



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

**UNIDAD IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
MAESTRÍA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL**

**“EVALUACIÓN FUNCIONAL DE ESPERMATOZOIDES
POSTERIOR A LA SEPARACIÓN POR COLUMNAS
MAGNÉTICAS”**

T E S I S

para obtener el grado de Maestra en Biología de la Reproducción Animal presenta:

Biól. Exp. Ana Itzel Gómez Morales

CODIRECTORA

Dra. Reyna Carmen Fierro Pastrana

CODIRECTOR

Dr. en C. Gabriel Arteaga Troncoso

ASESORA

Dra. Irma Jiménez Morales

México, D.F. a 30 de enero de 2020

COMITÉ TUTORAL

CODIRECTORA INTERNA

Dra. Reyna Carmen Fierro Pastrana
Profesora titular C Laboratorio de Andrología
Departamento de Ciencias de la Salud
DCBS UAM-Iztapalapa
reyna@xanum.uam.mx

CODIRECTOR EXTERNO

Dr. en C. Gabriel Arteaga Troncoso
MVZ., Esp. Est. Apl., M en C., Dr. en C.
Investigador en Ciencias Médicas “D”
Instituto Nacional de Perinatología
drgarteagat@yahoo.com.mx

ASESORA

Dra. Irma Jiménez Morales
Profesora titular C Laboratorio de Andrología
Depto. de Ciencias de la Salud
DCBS UAM-iztapalapa
jimi@xanum.uam.mx

MIEMBROS DEL JURADO

PRESIDENTA

Dra. Irma Jiménez Morales
Profesora titular C, Laboratorio de Andrología
Depto. de Ciencias de la Salud
DCBS UAM-iztapalapa
jimi@xanum.uam.mx

SECRETARIA

Dra. Marcela Arteaga Silva
Depto. de Biología de la Reproducción
DCBS UAM-Iztapalapa
arteaga1967@hotmail.com

VOCAL

Dra. Marcela Vergara Onofre
Profesor Titular C, T. C.
Depto. de Producción Agrícola y Animal
DCBS UAM-Xochimilco
mvergara@correo.xoc.uam.mx

VOCAL

Dr. José Antonio Herrera Barragán
Depto. de Producción Agrícola y Animal
DCBS UAM-Xochimilco
mvzjoseherrera@yahoo.com.mx

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de biología de la reproducción a cargo de la MVZ. Esperanza Carballo Mondragón del hospital Ángeles Lomas y bajo la supervisión de Dr. Alberto Kably del Centro Mexicano de Fertilidad. La beca académica No. 868851 fue gestionada por el Programa de la Maestría en Biología de la Reproducción Animal de la Universidad Autónoma Metropolitana, unidad Iztapalapa evaluada en el Nivel de Desarrollo en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad del CONACyT con No. de referencia 003797.

Agradezco a la Maestría de Biología de la Reproducción Animal de la Universidad Autónoma Metropolitana por el apoyo para la asistencia a la XLIV Reunión Anual de la Academia de Investigación en Biología de la Reproducción, que se celebrará del 26 al 29 de mayo del 2019, celebrado en la ciudad de Oaxaca, Oaxaca.

Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada:

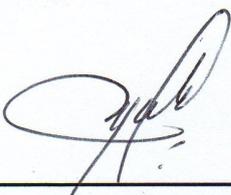
“Evaluación funcional de espermatozoides humanos posterior a la separación por columnas magnéticas”

con fecha 30 de enero del 2020.

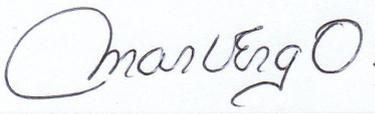
Dra. Irma Jiménez Morales
PRESIDENTA



Dra. Marcela Arteaga Silva
SECRETARIA



Dra. Marcela Vergara Onofre
VOCAL



Dr. José Antonio Herrera Barragán
VOCAL



«Nada en la vida es para ser temido, es sólo para ser comprendido. Ahora es el momento de entender más, de modo que podamos tener miedo.»

Marie Curie (1867 – 1934)

«Nada en la vida es para ser temido, es sólo para ser comprendido. Ahora es el momento de entender más, de modo que podamos temer menos»

Marie Curie (1867 – 1934)

DEDICATORIA

A mi madre, quien con todo su amor siempre sabe guiarme, por ser un ejemplo que seguir y mi mayor fuerza en la vida.

A mi padre por concederme la posibilidad de estudiar y formarme como una mejor persona.

A mis hermanos Verónica, Juan y Daniela por ser los mejores hermanos y por su apoyo incondicional. Ustedes son la mejor parte de mi vida.

A mi pareja Armando quien con su constante apoyo me alentó en las buenas y en las malas, siendo mi compañero de vida.

A mis compañeros y amigos de la Maestría Andrés, Sonia, Sofía, Rodrigo, Antonio y Moni quienes me mostraron el éxito que tienen las personas cuando trabajan en equipo dentro y fuera del aula de clases. Mi admiración para ustedes.

A mis amigos Karen, Pepe y Elizabeth a quienes agradezco su ayuda, sus consejos y los buenos momentos que son abundantes con ustedes.

Todo proyecto importante en la vida no sería posible de lograr si no fuera por la ayuda que nos brindan aquellas personas de quienes nos rodeamos y a quienes nos acercamos. Es por lo que esta tesis está dedicada a todos aquellos que contribuyeron de alguna manera a la realización de este documento.

AGRADECIMIENTOS

A todo el equipo que hizo posible la realización de este trabajo y especialmente quiero expresar mi gratitud a una serie de personas que enlistare a continuación:

A mi director de tesis el Dr. Gabriel Arteaga Troncoso por ser un padre académico para mí, por brindarme su tiempo y paciencia para trabajar en mi formación, por su supervisión y dirección y por compartir sus experiencias siendo un gran ejemplo y guía para mí.

A mi directora la Dra. Reyna Fierro Pastrana por su incondicional estímulo y apoyo en todo momento, por dedicarme su valioso tiempo.

A mi asesora la Dra. Irma Jiménez Morales por compartirme su sabiduría, por su paciencia y dedicación.

Al Centro Mexicano de Fertilidad Dr. Alberto Kably por abrirme las puertas de sus instalaciones. En particular agradecer y hacer una mención especial a la Dra. Esperanza Carballo Mondragón por permitirme aprender de la gran labor que realizan en reproducción además de apoyar la realización del proyecto, al Dr. Alberto Kably Ambe, a la Dra. Leonor A. Duran Monterrosas y a la Biól. Elizabeth Cervantes Ibarra, que con paciencia me enseñaron diversas técnicas y apoyaron en la obtención de resultados.

Al Biól. Juan Carlos Regalado por su enseñanza, consejos y por dirigirme con las personas indicadas, por ser mi guía.

Este estudio ha sido realizado en colaboración con el Dr. Fernando M. Guerra Infante al cual agradezco el apoyo y asesoramiento en el diseño y la realización de este. A la Dra. Guadalupe Razo Aguilera del Departamento de genética del INPer por el asesoramiento en las técnicas de microscopia de fluorescencia. Al Dr. Ismael Mancilla Herrera del Departamento de Infectología del INPer por el asesoramiento con las técnicas de citometría de flujo. Al Dr. Alberto Martin Guzman Grenfell por el asesoramiento en las técnicas de reacción acrosomal.

A todos los que me apoyaron para escribir y concluir esta tesis.

«Ninguna cantidad de experimentación puede probar que tengo razón; pero un solo experimento puede probar que estoy equivocado»

Albert Einstein (1879-1955)

ÍNDICE

	Pág.
ABREVIATURAS	3
RESUMEN	5
ABSTRACT	7
A. INTRODUCCIÓN.....	9
B. MARCO TEORICO.....	11
<i>a. Infertilidad</i>	11
<i>b. Infertilidad por factor masculino</i>	11
<i>c. Semen</i>	12
<i>d. Los espermatozoides</i>	12
<i>e. Membrana espermática</i>	14
<i>f. Apoptosis</i>	15
<i>g. Receptores apoptóticos</i>	17
aa. Fas (CD95, APO-1).....	17
bb. Receptores del Ligando inductor de Apoptosis Relacionado con el Factor de Necrosis Tumoral (TRAILR-1 y TRAILR-2).....	17
cc. Receptor 1 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR-1)	18
dd. Anexina V (Anexina A5)	18
<i>h. Apoptosis abortiva</i>	19
C. ANTECEDENTES	20
D. JUSTIFICACIÓN	21
E. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22
F. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	23
G. HIPÓTESIS	23
H. OBJETIVOS	23
<i>a. Objetivo general</i>	23
<i>b. Objetivos particulares</i>	24
I. MATERIAL Y MÉTODOS.....	24
<i>a. Diagrama general</i>	25
<i>ee. Experimentación</i>	25

<i>ff.</i>	<i>Primera separación de espermatozoides</i>	27
<i>gg.</i>	<i>Confirmación de los parámetros seminales</i>	27
<i>hh.</i>	<i>Expresión fenotípica de los espermatozoides</i>	28
<i>ii.</i>	<i>Identificación de marcadores por Western blot</i>	29
<i>jj.</i>	<i>Microscopía fluorescente para los espermatozoides marcados</i>	30
<i>kk.</i>	<i>Sistema de separación convencional</i>	30
<i>ll.</i>	<i>Sistema de separación por coctel de anticuerpos</i>	30
<i>mm.</i>	<i>Determinación de la fragmentación del DNA</i>	31
<i>nn.</i>	<i>Evaluación de potencial de membrana mitocondrial</i>	32
<i>oo.</i>	<i>Prueba de reacción acrosomal</i>	33
<i>pp.</i>	<i>Análisis estadístico</i>	34
J.	RESULTADOS	36
K.	DISCUSIÓN	74
L.	CONCLUSIÓN	97
M.	BIBLIOGRAFÍA	99
N.	ANEXOS	119
<i>a.</i>	<i>Anexo 1</i>	120
<i>b.</i>	<i>Anexo 2</i>	121
<i>c.</i>	<i>Anexo 3</i>	122
<i>d.</i>	<i>Anexo 4</i>	124
<i>e.</i>	<i>Anexo 5</i>	125
<i>f.</i>	<i>Anexo 6</i>	128
<i>g.</i>	<i>Anexo 7</i>	130
<i>h.</i>	<i>Anexo 8</i>	132
<i>i.</i>	<i>Anexo 9</i>	133
<i>j.</i>	<i>Anexo 10</i>	133
<i>k.</i>	<i>Anexo 11</i>	134
<i>l.</i>	<i>Anexo 12</i>	134

ABREVIATURAS

EROS: Especies Reactivas de Oxígeno

ACP: Análisis de componentes principales

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ANOVA: Analysis of variance. Análisis de varianza

SCGE: Single Cell Gel Electrophoresis assay. Electroforesis en gel de células individuales

ETS: Enfermedades de transmisión sexual

FITC: Fluorescein isothiocyanate. Isotiocianato de fluoresceína

FSH: Follicle stimulating hormone. Hormona estimuladora del folículo

LH: Leutenizing hormone. Hormona luteinizante

MANOVA: Multivariate analysis of variance. Análisis multivariado de varianza

IFM: Intensidad de fluorescencia media

OMS: Organización Mundial de la Salud

PS: Fosfatidilserina

RIPA: Radio-immunoprecipitation assay. Ensayo de radio inmunoprecipitación

ROS: Reactive oxygen species. Especies reactivas de oxígeno

SCD: Sperm chromatin dispersion. Test de dispersión de la cromatina espermática

TRAIL: Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. Ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral

TUNEL: Terminal dUTP nick-end labeling.

VEGF: Vascular endothelial growth factor. Factor de crecimiento endotelial vascular

MACS: Magnetic Activated Cell Sorting. Selección de células activadas magnéticamente

MACS V: Magnetic Activated Cell Sorting V. Selección de células activadas magnéticamente por medio de ANEXINA V

MACS COCTEL: Magnetic Activated Cell Sorting COCTEL. Selección de células activadas magnéticamente por medio del coctel de anticuerpos

PSA: Pisum sativum

PNA: Arachis hypogae

PLGF: Factor de Crecimiento Placentario

INPer: Instituto Nacional de Perinatología

RESUMEN

La infertilidad es un problema que afecta a una de cada seis parejas, de las cuales hasta en un 60% depende del factor masculino. En la búsqueda de un método no invasivo que permita dar solución a las bajas tasas de éxito en las técnicas de reproducción asistida se propone la implementación de un coctel de marcadores apoptóticos con la utilización del método MACS que permita eliminar espermatozoides con apoptosis inicial o temprana y apoptosis final o tardía, así como la evaluación del potencial de membrana mitocondrial para conocer el estado fisiológico de la célula, la prueba de reacción acrosomal con el propósito de obtener espermatozoides con un mayor potencial de fertilización. Por ende, el objetivo del proyecto fue evaluar la eficacia en la separación de espermatozoides apoptóticos, en fase temprana y tardía, presentes en el eyaculado de pacientes infértiles (normozoospermicos y astenozoospermicos). Se incluyeron muestras seminales de 74 hombres infértiles y 10 donadores fértiles. Se realizó una espermatobioscopia de cada muestra, antes y después del método de separación por *swim-up*. Dos métodos de separación magnética fueron comparados (convencional vs. Coctel de marcadores apoptóticos). La proporción de gametos positivos a TRAIL-R1, TRAIL-R2, Fas, VEGFR-1/Flt-1 y anexina V fueron evaluados en ambos métodos. Los resultados mostraron diferencia significativa del porcentaje de espermatozoides positivos a TRAIL-R1 en las muestras de los pacientes con infertilidad; baja expresión de las moléculas TRAIL-R1, TRAIL-R2, Fas, VEGF-R1/Flt-1 y anexina V en la membrana plasmática de los espermatozoides de los pacientes infértiles en contraste con donadores fértiles. Con excepción de anexina V que se localizó únicamente en la pieza media, la localización por inmunofluorescencia de los receptores fue en pieza media y flagelo. Una vez realizada la separación por cada tipo de MACS la viabilidad espermática mostró un decremento en la separación por MACS COCTEL al contrastar el porcentaje de gametos viables de donadores fértiles obtenidos por el método convencional (60% vs. 6%; $p < 0.01$), en pacientes infértiles normozoospermicos (30% vs. 4.3%, $p < 0.01$), pero no en las muestras de pacientes astenozoospermicos (32% vs. 55%, $p < 0.05$). Todas las comparaciones mostraron mayor proporción de espermatozoides móviles totales utilizando el método convencional de separación por MACS. Cabe mencionar que, la proporción de espermatozoides móviles progresivos en las fracciones negativas de los donadores fértiles fue significativamente mayor durante la separación realizada por el método convencional en contraste con el coctel de anticuerpos (49% vs. 15.8, $p < 0.01$), pacientes infértiles normozoospermicos (47.5% vs. 22.5%, $p < 0.03$) y astenozoospermicos (66.5% vs. 19.5%, $p < 0.01$), respectivamente. Todas las comparaciones mostraron menor proporción de espermatozoides apoptóticos utilizando el método de separación por coctel de anticuerpos. El diferencial medio del DFI en la relación de fracción negativa-positiva obtenida por el método de coctel de anticuerpos mostró menor proporción de gametos apoptóticos que la determinada por el método convencional por MACS en las muestras de donadores fértiles (-29.5% vs. -19%, $p < 0.05$), pacientes infértiles normozoospermicos (-34% vs. -9.3%, $p < 0.01$), y en las muestras de pacientes astenozoospermicos (-40% vs. -9%, $p < 0.01$). El análisis de varianza revela la diferencia estadísticamente significativa del modelo lineal corregido ($p < 0.025$) con potencia observada $\approx 80\%$ y la varianza del término de

error es constante en la combinación de los niveles de los factores (Prueba de Levene, $p=0.25$). El procedimiento mostró un adecuado comportamiento en la explicación de la varianza de la media general ($p<1 \times 10^{-7}$) y de los tratamientos, pero no de la clasificación clínica y la interacción de los tratamientos-clasificación clínica. La proporción de espermatozoides apoptóticos obtenidos por el método de coctel de anticuerpos fue significativamente menor que los derivados por método convencional con MACS ($F_{c1gl} = 5.04$, $p<0.03$). La clasificación clínica de las muestras seminales no muestra diferencia significativa por lo que no sesga los resultados de la separación de los gametos apoptóticos por ambos métodos ($p=0.94$). No se reveló error de tipo IV (interpretación incorrecta del rechazo correcto de la hipótesis nula) por lo que no se observa efecto del experimentador en la evaluación de los resultados ($p=0.76$). El estado del acrosoma de los gametos obtenidos de la fracción negativa durante la separación magnética usando el coctel de anticuerpos tuvo un porcentaje del 98%. Después de la evaluación de 10,000 eventos, el 99% de los espermatozoides formaron agregados de JC-1 revelando incremento del potencial mitocondrial y sólo el 0.5% permanecieron de forma monomérica en la fracción negativa en contraste con el 90.8% de los gametos que formaron agregados y el 43.3% que permanecieron como monómeros en la fracción positiva. En conclusión, encontrar una intensidad de fluorescencia para cada receptor mayor en los donadores fértiles que en los pacientes infértiles nos sugiere que probablemente la apoptosis en el espermatozoide tenga que ser inducida por la concentración de receptores en membrana, por tanto, al ser baja la cantidad de estos, la intensidad de la señal se considera débil y por eso escapan al mecanismo de eliminación, sufriendo así de una apoptosis abortiva. MACS con el coctel de anticuerpos es mejor eliminando las células apoptóticas con ADN fragmentado en comparación con la técnica estándar, células que posteriormente pueden ser utilizadas para TRA. La combinación de MACS con centrifugación en gradiente de doble densidad produce una población limpia de espermatozoides caracterizada por una mayor movilidad, viabilidad y morfología. Además, los espermatozoides tratados por MACS muestran manifestaciones de apoptosis reducidas, incluida la fragmentación del ADN. En este contexto, MACS puede considerarse una técnica de preparación molecular única que complementa los protocolos convencionales de preparación de espermatozoides.

ABSTRACT

Infertility is a problem that affects one in six couples, of which up to 60% depends on the male factor. In the search for a non-invasive method that allows to solve the low success rates in assisted reproduction techniques, the implementation of a cocktail of apoptotic markers is proposed with the use of the MACS method that allows eliminating sperm with initial or early apoptosis and Final or late apoptosis, as well as the evaluation of the mitochondrial membrane potential to know the physiological state of the cell, the acrosomal reaction test with the purpose of obtaining sperm with a greater potential for fertilization. Therefore, the objective of the project was to evaluate the efficacy in the separation of apoptotic spermatozoa, in the early and late stages, present in the ejaculate of infertile patients (normozoospermic and astenozoospermic). Seminal samples of 74 infertile men and 10 fertile donors were included. A spermatobioscopy of each sample was performed, before and after the swim-up separation method. Two methods of magnetic separation were compared (conventional vs. cocktail of apoptotic markers). The proportion of gametes positive for TRAIL-R1, TRAIL-R2, Fas, VEGFR-1/Flt-1 and annexin V were evaluated in both methods. The results showed a significant difference in the percentage of spermatozoa positive for TRAIL-R1 in the samples of patients with infertility; low expression of the TRAIL-R1, TRAIL-R2, Fas, VEGF-R1 / Flt-1 and annexin V molecules in the sperm plasma membrane of infertile patients in contrast to fertile donors. With the exception of annexin V, which was located only in the middle piece, the immunofluorescence location of the receptors was in the middle piece and scourge. Once the separation was made for each type of MACS, the sperm viability showed a decrease in the separation by MACS COCTEL when the percentage of viable gametes from fertile donors obtained by the conventional method was contrasted (60% vs. 6%; $p < 0.01$), in normozoospermic infertile patients (30% vs. 4.3%, $p < 0.01$), but not in the samples of astenozoospermic patients (32% vs. 55%, $p < 0.05$). All comparisons showed a higher proportion of total mobile sperm using the conventional MACS separation method. It should be mentioned that, the proportion of progressive mobile sperm in the negative fractions of fertile donors was significantly higher during the separation performed by the conventional method in contrast to the antibody cocktail (49% vs. 15.8, $p < 0.01$), infertile patients normozoospermic (47.5% vs. 22.5%, $p < 0.03$) and astenozoospermic (66.5% vs. 19.5%, $p < 0.01$), respectively. All comparisons showed a lower proportion of apoptotic sperm using the antibody cocktail separation method. The mean differential of the DFI in the negative-positive fraction ratio obtained by the antibody cocktail method showed a lower proportion of apoptotic gametes than that determined by the conventional method by MACS in the samples of fertile donors (-29.5% vs. -19 %, $p < 0.05$), normozoospermic infertile patients (-34% vs. -9.3%, $p < 0.01$), and in astenozoospermic patient samples (-40% vs. -9%, $p < 0.01$). The analysis of variance reveals the statistically significant difference of the corrected linear model ($p < 0.025$) with observed power $\approx 80\%$ and the variance of the error term is constant in the combination of the factor levels (Levene's test, $p = 0.25$). The procedure showed an adequate behavior in the

explanation of the variance of the general mean ($p < 1 \times 10^{-7}$) and of the treatments, but not of the clinical classification and the interaction of the treatments-clinical classification. The proportion of apoptotic sperm obtained by the antibody cocktail method was significantly lower than those derived by conventional method with MACS (Fc1gl= 5.04, $p < 0.03$). The clinical classification of the seminal samples does not show a significant difference, so it does not bias the results of the separation of apoptotic gametes by both methods ($p = 0.94$). No type IV error (incorrect interpretation of the correct rejection of the null hypothesis) was revealed, so no effect of the experimenter is observed in the evaluation of the results ($p = 0.76$). The acrosome state of the gametes obtained from the negative fraction during magnetic separation using the antibody cocktail had a percentage of 98%. After the evaluation of 10,000 events, 99% of sperm formed aggregates of JC-1 revealing an increase in mitochondrial potential and only 0.5% remained monomerically in the negative fraction in contrast to 90.8% of the gametes that formed aggregates and 43.3% that remained as monomers in the positive fraction. In conclusion, finding a fluorescence intensity for each recipient greater in fertile donors than in infertile patients suggests that sperm apoptosis probably has to be induced by the concentration of membrane receptors, therefore, as the amount is low of these, the signal strength is considered weak and therefore they escape the elimination mechanism, thus suffering from an abortive apoptosis. MACS with the antibody cocktail is better by removing apoptotic cells with fragmented DNA compared to the standard technique, cells that can later be used for TRA. The combination of MACS with double density gradient centrifugation produces a clean sperm population characterized by increased mobility, viability and morphology. In addition, sperm treated by MACS show reduced manifestations of apoptosis, including DNA fragmentation. In this context, MACS can be considered a unique molecular preparation technique that complements conventional sperm preparation protocols.

A.INTRODUCCIÓN

La carencia de descendencia no prevista en la pareja a pesar de tener relaciones sexuales sin protección regularmente dentro de un período de 12 meses o más se define como infertilidad¹. En México aproximadamente entre el 15% al 20% de las parejas sexualmente activas, no usan ningún tipo de anticoncepción y son incapaces de concebir. En la mitad de estas parejas el factor masculino es la única causa que contribuye al problema de la infertilidad. Las principales causas de este trastorno en los hombres se asocian con anomalías genéticas, fisiopatológicas y anatómopatológicas, ejercicios físicos intensos y prolongados, envejecimiento, uso de drogas y excesivo tiempo de abstinencia sexual².

La espermatogénesis es un proceso biológico complejo que depende de una cascada de eventos genéticamente orquestados que implican la proliferación de espermatogonias, reducción de la división cromosómica para producir un genoma haploide en cada célula hija y, finalmente, la diferenciación morfológica de estos gametos en espermatozoides maduros. La aparición de mutaciones genómicas en cualquiera de las etapas de la espermatogénesis puede tener como resultado un incontable número de alteraciones en el espermatozoide y el testículo en su conjunto³. La apoptosis espermática es un mecanismo esencial en la selección de los gametos aptos para fertilizar al ovocito. En los centros germinales del testículo, el proceso apoptótico controla la superproducción de los gametos restringiendo las cantidades de proliferación para que no sobrepasen la capacidad de apoyo hormonal de las células de Sertoli^{4,5,6}. En ratas púberes, se observa una mayor tasa de apoptosis durante el establecimiento inicial de la espermatogénesis, también llamada la primera ola de la espermatogénesis⁷, probablemente como un mecanismo para eliminar a las células germinales dañadas y limitar la rápida producción de células germinales en este período de vida.

La discusión en torno a la apoptosis espermática sigue siendo un tema controversial, ya que existe la incertidumbre en cuanto a si los espermatozoides apoptóticos son gametos con poca actividad funcional o si es un hecho indicativo de que la célula no ha completado la maduración durante la espermatogénesis. Diversos autores han

descrito la presencia de marcadores apoptóticos tales como la externalización de fosfatidilserina, fragmentación del ADN y la expresión de Fas en los espermatozoides de hombres infértiles y/o con alteración de la espermatogénesis^{8,9,10,11,12,13}. Aún no está claro si los espermatozoides eyaculados aún conservan la capacidad de activar la cascada de señalización de apoptosis o si los marcadores de apoptosis detectados en los espermatozoides eyaculados son meramente reliquias de un proceso apoptótico abortivo iniciado antes de la eyaculación¹⁴. El resultado de este proceso apoptótico está relacionado con una liberación prematura de espermátides en el eyaculado durante las primeras etapas de apoptosis en las células de Sertoli que normalmente deben participar en la eliminación de las espermátides defectuosas. Información reciente sugiere que el incremento en la proporción de gametos con marcadores apoptóticos en el eyaculado es una consecuencia del proceso de eliminación iniciado antes de la eyaculación y que la sobrevivencia de los gametos eyaculados sanos depende de un proceso de necrosis y no por apoptosis espermática¹⁵. El estudio realizado por Greco y colaboradores en 2015 mostró que la proporción de gametos con fragmentación del ADN fue marcadamente inferior en espermatozoides obtenidos del testículo en contraste con los gametos eyaculados¹⁶.

Aunque la preservación de la integridad del ADN espermático es esencial para mejorar la calidad de la muestra seminal en las técnicas de reproducción asistida, la utilidad del método de separación magnética usando microesferas MACS (*magnetic-activated cell sorting*) para seleccionar a los espermatozoides con mayor capacidad fecundante, ha tenido hasta ahora escaso desarrollo biotecnológico. En este estudio, el principal objetivo fue evaluar la eficiencia de un proceso biotecnológico en la remoción de gametos apoptóticos para maximizar la probabilidad de fertilización y por ende la posibilidad de un embarazo viable.

B.MARCO TEORICO

a. Infertilidad

La frecuencia con la que las parejas padecen problemas de infertilidad se ha asociado principalmente con factores femeninos, tales como: la ovulación (presente en alrededor del 20% de las parejas), el útero-tubárico-peritoneal (~30% de las parejas); mientras que el factor masculino ocupa un 40%, del cual la migración de los espermatozoides representa el 10%. De todas las parejas infértiles, aproximadamente el 40% presentan una combinación de factores femeninos y masculinos. En el 15% de parejas infértiles que no existe ninguna alteración objetiva o evidencia de que lleve a un diagnóstico definido de infertilidad, se le considera como infertilidad idiopática¹⁸. Las Técnicas de Reproducción Asistida (TRA) son ampliamente utilizadas para el tratamiento de la infertilidad humana. En estas técnicas la mayoría de las fallas son debidos a las deficiencias del factor masculino¹⁹. En condiciones *in vitro*, la calidad espermática es uno de los principales factores que determinan el éxito de la fertilización¹⁷.

b. Infertilidad por factor masculino

Existen evidencias que relacionan diversos factores con la calidad espermática, así el consumo de tabaco y alcohol se asocian con la alteración de los parámetros seminales y la calidad del semen²⁰; el abuso de alcohol, por ejemplo, se ha relacionado con una reducción de la síntesis y secreción de testosterona y una espermatogénesis anormal. El abuso y dependencia del tabaco conlleva a alteraciones en la viabilidad espermática^{20,21,22}. Otros factores de riesgo incluyen: varicocele, causas sistémicas, infecciones genitales, traumatismos, cirugías, disfunciones genéticas, daño oxidativo y abuso de sustancias tóxicas, las cuales, se han relacionado con alteraciones en la cantidad y calidad de espermatozoides. Además del comportamiento sexual de riesgo (sin prevención de enfermedades de transmisión sexual), todos estos son factores que llevan a graves consecuencias en la fertilidad¹⁸.

c.Semen

El semen es el medio líquido en el que se desplazan los espermatozoides y cuyo volumen corresponde a secreciones de las glándulas accesorias (99% aproximadamente). La calidad del semen de los pacientes con infertilidad se evalúa en relación con la concentración, características funcionales de los espermatozoides y del volumen de fluido total del eyaculado. Una emisión seminal típica contiene entre 200 y 400 millones de espermatozoides en un volumen de 3 a 4 ml, sin embargo, la calidad del semen también puede depender de la técnica de obtención^{1,23}.

Las alteraciones más frecuentes en el análisis del semen son: Oligozoospermia (baja concentración de espermatozoides), astenozoospermia (disminución de la movilidad de los espermatozoides), teratozoospermia (alto porcentaje de anomalías morfológicas), oligoastenoteratozoospermia (presenta baja concentración, baja movilidad y morfología mayor a 85% de formas anormales), azoospermia (ausencia de espermatozoides), aspermia (ausencia de semen) y necrozoospermia (menos del 58% de viabilidad espermática); siendo la normozoospermia cuando las características seminales cumplen los criterios de normalidad que establece la Organización Mundial de la Salud (OMS,2010)¹.

En la clínica de reproducción, la calidad espermática es calificada a partir de los resultados del análisis seminal de la pareja masculina infértil, los que son cotejados con los valores de referencia internacional cuyas directrices son proporcionadas por la OMS. Sin embargo, la calidad espermática necesaria para el éxito de la Inseminación Artificial (IA) o Fertilización *In Vitro* y Transferencia de Embriones (FIVTE), es siempre inferior a estos valores de referencia que evalúan el potencial de la fertilidad masculina a partir de un valor de corte para parejas fértiles²⁴.

d.Los espermatozoides

Los espermatozoides son células especializadas que estructuralmente se dividen en: Cabeza, (posee las estructuras requeridas para la fecundación) y flagelo (aporta la energía para la movilidad)²⁵. Los espermatozoides son el producto final del proceso

de gametogénesis en el hombre, la cual se lleva a cabo en los túbulos seminíferos de los testículos^{26,27}. El espermatozoide humano mide de 45 a 50 μm de longitud y se desplaza a una velocidad promedio de 75 $\mu\text{m/s}$ ¹⁹⁰. Los espermatozoides son células especializadas que estructuralmente se pueden dividir en cabeza, que posee las estructuras requeridas para la fecundación y el flagelo que aporta la energía para la movilidad²⁵.

