva: congénita o artificial. Se desarrolla un modelo de regresión logística multivariable en el que, nuevamente, los niveles de miR-31-5p tiene la capacidad de determinar el origen de la azoospermia con una sensibilidad y especificidad del 92.9 y 80% respectivamente. Este trabajo también desarrolla un modelo de regresión multivariante capaz de determinar el origen de la azoospermia obstructiva congénita mediante la determinación de miR-31-p5 con una sensibilidad y la especificidad 92,9 y el 80%, respectivamente. En otro estudio realizado sobre pacientes con azoospermia obstructiva (19), se aportan pruebas experimentales que respaldan el uso de miR-31-5p seminal como biomarcador de la azoospermia, subrayando la necesidad de tener en cuenta las variables preanalíticas para garantizar la validez de las mediciones.

En otro estudio llevado a cabo por Ma y colaboradores (20), se analizaron muestras de semen de pacientes afectados por varicocele, una causa de azoospermia no obstructiva. En estas muestras, se observó un incremento en la expresión del miR-210-3p y lo que es más importante, esta elevación en la expresión del miR-210-3p se encontró correlacionada con la gravedad del deterioro en las células de Sertoli. Estos hallazgos sugieren que el miR-210-3p podría tener el potencial de ser un biomarcador valioso para la evaluación del daño en las células de Sertoli y por lo tanto para el diagnóstico temprano y preciso de la azoospermia. Si se puede detectar y cuantificar el daño en estas células de manera efectiva, se podría proporcionar a los profesionales de la salud una herramienta diagnóstica valiosa para determinar la causa de la azoospermia.

Predicción de la presencia de espermatozoides en biopsias testiculares

La detección precisa de la presencia o ausencia de espermatozoides en biopsias testiculares es crucial para la planificación y el éxito de las técnicas de reproducción asistida. Dado que están implicados en la regulación de la espermatogénesis y la maduración espermática, los miRNAs han emergido como candidatos prometedores para distinguir entre tejidos testiculares que contienen espermatozoides viables y aquellos que no los contienen.

En un estudio llevado a cabo por Barceló et al. (9), se abordó este desafío mediante el análisis de los perfiles de expresión de miRNAs en biopsias testiculares de pacientes con azoospermia no obstructiva con presencia o ausencia de espermatozoides viables. Los investigadores se focalizaron en dos miRNAs específicos, miR-539-5p y miR-941, que, a pesar de no haber demostrado inicialmente una expresión diferencial entre los tejidos testiculares con y sin espermatozoides, fueron seleccionados para ser parte de un modelo de regresión logística. Sorprendentemente, este modelo resultante fue capaz de discriminar de manera precisa y confiable la presencia o ausencia de espermatozoides en biopsias testiculares con trastornos espermatogénicos. Los resultados fueron notables, ya que la precisión diagnóstica del modelo alcanzó el 100% tanto en términos de especificidad como de sensibilidad.

En última instancia, la acumulación de evidencia que muestra la asociación consistente de estos miRNAs con la azoospermia, tanto a nivel de los exosomas seminales como en el tejido testicular, plantea la perspectiva prometedora de utilizar estos miRNAs como biomarcadores potenciales en la evaluación clínica de la salud reproductiva masculina. Sin embargo, es importante destacar que se requieren investigaciones adicionales y estudios prospectivos en cohortes más amplias para validar y establecer la robustez de estos miRNAs como biomarcadores confiables en el diagnóstico y seguimiento de la azoospermia.

Ventajas e inconvenientes

En contraste con los métodos invasivos, como las biopsias, que pueden ser dolorosos y generar estrés en los pacientes, la recolección de exosomas seminales es un procedimiento no invasivo e indoloro, por lo que la principal ventaja de utilizar miRNAs de exosomas seminales radica en la forma en que se obtienen las muestras para su análisis (4). Este enfoque de recolección no invasivo implica simplemente la recogida de muestras de semen de los pacientes. El proceso es cómodo, seguro y no genera molestias

significativas. Además, puede realizarse en entornos médicos o clínicos sin requerir procedimientos especializados.

La no invasividad de esta metodología ofrece múltiples beneficios, incluyendo: comodidad para los pacientes y por lo tanto mayor adherencia. Al eliminar el factor de incomodidad asociado con procedimientos invasivos, es más probable que los pacientes se adhieran a los protocolos de prueba y sigan las recomendaciones médicas, lo que promueve la detección temprana y el diagnóstico preciso de la azoospermia. Por otro lado, la no invasividad minimiza los riesgos potenciales relacionados con procedimientos invasivos, como infecciones, sangrado o complicaciones.