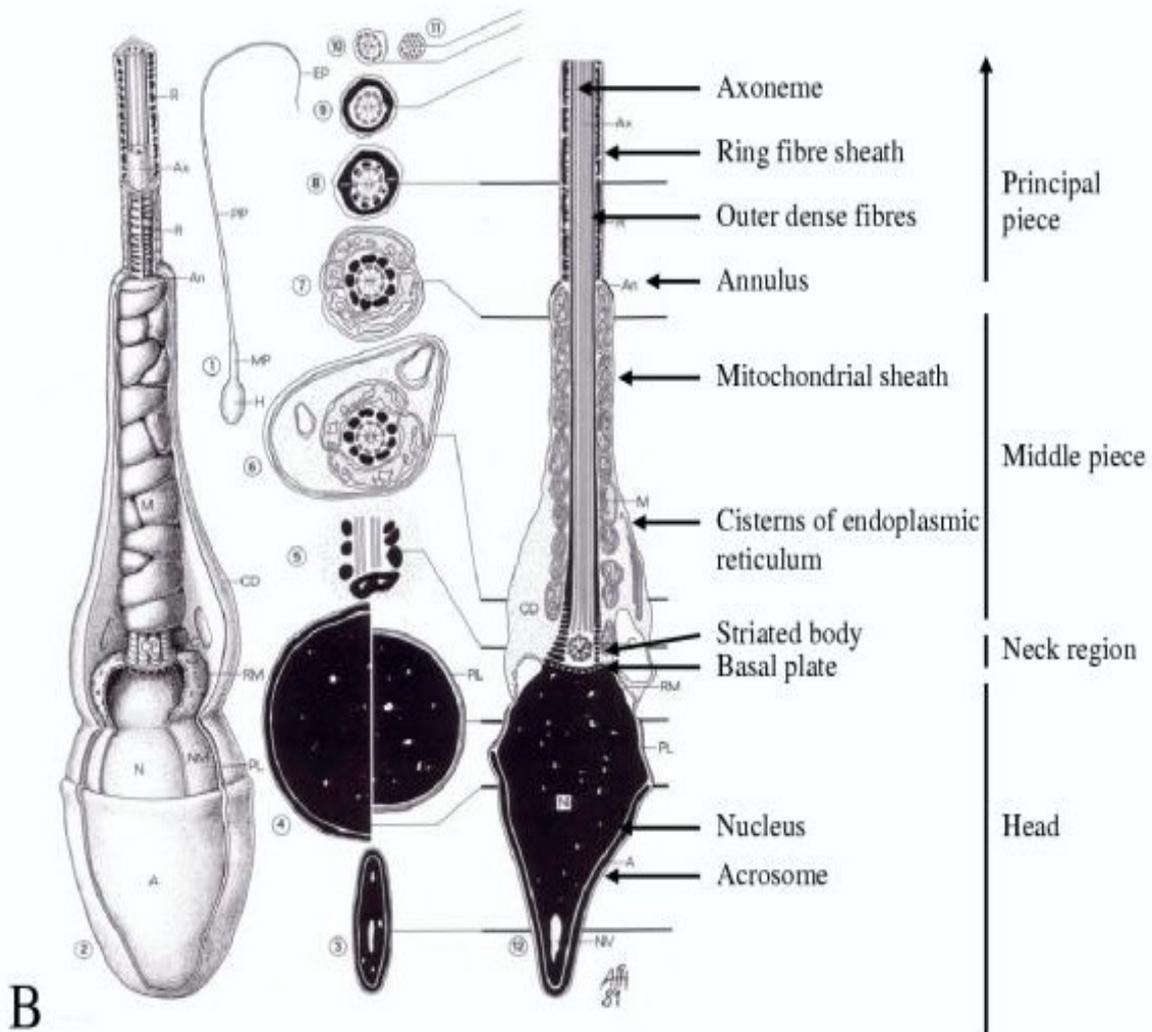


Figura A. El espermatozoide humano; aspecto microscópico mostrando el acrosoma, el núcleo y las envolturas nucleares, la vaina mitocondrial de la pieza principal del flagelo. Secciones transversales del espermatozoide humano de diferentes niveles indicados en (12) sección longitudinal del espermatozoide humano. Dibujo semiesquemático basado en micrografías electrónicas. Tomado de: Holstein et al., 2003. *Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. Reprod Biol Endocrinol*; 1:10.

En general, desde el punto de vista morfológico, los dos principales componentes del espermatozoide son la cabeza y el flagelo (figura A), los cuales se encuentran unidos por la pieza de unión o conexión¹⁹². que a su vez se encuentran recubiertas por una estructura laminar denominada membrana plasmática, caracterizada por su composición de lípidos y glicoproteínas que varía dependiendo de la región del espermatozoide, además de contener una escasa cantidad de citoplasma¹⁹². La cabeza se encuentra conformada por el acrosoma, el núcleo, las estructuras citoesqueléticas y una pequeña cantidad de citoplasma. El núcleo contiene la cromatina altamente condensada y se encuentra cubierto por el acrosoma. El flagelo se divide en cuello, pieza media, parte principal y terminal. Las piezas media y principal son dos regiones que se encuentran divididas por el anillo¹⁰¹. El flagelo contiene el axonema que es una estructura localizada en toda la longitud del flagelo y es el aparato motor del espermatozoide. El axonema se encuentra formado por un par de microtúbulos central y nueve pares periféricos que le dan la flexibilidad y la forma al movimiento flagelar¹⁹¹.

La pieza media del espermatozoide posee una gran cantidad de mitocondrias arregladas en forma de hélice que son las encargadas de suministrar energía a los microtúbulos para que el espermatozoide pueda moverse, energía que necesita para realizar su recorrido por el cérvix, el útero y las trompas de Falopio hasta llegar al ovocito para fecundarlo. Las mitocondrias de los espermatozoides humanos son susceptibles a los estímulos de apoptosis debido a su compartimentalización dentro de la pieza media^{29, 30}.

e. Membrana espermática

La membrana plasmática del espermatozoide es heterogénea y tiene cinco dominios específicos: acrosoma, segmento ecuatorial, basal, pieza media y cola y desempeña un papel importante durante la fecundación¹⁹², además de participar en el reconocimiento y transporte de moléculas, con funciones específicas que permiten que adapte su metabolismo al medio circundante, proporcionándole un sistema molecular para el reconocimiento del ovocito¹⁹³.

Bioquímicamente la membrana del espermatozoide está constituida por una bicapa lipídica y proteínas unidas por interacciones no covalentes, los lípidos están dispuestos en forma de una doble capa continua de 4 a 5 nm de grosor. Las proteínas que están incluidas en la bicapa lipídica realizan diversas funciones, como son: el transporte de moléculas específicas hacia el interior y exterior de la célula; mismas que actúan como enzimas o catalizadores de las diversas reacciones y funcionan como receptores en la transducción de señales. Además de lípidos y proteínas, la membrana también contiene carbohidratos²⁵. La organización y composición de la membrana plasmática varía entre las diferentes regiones de la superficie de los espermatozoides, lo que da una idea de un mosaico de dominios restringidos que reflejan las especializadas funciones de la superficie y los componentes citoplásmicos de los espermatozoides¹⁹³.

Las regiones más grandes de la membrana plasmática se encuentran en la cabeza de los espermatozoides (regiones acrosomal y postacrosomal). La región acrosomal puede ser dividida a su vez en tres dominios: a) segmento marginal, b) segmento principal y c) segmento ecuatorial¹⁰¹. La región postacrosomal, incluye a la membrana plasmática entre el margen posterior del acrosoma y la pieza de unión, el margen entre la región acrosomal y postacrosomal está delimitada en algunas especies por una banda dentada o segmento ecuatorial y la región del anillo posterior, la cual está localizada entre la cabeza del espermatozoide y la pieza de unión que forma una especie de sello hermético entre los compartimentos citoplasmáticos de las dos partes principales del espermatozoide¹⁹².

f. Apoptosis

La apoptosis es una vía de destrucción o muerte celular programada que regula el balance entre proliferación y pérdida celular, ante estímulos extra o intracelulares. La apoptosis tiene una función muy importante en los organismos, pues hace posible la destrucción de las células dañadas^{31,32}. Se puede postular que la apoptosis tiene dos papeles durante la espermatogénesis normal: 1) la limitación de la población de

células germinales a la cantidad de gametos que pueden ser soportados por las células de Sertoli; y, 2) la depleción selectiva de espermatozoides anormales³³.

Se han descrito dos vías apoptóticas principales: La vía extrínseca y la vía intrínseca³⁴. La primera implica la activación de receptores de muerte como Fas/APO1/CD95 o TRAIL-R1 y R2, por su ligando putativo, FasL (*Fas Ligand*), o TRAIL (*TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand*), respectivamente (Figura B). Una vez activados, estos receptores desencadenan una cascada de señalización que activan a la caspasa-8 o a la caspasa-10, que a su vez activan a la caspasa-3, la cual posteriormente activará a las caspasas- 6 y -7, terminando en apoptosis³⁵. Asimismo, la expresión del receptor de VEGFR-1 (Vascular Endothelial Growth Factor 1) puede estar involucrado en algunos parámetros espermáticos como la motilidad y sobrevivencia espermática³⁶.

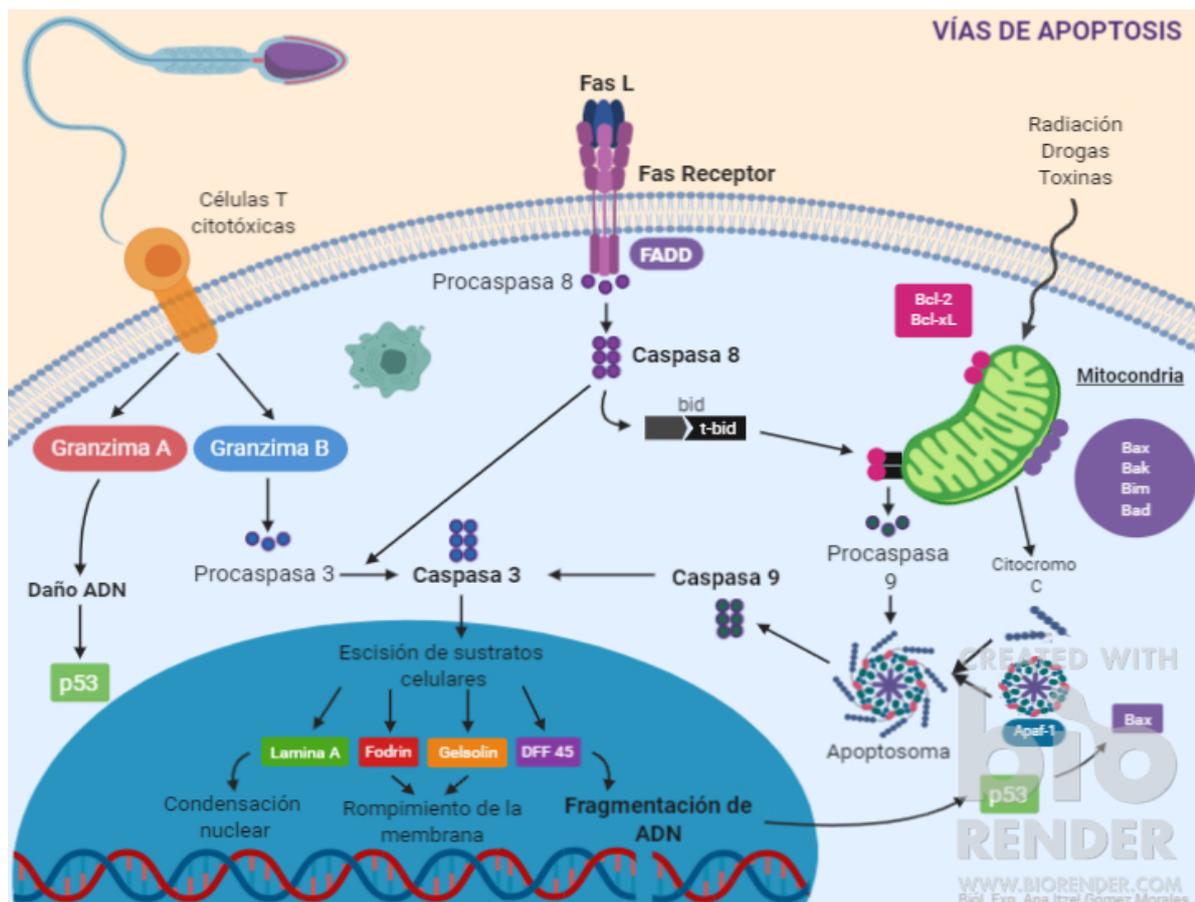


Figura B. Vías de apoptosis de células germinales masculinas: regulación. Modificada de Shaha y cols., 2010.

g.Receptores apoptóticos

aa.Fas (CD95, APO-1)

Fas es un receptor transmembranal proteico de 45 kDa⁶⁵.

La activación de Fas-Fas L induce la apoptosis en células normales y tumorales. Fas contiene un dominio de muerte citoplásmico, que tras la activación recluta a una molécula adaptadora citoplasmática que contiene un dominio de muerte, llamada FADD, la cual, a su vez, recluta a procaspasa 8 que al activarse desencadena la cascada de las caspasas dando lugar a la muerte rápida de la célula⁶⁶.

En el testículo, el sistema Fas-FasL está implicado en el mantenimiento de la naturaleza inmunoprivilegiada de este órgano. Las células de Sertoli eliminan las células Fas positivas protegiendo así las células germinales contra el sistema inmune y la prevención de reacciones de rechazo en el entorno testicular. Pentikäinen y cols. sugieren que dicho sistema está implicado en la apoptosis de células germinales en el testículo humano⁶⁸.

bb.Receptores del Ligando inductor de Apoptosis

Relacionado con el Factor de Necrosis Tumoral (TRAILR-1 y TRAILR-2).

TRAIL es una proteína transmembranal de tipo II con un peso molecular de 33-35KD, que puede inducir selectivamente la apoptosis en células tumorales, pero no en las células normales. TRAIL se expresa de forma basal en numerosos tejidos, como en hígado, corazón, riñón, pulmón o testículo⁶⁷. Ésta es capaz de unirse a 5 diferentes receptores: TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRAIL-R3 también llamado (TRID), TRAIL-R4 y el receptor soluble de osteoprotegerina (OPG). Dos de ellos, DR4/TRAIL-R1 y DR5/TRAIL-R2, contienen un dominio de muerte citoplasmático que transmite las señales de apoptosis en respuesta a TRAIL. El receptor TRAIL-R3 no posee un dominio intracelular mientras que TRAIL-R4 contiene un dominio de muerte truncado impidiendo así la activación de la maquinaria apoptótica^{68,69}.

cc.Receptor 1 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR-1)

El factor de crecimiento endotelial vascular es un regulador crucial en el desarrollo vascular durante la embriogénesis (vasculogénesis), así como en la formación de vasos sanguíneos (angiogénesis). La familia de proteínas del VEGF, incluyen al VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y el factor de crecimiento placentario (PLGF)⁷⁰. De esta familia de transcritos, el más estudiado es el VEGF-A que es referido simplemente como VEGF. Las moléculas VEGF-B y PLGF se unen a VEGFR1 y modulan la actividad de VEGF-A en células endoteliales durante el desarrollo embrionario y durante la angiogénesis patológica (PLGF)⁷⁰.

La actividad biológica del VEGF está mediada principalmente por dos receptores, el VEGFR-1 ó Flt-1 (fms-like tyrosine kinase-1) y el VEGFR-2 ó Flk-1 (fetal liver kinase-1). La expresión de estos receptores es baja en tejidos normales y sólo sobre expresada durante el desarrollo de estados patológicos, cuando se produce neovascularización⁷¹.

dd.Anexina V (Anexina A5)

La anexina V (Proteína reguladora del influjo de iones calcio). es una glicoproteína cuyo peso molecular es de 35 kDa^{74,77}, es una proteína de unión a fosfolípidos dependiente de calcio, la cual tiene una gran afinidad por los restos de fosfatidilserina (PS), un fosfolípido que se encuentra en el interior de la membrana plasmática y que al iniciar el proceso apoptótico, dicho fosfolípido es traslocado al exterior de la membrana^{73,74,75,76}. La funcionalidad de la proteína es desconocida; sin embargo, la anexina V puede desempeñar un papel en la inhibición de la coagulación de la sangre, al competir por los sitios de unión a fosfatidilserina con protrombina y también para inhibir la actividad de la fosfolipasa A1. Otras funciones biológicas destacan su participación en la agregación y fusión de membranas, en los procesos de endo y exocitosis y la capacidad de interacción con las proteínas del citoesqueleto⁷⁴.

La sobreexpresión de anexina V en el citoplasma de células tumorales, ha sido observada en muestras de pacientes con carcinoma papilar de tiroides⁷⁸.

Debido al alto potencial de afinidad, la anexina V se ha utilizado como un biomarcador de apoptosis para identificar células que expresan fosfatidilserina (PS) en la superficie. En técnicas de reproducción asistida, el sistema de separación magnética MACS (Magnetic-activated cell sorting) utiliza microesferas metálicas recubiertas por anexina V para separar espermatozoides apoptóticos entre la población espermática presente en el eyaculado seminal de pacientes con infertilidad. La separación de los espermatozoides tiene el propósito de obtener gametos con un mayor potencial de fertilización⁷⁹.

h. Apoptosis abortiva

En presencia de apoptosis eficiente, las células germinales se eliminan, de tal manera que, solo los espermatozoides normales están presentes en el eyaculado. Una espermatogénesis normal depende de la eficiencia de la apoptosis; aproximadamente del 25 al 75% de las células germinales son eliminadas en los testículos¹⁴. Por alguna razón, ciertas células germinales marcadas para la apoptosis “escapan” al mecanismo de eliminación y completan el proceso de remodelación durante la espermatogénesis. A su vez, el porcentaje de espermatozoides eyaculados con ADN dañado ha sido relacionado negativamente con una fertilidad reducida¹². La producción de espermatozoides eyaculados que poseen marcadores apoptóticos (positividad Fas y daño en el ADN) indica que en algunos hombres con parámetros espermáticos anormales se ha producido una apoptosis abortiva¹⁴. Por lo que sugiere que los espermatozoides que muestran morfología anormal, función bioquímica irregular o daño nuclear del ADN no se han podido eliminar debido a un mecanismo apoptótico abortivo³⁷.

El debate en torno a la apoptosis espermática sigue siendo un tema controversial ya que existe la incertidumbre en cuanto a si los espermatozoides apoptóticos son

espermatozoides con poca actividad funcional o si indican que la célula no ha completado la maduración durante la espermatogénesis³⁸.

La activación de las caspasas, la disrupción del potencial de membrana mitocondrial y el aumento de la fragmentación del ADN son algunas de las características apoptóticas que se han identificado en los espermatozoides eyaculados^{39,40}. La translocación de fosfatidilserina de la cara interna de la membrana a la cara externa de la misma es un evento temprano de la apoptosis de los espermatozoides^{41,42}.

C.ANTECEDENTES

La presencia de alteraciones relacionadas con el factor masculino en las parejas alcanza del 30 al 50% del total de los casos de infertilidad⁴³. En las muestras seminales de estos varones, los espermatozoides muestran características de apoptosis tales como la translocación de fosfatidilserina a la membrana plasmática externa, la activación de las caspasas pro-apoptóticas y la alteración del potencial de la membrana mitocondrial como resultado de la generación de EROS⁴⁴.

Dentro de los métodos para detectar daños a la cromatina se encuentran las pruebas de SCSA (*Sperm Chromatin Structure Assay*), TUNEL (*Terminal dUTP Nick-End Labeling*), Halosperm y Comet, todas estas requieren de la fijación permanente de los espermatozoides, lo que no permite utilizarlos posteriormente. Además, con dichas técnicas no se detectan gametos que no presentan daños estructurales en los fosfolípidos y proteínas de la membrana plasmática o en la fragmentación del ADN, debido a que se encuentran en una fase inicial de daño celular. Inclusive, algunas técnicas podrían por sí mismas causar daños en los espermatozoides por sus efectos carcinogénicos^{45,46}. Por estos motivos es necesario el desarrollo de nuevas metodologías que permitan separar los espermatozoides sanos de aquellos que presentan apoptosis⁴⁷.

Actualmente se ha implementado la separación magnética con microesferas conjugadas con Anexina V. Esta sobre expresión de Anexina V, también ha sido

observada en el citoplasma de células tumorales en muestras de pacientes con carcinoma papilar de tiroides⁴⁸.

En técnicas de reproducción asistida, el sistema de clasificación de células activadas magnéticamente MACS utiliza microesferas metálicas recubiertas por anexina V para separar espermatozoides apoptóticos entre la población espermática presente en el eyaculado seminal de pacientes con infertilidad, con el fin de eliminar los espermatozoides defectuosos o muertos y así poder aumentar las tasas de fecundación^{47,46,49}. Esta técnica se basa en la separación electroforética de espermatozoides apoptóticos (Fracción positiva para Anexina V) y espermatozoides no apoptóticos (Fracción negativa para Anexina V)^{50,51,52}.

Los datos recientes indican que las técnicas que permiten la selección de espermatozoides no apoptóticos pueden superar algunas de las limitaciones de otros métodos de evaluación espermática^{42,53,54,55,56,57}.

Otro fenómeno que tiene cabida en la apoptosis es la reducción del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi M$)^{29, 30}. Además, el daño al ADN en los espermatozoides puede afectar el ADN mitocondrial y nuclear. El daño a la cromatina del espermatozoide puede considerarse como un indicador de pronóstico negativo en la fertilización *in vitro* en parejas con abortos espontáneos y un impropio desarrollo embrionario⁵⁸. La disfunción mitocondrial ha sido implicada en la fisiopatología de muchas enfermedades, por lo tanto, la capacidad para determinar la funcionalidad de estas también puede proporcionar información complementaria importante sobre el estado fisiológico de la célula.^{29, 30}

D.JUSTIFICACIÓN

Actualmente, la calidad espermática se evalúa por un análisis por microscopía óptica para determinar los parámetros seminales tales como: la concentración, viabilidad, movilidad y morfología de las células según la OMS¹. Sin embargo, dicho análisis tiene un valor clínico limitado para predecir la tasa de éxito en la fertilización, ya que no utilizan criterios moleculares para evaluar la función reproductiva, por lo que las

células seleccionadas no tienen necesariamente la mayor competencia funcional. Por lo que es necesaria la detección de espermatozoides en apoptosis, lo cual es una causa parcialmente responsable de las bajas tasas de fertilización y/o de la posterior implantación²⁴.

La baja calidad espermática observada en las muestras seminales de pacientes con infertilidad puede deberse a una falla en el proceso de selección durante la espermatogénesis y persistir en el eyaculado (apoptosis abortiva). El actual manejo clínico de los pacientes con infertilidad idiopática y el fracaso de las técnicas de reproducción asistida en ellos, requiere de nuevas técnicas de evaluación de las propiedades bioquímicas de los espermatozoides, tanto en el fenotipo espermático como en la expresión de las moléculas de superficie que intervienen en la selección de gametos con mayor potencial de fertilización.

En la búsqueda de un método no invasivo que permita dar solución a las bajas tasas de éxito en la reproducción humana, se utilizará el método de separación magnética usando microesferas MACS para seleccionar a los espermatozoides con alta capacidad fecundante, el cual ha tenido hasta ahora escaso desarrollo biotecnológico. También se sabe de la eficacia del procedimiento que incluye microesferas conjugadas con Anexina V (Técnica estándar) para reducir el porcentaje de espermatozoides con ADN fragmentado y morfología anormal, sin embargo, todavía se desconoce si podría disminuir el porcentaje de espermatozoides aneuploides^{59,60}.

E. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El procedimiento que incluye microesferas conjugadas con Anexina V (Técnica estándar) no permite separar a los gametos no apoptóticos de aquellos con una apoptosis temprana y/o tardía, los cuales pueden servir para mejorar las TRA. Por lo cual, se propone la implementación de un coctel de marcadores apoptóticos que permita eliminar espermatozoides con apoptosis inicial o temprana y apoptosis final o tardía, así como la evaluación del potencial de membrana mitocondrial para conocer

el estado fisiológico de la célula, la prueba de reacción acrosomal con el propósito de obtener espermatozoides con un mayor potencial de fertilización.

F.PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál será la eficacia en la separación por el método de MACS conjugadas con Anexina V y la implementación de marcadores apoptóticos como TRAIL-R1, TRAIL-R2, Fas y VEGFR-1/Flt-1 para seleccionar espermatozoides con potencial altamente fertilizante, así como su patrón fenotípico en pacientes infértiles?

G.HIPÓTESIS

Cada subpoblación espermática expresa diferencias fenotípicas entre las muestras seminales de acuerdo con la condición del paciente. Se espera que la expresión de TRAIL-R1 sea del 23% entre las muestras de donadores fértiles y pacientes infértiles, de TRAIL-R2 sea del 13%, Fas sea del 16%, ANEXINA V sea del 17% y VEGFR-1/Flt-1 del 18% como resultado de la evaluación pre-eliminar que se realizó. Además, se espera que la fracción negativa de los espermatozoides separados por MACS usando un coctel de anticuerpos que considera a Anexina V, -TRAIL-R1, -TRAIL-R2, -Fas y -VEGFR-1/Flt-1 tengan un mayor potencial de fertilización que los espermatozoides obtenidos de manera convencional con Anexina V.

H.OBJETIVOS

a.Objetivo general

Establecer patrones fenotípicos que clasifiquen a los espermatozoides provenientes de muestras seminales de donadores fértiles y pacientes infértiles, así como evaluar la eficiencia de la separación magnética con Anexina V, Fas, TRAIL-R1, TRAIL-R2 y VEGFR-1/Flt-1 para la remoción de espermatozoides en fase temprana y tardía de apoptosis, de muestras seminales de pacientes con infertilidad, en contraste con los gametos separados con la técnica estándar.

b.Objetivos particulares

- Demostrar la presencia de los receptores TRAIL-R1, TRAIL-R2, Fas, VEGFR-1/Flt-1 y Anexina V en los espermatozoides de pacientes infértiles mediante las técnicas de Western blot y citometría de flujo.
- Estimar el porcentaje de espermatozoides que expresan los receptores del Coctel de marcadores apoptóticos que incluye TRAIL-R1, TRAIL-R2, Fas, VEGFR-1/Flt-1 y Anexina V, en comparación con el porcentaje de espermatozoides que expresan solo Anexina V (Técnica estándar) en las muestras seminales de pacientes infértiles y de donadores fértiles, antes y después de la separación magnética.
- Determinar el porcentaje de gametos positivos a TRAIL-R1, TRAIL-R2, Fas, VEGFR-1/Flt-1 y Anexina V; así como la cantidad de receptores por unidad de superficie en los gametos procedentes de donadores fértiles y pacientes infértiles.
- Analizar la expresión de receptores y la intensidad media de luminiscencia por grupo de clasificación clínica utilizando técnicas de análisis multivariado de componentes principales.
- Confirmar el patrón de expresión de los receptores en los espermatozoides de donadores fértiles y pacientes infértiles por un análisis de conglomerados.
- Determinar el potencial de la membrana mitocondrial de los gametos separados por separación magnética con la técnica estándar y con el Coctel de marcadores.
- Evaluar la funcionalidad de los espermatozoides separados por columnas magnéticas con el Coctel de marcadores, mediante la prueba de reacción acrosomal.

I.MATERIAL Y MÉTODOS

a. Diagrama general



ee. Experimentación

Dos métodos de separación magnética, estándar y por coctel de anticuerpos, fueron llevados a cabo bajo condiciones de experimentación. Se seleccionaron 48 muestras seminales provenientes de tres grupos de sujetos: pacientes del INPer clasificados como infértiles (1) normozoospermicos y (2) astenoospermicos, y (3) donadores fértiles que fueron inmunomarcados con esferas metálicas cubiertas con Anexina V y/o con anticuerpos policlonales -TRAIL-R1, -TRAIL-R2, -Fas, -VEGFR-1/Flt-1 y -Anexina V. En un diseño completamente al azar se utilizó un análisis de varianza

(ANOVA) de dos vías que permitió evaluar simultáneamente los efectos de dos fuentes de variación. La unidad experimental individual se representa como:

$$Y_{ijk} \quad i=1,\dots,a \quad j=1,\dots,b \quad k=1,\dots,n$$

Bajo un modelo aditivo lineal de efectos fijos:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

donde μ es la media general, α_i el efecto del nivel i del primer factor (método de separación), β_j el efecto del nivel j del segundo factor (clasificación clínica de la muestra seminal), $(\alpha\beta)_{ij}$ la interacción de ambos factores y ε_{ijk} las desviaciones aleatorias cercanas a las medias de tratamiento que se asumen que están normalmente distribuidas e independientes con media igual a cero y varianza σ^2 . A partir de las condiciones de muestreo aleatorio se asume la aditividad de los efectos de los factores. La proporción de gametos con ADN fragmentado fue la principal variable de salida.

Las muestras seminales se obtuvieron de los donadores con abstinencia sexual de 72 horas. Se excluyeron las muestras con índice de movilidad severo (15%) en el seminograma basal y la variable de edad fue considerada como posible factor de confusión. También las muestras seminales de los sujetos con antecedentes de tabaquismo y consumo de alcohol crónico, varicocele, tuberculosis, diabetes mellitus e hipertensión fueron excluidas del estudio. Además, los pacientes masculinos que sufrieron de alguna infección por *C. trachomatis*, *Mycoplasmas* y/o *Uroplasma*s, o con antecedentes de enfermedades cardíacas, neuronales o nefropatías fueron excluidos del análisis. Los sujetos con la condición de fertilidad comprobada fueron invitados a participar siendo reclutados al momento de asistir al Registro Civil del Instituto Nacional de Perinatología para registrar el nacimiento de sus bebés. Todos los participantes en el estudio firmaron el consentimiento informado previo a los análisis de las muestras seminales.

Los parámetros seminales convencionales, incluyendo la concentración espermática, motilidad, viabilidad y morfología, fueron evaluados acorde a las guías del Manual de Laboratorio para el Examen y Procesamiento de Semen Humano de la Organización

Mundial de la Salud.¹ El Comité Institucional de Investigación y Ética aprobó la realización del estudio (INPer: 212250-22691).

ff.Primer separación de espermatozoides

La separación de los gametos móviles entre la población total de espermatozoides del eyaculado se realizó por la técnica de gradiente, la solución de gradiente discontinuo de densidad es diseñado para obtener muestras limpias rápidamente, con altas concentraciones de espermatozoides móviles progresivos, tanto de semen saludable como de baja calidad, el cual consta de una capa superior de densidad del 50% y una capa inferior del 90%⁶¹.

En un tubo cónico, se adicionó 1 mL de gradiente de capa inferior del 90% y 1 mL de gradiente de capa superior del 50% (Isolate® Sperm Separation Medium, Irvine Scientific, Santa Ana, CA, USA), posteriormente se adicionaron 2 mL de la muestra seminal deslizándolo gentilmente por las paredes evitando mezclarse con las fases de gradiente y sin formar burbujas. La separación comenzó con la centrifugación a 323xg por 8 minutos. Por otro lado, en otro tubo con 2 mL de medio HTF, se colocó el botón de gametos obtenido centrifugando a 282xg por 7 minutos. El pellet de células obtenido se llevó a volumen mínimo adicionando 300 µL de medio HTF. La evaluación seminal se llevó a cabo con una alícuota de 10 µL colocando en cámara de Makler para la evaluación de movilidad, viabilidad y concentración espermática.

gg.Confirmación de los parámetros seminales

La proporción de espermatozoides móviles e inmóviles se evaluó bajo microscopía óptica. Se colocaron 10 µL de la muestra seminal sobre un portaobjetos limpio, observándose directamente al microscopio con el objetivo 40X. Los espermatozoides fueron clasificados de acuerdo con los criterios de la OMS en progresivos: (A) Movimiento rectilíneo rápido y (B) Movimiento curvilíneo lento; No progresivos: (C) Movimiento sobre su propio eje e inmóviles: (D) en un punto fijo sin moverse.¹ La

operación se repitió dos veces y la proporción de ambas evaluaciones se utilizó para estimar la proporción media de las clasificaciones.

Para evaluar la viabilidad espermática se utilizó la prueba de vitalidad también conocido con el nombre de prueba de Williams Pollack. Se mezclaron 6 μ L de la muestra seminal con el mismo volumen de eosina-nigrosina, incubando durante 30 segundos. La tinción de los gametos fue observada bajo microscopía óptica con objetivo 40X. En cada laminilla, se examinaron 100 espermatozoides y/o la cantidad total observada en los diferentes campos de visión para estimar el porcentaje de espermatozoides sin teñir.

hh. Expresión fenotípica de los espermatozoides

La expresión de los receptores apoptóticos en los espermatozoides fue evaluada por la técnica de citometría de flujo utilizando anticuerpos primarios policlonales α -Fas/CD95/TNFRSF6, α -Anexina V, α -VEGF R1/Flt-1, α -TRAIL R1/TNFRSF10A, y α -TRAIL R2/ TNFRSF10B (R&D Systems) conjugados con el fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC) y/o ficoeritrina (PE). Los espermatozoides fueron analizados en el citómetro de flujo FACS ARIA III Blue Laser (Beckton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, USA) equipado con líneas de láser azul, rojo y violeta a 488 nm, 633 nm y 405 nm, respectivamente. El citómetro de flujo se lavó con solución de hipoclorito de sodio al 10% durante 5 minutos entre las muestras para evitar la contaminación cruzada de las mismas. La fluorescencia específica FITC, ficoeritrina (PE), y PE-Cy5 a 488 nm, así como definir FSC y la señal de la dispersión de la luz ortogonal (SSC), fueron utilizados para establecer las ventanas tipo. Los eventos positivos se definieron como la fluorescencia que superó el 99% de los hechos observados emparejando el control de isotipo con las conjugaciones de anticuerpos de marcaje en los espermatozoides.

ii. Identificación de marcadores por Western blot

Una vez separados por gradientes, los espermatozoides fueron lisados con 200 μ L de solución RIPA, e incubados en hielo durante 15 min. Los lisados entonces fueron centrifugados durante 5 min a 3280xg a 4 °C; el sobrenadante fue transferido y la concentración de proteínas fue determinada por el método de Lowry⁶². El amortiguador de carga de Laemmli fue adicionado a 25 μ g de proteínas, calentando durante 5 min a 100 °C. Los extractos fueron separados en geles de poliacrilamida-SDS al 12%. Las proteínas de la membrana plasmática fueron cargadas en los geles incluyendo en el carril inicial 4 μ L del marcador de peso molecular (Precision Plus Protein Standards Dual Color, Bio-Rad). La electroforesis fue realizada a 28 mA, 200 V durante 90 minutos. Posteriormente, las proteínas fueron transferidas electroforéticamente a membranas de nitrocelulosa de 0.45 μ m (Amersham hybond-ECL, GE Healthcare), las cuales fueron activadas sumergiéndolas previamente en solución amortiguadora de transferencia. La transferencia se llevó a cabo a 100 V, 260 mA durante 90 minutos en cámara de electrotransferencia (Mini Protein Tetra System, Bio-Rad).

Los blots fueron teñidos con solución de rojo Ponceau al 2% para confirmar la igualdad de carga de lo transferido. Los blots fueron bloqueados con leche descremada en polvo al 6% (Svelty Figura 0%, Nestlé) en PBS, pH 7.6, conteniendo 0.3% de Tween 20 durante 24 h a temperatura de 4 °C.

El Western blot fue realizado usando anticuerpos policlonales de cabra α -Fas/CD95/TNFRSF6, α -Anexina V, α -VEGF R1/Flt-1, α -TRAIL R1/TNFRSF10A, y α -TRAIL R2/TNFRSF10B (R&D Systems) diluidos 1:10000, seguido por el anticuerpo secundario de burro anti-cabra conjugado con peroxidasa (HRP) Abcam a diferentes diluciones. El anticuerpo fue identificado mediante un kit de quimioluminiscencia (ImmunoCruz, Santa Cruz Biotechnology).

jj. Microscopía fluorescente para los espermatozoides marcados

Una vez marcados con los anticuerpos pro-apoptóticos, los espermatozoides fueron evaluados bajo microscopía fluorescente. Después de ser fijados con formaldehído, la muestra se llevó a volumen mínimo, colocándose 10 µL de la muestra en una laminilla salinizada (DAKO Corporation. Carpinteria, CA, EUA), además de 5 µL de solución Dapi (Sigma-Aldrich, MO, EUA); finalizando el montaje de la laminilla con un cubreobjetos de 22x22 mm (Corning Mexicana. Ciudad de México, México) y cubriendo los bordes de la preparación con esmalte de uñas transparente. Las laminillas fueron fotografiadas bajo un analizador de imágenes Zeiss Axio Imager Z.1 Microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany), usando el programa *Isis FISH Imagen System software* (versión 5.0, Meta Systems, Alemania).

kk. Sistema de separación convencional

El sistema de separación “Magnetic Activated Cell Sorting, MACS” se compone de microperlas coloidales super-paramagnéticas (~50 nm de diámetro) conjugadas con anexina V. La separación de los espermatozoides muertos y apoptóticos se realizó mediante la unión a los residuos de fosfatidil-serina externalizadas en la membrana plasmática de las células. Los gametos fueron incubados con las microperlas por 15 minutos y posteriormente se pasaron a través de una columna cargada magnéticamente (LS columna MILTENYIBIOTEC®). Los gametos retenidos fueron considerados apoptóticos (fracción positiva) y las células separadas que fueron capturadas en el tubo de recolección (Tubo de centrifugación de poliestireno de fondo redondo Corning® Falcon®) se consideraron gametos no apoptóticos (fracción negativa).^{40,124}

ll. Sistema de separación por coctel de anticuerpos

Posterior a la separación por gradientes, la alícuota se llevó a volumen mínimo centrifugando a 323gx por 5 min. Se agregaron 8 µL de cada uno de los anticuerpos

policlonales primarios mencionados arriba (TRAILR-1, TRAILR-2, VEGFR-1, Anexina V y Fas) incubando por 30 minutos a temperatura ambiente. Las alícuotas se lavaron con 2 mL de PBS a 323gx por 10 min. Se agregaron 2 mL de leche (sveltes) al 1% incubando por 10 minutos. Después de realizar 1-2 lavados con PBS para eliminar el exceso de leche, se adicionaron 2.5 mL del anticuerpo secundario biotinilado IgG α -conejo a dilución de 1:2500 (Rabbit anti-Goat IgG (H+L) Superclonal™, Thermo Fisher) incubando por 15 minutos. Posteriormente se realizaron 1-2 lavados con 2 mL de PBS centrifugando a 323gx por 5 minutos para dejar a volumen mínimo. Se agregaron 100 μ L de microperlas coloidales super-paramagnéticas conjugadas con estreptavidina (condiciones de esterilidad) y dejando reposar por 15 minutos en incubadora a 37°C.

En ambos métodos de separación, se instaló la columna cargada magnéticamente en el soporte colocando un tubo debajo de esta y posteriormente agregar 500 μ L de PBS al 1X para humedecer la columna. Se cambió este tubo colocando uno nuevo debajo de la columna para la recolección de la fracción negativa. Se adicionó la muestra de espermatozoide conjugados con las microperlas dejando el paso de la muestra “gota a gota” por gravedad. Se realizaron 4 lavados con 500 μ L de PBS etiquetando la fracción negativa. Para obtener la fracción positiva, se retiró la columna del imán con el embolo presionado para que el líquido fluya etiquetando el tubo como fracción positiva. Finalmente, se centrifugó a 323gx por 5 minutos resuspendiendo en 200 μ L de medio HTF. Se tomaron 10 μ L de cada fracción para evaluar la viabilidad y motilidad.

mm.Determinación de la fragmentación del DNA

La fragmentación del DNA espermático se evaluó en la fracción negativa y positiva de la separación magnética por MACS con el kit Halosperm (Laboratorios INDAS, España). Una alícuota de muestra de semen se diluyó a 1×10^6 mL en solución salina de fosfatos (PBS). La agarosa en los tubos Eppendorf proporcionados en el kit, se colocaron en baño de agua caliente a 90°C-100°C durante 5 minutos para permitir la fusión de la agarosa continuando en baño maría a 37°C. Después de

5 minutos de incubación, se añadieron 60 μL de la muestra de semen diluida en el tubo Eppendorf mezclándose con la agarosa fusionada. Se pipetearon 20 μL de mezcla de semen-agarosa sobre portaobjetos pre-cubiertos con agarosa y cubiertos con un cubreobjetos de 24 x 24 mm. Los portaobjetos se colocaron en una placa fría a 4°C durante 5 minutos para permitir que la agarosa produzca un microgel con las células de esperma incrustadas. Los cubreobjetos se retiraron y los portaobjetos se sumergieron horizontalmente en una solución ácida preparada (80 μL de HCl en 10 mL de agua destilada) incubando durante 7 minutos. Los portaobjetos se sumergieron horizontalmente en 10 mL de la solución de lisis por 25 minutos. Después de lavar por 5 minutos con agua destilada, los portaobjetos se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol (70%, 90%, 100%) durante 2 minutos y luego se dejaron secar. Los portaobjetos se cubrieron con una mezcla de solución de tinción de Wright (Merck, Alemania) y PBS (1:1) (Merck, Alemania) durante 5-10 minutos. Los portaobjetos se lavaron en agua corriente permitiendo el secado. Se evaluó un mínimo de 100 espermatozoides por muestra bajo microscopía óptica con objetivo de 100X. Los gametos con halo grande (grosor es similar o mayor que la longitud del diámetro más pequeño del núcleo) y gameto con halo mediano (grosor entre: mayor que 1/3 del diámetro más pequeño del núcleo y menor que el diámetro más pequeño del núcleo) se clasificaron como “espermatozoides sin fragmentación”. Los espermatozoides con un halo pequeño (el grosor fue similar o menor que 1/3 del diámetro más pequeño del núcleo) y/o sin halo se clasificaron como “espermatozoides con fragmentación de ADN”.

nn. **Evaluación de potencial de membrana mitocondrial**

Se utilizó la sonda JC-1 (JC-1 Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit, Cayman Chemical). JC-1 es un colorante catiónico lipófilo que puede entrar selectivamente en las mitocondrias cambiando reversiblemente el color verde al rojo a medida que aumenta el potencial de la membrana. Los gametos no apoptóticos con alto potencial mitocondrial ($\Delta\psi\text{M}$), JC-1 forma espontáneamente complejos conocidos como agregados en J con fluorescencia roja intensa. Asimismo, los gametos apoptóticos

con bajo potencial membranar ($\Delta\psi_M$), JC-1 permanece en forma monomérica, que muestra únicamente fluorescencia verde. El ensayo de potencial de membrana mitocondrial JC-1 se evaluó bajo citometría de flujo utilizando un citómetro FACS ARIA III Blue Laser (Beckton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, USA) equipado con líneas de láser azul, rojo y violeta a 488 nm, 633 nm y 405 nm, respectivamente. Se utilizó una muestra sin teñir para alinear los láser estandarizando el umbral de emisión de luz celular propia. La fluorescencia específica de FITC y PE a 488 nm, así como las señales de luz delantera dispersa (Forward Light Scatter, FLS) y de la luminosidad ortogonal dispersa (Orthogonal Light Scatter, SSC) se utilizaron para establecer las ventanas de análisis. JC-1 es un colorante que exhibe acumulación dependiente del potencial en mitocondrias, indicado por un cambio de emisión de fluorescencia de verde (~ 525 nm) a rojo (~ 590 nm). La relación de fluorescencia verde a roja depende solo del potencial de membrana y no en otros factores como el tamaño mitocondrial, la forma y la densidad que pueden influir señales de fluorescencia de un solo componente. La proporción de agregados en color rojo mostró el incremento en el potencial mitocondrial de los gametos separados por columnas magnéticas y se contabilizaron 10,000 eventos. Los datos fueron analizados con el programa FACSDiva v7.0 (Beckton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, USA).

oo.Prueba de reacción acrosomal

La inducción de la reacción acrosomal se realizó estimulando a los espermatozoides con una solución de cloruro de sodio al 0.9%, durante 10 minutos centrifugando la muestra por 10 min a 600xg. Posteriormente se realizó un frotis con la muestra sobre un portaobjetos y se dejó secar. El frotis una vez seco se fijó en etanol al 95% durante 1 hora y se dejó secar al aire. Posteriormente se agregaron 10 ml de PSA marcado con FITC en Solución Salina Amortiguada por Fosfatos (PBS) y se dejó la muestra durante hora y media a 4°C. Finalmente la laminilla fue rehidratada con PBS para adicionarle a lo largo del portaobjetos 20 μ l de VECTASHIELD con DAPI, colocándole un cubreobjetos y sellándolo por las orillas del cubreobjetos con una

capa línea delgada de cemento líquido y dejándolo secar. Después los extendidos secos fueron observados bajo microscopía de fluorescencia con un aumento de 100X para determinar el porcentaje de espermatozoides que mostraron reacción acrosómica. Se realizó el conteo de 100 espermatozoides por triplicado. Se cuantificaron los espermatozoides de aproximadamente cuatro campos a lo largo de la laminilla identificando 2 grupos fenotípicos de marcaje: (1) Número de espermatozoides con acrosoma intacto, donde toda la membrana acrosómica externa está intacta y muestra una fluorescencia verde (2) reacción acrosomal, marcaje del segmento ecuatorial la fluorescencia color verde que indica la separación de la membrana plasmática que cubre al acrosoma. Las laminillas fueron fotografiadas bajo un analizador de imágenes Zeiss Axio Imager Z.1 Microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany), usando el programa *Isis FISH Imagen System* software (versión 5.0, Meta Systems, Alemania).

pp.Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron mediante el programa estadístico IBM SPSS Statistics V22 (IBM Corporation, Armonk, New York, USA); y, en todos los casos, el análisis (2 colas) se consideró estadísticamente significativo con $p < 0.05$. Para las variables continuas (edad, parámetros seminales, fenotipo espermático), la diferencia estadísticamente significativa se determinó mediante la prueba de U de Mann-Whitney debido a la carencia de normalidad de los datos). El análisis MANOVA se utilizó para confirmar si existía un efecto multivariado significativo. Los datos categóricos fueron evaluados a partir de la prueba exacta de Fisher y las correlaciones entre las variables categóricas y continuas se examinaron usando la Rho de Spearman. Debido a que la expresión de los receptores apoptóticos describe al patrón fenotípico de los espermatozoides y estos están fuertemente interrelacionados, los análisis estadísticos se basaron en el análisis de componentes principales (ACP). Para visualizar las relaciones lineales entre las variables se construyó una matriz de correlación de Spearman. El coeficiente de correlación parcial indicó la relación existente entre dos variables, eliminando el efecto en el resto del total de variables. La matriz de correlaciones mostró el valor 1 en la

diagonal y los valores de significancia ($p < 0.05$), fueron más del 35% del total de las correlaciones.

Las variables fueron estandarizadas con el fin de eliminar las diferentes unidades de medida y considerar a todas las variables implícitamente equivalentes en cuanto a la información recogida. El porcentaje de espermatozoides y la intensidad de fluorescencia media de TRAIL-R1, TRAIL-R2, CD95, VEGFR-1/Flt-1 y Anexina V fueron normalizados a valores Z ($\mu = 0$; $\sigma = 1$) construyendo una matriz de datos cuyas filas corresponden a los sujetos estudiados y las columnas a los valores Z calculados. Otras variables, tales como: edad cronológica y el porcentaje de motilidad progresiva fueron integradas a la matriz.

La medida de la adecuación muestral de Kaiser-Meyer-Olkin, fue utilizada para contrastar la magnitud de los coeficientes de correlación observados con la magnitud de los coeficientes de correlación parcial. Un valor cercano a 1 indicó un adecuado ajuste de los datos por análisis de componentes principales. La prueba de esfericidad de Bartlett fue evaluada para contrastar la hipótesis de que la matriz de correlaciones obtenida no es una matriz de identidad. Un determinante próximo a cero indicó que una o varias de las variables originales pueden ser expresadas como una combinación lineal en otras nuevas variables.

La selección de los componentes principales se realizó de tal forma que el primero recogió la mayor proporción posible de la variabilidad original; el segundo componente incluyó la máxima variabilidad posible no amparada por el primero, y así sucesivamente. El Criterio de Kaiser indicó la preservación de los componentes principales cuyos eigen valores (valores propios) son mayores a la unidad.

Una vez seleccionados los componentes principales, los determinantes se representaron en forma de matriz factorial. Cada elemento de ésta representa los coeficientes factoriales de las variables (las correlaciones entre las variables originales y los componentes principales). La representación empírica de los sujetos clasificados de acuerdo con los componentes principales y a su característica clínica se visualizó mediante una gráfica de dispersión de puntos.

Para comprobar que la reducción de los factores consiguió representar a las subpoblaciones de espermatozoides, se realizó un análisis de conglomerados bietápicos. La separación de los conglomerados se efectuó calculando las distancias Euclidianas entre los datos. El coeficiente de silueta y su porcentaje cercano a 1 indicó un modelo adecuado. El número de agrupaciones que representan las subpoblaciones espermáticas fue clasificado mediante el algoritmo de agrupación de conglomerados, utilizando el criterio de información bayesiano (BIC). La asociación entre el método de clasificación de sujetos por los conglomerados y la condición clínica se realizó a partir de razón de verosimilitud y correlación de Pearson en tablas 3x3.

Una vez que se pudieron identificar grupos naturales entre las observaciones, cada subgrupo o subpoblación de espermatozoides, fue evaluado como tres conjuntos de datos separados. La descripción de la variación específica en el conjunto de variables correlacionadas en los subgrupos de espermatozoides fue evaluada por análisis de componentes principales como se mencionó anteriormente. La confirmación de la clasificación correspondiente a cada uno de los subgrupos espermáticos respecto a la expresión de sus receptores de membrana se desarrolló mediante un análisis de conglomerados jerárquicos, el cual utilizó el cuadrado de las distancias Euclidianas para establecer las proximidades entre las variables. Un dendograma fue empleado para evaluar la cohesión de los conglomerados que se formaron proporcionando la información sobre el número adecuado de conglomerados que debieron conservarse.

J.RESULTADOS

Análisis seminal.

Las muestras seminales de donadores fértiles y hombres infértiles fueron diversas en cuanto a características demográficas. La mediana de la edad de los participantes fue de 33 años con un rango de 18 a 47 años. Cuarenta y seis (59.74%) de los 77 hombres eran casados y 28 (40.26%) convivían en concubinato. El tiempo medio de

infertilidad fue de 56.5 meses (± 68.6). El análisis seminal de los parámetros convencionales mostró reducción en la concentración espermática ~ 33.6 (Limite de referencia inferior según la OMS 2010: $39 \times 10^6/\text{ml}$), movilidad progresiva ~ 39.83 (Limite de referencia inferior según la OMS 2010: 32%), y morfología menor a 7% (Limite de referencia inferior según la OMS 2010: 4%), en las muestras seminales de pacientes con infertilidad (Tabla 1).

Tabla 1. Características seminales de los donadores fértiles, y pacientes normozoospermicos y astenozoospermicos.

PARÁMETROS ESPERMÁTICOS	FÉRTILES n=10	INFÉRTILES	
		Normozoospermicos n= 42	Astenozoospermicos n= 25
Volumen (mL)	2.86 \pm 1.67	2.86 \pm 1.44	2.04 \pm 0.92
Concentración espermática (millones/mL)	85.89 \pm 34.6	52.29 \pm 21.95	53.72 \pm 29.73
Motilidad progresiva (%)	65.43 \pm 21.34	52.31 \pm 7.22	28.6 \pm 9.04
Vitalidad (%)	73.47 \pm 6.98	75.93 \pm 6.11	69.17 \pm 6.39
Morfología (%)	15.0 \pm 5.0	6.69 \pm 2.84	6.56 \pm 3.11

**Valores de referencia que establece la OMS para determinar al grupo de varones infértiles.*

**Cada valor indica el porcentaje \pm la desviación estándar.*

La proporción de espermatozoides morfológicamente normales de acuerdo con los criterios de la OMS disminuyó significativamente en los pacientes infértiles con más de 40 años. La evaluación de la morfología espermática de acuerdo con el criterio estricto de Kruger no mostró que la proporción de espermatozoides defectuosos en las muestras seminales obtuviera el 85% del total para que el resultado del espermiograma sea considerando normal.

Una vez que se realizó la separación de los espermatozoides por gradientes, el porcentaje de movilidad progresiva media fue mayor en las muestras espermáticas de los donadores fértiles ($62.86\% \pm 15.79\%$) en contraste con las muestras de pacientes normozoospermicos ($42.54\% \pm 23.96$) y astenozoospermicos ($44.39\% \pm 27.8\%$) ($p < 0.007$).

Expresión de los receptores apoptóticos.

La presencia de las proteínas de los receptores apoptóticos en los extractos de la membrana plasmática de espermatozoides de pacientes infértiles usando análisis de Western blot se observan en la figura 3. Los carriles 1, 2 y 5 corresponden a las muestras seminales de pacientes infértiles normozoospermicos; los carriles 3 y 4 pertenecen a muestras de pacientes infértiles astenozoospermicos; el carril 6 concierne a la muestra espermática de donador fértil y el carril 7 refiere a la detección de la proteína en el extracto de placenta (control positivo). La expresión de la proteína Anexina V fue detectada como una banda única de 37 kDa en todas las muestras espermáticas, pero con decremento en la intensidad de la banda en las muestras de los pacientes infértiles en contraste con las correspondientes a donadores fértiles y control positivo. La expresión de la proteína de influjo de iones de calcio en las muestras de pacientes astenozoospermicos se observa sumamente menor (carril 3 y 4).

El peso molecular de TRAIL-R1 y TRAIL-R2 mostró una señal en forma de banda inmunoreactiva a 52 kDa revelando similar expresión en las muestras espermáticas de pacientes infértiles, pero no en las muestras de donadores fértiles y el prototipo de placenta. Para el receptor Fas una banda de 50 kDa fue detectada con baja intensidad en las muestras de pacientes infértiles (normozoospermicos y astenozoospermicos) en contraste con las muestras de donador fértil y el control positivo. Lo cual puede estar relacionado al número de receptores de este tipo por unidad de superficie en los espermatozoides. Los niveles de la proteína del VEGF-R1

observa multi-bandas de 55, 140 y 200 kDa para todas las muestras, pero el decremento de la quioluminiscencia vario en cada grupo de clasificación clínica.

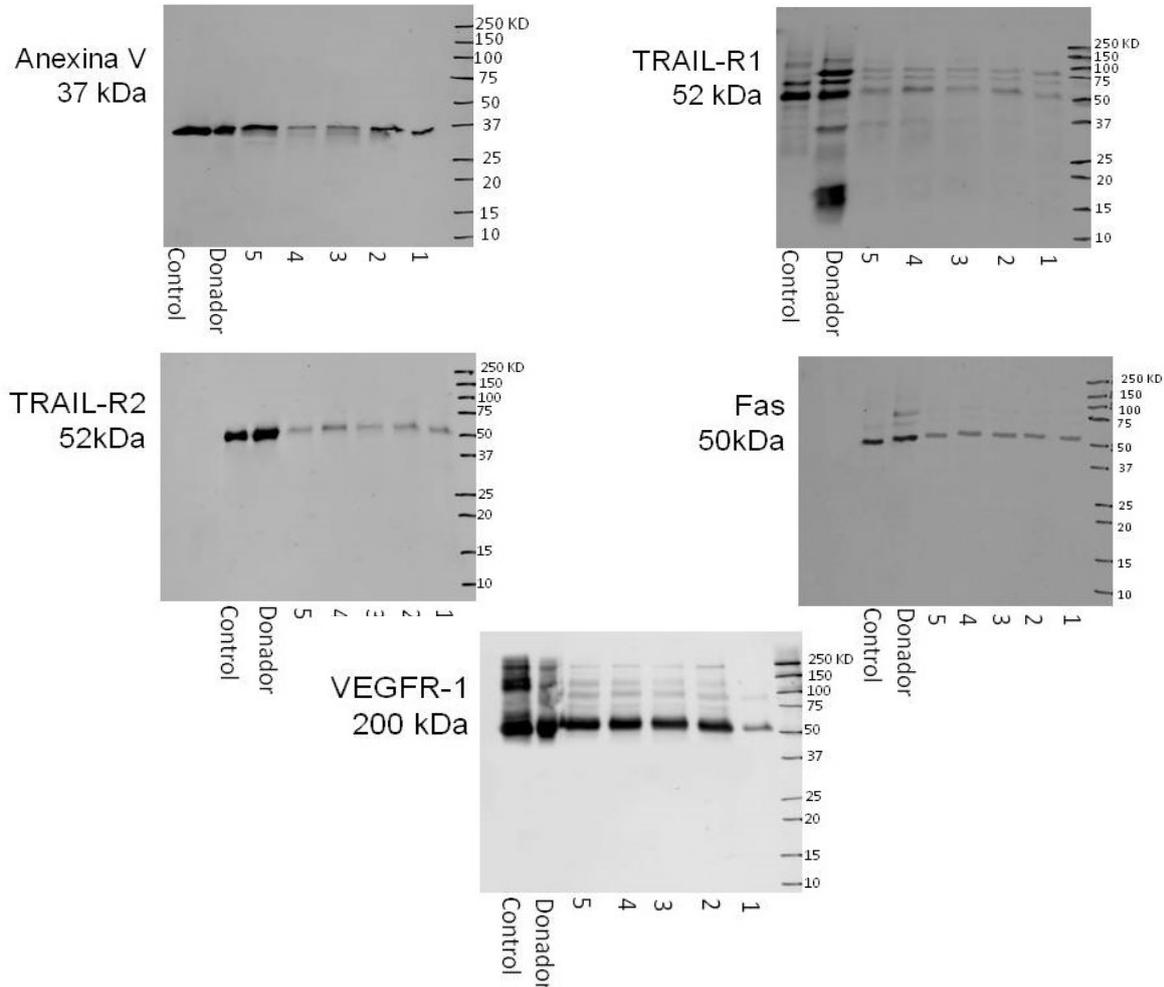


Figura 1. Detección de las proteínas de los receptores apoptóticos. Los análisis de Western blot fueron llevados a cabo para detectar a las proteínas de la membrana plasmática de los receptores apoptóticos en espermatozoides humanos. La detección específica de las proteínas en las muestras de donadores fértiles y el extracto de placenta humana fueron usados como prototipo de control positivo. Los carriles 1, 2, 5 pertenecen a las muestras procedentes de pacientes normospérmicos; y, los carriles 3 y 4 corresponden a pacientes astenozoospérmicos. La expresión del receptor en una muestra de donador fértil se observa en el carril 6. En general los receptores de muerte se detectar con una menor presencia de banda en pacientes infértiles que, en los donadores fértiles y la placenta utilizada como control, lo cual puede estar estrechamente relacionado con el número de receptores presentes por unidad de superficie.

En la figura 2 se muestra por microscopia fluorescente la detección de la proteína reguladora del influjo de iones de calcio (Anexina V), los receptores apoptóticos (TRAIL-R1, TRAIL-R2, Fas), así como el receptor del factor de crecimiento derivado de endotelio vascular (VEGF-R1) en los espermatozoides de donadores fértiles y

pacientes infértiles usando microscopía fluorescente. Los gametos se muestran sólo bajo la contra tinción DAPI (izquierda) y a los mismos espermatozoides con señal fluorescente en la membrana plasmática (derecha). La utilización de esta contra tinción se realizó ya que la emisión de luz azul de DAPI resulta conveniente para el uso de empalme espectral, efecto que puede hacer más preciso el análisis ya que la fluorescencia emitida por los receptores se marcó en color verde. La detección de la señal (verde) confirma la expresión de Anexina V en la región de la pieza media. La señal de los receptores de muerte TRAIL-R1, TRAIL-R2 y Fas fue detectada en la región de la pieza media y flagelo; al igual que, para el receptor del factor de crecimiento derivado de endotelio vascular (VEGF-R1).

La determinación de la expresión de los marcadores de membrana en los espermatozoides (Figura 2), mostró dos características no descritas anteriormente que definen a la población espermática de los pacientes infértiles. No se encontraron diferencias significativas en los porcentajes de gametos positivos a anexina V, TRAIL-R1, TRAIL-R2, Fas y VEGFR-1 entre los hombres fértiles e infértiles, aunque se observa una tendencia a aumentar el porcentaje como se observa en la Figura 2. Sin embargo, la intensidad de fluorescencia media por citometría de flujo de la expresión de los receptores fue estadísticamente diferente entre los grupos estudiados ($p < 0.0001$).

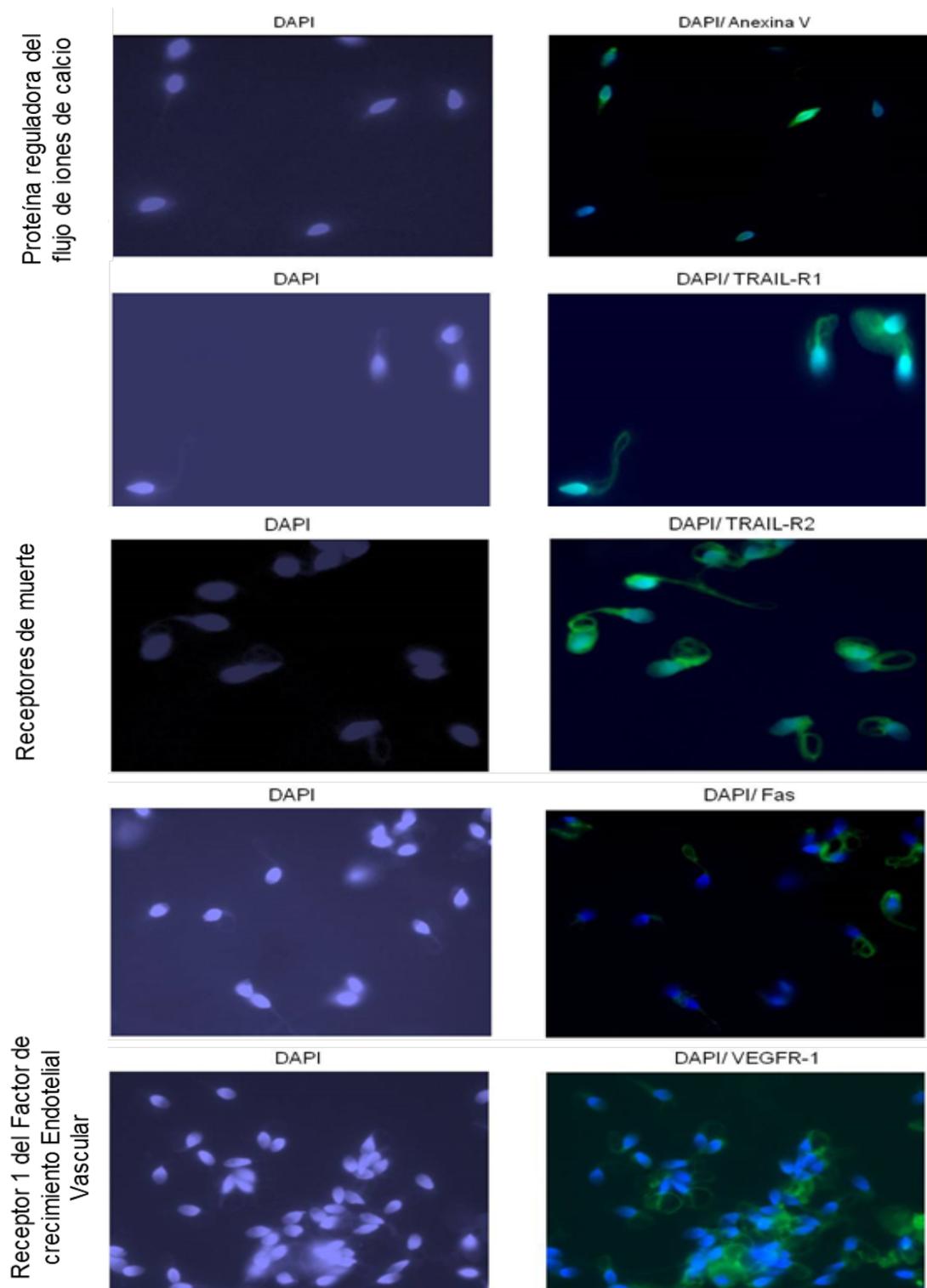


Figura 2. Localización los receptores en la membrana plasmática del espermatozoide. Los espermatozoides separados por gradientes expresan la proteína reguladora del influjo de iones de calcio (Anexina V), los receptores de muerte (TRAIL- R1, TRAIL-R2, Fas) y el Factor de Crecimiento Derivado de Endotelio Vascular (VEGF-R1).

Los porcentajes de espermatozoides positivos a los receptores y la intensidad de fluorescencia media se estimaron en tres grupos de clasificación clínica: fértiles, normozoospermicos y astenozoospermicos ajustados por edad (Tabla 2 y 3). El análisis MANOVA confirmó que existe un efecto multivariado significativo: $\lambda = 0.09$, $F(13.39)$, $GI = 22$, $p < 0.0001$. El análisis ANOVA univariante mostró efectos principales para el porcentaje de motilidad ($p < 0.004$) y de gametos positivos al receptor de TRAIL-1 ($p < 0.027$); y, a la intensidad de fluorescencia media de anexina V ($p < 0.0001$), TRAIL-R1 ($p < 0.0001$), TRAIL-R2 ($p < 0.0001$), Fas ($p < 0.0001$) y VEGFR-1 ($p < 0.0001$).

A pesar de que existió violación de la homogeneidad de la varianza entre los grupos, los ajustes de Brown-Forsythe F y F Welch demostraron que esto no tuvo impacto en el resultado de la significancia. La prueba honesta de Tukey mostró que la intensidad de fluorescencia media de los receptores espermáticos de los donadores fértiles fue significativamente mayor que en los espermatozoides de pacientes normozoospermicos y astenozoospermicos (anexina V, $p < 0.0001$; TRAIL-R1, $p < 0.0001$; TRAIL-R2, $p < 0.0001$; Fas, $p < 0.0001$; y, VEGFR-1 $p < 0.0001$). Por otro lado, los análisis mostraron que sólo la IFM (Intensidad de Fluorescencia Media) de Fas, TRAIL-R2, VEGFR-1 y Anexina V en los gametos de los pacientes normozoospermicos fue menor que en los pacientes astenozoospermicos, la excepción se observa para el receptor TRAIL-R1. No se observaron diferencias significativas de los biomarcadores en función del factor edad y la interacción grupo-edad.