Unas de las características más destacadas de los miRNAs son su alta estabilidad y resistencia a condiciones extremas, lo que fortalece su idoneidad para su uso en aplicaciones diagnósticas y de investigación. Un estudio realizado por Vojtech y colaboradores (12) demostró que más del 88% del ARN presente en las fracciones de exosomas permaneció protegido incluso después de la combinación de tratamientos con ARNasa y proteasa, resaltando la robustez de los miRNAs en exosomas como una ventaja distintiva. La excepcional estabilidad de los miRNAs en exosomas es fundamental para su utilidad como biomarcadores. Estas moléculas pueden mantener su integridad y función incluso en condiciones adversas, ya que se encuentran protegidos por la membrana exosomal (3). Esta característica es crucial para garantizar resultados consistentes y confiables en el análisis de muestras, ya que asegura que los miRNAs mantengan su estructura y función a lo largo del tiempo y en diferentes entornos (11). La resistencia de los miRNAs a condiciones extremas podría permitir el almacenamiento a largo plazo de las muestras, lo será esencial para la realización de estudios longitudinales y comparativos.

Además, la especificidad es otro aspecto clave de los miRNAs en exosomas como biomarcadores de la azoospermia. La capacidad de distinguir entre diferentes tipos de azoospermia, como la obstructiva y la no obstructiva, es fundamental para proporcionar información precisa sobre la causa subyacente de la condición (3). Esta especificidad

permitiría un diagnóstico más preciso y la selección de tratamientos más dirigidos y efectivos, ya que diferentes subtipos pueden requerir enfoques terapéuticos distintos (6).

La combinación de sensibilidad y especificidad en los miARNs en exosomas seminales ofrece un potencial significativo en la detección temprana, el diagnóstico diferencial y el seguimiento de la azoospermia. Sin embargo, es esencial continuar investigando y validando estos biomarcadores en cohortes de pacientes más amplias y diversas para confirmar su utilidad clínica y establecer protocolos de detección y diagnóstico efectivos.

A pesar de sus prometedoras ventajas, el uso de miRNAs derivados de los exosomas seminales como biomarcadores de azoospermia también presenta ciertas limitaciones que deben ser consideradas en su aplicación clínica y en la investigación. La variabilidad en la composición de los exosomas y los perfiles de miRNAs entre individuos puede afectar la consistencia de los resultados. La regulación y expresión de miRNAs son procesos biológicos complejos que pueden estar influenciados por múltiples factores (4). Esto puede deberse a factores genéticos, ambientales o de estilo de vida, lo que complica la estandarización de los biomarcadores. Los niveles de miRNAs pueden cambiar a lo largo del tiempo debido a factores como el estado de salud, la dieta y otros cambios fisiológicos (13) y esta variabilidad temporal puede dificultar la comparación de resultados en diferentes momentos. La interpretación de los resultados puede ser desafiante y requiere un conocimiento sólido de la biología molecular y la genética.

Por otro lado, la falta de estandarización en los métodos de extracción, cuantificación y análisis de miRNAs en exosomas puede llevar a variaciones en los resultados entre diferentes estudios y laboratorios (4,10,11). Además, las técnicas de análisis de miRNAs en exosomas pueden requerir equipos y reactivos especializados, lo que puede aumentar los costos y la necesidad de recursos técnicos y humanos capacitados.

Aunque los estudios iniciales sugieren el potencial de los miRNAs en exosomas como biomarcadores, se requiere una validación clínica rigurosa en cohortes de pacientes más grandes y diversas para establecer su confiabilidad y utilidad en entornos clínicos reales.

La identificación de perfiles de miRNAs asociados con la azoospermia puede proporcionar información valiosa, pero la azoospermia es una condición heterogénea con diferentes causas subyacentes por lo que podemos encontrar miRNAs específicos que pueden ser útiles para ciertos subtipos de azoospermia, pero no para otros. La interpretación clínica precisa y la correlación con los síntomas y resultados clínicos son cruciales para la toma de decisiones informadas.

Implicaciones clínicas

El uso de miRNAs de exosomas seminales como biomarcadores de azoospermia tiene importantes implicaciones clínicas en la evaluación de la infertilidad masculina y la calidad del semen.

- **Mayor precisión diagnóstica:** Los exosomas seminales pueden proporcionar información adicional sobre el estado de la espermatogénesis en comparación con los métodos de diagnóstico convencionales. Esto es especialmente relevante en los casos de azoospermia no obstructiva, donde las causas subyacentes son más difíciles de identificar y los métodos convencionales pueden no ser suficientemente precisos.
- **Detección temprana:** Los cambios en los perfiles de miRNAs en los exosomas seminales podrían indicar anomalías en la espermatogénesis antes de que se manifiesten en los análisis convencionales del semen. Esto permitiría un diagnóstico y tratamiento más tempranos, lo que podría mejorar las posibilidades de éxito en los procedimientos de fertilidad.
- **Personalización del tratamiento:** La identificación de miRNAs específicos asociados con diferentes tipos de azoospermia podría permitir una estratificación más precisa de los pacientes y la personalización de sus planes de tratamiento.