ESPERMATOZOIDES POSITIVOS A LOS RECEPTORES				
VARIABLES	FÉRTILES	INFÉRTILES		VALOR P
		Normozoospermicos	Astenozoospermicos	
Porcentaje de gametos				
Anexina V	26.90 ± 29.29	44.67 ± 39.08	50.89 ± 42.81	0.368
TRAIL-R1	25.07 ± 13.61	47.97 ± 40.76	39.58 ± 40.68	0.295
TRAIL-R2	28.44 ± 13.61	41.92 ± 38.37	48.20 ± 41.20	0.442
Fas	31.19 ± 27.47	47.86 ± 41.66	54.40 ± 44.05	0.450
VEGFR-1	20.78 ± 15.04	39.23 ± 45.15	44.32 ± 46.29	0.739

INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA MEDIA				
VARIABLES	FÉRTILES	INFÉRTILES		VALOR P
		Normozoospermicos	Astenozoospermicos	
Anexina V	1208.50 ± 899.07	59.23 ± 53.64	167.89 ± 350.23	0.0001
TRAIL-R1	1272.60 ± 1128.55	105.62 ± 205.91	79.26 ± 82.31	0.0001
TRAIL-R2	518.57 ± 414.52	60.44 ± 51.71	141.94 ± 195.68	0.0001
Fas	497.36 ± 366.06	70.91 ± 73.56	191.05 ± 231.90	0.0001
VEGFR-1	638.33 ± 357.17	80.24 ± 121.62	117.72 ± 178.30	0.0001

Tabla 2 y 3. Porcentajes de espermatozoides positivos a los receptores e intensidad de fluorescencia media estimada por grupos de clasificación clínica. Los resultados mostraron diferencia significativa en el porcentaje de espermatozoides principalmente positivos a TRAIL-R1 en las muestras de paciente con infertilidad, lo que significa que hay un mayor número de espermatozoides con la presencia de los receptores de muerte en las muestras de pacientes infértiles en comparación con los donadores fértiles; baja expresión de las moléculas TRAIL-R1, TRAIL-R2, Fas, VEGF-R1/Flt-1 y anexina V en la membrana plasmática de los espermatozoides de pacientes infértiles en contraste con los fértiles. *Cada valor indica el porcentaje ± la desviación estándar.

La matriz inicial de los datos representada por los valores de correlación de Spearman, permiten evaluar la interdependencia de los marcadores de membrana espermática (Tabla 3). Excepto por la relación de motilidad y los porcentajes de espermatozoides positivos a anexina V, TRAIL-R1, TRAIL-R2, Fas y VEGFR-1, todas las variables mostraron una interdependencia estadísticamente significativa ($p < 0.001$).

Tabla 4. Matriz de correlaciones de Spearman

Variables	Anexina V	TRAIL-R1	TRAIL-R2	Fas	VEGFR-1	Anexina V MIF	TRAIL-R1 MIF	TRAIL-R2 MIF	Fas MIF	VEGFR-1 MIF	Motilidad
Anexina V	1										
TRAIL-R1	0.861**	1									
TRAIL-R2	0.856**	0.849**	1								
Fas	0.866**	0.909**	0.909**	1							
VEGFR-1	0.920**	0.967**	0.967**	0.975**	1						
Anexina V IFM	0.514**	0.497**	0.550**	0.508**	0.629**	1					
TRAIL-R1 IFM	0.484**	0.620**	0.634**	0.628**	0.609**	0.927**	1				
TRAIL-R2 IFM	0.495**	0.495**	0.599*	0.554**	0.619**	0.874**	0.899**	1			
Fas IFM	0.526**	0.549**	0.651**	0.617**	0.655**	0.909**	0.932**	0.895**	1		
VEGFR-1 IFM	0.603**	0.693**	0.706**	0.697**	0.707**	0.936**	0.930**	0.885**	0.942**	1	
Motilidad	-0.032	-0.076	0.042	0.013	0.082	0.193*	0.277*	0.276**	0.230*	0.246*	1

**La correlación de Spearman es significativa al nivel de 0.01 (valor crítico de significancia para prueba bilateral)

* La correlación de Spearman es significativa al nivel de 0.05 (valor crítico de significancia para prueba bilateral)

Fenotipo espermático acorde a los receptores apoptóticos

Nuevos ejes ortogonales muestran la variación de los biomarcadores apoptóticos en espermatozoides de donadores fértiles y pacientes infértiles (Figura 3). Un gráfico bidimensional con dos ejes muestra la expresión de los marcadores espermáticos que reflejan a los grupos de clasificación. El primer componente denominado fenotipo espermático refleja la variación de la proporción de espermatozoides positivos a los marcadores entre los donadores fértiles, pacientes normozoospermicos y astenozoospermicos, con una acumulación de puntos que separa al porcentaje de motilidad progresiva y edad del paciente. La intensidad de fluorescencia media de los biomarcadores en los 2 grupos clasificados fue mostrada por el segundo componente (nombrada cantidad de receptores por espermatozoide). Este tipo de abordaje nos permite la identificación de los receptores específicos que son expresados en la membrana plasmática de los espermatozoides apoptóticos de las muestras de los diferentes grupos de clasificación clínica con base en la relación que tenga (si es que hubiera) el porcentaje de espermatozoides positivos a los receptores de muerte y el número de receptores presentes por unidad de superficie expresado como intensidad de fluorescencia media de cada uno de los receptores; con el objetivo de incluir en el coctel de anticuerpos solo los receptores principalmente expresados por cada grupo de clasificación clínica: los donadores fértiles, los pacientes normozoospermicos y los pacientes astenozoospermicos.

Matriz de componente

	Componente	
	1	2
Z_TRAILR2	.882	-.405
Z_ANEXINAV	.859	-.435
Z_FAS	.883	-.444
Z_VEGF	.891	-.434
Z_TRAILR1	.894	-.419
Z_ANEXINA_IFM	.347	.767
Z_TRAILR2_IFM	.540	.745
Z_FAS_IFM	.669	.666
Z_VEGF_IFM	.654	.682
Z_TRAILR1_IFM	.378	.642
Z_EDAD	-.036	-.544
Z_POSTB	.269	.230

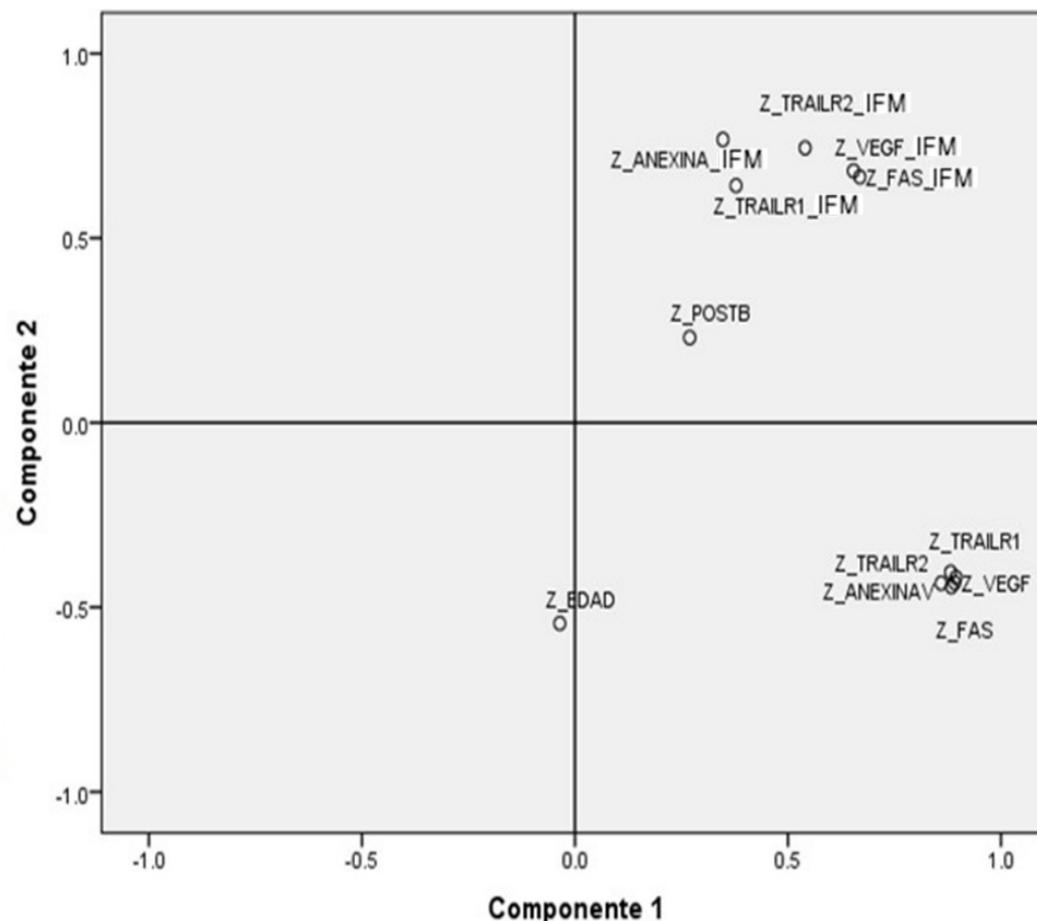


Figura 3. Dos componentes principales de la variación del total de muestras espermáticas. El primer componente (recuadro rojo) refleja la variación en el porcentaje de espermatozoides positivos a Anexina V, TRAIL-R1, TRAIL-R2, Fas y VEGFR-1 entre los grupos clasificados, con una fracción que separa el porcentaje de motilidad y la edad. Siguiendo el segundo componente (recuadro verde) que separa la expresión de la intensidad media de fluorescencia de los biomarcadores.

En la figura 4 se muestra un gráfico de los valores propios de los componentes principales. Dos valores propios ($\lambda_1= 5.39$; $\lambda_2=3.72$) se encuentran por encima del punto de corte de 1 (criterio de Kaiser), lo que sugiere la reducción a dos dimensiones para el ajuste de los datos. Estos dos primeros componentes principales representan más del 70% de la varianza total. El primer componente representó el 45% de la variabilidad total y el segundo componente explicó el 31% como resultado de los valores propios. El grado de correlación y el signo implican que una fracción de la muestra inicial provee la mayor parte de los porcentajes espermáticos positivos a los biomarcadores y el segundo eje vectorial separa a la intensidad de fluorescencia media de esos biomarcadores. Para comprobar que la matriz de correlaciones de los datos originales no es una matriz identidad el valor de $p<0.0001$ justificó el uso del ACP como resultado de la prueba de esfericidad de Bartlett. Conjuntamente se observó un valor de 0.72 para la medida de la adecuación muestral de Kaiser-Meyer Olkin indicando un adecuado ajuste de los datos por el análisis de componentes principales.

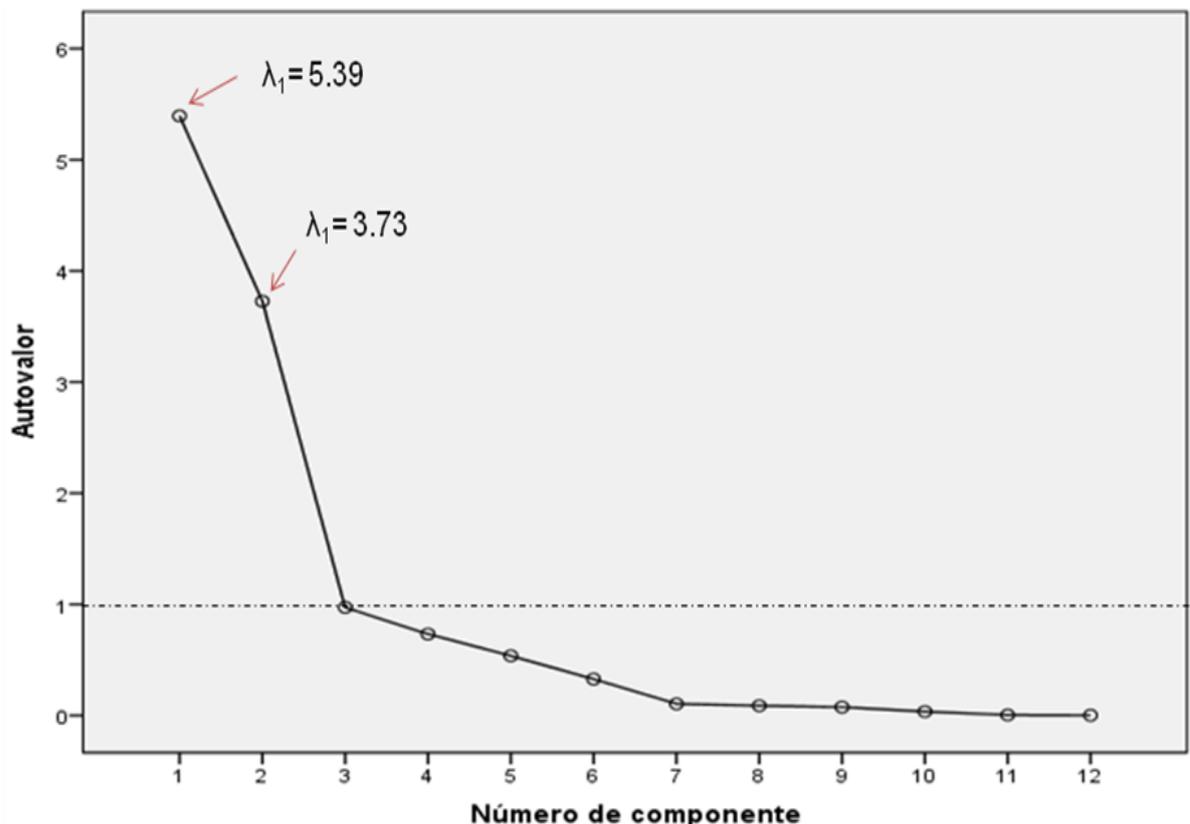


Figura 4. Gráfico de sedimentación que muestra dos valores propios que se encuentran por encima del punto de corte de 1 (Criterio de Kaiser), lo que indica que los dos primeros componentes explican la mayor varianza (flechas). Un tercer componente cuyo valor propio es 0.972 sólo aporta el 8.1% de la varianza total.

La representación empírica de los valores factoriales de acuerdo con los dos componentes principales y la relación con la clasificación clínica de las muestras espermáticas se visualizó mediante una gráfica de dispersión de puntos (Figura 5). A partir de 2 componentes se formaron 3 cúmulos de puntos (conjuntos A, B y C) que pueden representar a dicha clasificación clínica. Con relación al eje del componente 1, la probabilidad de pertenecer al conjunto A dado ser espermatozoides de muestra normozoospermica fue del 35% (IC_{95%}: 15-50%) y astenozoospermica 33% (IC_{95%}: 13-53%), y de pertenecer al conjunto B siendo espermatozoides de pacientes normozoospermicos fue 65% (IC_{95%}: 45-80%) y astenozoospermicos 67% (IC_{95%}: 47-87%). Respecto al eje de la componente 2, la probabilidad de pertinencia al conjunto C para los gametos de los donadores fértiles fue 93% (IC_{95%}: 81-100%).

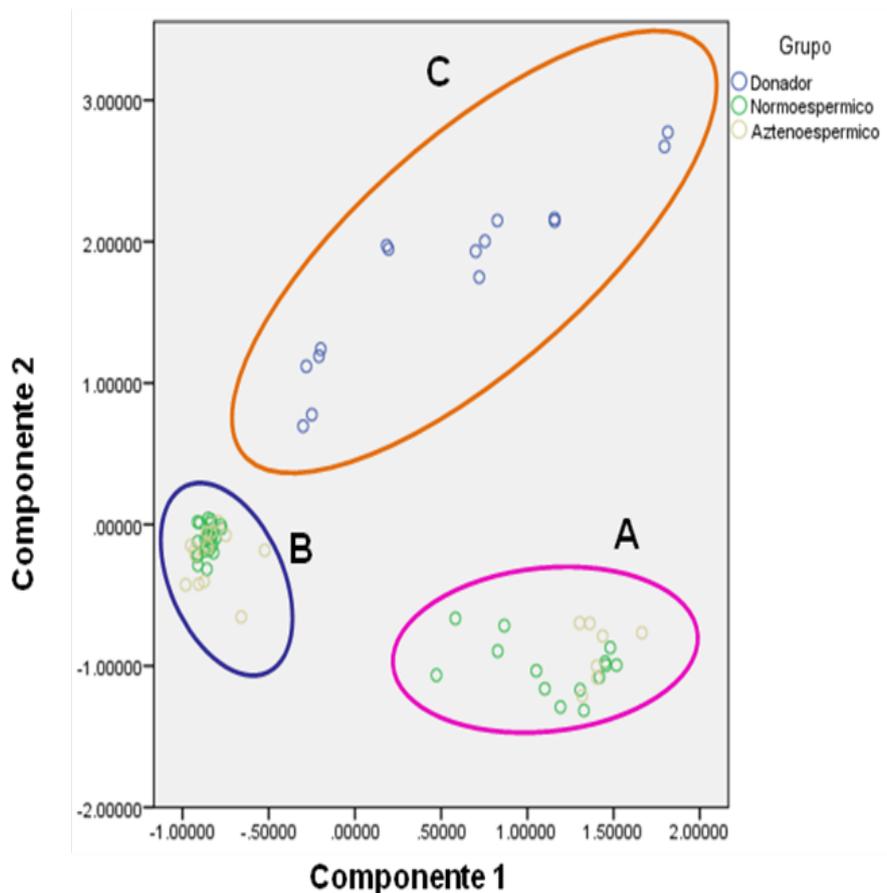


Figura 5. Representación empírica de los valores factoriales de acuerdo a la selección de los dos componentes principales y su relación con la característica clínica de los gametos.

Debido a la superposición significativa entre el grupo de elementos del primer componente que refleja el fenotipo espermático y del segundo componente que describe la expresión de IFM, así como los tres cúmulos de determinantes factoriales, se decidió analizar cada uno de los grupos de pacientes por separado. Para el grupo de donadores fértiles se obtuvieron 3 componentes, los cuales representaron el 87.22% de varianza total. En el primer componente (63.09%) se muestra una correlación positiva entre TRAIL-R2, VEGFR-1, Fas, Fas IFM y VEGF IFM (Figura 6). El segundo componente (12.89%) indica una relación positiva con Anexina V MIF, en tanto que TRAIL-R1 IFM muestra correlación positiva con el tercer componente (11.22%). En la figura 6 se muestra la distribución de las nuevas variables en el espacio tridimensional de los donadores fértiles.

Matriz de componente

	Componente		
	1	2	3
Z_TRAIL-R2	0.975	0.125	0.081
Z_anexina V	0.779	-0.351	-0.278
Z_Fas	0.978	0.081	0.053
Z_VEGFR-1	0.936	0.221	0.084
Z_TRAIL-R1	0.884	-0.063	0.139
Z_TRAIL-R2_IFM	0.516	0.661	-0.381
Z_anexina V_IFM	0.810	-0.548	-0.066
Z_Fas_IFM	0.906	-0.304	-0.037
Z_VEGFR-1_IFM	0.929	-0.139	-0.075
Z_TRAIL-R1_IFM	0.114	-0.303	0.807
Z_Edad	0.839	0.381	-0.045
Z_PostB	0.280	0.512	0.652

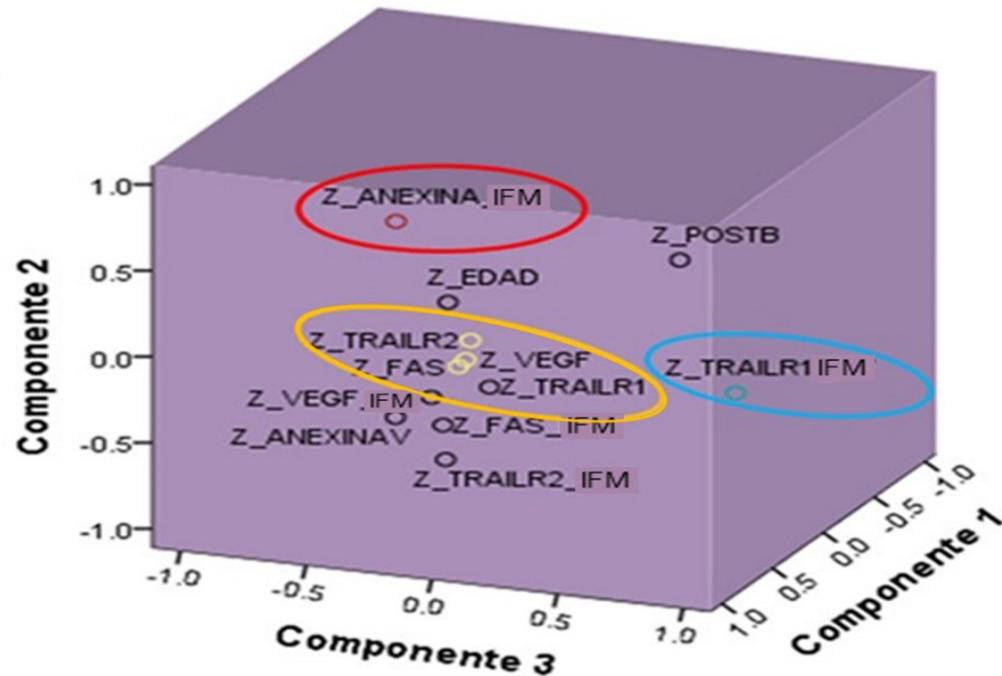


Figura 6. Distribución de las variables de los donadores fértiles de acuerdo a los 3 componentes. Las variables que corresponden al componente se indican con círculos amarillos, las correspondientes al segundo componente en círculos rojos y las del tercer componente en círculos azules. Z: Valores normalizados.

En contraste, para el grupo de normozoospermicos se obtuvieron 2 componentes los cuales significaron el 81.79% de la varianza total. En el primer componente (70.79%) se muestra una correlación positiva entre VEGFR-1, TRAIL-R1, Fas, Anexina V y TRAIL-R2 en cuanto al segundo componente (10.95%) indica una relación positiva con la Motilidad (Figura 7). En la figura 7 se muestra la distribución de las variables en el espacio bidimensional de los pacientes infértiles normozoospermicos.

Matriz de componente

	Componente	
	1	2
Z_TRAILR2	.930	.165
Z_ANEXINAV	.946	.159
Z_FAS	.951	.206
Z_VEGF	.964	.174
Z_TRAILR1	.957	.201
Z_ANEXINA_IFM	.901	-.247
Z_TRAILR2_IFM	.821	.251
Z_FAS_IFM	.937	-.212
Z_VEGF_IFM	.900	-.263
Z_TRAILR1_IFM	.808	-.429
Z_EDAD	.396	-.253
Z_POSTB	.048	.813

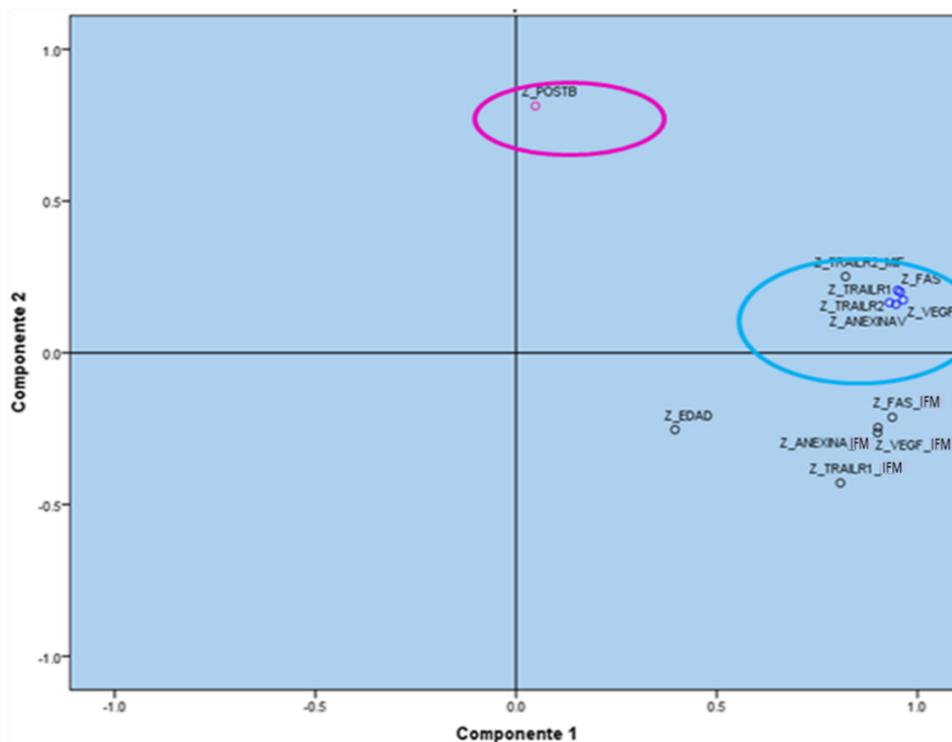


Figura 7. Distribución de las variables de los pacientes normozoospermicos de acuerdo a 2 componentes. Las variables que corresponden al componente 1 se indican con círculos azules, las correspondientes al componente 2 en círculos rosas. Z: Valores normalizados.

Al igual que en el grupo de los normozoospermicos, en el grupo de los astenozoospermicos se obtuvieron dos componentes que explicaron el 83.35% de la varianza total (Figura 8). El primer componente (73.17%) mostró una correlación positiva entre las variables VEGFR-1, Fas, TRAIL-R1, TRAIL-R2 y anexina V mientras que el segundo componente (10.18%) reflejó una relación negativa con la variable Motilidad. La figura 8 se expone la distribución de las variables en el espacio bidimensional de los pacientes infértiles astenozoospermicos.

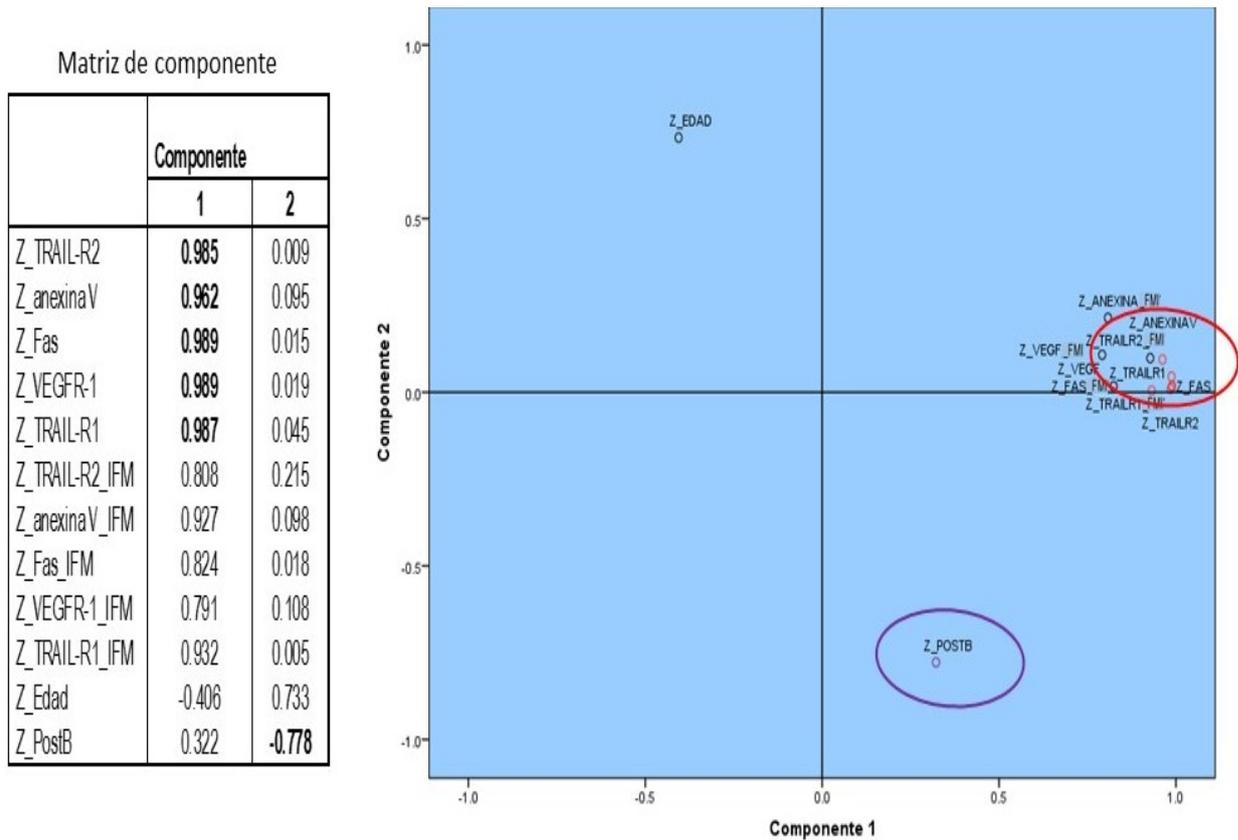


Figura 8. Distribución de las variables de los pacientes astenozoospermicos de acuerdo a 2 componentes. Las variables que corresponden al componente 1 se indican con círculos rojos, las correspondientes al componente 2 en círculos morados. Z: Valores normalizados.

La figura 9, muestra que las determinantes factoriales de las variables Fas-TRAIL-R2-VEGF-R1 determinado por ACP para donadores fértiles ahora se agrupan en base a la similitud. La primera separación de grupos muestra dos conglomerados, aunque uno de ellos es separado en dos subgrupos. En el primer conglomerado (A), un subgrupo de variables muestra a dos receptores apoptóticos (Fas-TRAIL R2) robustamente similares. A esta similitud, estrecha cercanía fue determinada para VEGF R1 y TRAIL-R1 y en un nivel menor a anexina V. En el otro subgrupo, se observa similitud entre dos variables con carácter clínico, la edad y la motilidad. El segundo conglomerado (B), constituido por la expresión de la IFM de los receptores evaluados.

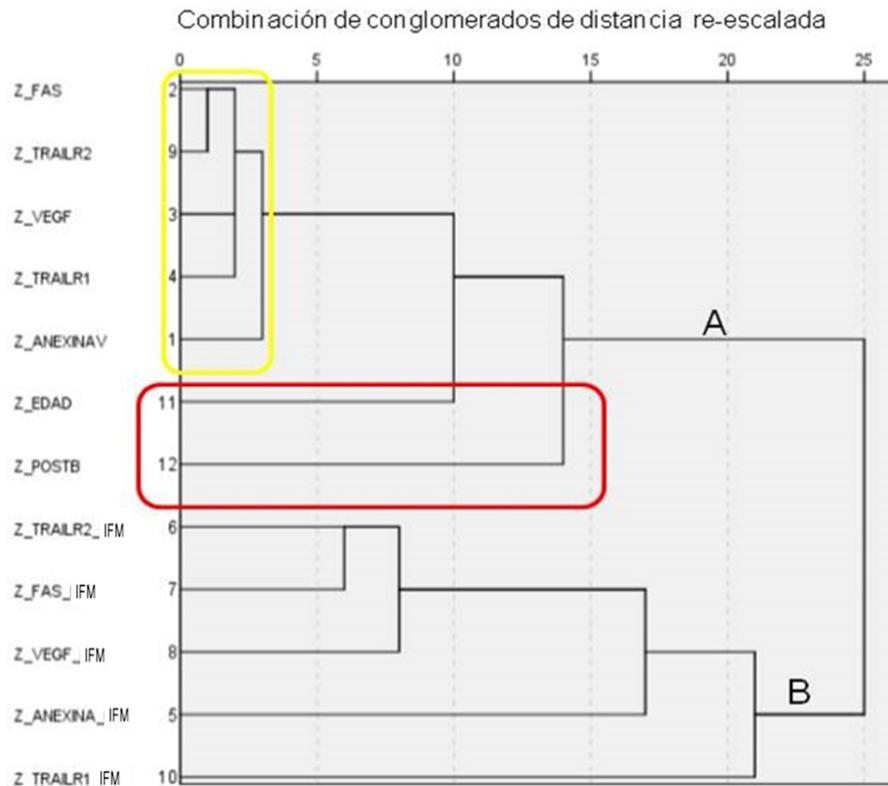


Figura 9. Dendrograma que muestra la agrupación de las variables de acuerdo a su similitud. La primera separación de grupos muestra 2 conglomerados (A y B). El recuadro amarillo muestra en primer subgrupo separado del conglomerado A y el recuadro rojo señala el segundo subgrupo.

Las determinantes factoriales de las variables VEGF-TRAIL-R1-Fas-Anexina V y TRAIL-R2, determinadas por ACP que representan la condición clínica normozoospermia, son agrupadas en 3 conglomerados (Figura 10). La primera separación muestra la presencia de 2 subgrupos, el primero de estos agrupa a los biomarcadores Fas y TRAIL R1 con estrecha similitud, en tanto que el biomarcador VEGFR-1, muestra una cercanía a esta relación. El segundo subgrupo, muestra similitud entre los receptores anexina V y TRAIL-R2. El conglomerado dos también se subdividió en dos grupos, uno que se constituye a partir de la similitud entre las variables anexina IFM y TRAIL-R2 IFM y otro formado por la proximidad de las variables Fas IFM, TRAILR-1 IFM y en un nivel menor a VEGFR-1 IFM. El tercer conglomerado agrupa a las variables clínicas edad y motilidad.

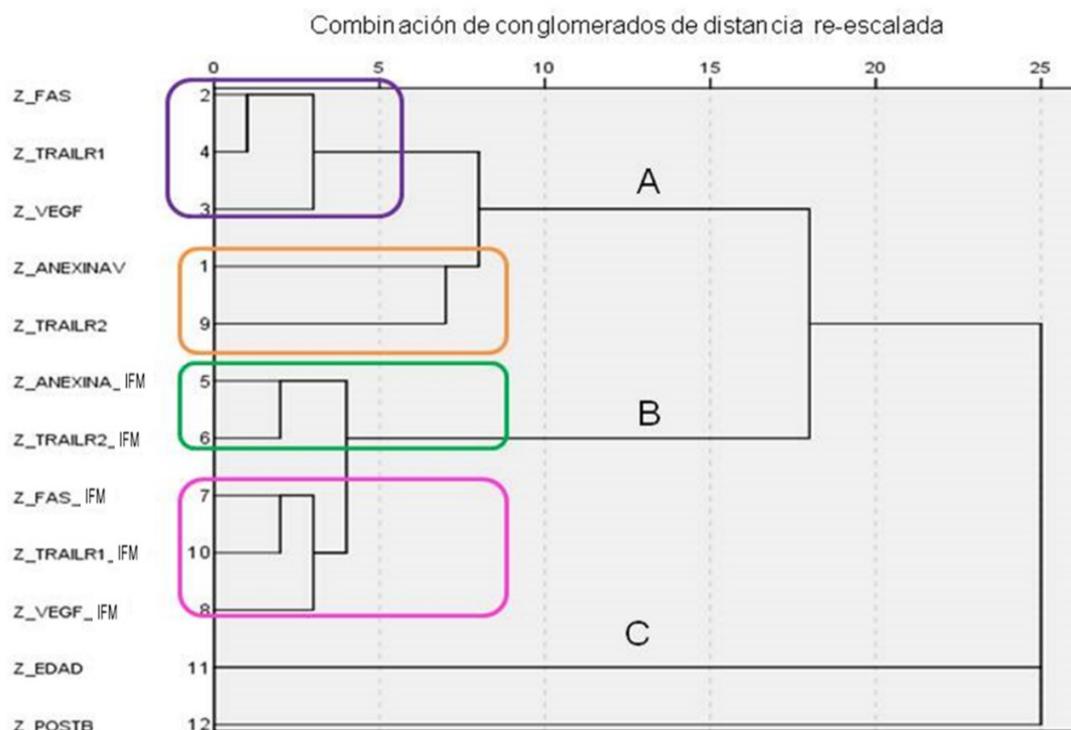


Figura 10. Dendrograma que representa la agrupación de las variables de acuerdo a su similitud relacionadas a gametos normozoospermicos. La primera separación de grupos muestra 3 conglomerados (A,B y C). El recuadro morado muestra el primer subgrupo separado del conglomerado A y el recuadro anaranjado señala el segundo subgrupo. Los subgrupos del conglomerado B son delimitados en color verde y rosa para el primer y segundo subgrupo respectivamente.

Al igual que en la separación de grupos de variables relacionadas con pacientes normozoospermicos, la agrupación de las variables para pacientes astenozoospermicos, fue en 3 conglomerados (Figura 11); el primero de éstos reúne a los biomarcadores mostrando una mayor similitud entre Fas y TRAIL-R2. El segundo conglomerado considera sólo a la variable motilidad y el tercer conglomerado incorpora a los biomarcadores Fas IFM-TRAIL R1 IFM-VEGFR-1 IFM-TRAIL-R2 IFM-anexina V IFM y edad, exhibiendo mayor proximidad entre las variables TRAIL-R2 IFM y Fas IFM.

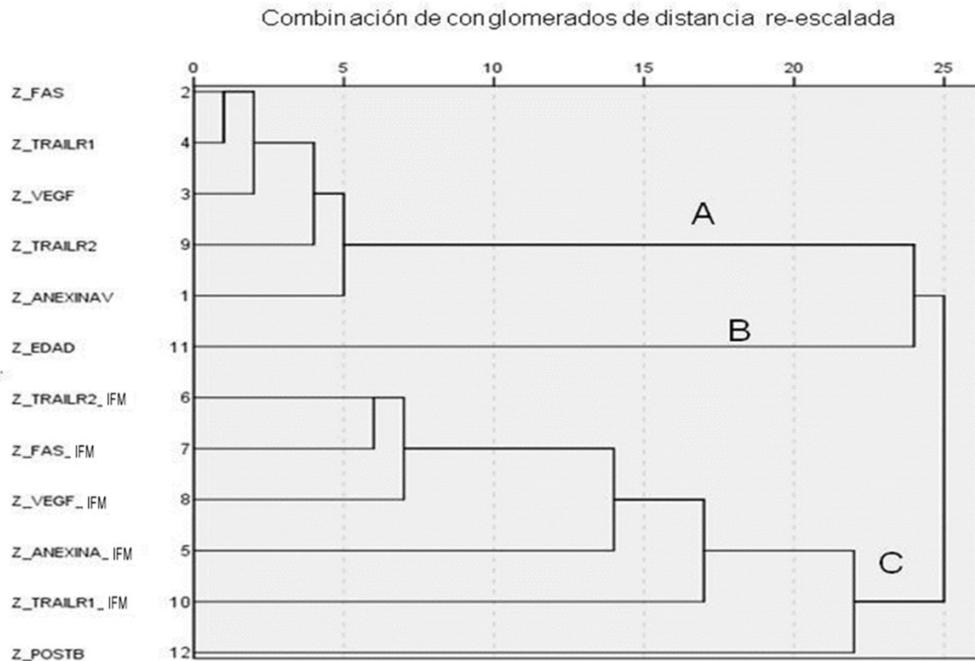


Figura 11. Dendrograma que explica la asociación de las variables de acuerdo a su similaridad relacionadas a gametos astenozoospermicos. La separación de grupos muestra 3 conglomerados (A,B y C).

Viabilidad de los gametos obtenidos

Las figuras 12-14 muestran la viabilidad espermática expresada como porcentaje de espermatozoides vivos, la cual fue evaluada en la separación magnética convencional por MACS en contraste con el coctel de anticuerpos. Excepto por el porcentaje de gametos viables de donadores fértiles obtenido por el método de coctel de anticuerpos, decremento de la proporción de espermatozoides viables fue observada al contrastar la fracción negativa y positiva. Diferencias significativas fueron determinadas al contrastar el porcentaje de gametos viables de donadores fértiles obtenidos por el método convencional (60% vs. 6%; $p < 0.01$). La diferencia media de la proporción de gametos viables de la fracción negativa-positiva obtenida por el método de coctel de anticuerpos fue mayor que la determinada por el método convencional por MACS en las muestras de pacientes infértiles normozoospermicos (30% vs. 4.3%, $p < 0.01$), pero no en las muestras de pacientes astenozoospermicos (32% vs. 55%, $p < 0.05$).

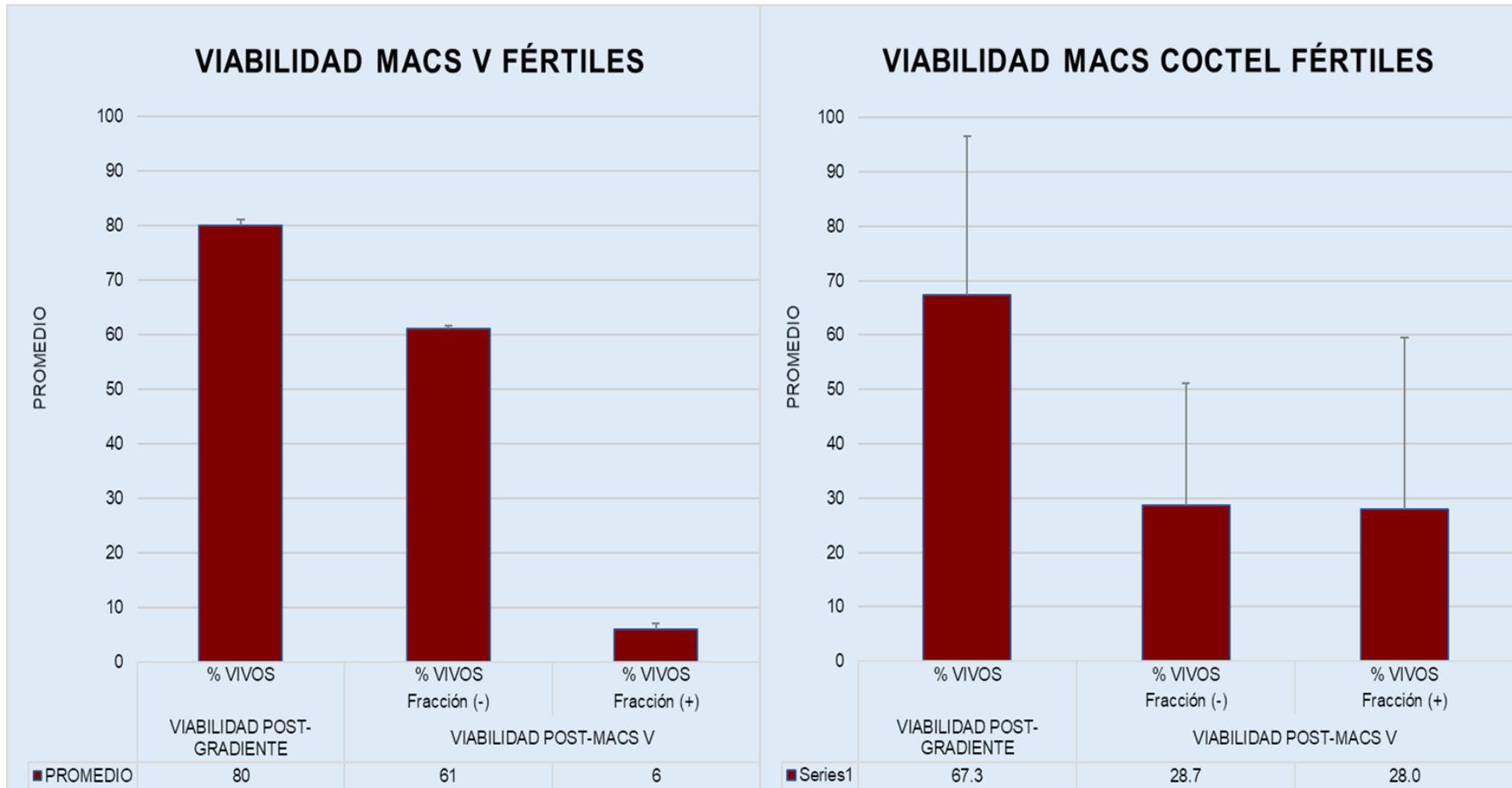


Figura 12. Comparativo de los métodos de separación magnética en la viabilidad espermática de donadores fértiles. Porcentaje de espermatozoides vivos en las muestras después del gradiente y después de la separación por columnas magnéticas con el método convencional (MACS V) en comparación con el coctel de marcadores propuestos (MACS COCTEL), tanto en la fracción positiva como en la fracción negativa.

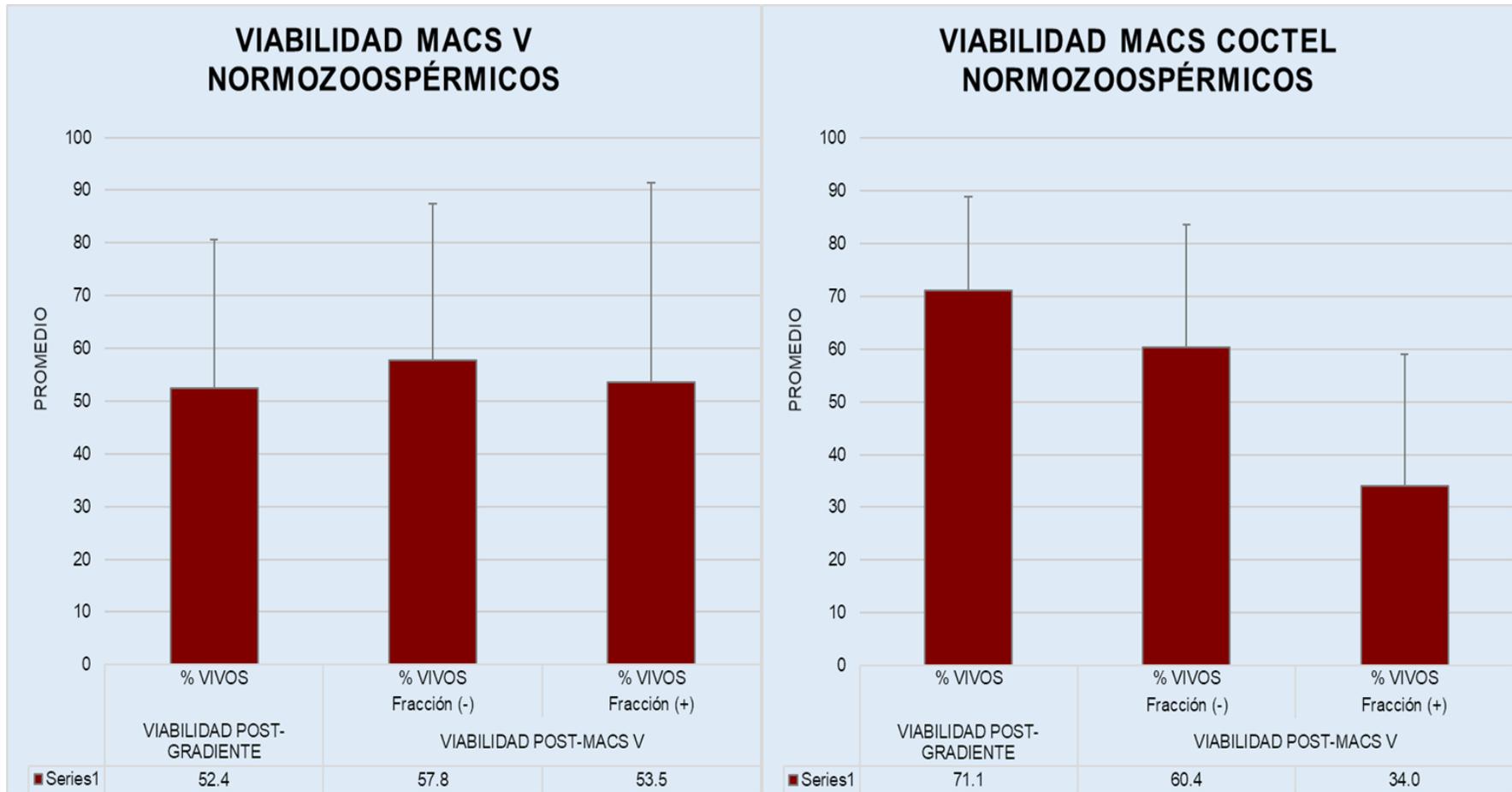


Figura 13. Comparativo de los métodos de separación magnética en la viabilidad espermática de pacientes normozoospermicos. Porcentaje de espermatozoides vivos en las muestras después del gradiente y después de la separación por columnas magnéticas con el método convencional (MACS V) en comparación con el coctel de marcadores propuestos (MACS COCTEL), tanto en la fracción positiva como en la fracción negativa.

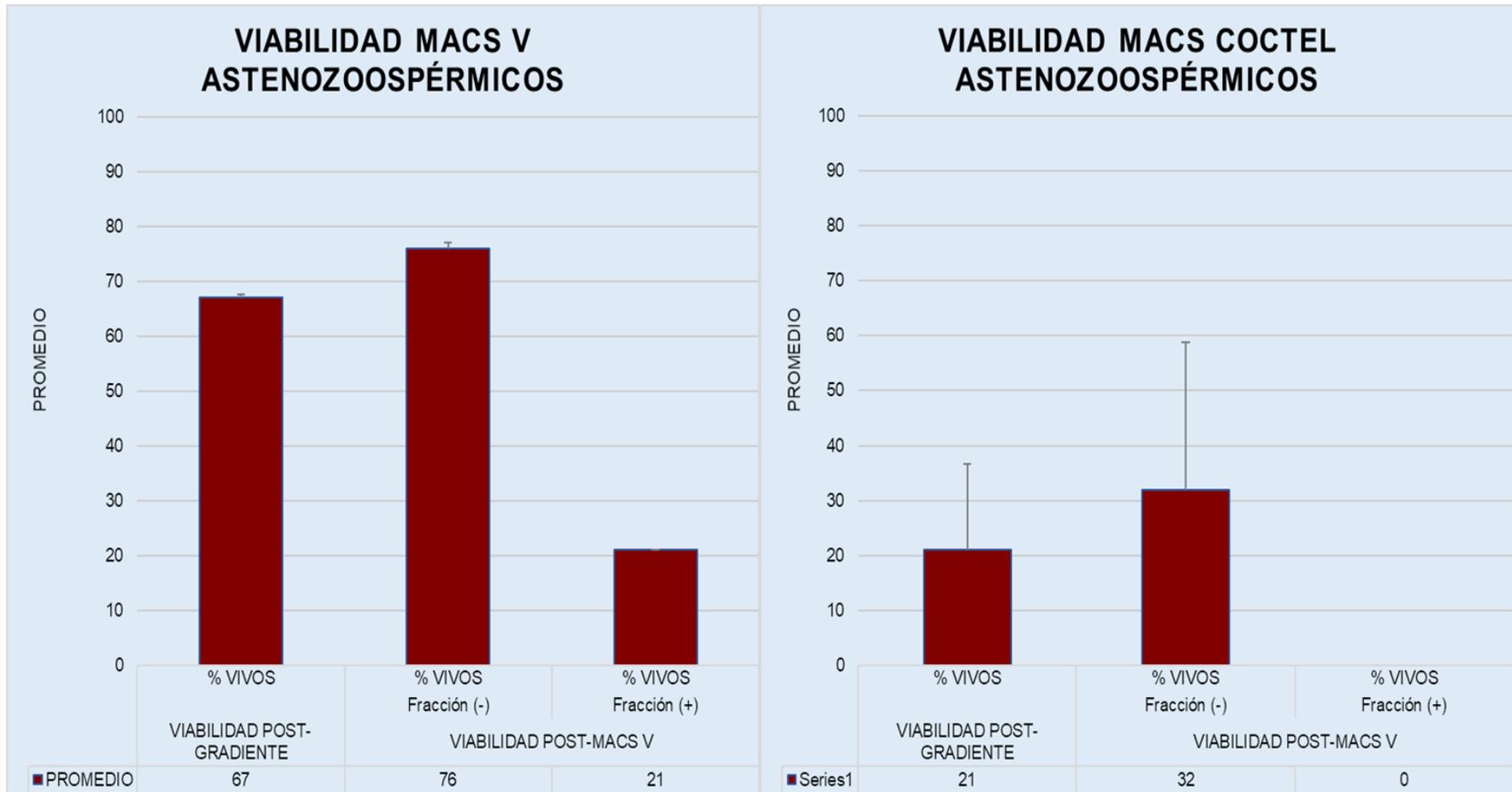


Figura 14. Comparativo de los métodos de separación magnética en la viabilidad espermática de pacientes astenozoospermicos. Porcentaje de espermatozoides vivos en las muestras después del gradiente y después de la separación por columnas magnéticas con el método convencional (MACS V) en comparación con el coctel de marcadores propuestos (MACS COCTEL), tanto en la fracción positiva como en la fracción negativa.

Movilidad espermática

Las figuras 15-17 muestran la movilidad espermática expresada como porcentaje de espermatozoides móviles progresivos y totales, la cual fue comparada en los dos métodos de separación magnética. Todas las comparaciones mostraron mayor proporción de espermatozoides móviles totales utilizando el método convencional de separación por MACS. La diferencia media de la proporción de gametos móviles totales en relación de la fracción negativa-positiva obtenida por el método convencional por MACS fue mayor que la determinada por el método de coctel de anticuerpos en las muestras de donadores fértiles (73% vs. 22.8, $p < 0.01$), pacientes infértiles normozoospermicos (55.6% vs. 40.9%, $p < 0.05$), y en las muestras de pacientes astenozoospermicos (82% vs. 31.5%, $p < 0.01$). Cabe mencionar que, la proporción de espermatozoides móviles progresivos en las fracciones negativas de los donadores fértiles fue significativamente mayor durante la separación realizada por el método convencional en contraste con el coctel de anticuerpos (49% vs. 15.8, $p < 0.01$), pacientes infértiles normozoospermicos (47.5% vs. 22.5%, $p < 0.03$) y astenozoospermicos (66.5% vs. 19.5%, $p < 0.01$), respectivamente.

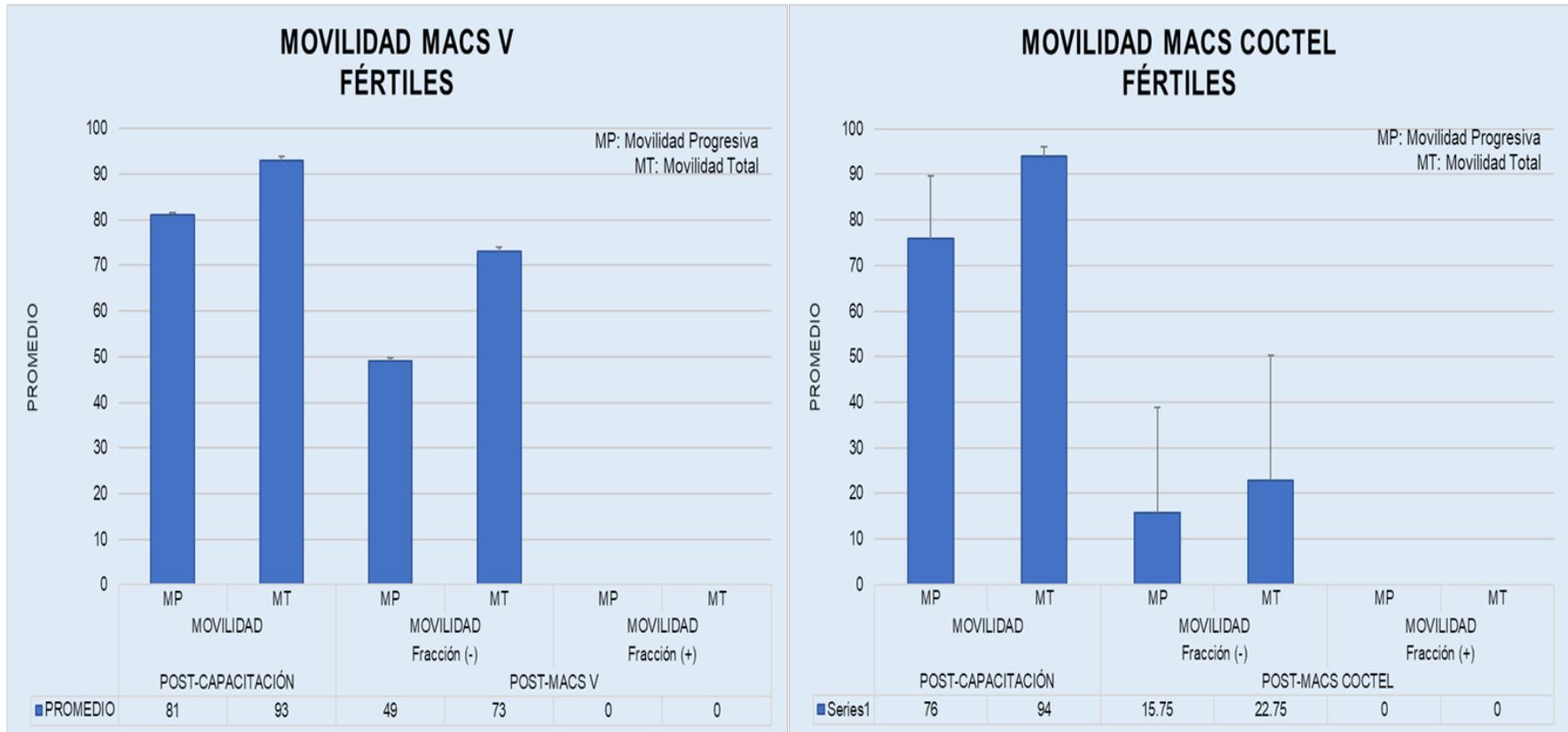


Figura 15. Comparativo de las técnicas de separación en la movilidad espermática de donadores fértiles. Porcentaje de movilidad en muestras de donadores fértiles después del gradiente y de la separación por ambos métodos: MACS V que solo considera a Anexina V y MACS Coctel de anticuerpos en las fracciones negativa y positiva.

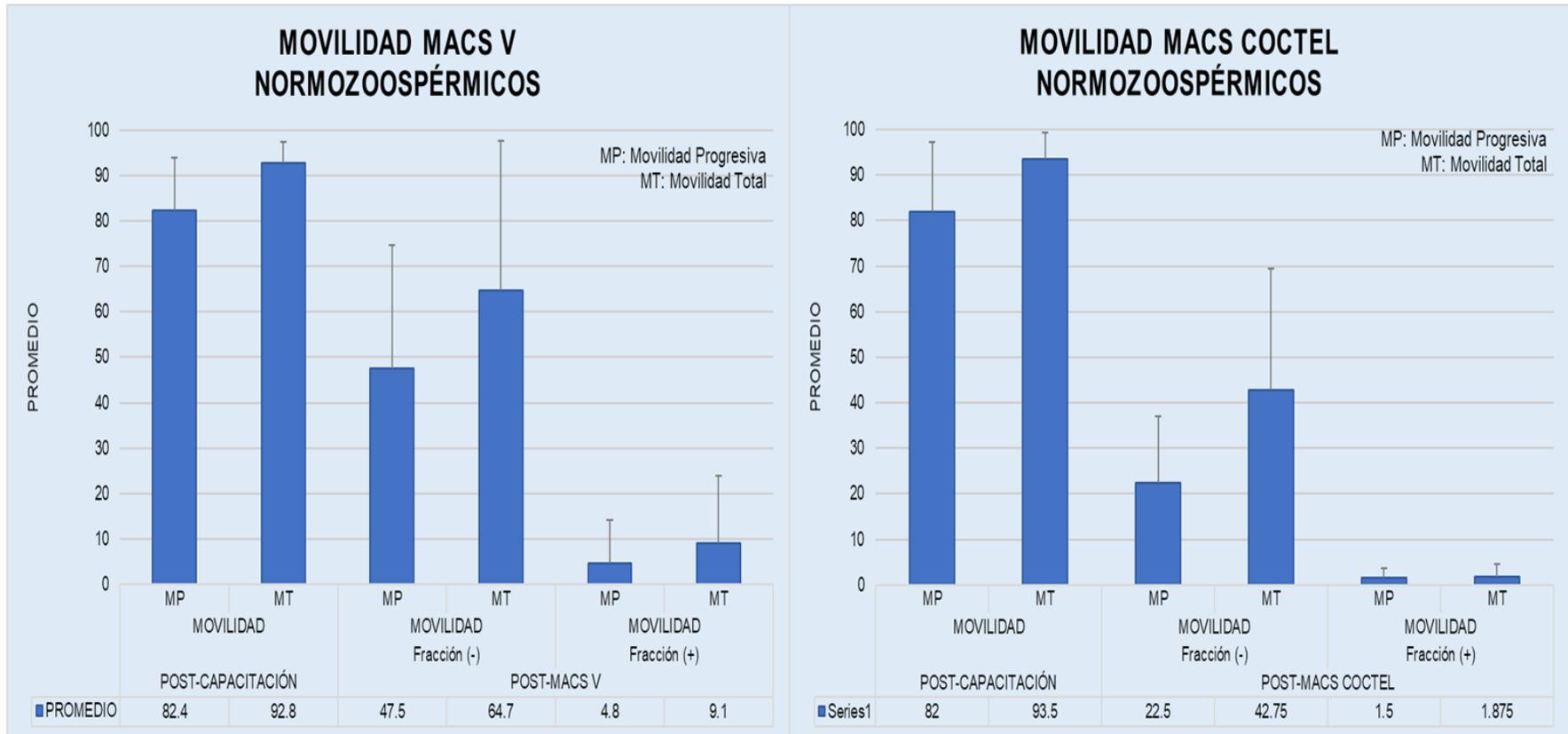


Figura 16. Comparativo de las técnicas de separación en la movilidad espermática de pacientes normozoospermicos. Porcentaje de movilidad en muestras de pacientes normozoospermicos después del gradiente y de la separación por ambos métodos: MACS V que solo considera a Anexina V y MACS Coctel de anticuerpos en las fracciones negativa y positiva.

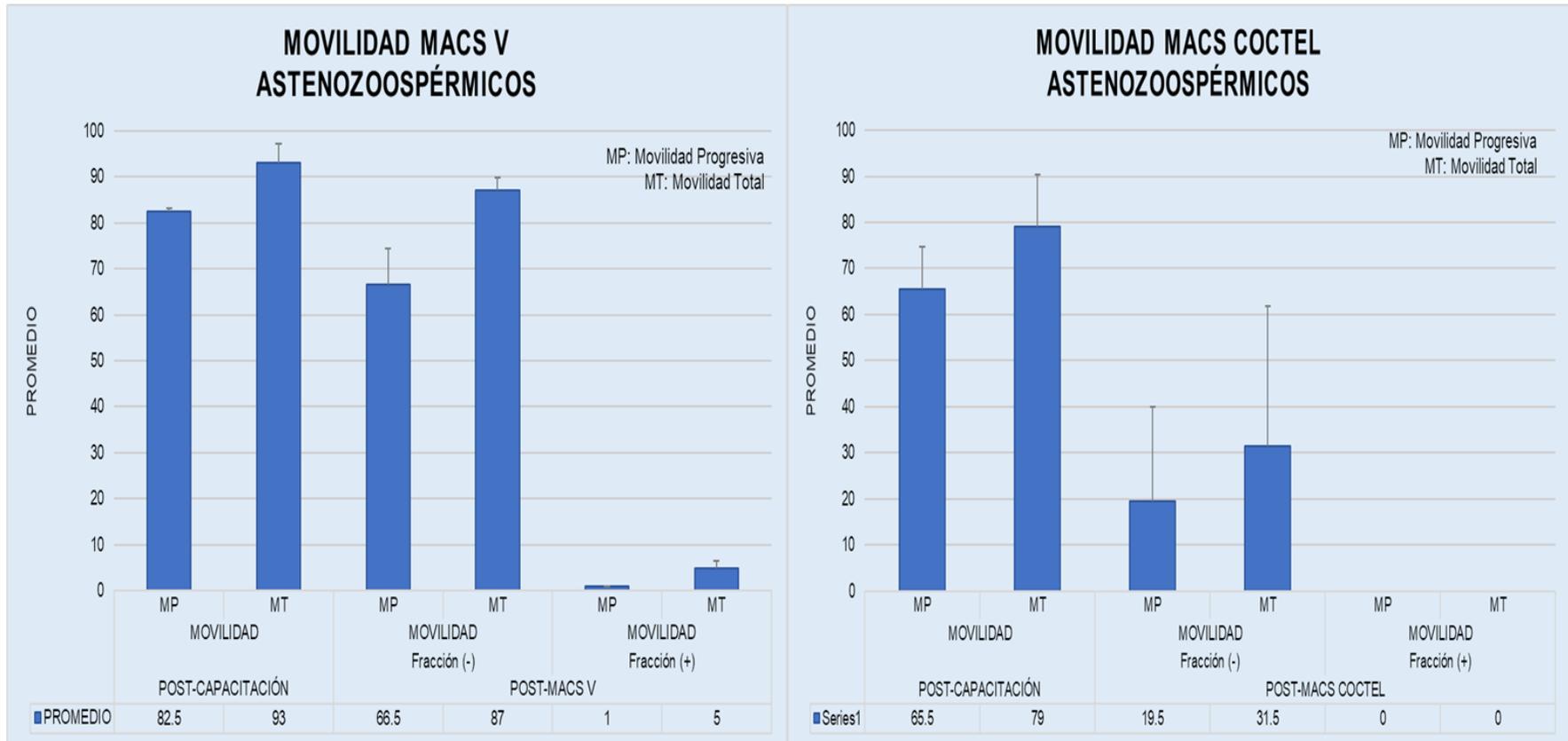


Figura 17. Comparativo de las técnicas de separación en la movilidad espermática de pacientes astenozoospermicos. Porcentaje de movilidad en muestras de pacientes astenozoospermicos después del gradiente y de la separación por ambos métodos: MACS V que solo considera a Anexina V y MACS Coctel de anticuerpos en las fracciones negativa y positiva.