- Monitorización de la respuesta al tratamiento: Los cambios en los perfiles de miRNAs podrían utilizarse para evaluar la efectividad de las terapias y tratamientos aplicados y para realizar ajustes en tiempo real.

A pesar de estas ventajas, es importante destacar que la investigación en este campo aún está en una etapa temprana. Se requieren más estudios para establecer criterios sólidos de referencia para la interpretación de los perfiles de miRNAs de exosomas seminales, así como para determinar su eficacia en diferentes poblaciones de pacientes con infertilidad masculina. Además, es fundamental comprender mejor cómo los miRNAs específicos en los exosomas seminales influyen en la regulación de la fertilidad masculina y cómo podrían ser utilizados en la mejora de los enfoques terapéuticos para tratar la infertilidad.

Los autores también discuten el potencial terapéutico de los miRNAs. Las características únicas de los exosomas los posicionan como una opción atractiva en el campo de la terapia y medicina regenerativa. Su habilidad para transportar selectivamente material genético y proteínas hacia células específicas les otorga un potencial terapéutico sin precedentes. Esta cualidad ha atraído la atención de los investigadores que buscan nuevas estrategias para tratar enfermedades, incluida la azoospermia.

Uno de los desafíos en la terapia génica y de expresión génica es la entrega precisa de los materiales terapéuticos a las células diana. Los exosomas ofrecen una solución natural a este problema. Su membrana lipídica actúa como un escudo protector que permite la estabilidad de las moléculas, evitando la degradación no deseada, garantizando que los materiales terapéuticos lleguen a su destino intactos y funcionales.

Además, los exosomas tienen la capacidad única de sortear barreras biológicas, lo que aumenta su potencial para alcanzar tejidos y órganos difíciles de acceder. Esto es particularmente importante en el tratamiento de la infertilidad masculina, donde el objetivo es influir en las células germinales y el microambiente testicular. Los exosomas podrían superar las barreras que de otro modo limitarían el acceso de terapias convencionales.

Los exosomas pueden convertirse en vehículos de entrega de microRNAs específicos. Los miRNAs identificados como reguladores clave en la espermatogénesis podrían ser encapsulados en exosomas y administrados directamente a las células testiculares. Los estudios preclínicos han demostrado que la administración de miRNAs exógenos puede mejorar la espermatogénesis en modelos animales de infertilidad masculina. Sin embargo, la terapia con microRNAs aún se encuentra en una etapa temprana de desarrollo y se necesitan más estudios antes de que se pueda utilizar en la clínica (16).

Conclusiones

- Los miRNAs contenidos en los exosomas seminales presentan un potencial prometedor como biomarcadores para la detección y caracterización de la azoospermia. Su no invasividad y su especificidad para reflejar la función testicular y la espermatogénesis los hace candidatos atractivos para mejorar el diagnóstico de esta condición.
- Los perfiles de miRNAs en los exosomas seminales se convierten en la base para la construcción de modelos predictivos pueden proporcionar información sobre la causa subyacente de la azoospermia.
- El perfil de miRNAs presentes en los exosomas seminales podría ayudarnos no solo detectar la azoospermia, sino también ayudar a diferenciar entre los subtipos, lo que es crucial para el manejo clínico.
- La presencia y la expresión de miRNAs específicos en el plasma seminal puede ser una herramienta prometedora ayudar a predecir la posible existencia de espermatogénesis residual en el testículo, lo que es esencial para determinar la viabilidad de una biopsia testicular.
- A pesar del potencial de los perfiles de miRNAs exosomales, se necesita una validación clínica rigurosa para confirmar su utilidad en la práctica clínica. Se deben llevar a cabo estudios clínicos más amplios y controlados que confirmen la utilidad y la precisión de estos biomarcadores, así como establecer estándares y protocolos estandarizados para la recolección, el análisis y la interpretación de los datos.