Fragmentación del ADN espermático

Las figuras 18-20 muestran el índice de fragmentación del DNA espermático (DFI) expresado en porcentaje de espermatozoides apoptóticos, el cual fue comparado en ambos métodos de separación magnética. Todas las comparaciones mostraron menor proporción de espermatozoides apoptóticos utilizando el método de separación por coctel de anticuerpos. El diferencial medio del DFI en la relación de fracción negativa-positiva obtenida por el método de coctel de anticuerpos mostró menor proporción de gametos apoptóticos que la determinada por el método convencional por MACS en las muestras de donadores fértiles (-29.5% vs. -19%, $p<0.05$), pacientes infértiles normozoospermicos (-34% vs. -9.3%, $p<0.01$), y en las muestras de pacientes astenozoospermicos (-40% vs. -9%, $p<0.01$).

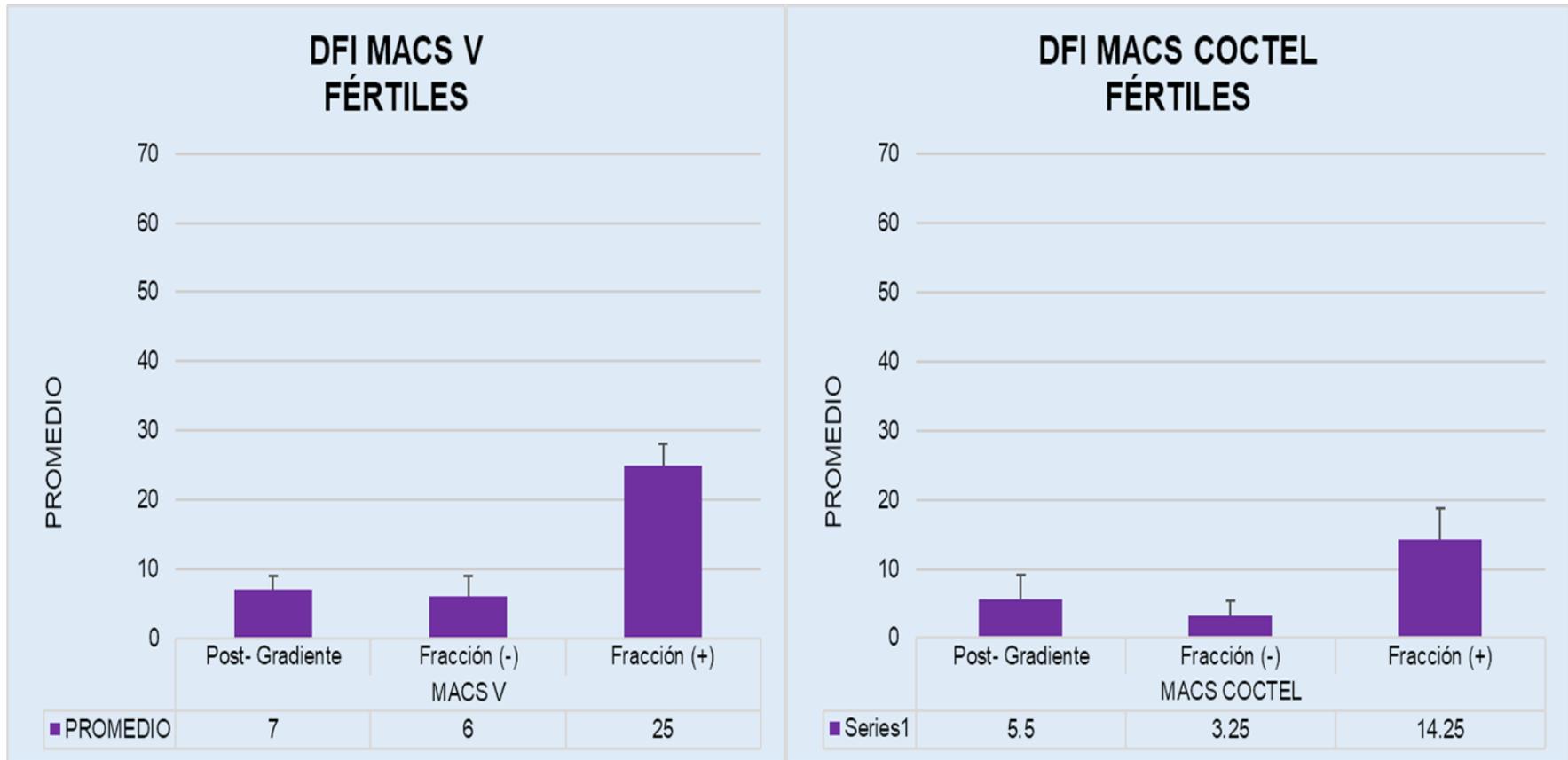


Figura 18. Comparativo de las técnicas de separación en el índice de fragmentación del DNA (DFI) espermático de donadores fértiles. La proporción de gametos apoptóticos en las muestras de donadores fértiles después del gradiente y de la separación por ambos métodos: Convencional por MACS con solo Anexina V y el propuesto con el Coctel de anticuerpos en las fracciones negativa y positiva.

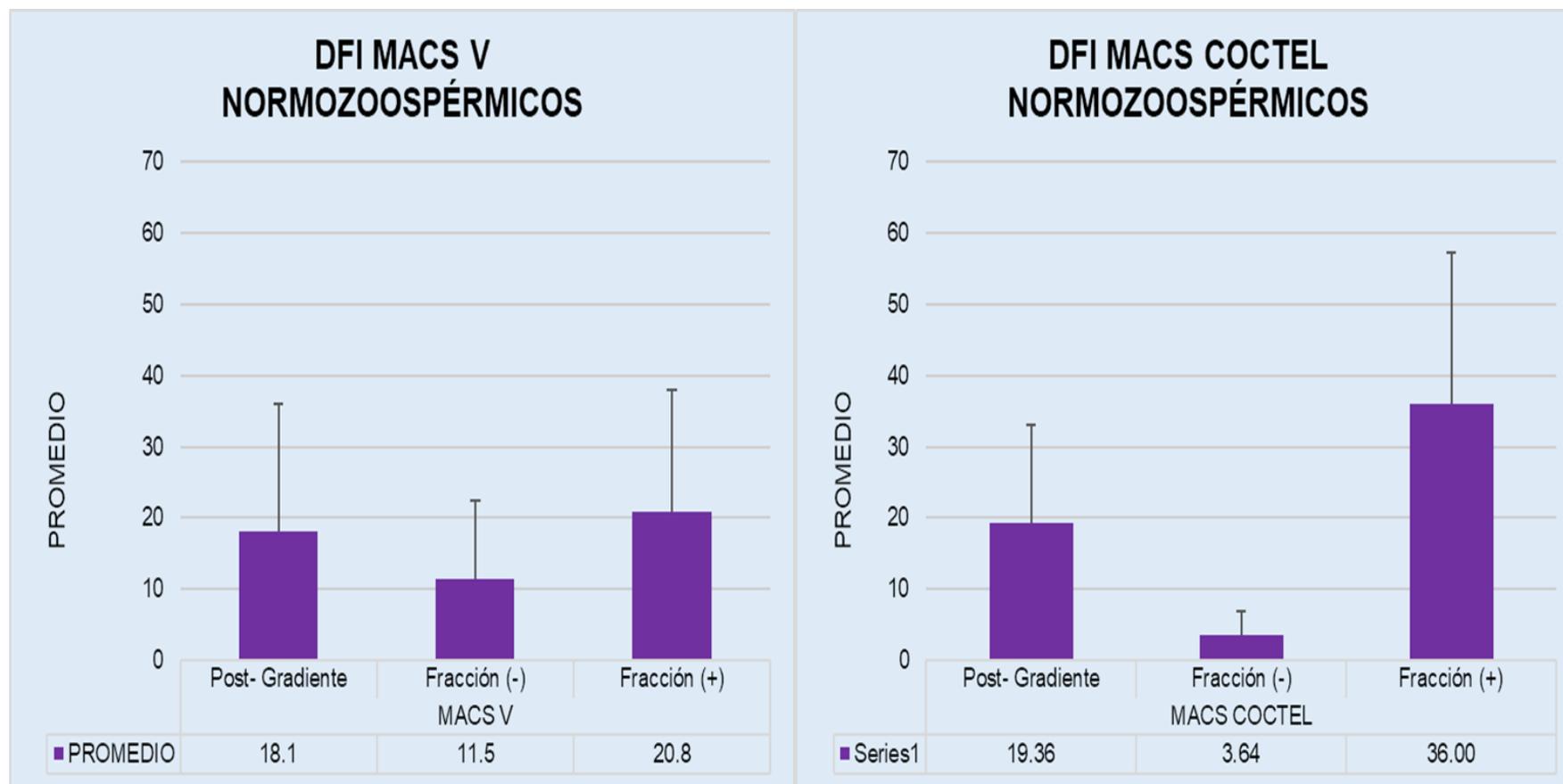


Figura 19. Comparativo de las técnicas de separación en el índice de fragmentación del DNA espermático de pacientes normozoospermicos. La proporción de gametos apoptóticos en las muestras de donadores fértiles después del gradiente y de la separación por ambos métodos: Convencional por MACS con solo Anexina V y el propuesto con el Coctel de anticuerpos en las fracciones negativa y positiva.

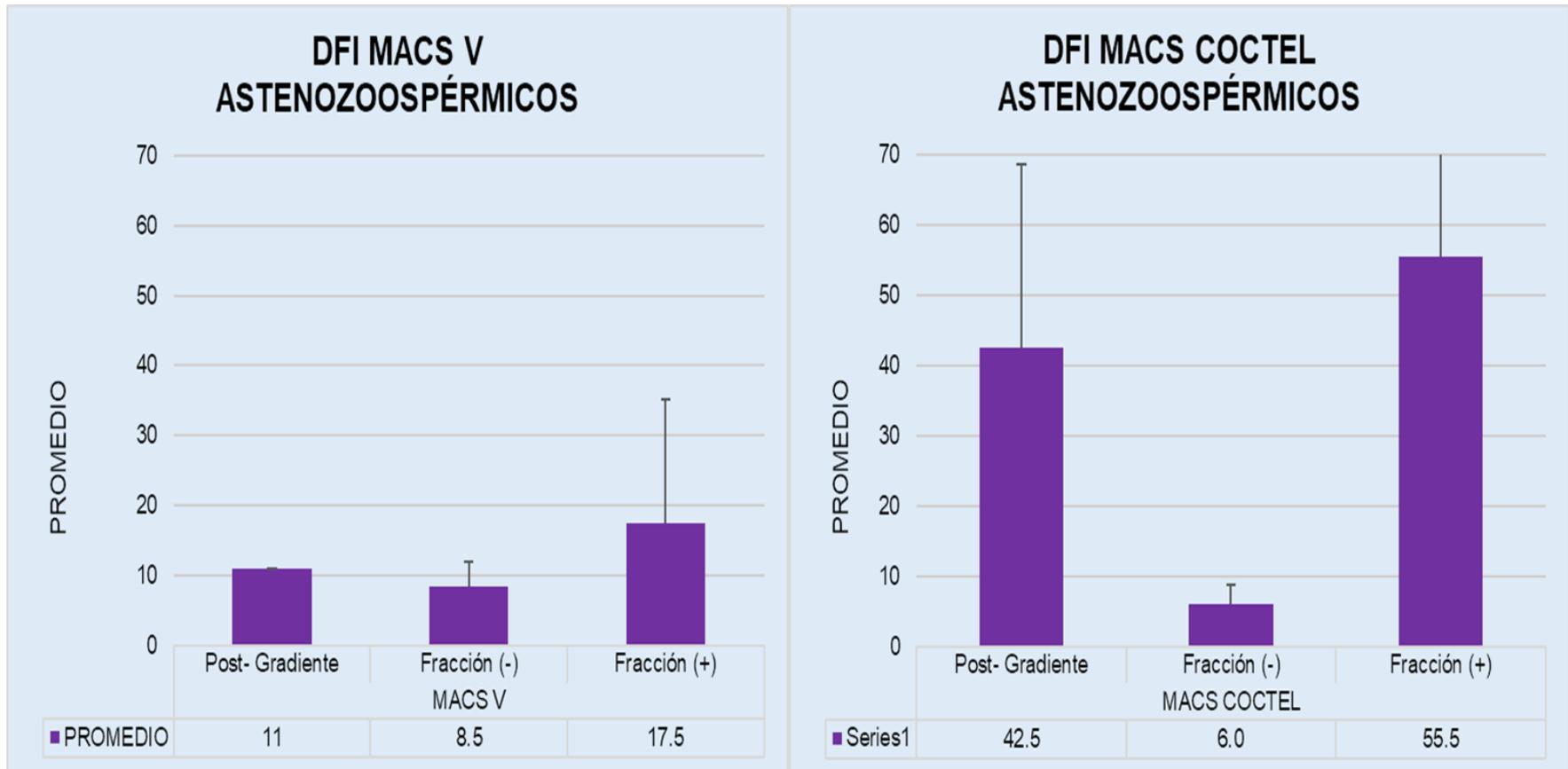


Figura 20. Comparativo de las técnicas de separación en el índice de fragmentación del DNA espermático de pacientes astenozoospermicos. La proporción de gametos apoptóticos en las muestras de donadores fértiles después del gradiente y de la separación por ambos métodos: Convencional por MACS con solo Anexina V y el propuesto con el Coctel de anticuerpos en las fracciones negativa y positiva.

Comparativo de los métodos de separación magnética

El análisis de varianza revela la diferencia estadísticamente significativa del modelo lineal corregido ($p < 0.025$) con potencia observada $\approx 80\%$ y la varianza del término de error es constante en la combinación de los niveles de los factores (Prueba de Levene, $p = 0.25$) (Tabla 5). El procedimiento mostró un adecuado comportamiento en la explicación de la varianza de la media general ($p < 1 \times 10^{-7}$) y de los tratamientos, pero no de la clasificación clínica y la interacción de los tratamientos-clasificación clínica. La proporción de espermatozoides apoptóticos obtenidos por el método de coctel de anticuerpos fue significativamente menor que los derivados por método convencional con MACS ($F_{C1gl} = 5.04$, $p < 0.03$). La clasificación clínica de las muestras seminales no muestra diferencia significativa por lo que no sesga los resultados de la separación de los gametos apoptóticos por ambos métodos ($p = 0.94$). No se reveló error de tipo IV (interpretación incorrecta del rechazo correcto de la hipótesis nula) por lo que no se observa efecto del experimentador en la evaluación de los resultados ($p = 0.76$). Además, se confirma que existe efecto del tratamiento en la separación de espermatozoides apoptóticos puesto que se cumplen con los supuestos adicionales del modelo (paralelismo y residuales cercanos a cero). Las medias marginales estimadas muestran una amplia brecha entre los métodos de separación magnética sugiriendo que la diferencia permanece constante a pesar del criterio de clasificación clínica.

Tabla 5. Análisis de varianza y supuestos adicionales del modelo lineal en el comparativo de los métodos de separación magnética.

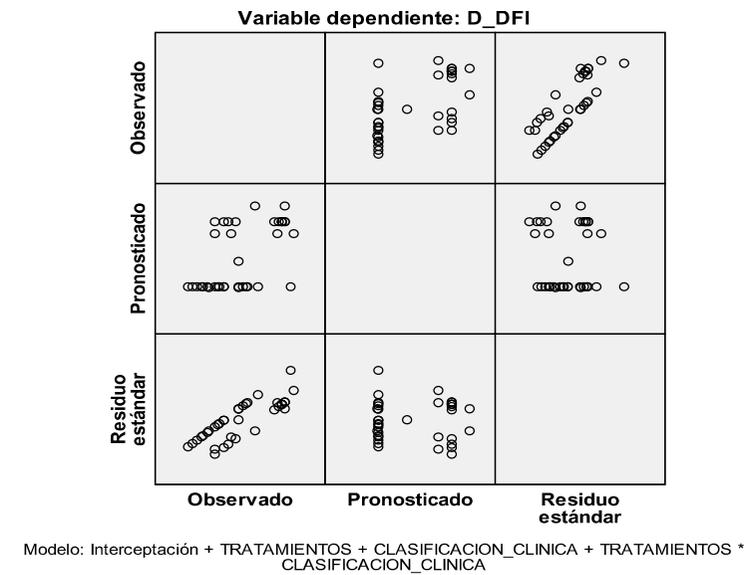
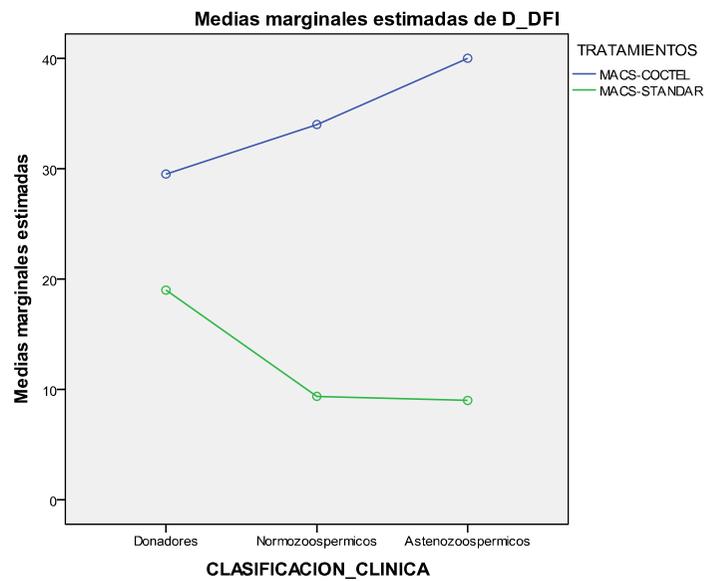
Pruebas de efectos inter-sujetos

Variable dependiente: D_DFI

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.	Eta parcial al cuadrado	Parámetro de no centralidad	Potencia observada ^b
Modelo corregido	5465.928 ^a	5	1093.186	3.022	.025	.328	15.109	.795
Interceptación	8267.401	1	8267.401	22.853	.000	.424	22.853	.996
TRATAMIENTOS	1823.300	1	1823.300	5.040	.032	.140	5.040	.585
CLASIFICACION_CLINICA	41.837	2	20.919	.058	.944	.004	.116	.058
TRATAMIENTOS * CLASIFICACION_CLINICA	197.564	2	98.782	.273	.763	.017	.546	.089
Error	11214.882	31	361.770					
Total	32622.000	37						
Total corregido	16680.811	36						

a. R al cuadrado = .328 (R al cuadrado ajustada = .219)

b. Se ha calculado utilizando alpha = .05



Reacción acrosomal en espermatozoides

El estado del acrosoma de los gametos obtenidos de la fracción negativa durante la separación magnética usando el coctel de anticuerpos fue evaluado de acuerdo con la presencia de un acrosoma refringente en un espermatozoide no reaccionado y región acrosomal coloreado de uno reaccionado como se muestra en las figuras 21-23. El porcentaje de espermatozoides que fueron capaces de realizar reacción acrosomal fue de aproximadamente un 98% para todos los grupos de clasificación clínica (figuras 21.1,22.1 y 23.1), posterior a la separación por columnas magnéticas por el método de MACS COCTEL en la fracción negativa a los marcadores de muerte, lo cual resulta muy favorecedor, ya que nos indicaría que el método de separación propuesto es efectivo para obtener células con un mayor potencial de fertilización.

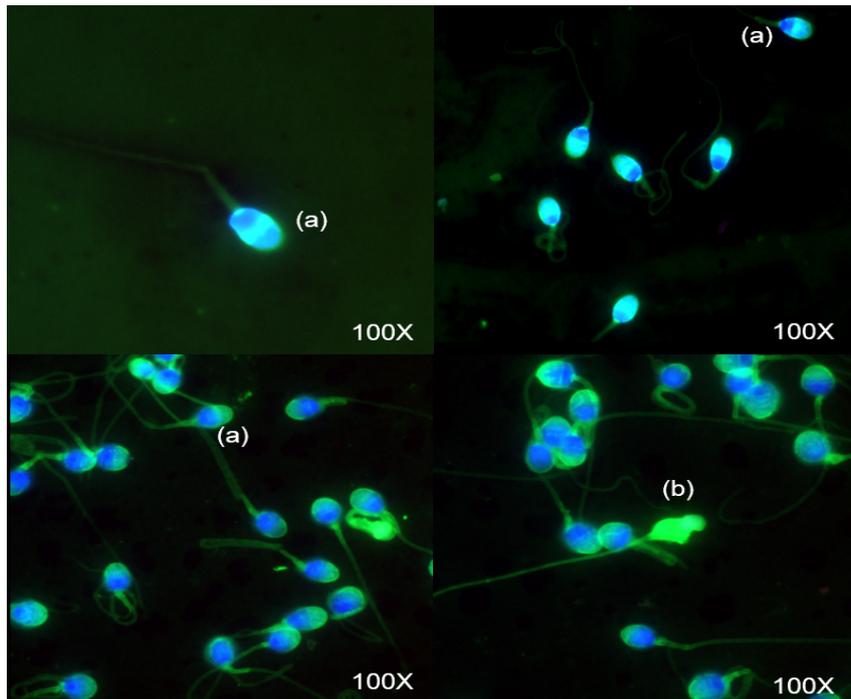


Figura 21. Modelo de reacción acrosomal en espermatozoides de donadores fértiles obtenidos en la fracción negativa separados por el coctel de anticuerpos. Espermatozoides marcados con la lectina PSA-FITC observados por microscopía de fluorescencia a 100X. Los espermatozoides marcados con fluorescencia de color verde en forma de banda en la zona ecuatorial de la cabeza son espermatozoides reaccionados (a) y los que muestran la fluorescencia en todo lo largo del acrosoma son espermatozoides no reaccionados (b).

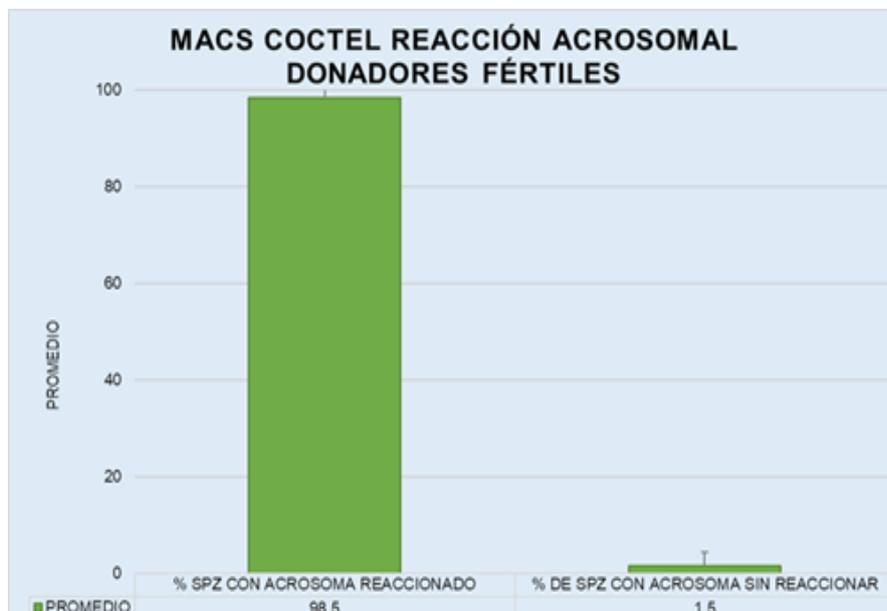


Figura 21.1 Espermatozoides que sufrieron y no reacción acrosomal. El promedio de espermatozoides de la fracción negativa de las muestras de donadores fértiles posterior a la separación por columnas magnéticas MACS con el COCTEL de anticuerpos.

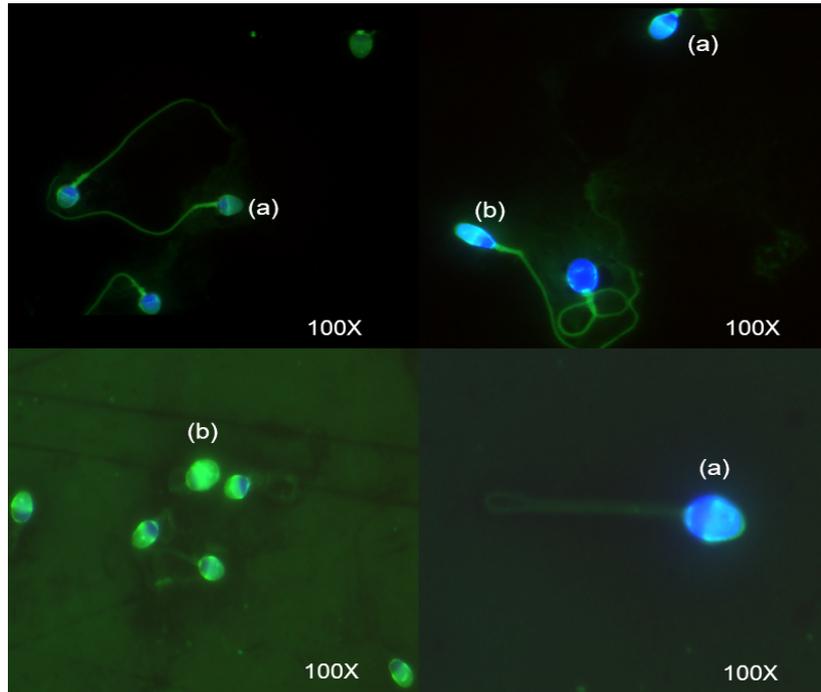


Figura 22. Prueba de reacción acrosomal en espermatozoides de la fracción negativa separados por MACS COTEL de pacientes normozoospermicos. Espermatozoides marcados con la lectina PSA-FITC observados por microscopia de fluorescencia a 100X. Los espermatozoides marcados con fluorescencia de color verde en forma de banda en la zona ecuatorial de la cabeza son espermatozoides reaccionados y los que muestran la fluorescencia en todo lo largo del acrosoma son espermatozoides no reaccionados.

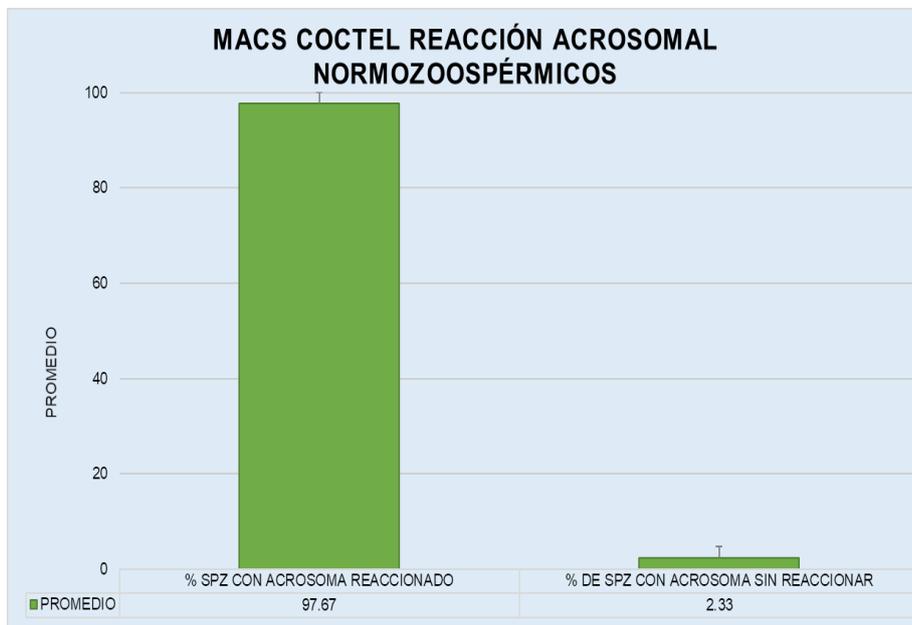


Figura 22.1 Espermatozoides que sufrieron y no reacción acrosomal. El promedio de espermatozoides de la fracción negativa de las muestras de pacientes normozoospermicos posterior a la separación por columnas magnéticas MACS con el COCTEL de anticuerpos.

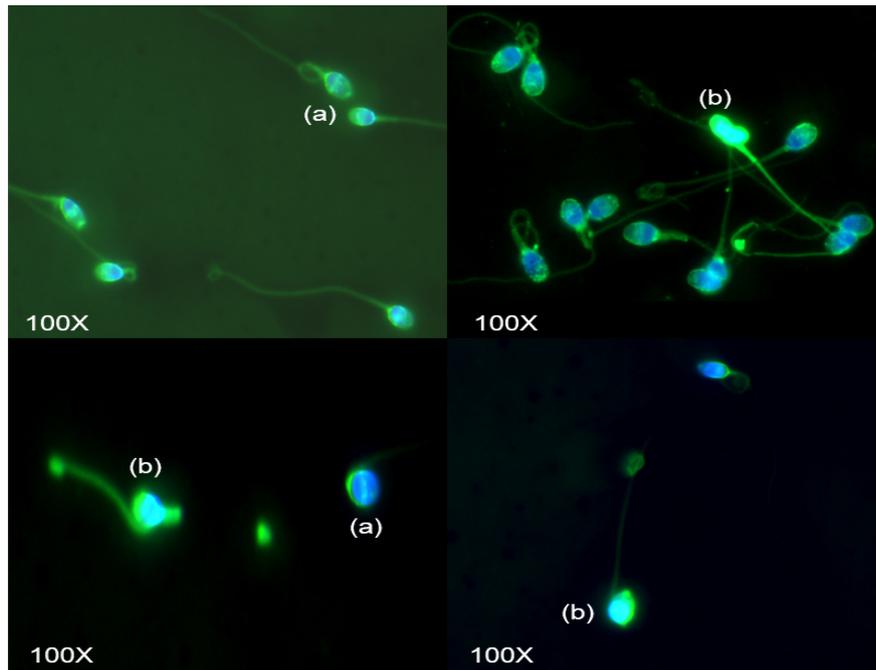


Figura 23. Prueba de reacción acrosomal en espermatozoides de la fracción negativa separados por MACS COTEL de pacientes astenozoospermicos. Espermatozoides marcados con la lectina PSA-FITC observados por microscopia de fluorescencia a 100X. Los espermatozoides marcados con fluorescencia de color verde en forma de banda en la zona ecuatorial de la cabeza son espermatozoides reaccionados y los que muestran la fluorescencia en todo lo largo del acrosoma son espermatozoides no reaccionados.

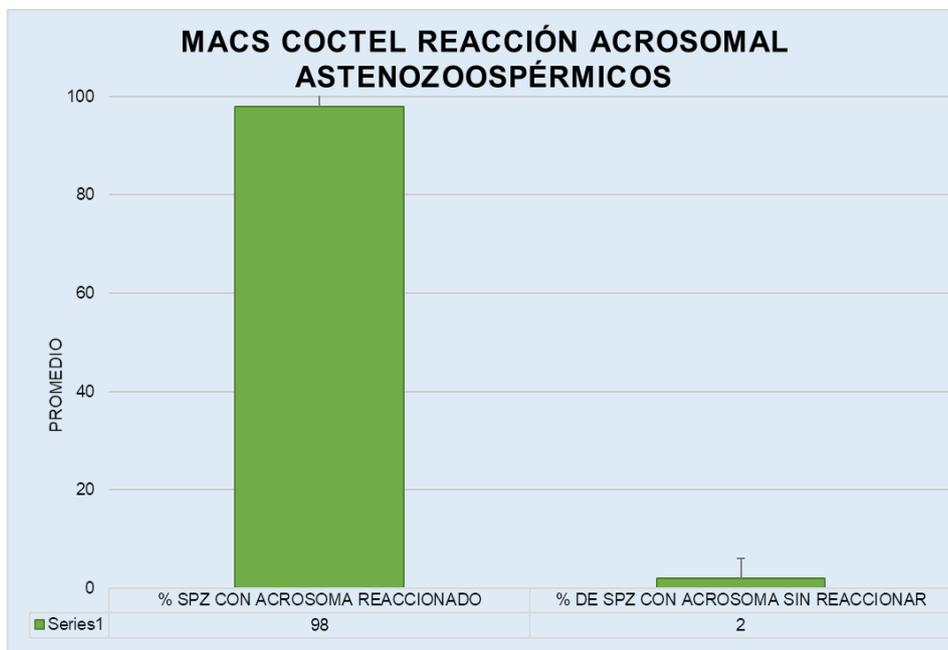


Figura 23.1 Espermatozoides que sufrieron y no reacción acrosomal. El promedio de espermatozoides de la fracción negativa de las muestras de pacientes astenozoospermicos posterior a la separación por columnas magnéticas MACS con el COCTEL de anticuerpos.

Potencial de membrana mitocondrial

La proporción de espermatozoides que formaron agregados-monómeros de JC-1 en la fracción negativa difiere significativamente de los gametos obtenidos en la fracción positiva (Figura 24). Después de la evaluación de 10,000 eventos, el 99% de los espermatozoides formaron agregados de JC-1 revelando incremento del potencial mitocondrial y sólo el 0.5% permanecieron de forma monomérica en la fracción negativa en contraste con el 90.8% de los gametos que formaron agregados y el 43.3% que permanecieron como monómeros en la fracción positiva.

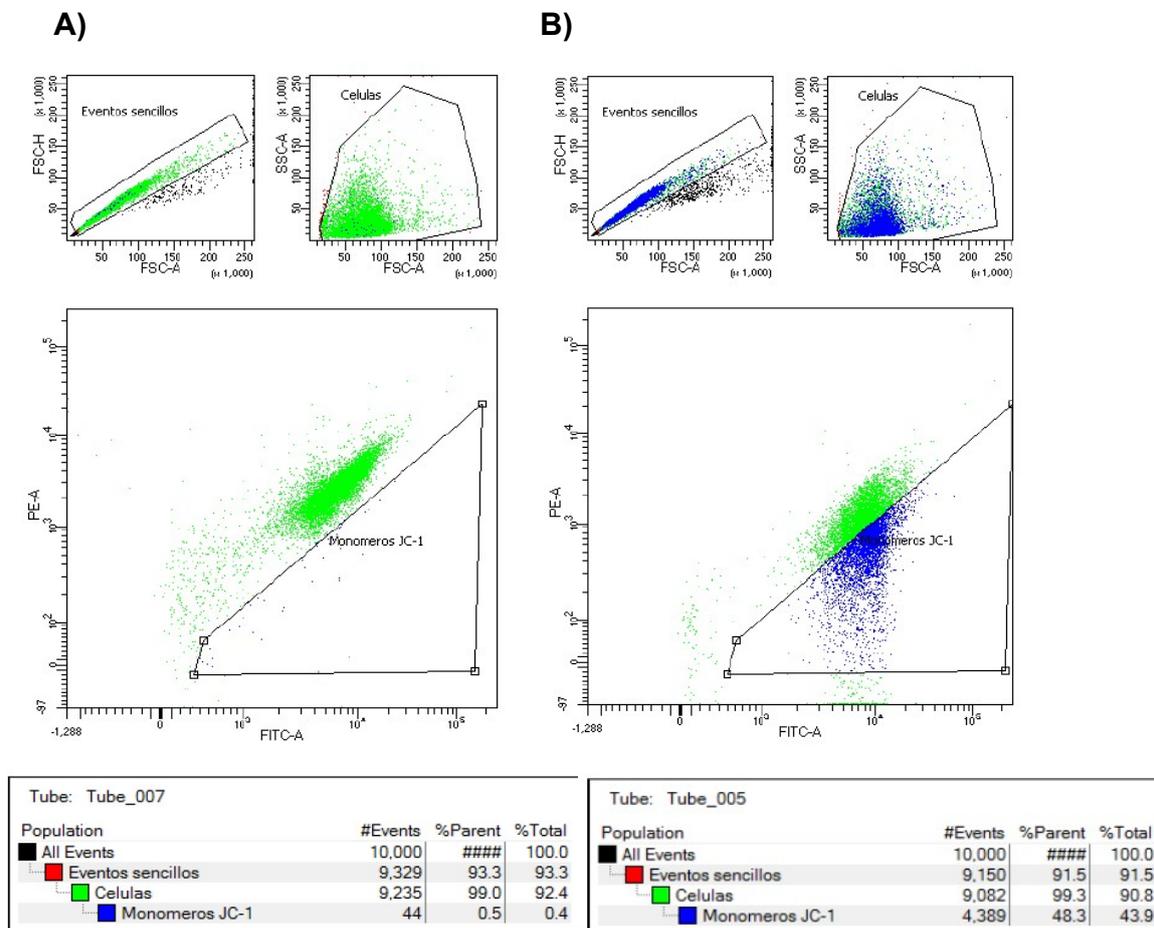


Figura 24. Representación esquemática de las fracciones negativa (A) y positiva (B) obtenida del método de separación magnética por coctel de anticuerpos. a: selección de la población de espermatozoides de interés en el análisis del potencial de membrana mitocondrial por tamaño y granularidad. b: dispersión de espermatozoides que formaron agregados y monómeros de JC-1 en la población de espermatozoides. c: grupo de espermatozoides positivos a PE y positivos a FITC. En las tablas inferiores se muestra el porcentaje de espermatozoides clasificados como: MMP Alto: En color verde (Células que formaron agregados de JC-1); MMP Bajo: En color azul (Células con el monómero de JC-1).

K.DISCUSIÓN

Las Técnicas de Reproducción Asistida son un conjunto de procedimientos médicos conducidos para favorecer el embarazo humano cuando existen problemas de fertilidad masculina, femenina o de ambos; por ejemplo, la inseminación artificial, ovodonación y fertilización *in vitro*, entre otros. Algunas técnicas específicas son complementarias para las TRA, tal es el caso de la técnica de MACS que permite seleccionar a los espermatozoides con las mejores características morfológicas y genéticas para ser utilizados en los tratamientos de reproducción asistida eliminando a los gametos apoptóticos y sólo eligiendo a los sanos, con lo que se incrementa de esta manera, la posibilidad de un embarazo exitoso.

Diversos trabajos en el modelo murino demostraron la presencia de algunos marcadores apoptóticos en células germinales y células de Sertoli^{68,84,89,96,98,99,100,116,117}, sin embargo, no se ha reportado la expresión de estos en los gametos eyaculados. De manera individual, los resultados de este trabajo de investigación coinciden con lo reportado por Rodríguez en 2010 sobre la expresión de Fas (CD 95) en células germinales en testículo de rata¹⁰¹; lo reportado por Grataroli y cols. en 2004 para la presencia de TRAIL-R1 en células germinales y células de Sertoli en ratón⁶⁹, lo reportado para TRAIL-R1 por Spierings y cols. en 2004 y su probable papel funcional durante la modulación de la apoptosis de células germinales en los testículos *in vivo* en modelo murino⁹⁶; lo reportado por Mc Donald y cols. en 2009 sobre la proteína de unión a fosfatidilserina traslocada en la membrana plasmática de espermatozoides apoptóticos¹⁰² y lo ya reportado por Ergun y cols. en 1997 para la presencia de VEGFR-1 en tejido testicular humano¹⁰³.

La expresión de estos receptores apoptóticos, así como del receptor VEGF y la proteína reguladora del influjo de iones calcio, anexina V, sólo se habían descrito exclusivamente en las células del sistema inmunológico^{82,81,82,83,84,85}, aunque estudios posteriores se demostró la expresión de los receptores TRAIL-R1, TRAIL-R2, Fas, y de VEGF en otros tipos de tejidos y células^{86,87,88}. Hasta el momento,

nuestro grupo de investigación es el pionero en examinar en conjunto a los receptores de muerte y de migración, así como a la proteína anexina V en gametos procedentes de muestras de eyaculado.

Los receptores apoptóticos han sido ampliamente estudiados en diversas células, pero poco se sabe de su función en los espermatozoides humanos. TRAIL-R1 está implicado en procesos de activación de apoptosis. El receptor 1 del ligando inductor de apoptosis relacionado al factor de necrosis tumoral (TRAIL-R1), se ha descrito en células tubulares renales, podocitos, hepatocitos, células estelares y estrelladas (lipocitos o células de Ito)^{68,89}. Estudios en el modelo murino han demostrado la potencial aplicación de TRAIL-R1 en enfermedades autoinmunes y en terapia anti-tumoral^{90,91}, diabetes tipo 1⁹¹ y en medicina reproductiva⁶⁹. Además, se ha considerado un regulador en el mantenimiento de la homeostasis de células germinales y en la espermatogénesis funcional⁹², aunque el papel del receptor y su mecanismo de funcionalidad en espermatozoides eyaculados de humanos son hasta ahora desconocidos. Nuestros resultados mostraron diferencia significativa del porcentaje de espermatozoides positivos a TRAIL-R1 en las muestras seminales de los pacientes con infertilidad en contraste con los donadores fértiles, pero no con los otros receptores (TRAIL-R2, Fas y VEGFR-1), así como de anexina V como se deduce del análisis de varianza multivariado.

Por otro lado, la expresión de TRAIL-R1 demostró dos bandas de 52 kDa y 75 kDa en la membrana plasmática de espermatozoides eyaculados, aunque este hallazgo difiere de lo reportado por Dörr y cols. en 2002 y Song y cols. en 2003 en oligodendrocitos, neuronas y astrocitos ya que se detectaron multi-bandas de diferentes pesos moleculares^{93,94}. La expresión de TRAIL-R1 con un peso aproximado de 60 kDa fue detectado por Kurbanov y cols. en 2005 en líneas celulares de melanoma, cultivo de melanocitos humanos normales y en líneas celulares de hepatocarcinoma humano; en epitelio del conducto biliar, neuronas, túbulos renales, miocitos cardíacos, células de Leydig y células germinales^{95,96}. Estas detecciones pueden variar debido a la sensibilidad y especificidad de los anticuerpos usados en las técnicas de Western blot. Importante es el hecho de la reducción en la

intensidad de la expresión del receptor en las muestras espermáticas de pacientes infértiles comparada con los donadores fértiles, no obstante ser la misma cantidad de proteína cargada en cada uno de los carriles del gel de acrilamida. Además, para el panel de extractos de proteínas membranales, se determinaron bandas de 100, 75, 57 y 37 kDa en los espermatozoides, pero no con la muestra de placenta humana (control positivo) que carece del pico de señal de 100 kDa. Cabe señalar que, se uso el extracto de proteínas membranales y no el extracto somático de espermatozoides para la determinación de la expresión de los receptores apoptóticos.

El receptor de muerte TRAIL-R2, a diferencia de TRAIL-R1, mostró una sola línea de bandeo de 52 kDa, lo cual concuerda con lo reportado por Dörr y cols. en 2002, en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos⁹³ y por Spierings y cols. en 2004, en neuronas, tejido de riñón, asa de Henle, miocitos cardíacos, colon, células de Leydig, células germinales, septos alveolares y epitelio bronquial⁹⁶. Los receptores TRAIL-R2 y Fas han sido poco estudiados en gametos humanos. Un estudio realizado por McKee y cols. en 2006, demostró que la adición combinada de la proteína recombinante TRAIL y el anticuerpo anti-DR5 mejoró la capacidad de TRAIL a reclutarse y activar a TRAIL-R2, resultando en un incremento significativo de la apoptosis celular de la línea germinal GC2spd⁹⁷. Esto implica que existe un probable papel funcional de TRAIL durante la modulación de la apoptosis de células germinales en los testículos *in vivo* en el modelo murino. En el caso del receptor apoptótico Fas, ha sido detectado en células de la granulosa⁹⁸, células nerviosas⁹⁹, células pancreáticas y cardiomiocitos¹⁰⁰, membranas de cerebro de mamíferos⁹⁹ y hepatocitos¹⁰⁰. Estudios hechos en rata sugieren que el sistema Fas puede estar involucrado en la regulación de la apoptosis de células germinales en testículos, principalmente en espermatozoides de la primera fase de la espermatogénesis²⁵.

La expresión de Fas fue detectada por una banda de 50 kDa en las muestras espermáticas de pacientes infértiles y en los controles, lo que sugiere que dicho receptor no se expresa de manera diferencial en los gametos con distintas características clínicas. Sin embargo, se observó un decremento en la intensidad de las bandas en las muestras de los pacientes infértiles, lo que puede sugerir reducción

de la cantidad de receptores por unidad de superficie en la membrana plasmática de los gametos como resultado de algún defecto genético en la línea basal de la espermatogénesis. La evaluación de la presencia de Fas en los gametos fue complementada a partir del porcentaje de espermatozoides CD95⁺ y de la intensidad de fluorescencia emitida por los espermatozoides, sólo móviles, de pacientes infértiles y donadores fértiles. Si bien no se demostró diferencia significativa en relación con el porcentaje de espermatozoides positivos a Fas, la proporción de gametos CD95⁺ fue mayor en las muestras espermáticas de los pacientes infértiles en comparación con los donadores fértiles. Quizá lo más relevante de nuestros hallazgos fue la baja expresión de las moléculas Fas en la membrana plasmática de los espermatozoides de los pacientes infértiles como resultado de la intensidad media de fluorescencia.

La activación de caspasa 8 mediada por Fas ha sido identificada en el modelo murino y de ningún modo, en alguna forma de inducción, ya sea por la conocida con inyección de anticuerpos agonistas de Fas o FASL se ha considerado la baja expresión de las moléculas de superficie celular⁸⁴. Dado que el anticuerpo anti-CD95 Jo2 causa la apoptosis masiva de células hepáticas, se había postulado que el CD95 induce la apoptosis de los hepatocitos. En casos clínicos, las células hepáticas mueren por apoptosis mediada por CD95 durante la hepatitis viral, cirrosis hepática y la enfermedad de Wilson. Sin embargo, CD95 también está involucrado en la regeneración hepática posterior a la hepatectomía parcial¹⁰⁰. De hecho, la inyección del anticuerpo Jo2 normalmente hepatotóxico en ratones parcialmente hepatectomizados en realidad acelera la regeneración del hígado.

La bien conocida ruta de activación de muerte mediada por el receptor Fas que implica el procesamiento automático de caspasa 8, seguida por cualquier activación directa de caspasas efectoras o la activación proteolítica de la proteína BID que activa la ruta apoptótica regulada por BCL-2. La caspasa 8 está relacionada con la proteína c-FLIP como un catalizador inactivo sustituto de la caspasa 8 que compite por la unión a FADD, limitando de este modo el reclutamiento y la activación de la caspasa 8, afectando así la iniciación de la apoptosis. Bajo ciertas circunstancias,

también se ha demostrado que c-FLIP promueve el reclutamiento y la activación de la caspasa 8. La otra forma de activación celular no apoptótica es con la participación de FADD y caspasa 8, en la cual se promueve la proliferación y diferenciación de linfocitos T humanos sin necesidad de procesarse ellos mismos¹⁰⁰. Por esta vía no se han identificado ni los activadores ascendentes, es decir, los receptores de muerte, ni los sustratos de la caspasa 8. Aunque la importancia fisiológica de las vías de señalización no apoptóticas activados por Fas sigue siendo controvertido⁸⁴, está ampliamente aceptado que los componentes esenciales de la maquinaria apoptótica mediada por receptores de muerte también realizan funciones no apoptóticas críticas⁸⁴, lo que nos lleva a cuestionar el papel que desempeña este receptor cuando existe una baja expresión de las moléculas de superficie de los espermatozoides de hombres infértiles.

El decremento en la intensidad de fluorescencia y la baja cantidad de proteína en la membrana plasmática de gametos Fas+ sugieren que el mecanismo de apoptosis en esos espermatozoides de pacientes infértiles puede no siempre llevarse a cabo. El CD95 (APO-1; Fas) ha irrumpido como un importante regulador celular de la vía extrínseca de señalización en la inducción de apoptosis en una amplia variedad de tejidos¹⁰⁴. Fas es expresado como una proteína membranal tipo 1 con peso molecular de 45 kDa siendo miembro de la superfamilia de receptores asociados al factor de necrosis tumoral⁶⁶.

La inmunodetección de Fas en la membrana de los espermatozoides está de acuerdo con lo reportado por Mc Vicar y cols. en 2004 y Soleimani y cols. en 2010^{105,106}. En una muestra de espermatozoides obtenidos por gradiente de sedimentación de hombres infértiles se identificó un 70% de gametos Fas+ mientras que sólo el 5% fue determinado en las muestras espermáticas de donadores fértiles¹⁰⁵. De todas las muestras espermáticas positivas a Fas, el 96% de ellas correspondieron a hombres cuyas parejas no se les detectó ninguna anomalía fisiológica. Esto sugiere una fuerte relación entre la señalización apoptótica mediada por Fas y el nivel de la fertilidad masculina. El estudio realizado por Soleimani y cols. en 2010, reporta muestras espermáticas con baja concentración (<20 millones/mL) y

pobre morfología (<14% de gametos normales) con porcentajes de gametos Fas+ del 4% y 5%, respectivamente¹⁰⁶. Sin embargo, Castro y cols. en 2004 y Perticarari y cols. en 2008, no detectaron cantidades substanciales de la presencia de CD95 en espermatozoides de hombres normozoospermicos y pacientes con varicocele, criptorquidismo o con alteración de los parámetros seminales e infertilidad idiopática lo que sugiere que las diferentes metodologías (método de detección indirecta vs. directa, separación de poblaciones espermáticas, clona del anticuerpo) puedan estar implicadas en los resultados obtenidos^{107,108}. El anticuerpo monoclonal anti CD95 de la clona DX2 utilizado por Castro y cols. y Perticarari y cols., es un anticuerpo específico para el receptor de Fas humano cuando los enlaces cruzados con Fas en la célula blanco presentan una señal apoptótica, lo que sugiere que DX2 reconoce a algún epitopo funcional del antígeno CD95^{107,108}. Por otra parte, la especificidad de la clona utilizada en el presente estudio deriva de una línea celular de mieloma de origen murino que detecta a Fas humano en el orden del 95-99%. El fabricante menciona reacción cruzada del 5% contra Fas de rata y del 1% contra el antígeno recombinante de Fas felino, Fas murino TNF-R1 y TNF-R2 humano y TNF-R2 de mono (R&D Systems, Certificado de análisis).

La teoría abortiva postula que algunas formas de infertilidad asociada a la presencia de parámetros anormales en las muestras seminales, puede ser el resultado de un programa abortivo de la muerte de células germinales. En este caso, el proceso apoptótico es incompleto debido a la falla en eliminar células germinales, aunque la presentación apoptótica en los testículos ha iniciado con anticipación. La apoptosis abortiva sugiere que el mecanismo apoptótico ha funcionado mal y que ha sido alterado o no ha sido completado debidamente durante la liberación de espermatozoides "cuasi apoptóticos" en los túbulos seminíferos¹⁴.

Aunque Fas ha sido considerado principalmente un receptor de muerte celular, diversas investigaciones le han atribuido actividades no apoptóticas tales como promover la proliferación, supervivencia y/o activación de linfocitos T humanos¹⁰⁰, la maduración de células dendríticas en cultivo y el aceleramiento de la regeneración del hígado en ratones sometidos a hepatectomía parcial⁸⁴. Además del papel

fisiológico en la regulación del desarrollo neuronal, crecimiento, diferenciación y regeneración en el sistema nervioso central, así como de la actividad no apoptótica en otros tejidos tales como corazón, páncreas y colon^{109,100}.

Otro receptor previamente localizado mediante inmunocitoquímica y citometría de flujo en espermatozoides de varones infértiles candidatos a ICSI y FIV, que no ha sido relacionado a procesos de muerte celular es el VEGFR-1¹¹⁰. Los resultados del presente estudio muestran que el porcentaje de gametos positivos al receptor 1 de VEGF en las muestras de donadores fértiles fue menor que en las muestras de pacientes infértiles. El fenotipo determinado en los espermatozoides de donadores fértiles fue 20.8% ($\pm 15\%$) mientras que para aquellos de los pacientes infértiles normozoospermicos y astenozoospermicos fueron de 39.2% ($\pm 45.1\%$) y 44.3% ($\pm 46.3\%$), respectivamente.

Existe evidencia de que la vía reproductiva femenina es dependiente de la angiogénesis, pero hay poca información disponible en la literatura acerca de la regulación de la fertilidad masculina¹¹¹. Brown y cols. (1995)¹¹², detectaron una cantidad sustancial de la proteína VEGF en el plasma seminal y sorprendentemente, las concentraciones más altas se detectaron en pacientes vasectomizados; por ello, se sugirió que la próstata y la vesícula seminal son las principales fuentes secretoras de esta proteína en el plasma seminal, en lugar del testículo y el epidídimo. Los resultados de Ergun y cols. en 1997, describen los patrones de expresión de la proteína y de los receptores Flt-1 y Flk-1, en el tejido normal de testículo humano explicando que el factor de crecimiento endotelial vascular podría ejercer efectos diferentes en el tejido testicular y en los capilares testiculares¹⁰³. Obermair y cols. en 1999, determinaron las concentraciones del VEGF en el fluido seminal comparando los resultados con la presencia del factor de infertilidad masculina. Se observó una asociación altamente significativa cuando se compararon las concentraciones proteicas con la tasa de embarazo. Sin embargo, fue evidente que el VEGF no se asoció con el factor de la infertilidad masculina y no mejoró la tasa de fecundación. Además, se pudieron localizar ambos receptores del VEGF, Flt-1 y Flk-1, en los espermatozoides¹¹⁰.

Hasta ahora, la función del factor de crecimiento endotelial vascular y de sus receptores en el sistema reproductor masculino, sigue siendo poco clara. En este proyecto se detectó la expresión de VEGF-R1/Flt-1 en espermatozoides y se observó un marcaje positivo de este receptor en todas las muestras espermáticas incluyendo al control positivo. Se identificaron multi bandas de 55, 140 y 200 kDa para todas las muestras. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Man y cols. en 2006, quienes inmunolocalizaron este receptor en queratinocitos humanos. Se detectó un incremento en la intensidad de las bandas en los espermatozoides de los donadores fértiles y la placenta en contraste con baja señal en los espermatozoides de los pacientes infértiles. Además, la localización de Flt-1 sobre los espermatozoides, como resultado de la inmunolocalización, nos proporciona evidencia circunstancial de que el propio gameto podría ser un blanco para el factor de crecimiento endotelial vascular del plasma seminal⁸⁷.

El VEGFR-1 ha sido implicado principalmente en funciones angiogénicas, pero se le han atribuido nuevas actividades no angiogénicas, tales como la proliferación y la diferenciación de las células germinales¹¹³. Iyibozkurt y cols. en 2009, tomando en cuenta lo reportado por Von Wolff y cols. en 2007 respecto a que no existe diferencia en la concentración de la proteína VEGF en el plasma seminal de hombres con espermatozoides normales y anormales, demostraron que la adición de diferentes concentraciones de esta proteína a espermatozoides de pacientes fértiles produce un incremento en la motilidad de los mismos, sugiriendo que este efecto es probablemente mediado por la expresión de receptores en el espermatozoide^{36,114}. Además, otras investigaciones sugieren que el tratamiento in vitro de tejido testicular bovino con VEGF estimula una respuesta intracelular que evita la muerte de las células germinales, apoyando así la hipótesis de que el VEGF es compatible con la supervivencia de las células germinales y la producción de espermatozoides en los toros¹¹⁵. En el modelo murino se ha reportado como un sistema esencial durante la embriogénesis ya que la falta de expresión del receptor en ratones KO provoca la muerte del embrión entre los días 8.5 y 9.5¹¹⁶.

Otros estudios han enfatizado los efectos de VEGFR-1 en la hematopoyesis y el reclutamiento de células progenitoras endoteliales. LeCouter y cols. en 2003, sugirieron que la función del receptor en las células endoteliales de sinusoides hepáticos no está asociado a la regulación de la angiogénesis, sino más bien, la liberación paracrina de factores de crecimiento y/o supervivencia específicos del propio tejido¹¹⁷. Wilgus y cols. en 2005, notificaron que VEGFR-1 se expresa en queratinocitos murinos durante la recuperación de heridas por objeto punzocortante, así como en queratinocitos humanos normales^{87,118}. El VEGFR-1 también se conoce como un regulador positivo de la migración de monocitos y macrófagos¹¹⁶. Sin embargo, el VEGFR-1 también ha sido identificado en células endoteliales de pulmón vinculando la expresión con procesos oncológicos¹¹⁶.

Por otro lado, la proteína anexina V es considerada como una proteína intracelular de unión dependiente de calcio; se ha reportado que se transloca desde el citosol hacia la membrana plasmática después de un incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular. Es conocida por inducir el flujo de calcio por la formación de canales de Ca^{2+} y por inhibir actividades enzimáticas ligadas a la activación por Ca^{2+} , tal como fosfolipasa A2 y la proteína cinasa C¹¹⁹. También se ha sugerido que anexina V regula la señalización mediada por Ca^{2+} durante el ciclo celular, la transducción de señales, la organización y el tráfico de proteínas membranales), aunado a la evidencia que indica que anexina V puede participar en la modulación de la apoptosis¹¹⁹. Song y cols en 2002, demostraron que las células DT40 carentes de anexina V son resistentes a la apoptosis calcio-dependiente¹²⁰; asimismo, Wang y cols. en 1998 reportaron que la inhibición de la proteína mediada por el influjo de iones de Ca^{2+} reduce la apoptosis en condrocitos^{119,121}. La detección de la proteína anexina V realizada en este estudio mostró una banda de 37 kDa concordando con lo reportado por Sun y cols. en 1992 y van Genderen y cols. en 2008, en células endoteliales humanas de cordón umbilical, epiteliales y fibroblastos^{122,123}. Existen escasos estudios de esta proteína en el sistema reproductor masculino, pero es ampliamente conocido su uso como una proteína que se une a fosfatidilserina (PS por sus siglas en inglés), translocada en la membrana plasmática de espermatozoides apoptóticos. La técnica de separación magnética de los gametos

con ADN fragmentado utilizando esferas metálicas recubiertas por anexina V es desarrollada dada su afinidad por la PS. La anexina V se une con alta afinidad a la PS en un manejo calcio dependiente y a un entorno de cargas eléctricas. Este fosfolípido sufre translocación en las primeras etapas de la apoptosis¹⁰². Sin embargo, las células vivas también pueden expresar PS en su superficie independientemente de la muerte celular. Por ejemplo, los monocitos al diferenciarse en macrófagos y subpoblaciones de linfocitos T pueden exponer PS¹²³. Además, los trofoblastos al diferenciarse en un sincitiotrofoblasto de la placenta expresan PS¹²³. La inmunolocalización de la proteína a nivel de la pieza media del espermatozoide sugiere su participación en la inducción del influjo de iones de calcio mediante la formación de canales durante la motilidad espermática¹²⁰. Por otra parte, el uso de anexina V endógena ha hecho posible el atraso del mecanismo apoptótico al bloquear el aumento de Ca^{2+} intracelular mejorando la permeabilidad de la membrana^{80,102}.

De acuerdo con los resultados anteriores demostramos la presencia de los receptores apoptóticos propuestos en pacientes fértiles e infértiles (normozoospermicos y astenozoospermicos). La microscopia de fluorescencia nos permitió observar localización de los receptores en la membrana del espermatozoide, principalmente en el flagelo (TRAIL-R1, TRAIL-R2, VEGFR-1 y Fas) y pieza media (Anexina V).

Encontrar una intensidad de fluorescencia para cada receptor mayor en los pacientes fértiles que en los infértiles nos sugiere probablemente que la apoptosis en el espermatozoide tenga que ser inducida por la concentración de receptores en la membrana, por lo tanto, al ser baja la cantidad de estos, la intensidad de la señal se considera débil y por eso escaparon al mecanismo de eliminación.

El porcentaje de espermatozoides positivos a TRAIL-R1, TRAIL-R2, Fas, VEGFR-1 y anexina V, así como de la expresión de las proteínas en la superficie corrobora que el Análisis de Componentes Principales (ACP) puede encontrar un grupo reducido de variables que pueden ser favorables para la clasificación de patrones fenotípicos de espermatozoides humanos. La reducción de la dimensionalidad de los datos de 12

variables en tres componentes a partir de la combinación lineal de las variables originales, permiten establecer la independencia de los factores. El primer componente principal o factor integra altas correlaciones positivas para los biomarcadores Fas, TRAIL- R2 y VEGFR-1, así como la intensidad de fluorescencia media de VEGFR-1 y Fas. El segundo componente indica una relación positiva con la expresión de la proteína anexina V, en tanto que, para el tercer componente TRAIL-R1 muestra correlación positiva. La distribución de la expresión de receptores es más importante en el primer componente ya que este aporta el 63% de la varianza generalizada mientras que el segundo sólo contribuye con el 12.89% y el tercero con 11.22%. El receptor TRAIL-R2, VEGFR-1 y Fas así como la sobreexpresión de los receptores Fas y VEGFR-1 sugieren que estos biomarcadores pueden ser considerados el patrón fenotípico característico de los donadores fértiles. Está firmemente establecido que varios miembros de la familia de los receptores TNF, entre ellos algunos que están clasificados como receptores de muerte (TRAIL-R1, TRAIL-R2) y sus ligandos correspondientes, ejercen (exclusivamente o además de su actividad proapoptótica) algunas funciones no apoptóticas, tales como la inducción de la activación celular, proliferación, diferenciación y/o migración.⁸⁴ También para la activación de Fas, algunas investigaciones han observado secuelas no apoptóticas, pero sí de proliferación y/o maduración en linfocitos T, células dendríticas y fibroblastos^{66,100}. Asimismo, la expresión del receptor de VEGFR-1 puede estar involucrado en algunos parámetros de motilidad y sobrevivencia espermática. La incubación de espermatozoides en medio sintético para espermas con concentraciones conocidas de una proteína recombinante de VEGFR-1, mostró incremento de la movilidad espermática en dosis dependiente³⁶. No obstante, estos resultados deberán ser confirmados evaluando las características funcionales de estos gametos seleccionados.

En cuanto al fenotipo espermático de los hombres con normozoospermia fue observada una distribución bimodal con dos factores. El primer factor que contribuyó con el 70.79% de la varianza representó el porcentaje de espermatozoides positivos a TRAIL-R1, TRAIL-R2, Fas, VEGFR-1 y anexina V en tanto que el segundo componente que aportó el 10.95% de la varianza mostró relación positiva con

motilidad. De acuerdo con estos resultados nosotros podemos especular la existencia de dos fenotipos espermáticos diferentes en las muestras espermáticas de pacientes normozoospermicos, uno representado por gametos positivos a Fas, TRAIL-R1 y VEGFR-1 y otro constituido por anexina V y TRAIL-R2 con baja expresión de sus moléculas de superficie.

Para confirmar los resultados obtenidos por el análisis de componentes principales se realizaron los análisis de conglomerados jerárquicos. En el análisis de conglomerados jerárquicos las muestras son agrupadas en base a su similitud cercanía a centroides sin tomar en cuenta la previa clasificación acerca de los grupos de pertenencia. Este análisis utiliza menos información (solo distancias euclídeas) que el ACP y los resultados obtenidos para cada grupo clínico son visualizados a partir de dendogramas. Los datos de 12 variables obtenidos por FACS de los espermatozoides de donadores fértiles mostraron dos conglomerados jerárquicos. El dendograma representa las etapas del proceso de conjunción de variables y las distancias combinadas entre los conjuntos de elementos. Las distancias están representadas por escala estandarizada de 20 puntos, y las líneas verticales identifican a los conglomerados o conjuntos de elementos y las líneas horizontales a las distancias existentes entre los conjuntos de elementos. El primer conglomerado de estos está dividido en dos subgrupos de elementos. El primer subgrupo del conglomerado A muestra una cercanía entre los receptores Fas y TRAIL-R2, esta estrecha relación sugiere que los mecanismos extrínsecos de apoptosis en estos gametos no se encuentran afectados, a esta similitud, precisa cercanía fue determinada para los receptores VEGF-R1 y TRAIL-R1 que a su vez pueden estar implicados en la inducción de la activación y/o migración espermática. En el otro subgrupo, las variables con carácter clínico como la edad y motilidad son agrupadas, lo que indica la existencia de independencia entre los subgrupos de elementos. El conglomerado B que fue constituido por la expresión de las moléculas de superficie de TRAIL-R1, TRAIL-R2, Fas, VEGF-R1/Flt-1 y Anexina V alude una relación no cercana con el porcentaje de espermatozoides positivos a esos receptores. Ambos métodos estadísticos, ACP y conglomerados jerárquicos, coinciden en la separación de los gametos con fenotipo Fas+, TRAIL-R2+ y VEGF-R1/Flt-1+.