Bibliografía

1. Eikmans M, Anholts JDH, Blijleven L, Meuleman T, van Beelen E, van der Hoorn MLP, et al. Optimization of microRNA acquisition from seminal plasma and identification of diminished seminal microRNA-34B as indicator of low semen concentration. *Int J Mol Sci.* 2020 Jun 1;21(11):1–15.
2. Wosnitzer M, Goldstein M, Hardy MP. Review of Azoospermia. *Spermatogenesis.* 2014 Jan;4(1):e28218.
3. Vickram AS, Srikumar PS, Srinivasan S, Jeyanthi P, Anbarasu K, Thanigaivel S, et al. Seminal exosomes – An important biological marker for various disorders and syndrome in human reproduction. Vol. 28, *Saudi Journal of Biological Sciences.* Elsevier B.V.; 2021. p. 3607–15.
4. Simon C, Greening DW, Bolumar D, Balaguer N, Salamonsen LA, Vilella F. Extracellular Vesicles in Human Reproduction in Health and Disease. *Endocr Rev [Internet].* 2018 Jun 1 [cited 2023 Mar 7];39(3):292–332.
5. Baskaran S, Panner Selvam MK, Agarwal A. Exosomes of male reproduction. *Adv Clin Chem.* 2020 Jan 1;95:149–63.
6. Dimik M, Abeysinghe P, Logan J, Mitchell M. The exosome: a review of current therapeutic roles and capabilities in human reproduction. Vol. 13, *Drug Delivery and Translational Research.* Springer; 2023. p. 473–502.
7. Zhang HT, Zhang Z, Hong K, Tang WH, Liu DF, Mao JM, et al. Altered microRNA profiles of testicular biopsies from patients with nonobstructive azoospermia. *Asian J Androl [Internet].* 2020 Jan 1 [cited 2023 Apr 14];22(1):100–5.
8. Candenas L, Chianese R. Exosome composition and seminal plasma proteome: A promising source of biomarkers of male infertility. *Int J Mol Sci.* 2020 Oct 1;21(19):1–27.
9. Barceló M, Mata A, Bassas L, Larriba S. Exosomal microRNAs in seminal plasma are markers of the origin of azoospermia and can predict the presence of sperm in testicular tissue. *Human Reproduction.* 2018 Jun 1;33(6):1087–98.

10. Murdica V, Giacomini E, Alteri A, Bartolacci A, Cermisoni GC, Zarovni N, et al. Seminal plasma of men with severe asthenozoospermia contain exosomes that affect spermatozoa motility and capacitation. *Fertil Steril*. 2019 May 1;111(5):897-908.e2.
11. Kowalczyk A, Wrzecińska M, Czerniawska-Piątkowska E, Kupczyński R. Exosomes – Spectacular role in reproduction. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2022 Apr 1;148.
12. Vojtech L, Woo S, Hughes S, Levy C, Ballweber L, Sauteraud RP, et al. Exosomes in human semen carry a distinctive repertoire of small non-coding RNAs with potential regulatory functions. *Nucleic Acids Res*. 2014 Jun 17;42(11):7290–304.
13. Ayaz A, Houle E, Pilsner JR. Extracellular vesicle cargo of the male reproductive tract and the paternal preconception environment. Vol. 67, *Systems Biology in Reproductive Medicine*. Taylor and Francis Ltd.; 2021. p. 103–11.
14. Salas-Huetos A, James ER, Aston KI, Carrell DT, Jenkins TG, Yeste M. The role of miRNAs in male human reproduction: a systematic review. Vol. 8, *Andrology*. Blackwell Publishing Ltd; 2020. p. 7–26.
15. Wu J, Bao J, Kim M, Yuan S, Tang C, Zheng H, et al. Two miRNA clusters, miR-34b/c and miR-449, are essential for normal brain development, motile ciliogenesis, and spermatogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2014 Jul 15 [cited 2023 Aug 21];111(28).
16. Rastgar Rezaei Y, Zarezadeh R, Nikanfar S, Oghbaei H, Nazdikbin N, Bahrami-Asl Z, et al. microRNAs in the pathogenesis of non-obstructive azoospermia: the underlying mechanisms and therapeutic potentials. *Syst Biol Reprod Med* [Internet]. 2021 [cited 2023 Apr 14];67(5):337–53.
17. Abu-Halima M, Hammadeh M, Backes C, Fischer U, Leidinger P, Lubbad AM, et al. Panel of five microRNAs as potential biomarkers for the diagnosis and assessment of male infertility. *Fertil Steril*. 2014 Oct 1;102(4):989-997.e1.
18. Belleannée C, Légaré C, Calvo É, Thimon V, Sullivan R. MicroRNA signature is altered in both human epididymis and seminal microvesicles following vasectomy. *Human Reproduction*. 2013;28(6):1455–67.

19. Plata-Peña L, López-Rodrigo O, Bassas L, Larriba S. Experimental validation of seminal miR-31-5p as biomarker for azoospermia and evaluation of the effect of preanalytical variables. *Andrology* [Internet]. 2023 May 1 [cited 2023 Apr 10];11(4):668–76.
20. Ma Y, Zhou Y, Xiao Q, Zou SS, Zhu YC, Ping P, et al. Seminal exosomal miR-210-3p as a potential marker of Sertoli cell damage in Varicocele. 2020;

-