Las variables que representan a la condición clínica normozoospermia fueron agrupadas en 3 conglomerados. La presencia de dos subgrupos fue observada para el primer conglomerado (A), el primero recluta a los biomarcadores Fas y TRAIL-R1 mientras que el receptor VEGFR-1/Flt-1 muestra cercanía a la conjunción anterior. El segundo subgrupo, incorpora a anexina V y TRAIL-R2. Por otro lado, el conglomerado B también es subdividido en dos grupos, uno que revela la similitud entre la baja intensidad fluorescente de anexina V y TRAIL-R2 y otro integrado por la proximidad de las variables Fas IFM y TRAIL-R1 IFM. Un nivel menor de separación la baja intensidad fluorescente de VEGFR-1/Flt-1 fue también identificada. El tercer conglomerado agrupa a las variables clínicas edad y motilidad. Esta separación permitió ampliar el panorama visual acerca de la relación que existe entre las variables que conforman el fenotipo espermático aquí propuesto para los hombres con normozoospermia que no fue posible visualizar mediante el ACP.

La agrupación de variables para los espermatozoides provenientes de pacientes astenozoospermicos fue observada en 3 conglomerados. La similitud entre Fas y TRAIL-R2 fue representada por el primer conglomerado (A). Un segundo conglomerado (B) fue conformado por la baja movilidad en tanto que el conglomerado C incorporó a la baja expresión de la intensidad de fluorescencia de los biomarcadores Fas, TRAIL-R1, VEGFR-1/Flt-1, TRAIL-R2 y anexina V, así como de la variable edad avanzada. A diferencia del ACP con conglomerados jerárquicos se pudo evidenciar la separación entre los porcentajes de gametos positivos y la expresión de receptores de superficie de membrana espermática.

En los dos métodos de separación la viabilidad de los espermatozoides postgradiente tiende a disminuir en comparación con la muerte en fresco, esto podría estar sucediendo ya que en fresco la muestra se encuentra aun con los amortiguadores naturales contenidos en el semen, sin embargo, en las muestras posteriores al gradiente de separación nos hemos desecho de estos amortiguadores y solo tiene los que son aportados por el medio de cultivo utilizado para la resuspensión del botón celular.

Said y cols. en el 2008 reportó que espermatozoides no apoptóticos obtenidos por MACS muestran una mayor calidad en términos de parámetros de rutina y esta calidad está representada por un mayor potencial de penetración de ovocitos y tasas de criosupervivencia⁴⁰, sin embargo, nuestros resultados muestran que con las dos técnicas de separación, ya sea con MACS en la técnica convencional o MACS con el coctel de anticuerpos, la movilidad es uno de los parámetros que se ve afectado, ya que la movilidad va disminuyendo con el transcurso del tiempo. Al ser sometida la muestra al protocolo de MACS con el coctel de anticuerpos la complejidad del procedimiento aumenta por tanto el tiempo que se necesita para procesar la muestra es mayor que con el protocolo estándar, además, el número de lavados y centrifugación de la muestra es mayor, lo cual afecta y se refleja en la pérdida celular^{40,126,127,128}. Resultados similares han sido reportados por otros grupos de investigación tanto para la movilidad, morfología y la viabilidad en la fracción positiva a Anexina^{24,129,130,131}. Lo cual es apoyado por la correlación entre activación de caspasa-3 y cambios mitocondriales típicos de la apoptosis^{132,133,134,135}.

Se ha reportado que la separación magnética conduce a una mejora en la calidad y funcionalidad del espermatozoides^{136,40,137,138} debido a que MACS-Anexina V afecta positivamente la motilidad y viabilidad de los espermatozoides y la morfología según lo determinado por el índice de deformidad espermática. Los resultados de nuestros experimentos muestran relativo incremento de motilidad espermática en los gametos seleccionados por el método convencional en contraste con los obtenidos por el coctel de anticuerpos. Aunque, la viabilidad de los gametos presentes en la fracción negativa de ambos métodos de separación no muestra diferencia significativa.

El sistema MACS-Anexina V es un método eficiente que reduce los niveles de fragmentación del ADN espermático de las muestras de eyaculado mostrando una mejora en parámetros de rutina como la movilidad, viabilidad y morfología^{130,138,139,140,141,142,143} y separa eficazmente los espermatozoides apoptóticos de los no apoptóticos. Previos reportes en semen de pacientes astenozoospermicos con el uso de microesferas conjugadas con anexina V mostraron una separación entre el 5.8% al 10% de gametos apoptóticos en la fracción negativa^{142,144}. Nuestros resultados

demuestran diferencias estadísticas significativas en los niveles de fragmentación espermática entre el método de coctel de anticuerpos y el método convencional, mostrando niveles más bajos de ADN fragmentado en espermatozoides obtenidos por MACS Coctel. Sin modificación de los niveles de fragmentación como consecuencia de los grupos de clasificación de donadores fértiles, y pacientes normozoospermicos y astenozoospermicos resultado del análisis estadístico.

La fragmentación del ADN consiste en interrupciones en las cadenas simples o dobles y es particularmente frecuente en hombres con infertilidad. La transferencia del ADN espermático integro al óvulo es esencial para conseguir una fecundación exitosa gracias a sus características de condensación, insolubilidad y alta organización. Sin embargo, la ruptura del ADN podría llevar a alteraciones en la fertilización, en el desarrollo embrionario y fetal e incluso puede afectar la salud del producto y se ha reportado que puede ser resultado de un proceso de apoptosis abortiva, así como del estrés oxidativo producido por la célula^{145,146,147,148}.

Se ha observado que altos niveles de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) alteran la movilidad y la morfología espermática, provocando fragmentación del ADN que puede acelerar el proceso de apoptosis de las células germinales, disminuyendo la concentración espermática y con este el consecuente deterioro de la calidad seminal¹⁴⁹. Esto se relaciona con los resultados obtenidos, ya que las muestras de pacientes con baja movilidad espermática muestran niveles más altos de fragmentación del ADN postgradientes.

Diversos estudios han señalado que, aunque el ovocito tiene la capacidad de reparar el daño en el ADN espermático en un primer estadio, cuando la fragmentación del ADN es de cadena doble no hay maquinaria que pueda revertir ese daño, además de depender de la calidad genómica y citoplasmática del ovocito, por lo que se tienen efectos negativos en el desarrollo^{146,150,151}.

Comhairea y cols. en el 2018¹⁵² describieron un modelo matemático de regresión logística que predice el resultado individual de la FIV (Fecundación In Vitro) en 38 parejas infértiles aleatorias, mediante la evaluación de parámetros de rutina del semen y de la valoración del estrés oxidativo y la fragmentación de ADN del

espermatozoide, donde los resultados de estas dos últimas pruebas se asociaron significativamente con la ocurrencia del embarazo, mientras que ni las características del semen convencional, ni el resultado de varias otras pruebas estaban significativamente relacionados ($p > 0.05$). Por lo cual proponen que la fragmentación del ADN espermático determina en gran medida el éxito de la FIV.

El estrés oxidativo es de suma importancia ya que nos habla de un desequilibrio entre la producción de radicales libres y la capacidad del organismo para contrarrestar sus posibles efectos negativos. Esta alteración en el estado REDOX normal de las células puede causar toxicidad celular inducida directamente por el oxígeno activo o sus derivados, las cuales si no son contrarrestados por antioxidantes generan daños a nivel de proteínas, lípidos de membrana y cadena de ADN, tanto nuclear como mitocondrial^{146,153}.

Calull-Bagó y colaboradores en 2017¹⁵⁶ realizaron un análisis donde reportan una relación entre parámetros seminales alterados y su asociación con la fragmentación del ADN espermático. Evaluaron la fragmentación del ADN por Halosperm®, considerando una fragmentación normal a los casos con índice de fragmentación menor de 15%, fragmentación moderada cuando el índice de fragmentación fue de 15 a 30% y fragmentación crítica cuando el índice de fragmentación fue mayor de 30%. Posterior a su análisis de varianza ANOVA observaron una diferencia significativa en la concentración, movilidad progresiva, viabilidad, morfología normal y el total de parámetros alterados, observando una estrecha relación entre el porcentaje de espermatozoides progresivos y el porcentaje de espermatozoides viables¹⁵⁶, lo cual coincide con los resultados obtenidos por nuestro grupo de investigación donde observamos que en pacientes con astenozoospermia, es decir pacientes que tuvieron una movilidad progresiva menor al 32%, la fragmentación de ADN fue de 42.5% en comparación con el 19.36% de fragmentación observada para el grupo de pacientes normozoospermicos.

Además, Calull Bagó y colaboradores¹⁵⁶ en este mismo estudio no observaron diferencias significativas para los parámetros de volumen, leucocitos y los días de abstinencia. Además, según la estimación de riesgo (OR) la probabilidad de

encontrar fragmentación en los pacientes con astenozoospermia es 8 veces mayor (OR=8.0) que en los pacientes sin astenozoospermia además es 26 veces mayor cuando el tipo de fragmentación es crítica (OR=26.2); reportaron también que conforme los pacientes tuvieron mayor número de alteraciones en el seminograma, el índice de fragmentación se incrementó. En el mismo estudio también analizaron los resultados del índice de fragmentación del ADN cuando los pacientes no tuvieron ninguna alteración en el seminograma; es decir, pacientes con esperma normal, los cuales se consideran como pacientes normozoospermicos, en los cuales encontraron que la media de fragmentación fue del 10% \pm 4.9%. Estos resultados contribuyen a conocer la importancia de evaluar la fragmentación del ADN y, por tanto, la importancia de utilizar técnicas que ayuden a mejorar estos índices de fragmentación del ADN espermático, con el objetivo de mejorar las bajas tasas de fertilización,^{157,158,159} de desarrollo embrionario,^{158,159} de implantación^{162,163,164,165} las bajas tasas de embarazo^{158,164,167} y las elevadas tasas de abortos y anomalías congénitas.^{162,163,166,167}

Tal y como lo observaron distintos autores^{168,169,170,171,172,173}, Gongora y cols. en el 2014¹⁶⁷ obtuvieron resultados similares a los reportados por Calull-Bagó y cols.¹⁵⁵ al correlacionar el porcentaje de fragmentación del ADN espermático con el diagnóstico de infertilidad; Observaron que los resultados del índice de fragmentación del ADN variaron según el diagnóstico y se evidencio un aumento significativo cuando aumentaban las anomalías de los parámetros de la espermatobioscopía encontrando una relación significativa con el aumento en las anomalías morfológicas y la disminución en la movilidad espermática¹⁶.

Una de las causas de esta fragmentación elevada del ADN es el aumento desproporcionado de la formación de radicales libres los cuales alteran el ambiente testicular, provocando que los procesos de apoptosis normales se disminuyan, dejando así células inmaduras y con alteraciones, lo cual repercute en un abaja calidad del eyaculado¹⁷⁴. La severidad de las consecuencias de esta fragmentación en el ADN espermático se basa en el tipo de rotura, es decir, si es de cadena sencilla o doble, así como del lugar donde se dio, ya que puede involucrar información de

genes vitales, lo cual puede afectar diferentes procesos tales como la fertilización o provocar daños congénitos en el feto¹⁶⁷.

Funcionalidad de las células separadas por MACS

Para el éxito en la fertilización es necesario que se lleven a cabo diferentes procesos tales como cambios biomecánicos y bioquímicos para que pueda atravesar el oviducto y alcanzar el complejo cumulus-ovocito¹⁸².

Además de las características macroscópicas y microscópicas del espermatozoide existen procesos que son indispensables para la fecundación y que se generan mediante el reconocimiento de inductores adecuados tal es el caso del proceso conocido como reacción acrosomal, donde se presenta una exocitosis regulada en gran parte por el calcio Ca^{2+25} . Los cuales provocan la fusión de la membrana citoplasmática con la membrana acrosomal externa en la zona apical de la cabeza espermática originando la liberación de las enzimas almacenadas en el acrosoma y la exposición de la membrana acrosomal interna¹⁷⁶. La importancia de la reacción acrosomal es la liberación de las enzimas hidrolíticas que son requeridas para el reconocimiento de la zona pelúcida y su posterior penetración; este proceso se desencadena luego que el espermatozoide entra en contacto con una serie de moléculas presentes en la zona pelúcida, lo cual permite el reconocimiento específico entre el espermatozoide y el ovocito¹⁷⁵. Para el reconocimiento de las células que tienen la capacidad de activar dicha maquinaria, lo cual proporciona información sobre la funcionalidad de la célula, se lleva a cabo el reconocimiento de algunas lectinas tales como PSA (Pisum sativum) y PNA (Arachis hypogae). En particular PSA se utiliza para el reconocimiento de los residuos de manosa y N-acetil glucosamina presentes en la membrana acrosomal interna del espermatozoide una vez que ha llevado a cabo la reacción acrosomal.

Cardona y Cadavid en 2005¹⁷⁶ describieron al receptor de manosa y al de N-acetil glucosamina, que en general participan en la interacción intergametos en humanos y menciona que su distribución topográfica en espermatozoides humanos está

fuertemente correlacionada con el estado del acrosoma; luego que el espermatozoide sufre la reacción acrosomal, por su parte, el receptor de manosa se desplaza a la región ecuatorial simultáneamente con la liberación del contenido del acrosoma para permitir la fusión de la membrana plasmática del espermatozoide con la membrana plasmática del ovocito^{177,178}. En 1995 se reportó que la N-acetil glucosamina inducía la reacción acrosomal en espermatozoides humanos a través de mecanismos similares a los descritos en la inducción de esta reacción por la zona pelúcida, además se correlacionó con la fertilización *in vitro*^{179,180}. Los reportes sugieren que la reacción acrosomal inducida por la N-acetil glucosamina y por la zona pelúcida comparten muchas características. La participación de los residuos de N-acetil glucosamina de la zona pelúcida en la interacción espermatozoide-ovocito en humanos podría ser sustentada en ensayos donde se trataron los ovocitos con N-acetilglucosaminidasas y se bloqueó la capacidad de unión de los espermatozoides, lo que sugiere la presencia de sitios de unión de N-acetil glucosamina en el espermatozoide¹⁸¹.

Con base en lo reportado, la detección de la función del acrosoma proporciona información sobre la capacidad de fertilización de los espermatozoides, y por lo tanto se considera una herramienta de diagnóstico útil para la infertilidad masculina¹⁸¹.

Los resultados obtenidos del ensayo de reacción acrosomal por medio de *Pisum sativum* conjugado con isotiocianato de fluoresceína agglutim (FITC-PSA) muestran que para los tres grupos estudiados (donadores fértiles y pacientes con infertilidad; normozoospermicos y astenozoospermicos) es igual de efectiva la separación por MACS coctel reportando un porcentaje de espermatozoides que sufrieron reacción acrosomal por arriba del 97%, lo cual confirma los resultados obtenidos de fragmentación, ya que quiere decir que una vez que la muestra es separada por MACS anticuerpos la posibilidad de tomar un espermatozoide que tenga un alto potencial de fertilizar para alguna TRA es de más del 97%.

De acuerdo con los resultados obtenidos de la prueba de PSA-FICT podemos decir que la separación por columnas magnéticas con la implementación del Coctel de anticuerpos proporciona una muestra espermática con una buena proporción de

espermatozoides con la capacidad funcional de realizar reacción acrosómica, lo cual nos habla de una buena capacidad fertilizante.

En cuanto a la proporción de espermatozoides que no sufrieron reacción acrosomal nos habla de espermatozoides que no tenían una integridad acrosomal, es decir que, probablemente presentaron defectos estructurales y funcionales en el acrosoma, los cuales no son eliminados por la técnica de separación con MACS¹⁸¹.

En la bibliografía no existen reportes sobre la evaluación de la funcionalidad en cuanto a la capacidad del espermatozoide de realizar la reacción acrosomal posterior a la técnica de separación por columnas magnéticas MACS con la técnica estándar que considera solo a Anexina V, por lo cual nuestros resultados preliminares podrían ser útiles para conocer el estado funcional de los espermatozoides obtenidos con la técnica propuesta.

Una espermiogénesis ineficaz provoca que en el semen existan subpoblaciones espermáticas inmaduras las cuales, producen radicales libres que en mayor o menor grado pueden inducir daño iatrogénico durante la preparación del semen. Esto podría conllevar a la permeabilización de la membrana plasmática (con la consiguiente necroastenozoospermia), daño del cromosoma, daño de centriolos, daño de fosfolipasa Czeta (que es el factor de activación de ovocito) y fragmentación de DNA. Este tipo de daño es lo que se conoce como disfunción espermática iatrogénica y se ha recomendado que para disminuir el daño se utilicen métodos de preparación del semen entre los que se incluye el swim-up directo, ciertos métodos de adherencia y los gradientes de densidad.¹²⁶ Otro de los daños también reportados es la disminución en el Potencial de Membrana Mitocondrial (MMP), Folgero y cols en 1993 realizaron análisis por microscopia electrónica de espermatozoides de un paciente con enfermedad mitocondrial, el cual reveló mitocondrias con matriz aumentada, engrosamiento de membranas, paralelización de cristales e inclusiones lipídicas, los cuales son hallazgos característicos en los trastornos mitocondriales. En ese mismo estudio también encontraron mitocondrias anormales en una espermátida, sugiriendo que los cambios ultraestructurales de las mitocondrias son primarios y pueden darse durante la espermatogénesis y no secundarios a la

degeneración del espermatozoide. Por lo tanto, la disfunción mitocondrial causa movilidad baja de los espermatozoides en algunos hombres (astenozoospermia) debido a la caída en la generación de ATP¹⁸⁵.

Las causas se conocen en menos de la mitad de estos casos, de los cuales la enfermedad genética o hereditaria y las anomalías específicas a nivel cromosómico son factores importantes. Los ataques sobre el ADN mitocondrial (ADNmt) de los espermatozoides por especies reactivas de oxígeno o radicales libres inevitablemente causarán daño oxidativo y/o mutación al genoma mitocondrial con consecuencias patológicas, las cuales pueden conducir a la infertilidad en los hombres. La enzima nuclear clave involucrada en el alargamiento y reparación de las cadenas de ADNmt es la ADN polimerasa gamma, asignada al brazo largo del cromosoma 15 (15q25) e incluye una región de repetición CAG. Su mutación afecta la producción de trifosfato de adenosina, por tanto, una alteración genética en dicho cromosoma se verá relacionado con alteraciones en el ADNmt y por tanto en la funcionalidad de la mitocondria que afectará a su vez la producción energética para la movilidad del espermatozoide¹⁸⁶.

Se sabe que el cambio en el potencial de membrana mitocondrial, ($\Delta\psi M$), es un parámetro importante de la función mitocondrial que se ha utilizado como indicador de la salud de las células. JC-1 es un colorante que puede entrar selectivamente en las mitocondrias y reversiblemente cambiar de color de verde a rojo con el aumento potencial de la membrana. En las células sanas con alto potencial mitocondrial ($\Delta\psi M$), JC-1 forma espontáneamente complejos conocidos como J-agregados con fluorescencia roja intensa. Por otra parte, en células apoptóticas o no saludables con bajo ($\Delta\psi M$), JC-1 permanece en la forma monomérica, que muestra sólo una fluorescencia verde. Por tanto, nuestros resultados muestran las proporciones de célula que expresaron JC-1 como agregado y la proporción de JC-1 monomérico¹⁸⁹.

Una característica distintiva de las primeras etapas de la muerte celular programada es la interrupción de las mitocondrias activas. Esta alteración mitocondrial incluye cambios en el potencial de membrana y alteraciones en el potencial de oxidación-reducción de las mitocondrias. Estos cambios son resultado de la apertura del poro

de transición de permeabilidad mitocondrial (MPTP), lo que permite el paso de iones y moléculas pequeñas. El equilibrio resultante de iones conduce a su vez al desacoplamiento de la cadena respiratoria y la liberación del citocromo c en el citosol¹⁸⁹.

El potencial de fertilización de los espermatozoides humanos necesita de varios atributos y funciones, así como parámetros como la movilidad y morfología espermática los cuales son considerados críticos para la calidad del espermática. El estatus energético del espermatozoide es proporcionado por la mitocondria y el potencial de membrana de esta. Gallon y cols. en 2006 observaron que los espermatozoides altamente móviles tienen un MMP más alto y generalmente son morfológicamente normales, además pueden sufrir una reacción acrosomal invariablemente¹⁸³. Lo que encontramos es que efectivamente, una espermatozoide con un MMP alto, puede también realizar adecuadamente la reacción acrosomal, ya que observamos que el porcentaje de espermatozoides que sufrieron reacción acrosomal ($98\pm 2\%$) se relaciona con el porcentaje de espermatozoides con alto MMP ($99\pm 0.7\%$), en muestras de la fracción negativa obtenidas posterior a la separación por MACS coctel de donadores fértiles, pacientes normozoospermicos y astenozoospermicos, lo cual confirma la efectividad del método de separación por columnas magnéticas para obtener espermatozoides con un alto potencial de fertilización. Cabe mencionar que el porcentaje de espermatozoides con MMP bajo en la fracción positiva obtenida posterior a la separación por MACS COCTEL es del 48.3%.

Agnihotri y cols. en el 2016 observaron que pacientes con infertilidad y movilidad espermática baja tienen un bajo MMP comparado con individuos sanos. Este grupo sometió muestras espermáticas humanas a espermicidas reduciendo drásticamente su movilidad y observaron que su potencial mitocondrial disminuyó significativamente. Por lo cual consideran que el MMP puede ser considerado un regulador e indicador potencial de la movilidad espermática y por supuesto estar directamente relacionado con la fertilidad masculina¹⁸⁴. Los resultados obtenidos por medio de la utilización de la sonda JC-1 indican que a pesar de que los

espermatozoides de pacientes astenozoopérmicos puedan haber sufrido una alteración en la mitocondria por efecto de la apoptosis abortiva, la técnica de separación por MACS además de separar espermatozoides apoptóticos de los no apoptóticos, dentro de la población de espermatozoides no apoptóticos asegura características funcionales tales como un alto potencial de membrana mitocondrial, lo cual contribuye al éxito en la fertilización.

También se ha reportado que existe una correlación significativa entre el conteo de espermatozoides y la morfología normal con el MMP, así como la movilidad espermática. Además, se ha reportado que los hombres con una fragmentación del ADN por debajo de los valores de corte (15%) tiene un mayor MMP, en comparación con los que tienen valores por encima de este valor, y que muestran aproximadamente cinco veces más probabilidades de concepción natural. Por lo tanto, el MMP es indicativo del potencial fértil del espermatozoide^{184,187,188}.

Barroso y cols. en 2006 reportaron la correlación de la translocación PS de la membrana plasmática y la pérdida del potencial de membrana mitocondrial, lo cual, sugiere un fenotipo de apoptosis temprana, como se observa típicamente en las células somáticas identificadas en subpoblaciones de esperma con porcentaje de células con baja movilidad y especulan que tales cambios podrían ser utilizados como marcadores de diagnóstico de disfunción o disfunciones en el espermatozoide y que los niveles altos de pérdida de MMP encontrados en hombres subfértiles podrían ser indicadores de potencial de fertilidad reducido¹⁸⁷.

Microperlas coloidales super-paramagnéticas (~ 50 nm de diámetro) conjugadas con anexina V a PS se usan para separar espermatozoides muertos y apoptóticos mediante la clasificación de células magnéticas (MACS)⁴⁰. Las células con fosfatidilserina en la membrana externa se unen a estas microperlas, mientras que las células no apoptóticas con las membranas intactas no se unen y podrían usarse durante los TRA, sin embargo, al detectar un proceso de apoptosis temprana, las células tendrán una apoptosis de una forma tardía, aun permanecerían en el eyaculado, limitante que podría ser abolida al implementar la separación por un coctel de marcadores como los propuestos, constituidos por TRAIL-R1, TRAIL-R2,

VEGF-R1., Fas y Anexina V, para eliminar espermatozoides y diferentes fases de apoptosis, según los resultados obtenidos, esta técnica es más eficiente para separar espermatozoides apoptóticos de los no apoptóticos.

L.CONCLUSIÓN

Los datos presentados indican que entre la población de espermatozoides eyaculados existen algunas subpoblaciones de gametos que presentan patrones fenotípicamente diferentes y que fueron reconocidos por un enfoque bioinformático. Esto permitió la clasificación de sujetos fértiles con base en los perfiles citométricos de espermatozoides positivos a Fas, TRAIL- R2 y VEGFR-1 con alta intensidad fluorescente de VEGFR-1 y Fas.

Se determinaron dos fenotipos diferentes de espermatozoides: Fas⁺TRAIL-R1⁺VEGF-R1/Flt-1⁺ y gametos anexina V⁺TRAIL-R2⁺ que son propios de los pacientes infértiles normozoospermicos.

El fenotipo de espermatozoides Fas⁺VEGF-R1/Flt-1⁺TRAIL-R1⁺TRAIL-R2⁺anexina V⁺ con baja motilidad es característico de los pacientes infértiles astenozoospermicos.

Se determinó un decremento de la intensidad de fluorescencia media y baja de expresión de las moléculas TRAIL-R1, TRAIL-R2, Fas, VEGF-R1/Flt-1 y anexina V en la membrana plasmática de los espermatozoides de los pacientes infértiles en contraste con donadores fértiles.

Los receptores TRAIL-R1, TRAIL-R2, Fas, VEGF-R1/Flt-1 fueron inmunolocalizados en la membrana plasmática de los espermatozoides en la región de la pieza media y flagelo a excepción de la proteína anexina V que solo se localizó en la pieza media.

Se demostró la presencia de los receptores apoptóticos propuestos en pacientes fértiles e infértiles (normozoospermicos y astenozoospermicos); se determinó la localización de los receptores en la membrana del espermatozoide, principalmente en el flagelo (TRAIL-R1, TRAIL-R2, VEGFR-1 y Fas) y pieza media (Anexina V).

Encontramos una intensidad de florescencia para cada receptor mayor en los donadores fértiles que en los pacientes infértiles, lo que nos sugiere que

probablemente la apoptosis en el espermatozoide tenga que ser inducida por la concentración de receptores en membrana, por tanto, al ser baja la cantidad de estos, la intensidad de la señal se considera débil y por eso escapan al mecanismo de eliminación, sufriendo así de una apoptosis abortiva.

Cada subpoblación espermática expresa diferencias fenotípicas entre las muestras seminales de acuerdo con la condición del paciente, lo que permitirá dar un mejor tratamiento a la muestra dependiendo de estas características fenotípicas.

MACS con el coctel de anticuerpos es eficiente para eliminar las células apoptóticas de las no apoptóticas en comparación con la técnica estándar, células que posteriormente pueden ser utilizadas para TRA.

La combinación de MACS con centrifugación en gradiente de doble densidad produce una población limpia de esperma caracterizada por una mayor movilidad, viabilidad y morfología. Además, los espermatozoides preparados por MACS muestran manifestaciones de apoptosis reducidas, incluida la fragmentación del ADN. En este contexto, MACS puede considerarse una técnica de preparación molecular única que complementa los protocolos convencionales de preparación de muestras de espermatozoides.

M.BIBLIOGRAFÍA

- 1.WHO. 2010. Laboratory Manual for the Examination and processing of Human semen, 5 ed. World Health Organization. Disponible en: http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241547789_eng.pdf. Revisado en octubre del 2017.
- 2.Tournaye, H. 2006. Evidence-based management of male subfertility *Curr Opin Obstet Gynecol*; 18: 253-259.
- 3.Aitken, R. J. y Krausz, C. 2001. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction*; 122(4): 497-506.
- 4.Kocak, I., Dundar, M., Hekimgil, M., Okyay, P. 2002. Assessment of germ cell apoptosis in cryptorchid rats. *Asian J Androl*;4(3):183-186.
- 5.Moreno, R.D., Lizama, C., Urzúa, N., Vergara, S. P., Reyes, J. G. 2006. *Cell Tissue Res. Sep*;325(3): 533-540.
- 6.Rodriguez, I., Ody C., Araki, K., Garcia, I., Vassalli, P. 1997. An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis. *EMBO J.*; 16(9): 2262-2270.
- 7.Wang, Z. Q., Todani, T., Watanabe Y., Toki, A., Ogura, K., Miyamoto, O., Toyoshima, T. y Itano, T. 1998. Germ-cell degeneration in experimental unilateral cryptorchidism: role of apoptosis. *Pediatr Surg Int*; 14(1-2): 9-13.
- 8.Bantel, H., Brüning, T. y Schulze-Osthoff, K. 1998. Activation of caspases by death receptors. *Eur Cytokine Netw*; 9(4): 681-684.
- 9.Barroso, G., Morshedi, M. y Oehninger, S. 2000. Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human sperm. *Hum Reprod*; 15: 1338-1344.
- 10.Gandini, L., Lombardo, F., Paoli, D., Caponecchia, L., Familiari, G., Verlengia, C., Dondero, F. y Lenzi, A. 2000. Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod*; 15(4): 830-839.
- 11.Oosterhuis, G. J., Mulder, A. B., Kalsbeek-Batenburg, E., Lambalk, C. B., Schoemaker, J. y Vermes I. 2000. Measuring apoptosis in human spermatozoa: a biological assay for semen quality? *Fertil Steril*; 74(2): 245-250.

12. Ricci, G., Perticarari, S., Fragonas, E., Giolo, E., Canova, S., Pozzobon, C., Guaschino, S. y Presani, G. 2002. Apoptosis in human sperm: its correlation with semen quality and the presence of leukocytes. *Hum Reprod*; 17(10): 2665-2672.
13. Tesarik, J., Greco, E. y Mendoza, C. Assisted reproduction with in-vitro-cultured testicular spermatozoa in cases of severe germ cell apoptosis: a pilot study. *Hum Reprod*; 16(12): 2640-2645.
14. Sakkas, D., Mariethoz, E. y St John, J. C. 1999. Abnormal sperm parameters in humans are indicative of an abortive apoptotic mechanism linked to the Fas-mediated pathway. *Exp Cell Res* 251: 350–355.
15. Lachaud, C., Tesarik, J., Cañadas, M. L. y Mendoza, C. 2004. Apoptosis and necrosis in human ejaculated spermatozoa. *Hum Reprod*; 19(3): 607-610.
16. Greco, E., Scarselli, F., Iacobelli, M., Rienzi, L., Ubaldi, F., Ferrero, S., Franco, G., Anniballo, N., Mendoza, C., Tesarik, J. 2005. Efficient treatment of infertility due to sperm DNA damage by ICSI with testicular spermatozoa. *Hum Reprod*; 20(1):226-30.
17. Nadalini, M., Tarozzi, N., Di Santo, M. y Borini, A. 2014. Annexin V magnetic-activated cell sorting versus swim-up for the selection of human sperm in ART: is the new approach better than the traditional one? *J Assist Reprod Genet* 31: 1045–1051.
18. Brugo, S., Chillik, C. y Kopelman, S. 2003. Definición y causas de la infertilidad. *Rev Col Obst Ginecol*; 54: 227-248.
19. Ishihara, O., Adamson, G. D., Dyer, S., de Mouzon, J., Nygren, K. G., Sullivan, E. A., Zegers, H. F. y Mansour, R. 2015. International committee for monitoring assisted reproductive technologies: world report on assisted reproductive technologies. *Fertil Steril* 103(402–13), e11.
20. Silva J. V., Cruz D., Gomes M., Correia B. R., Freitas M. J., Sousa L., Silva V. y Fardilha M. 2017. Study on the short-term effects of increased alcohol and cigarette consumption in healthy young men's seminal quality. *Sci Rep*; 7: 454-457.

21. Sofikitis N., Miyagawa I., Dimitriadis D., Zavos P., Sikka S. y Hellstrom W. 1995. Effects of smoking on testicular function, semen quality and sperm fertilizing capacity. *The Journal of urology*; 154(3): 1030-1034.
22. Condorelli R. A., Russo G. I., Calogero A. E., Morgia G., La Vignera S. 2017. Chronic prostatitis and its detrimental impact on sperm parameters: a systematic review and meta-analysis. *J Endocrinol Invest*; 40(11):1209-1218.
23. Gal I., López M., Martín A. y Prieto J. 2007. *Bases de la Fisiología*. 2da ed. Editorial Tebar. Madrid, España. Págs. 468-473.
24. Aziz N. y Agarwal A. 2008. Evaluation of sperm damage: beyond the World Health Organization criteria. *Fertil Steril*; 90:484-485.
25. Arenas E., Cambrón A., Ambríz D., Zúñiga P. J., Rodríguez A. y Rosado A. 2010. Bases fisiológicas de la capacitación y la reacción acrosomal del espermatozoide. *Contactos*; 78:5-11.
26. Kretser D., Loveland K., Meinhardt A. Simorangkir D. y Wreford N. 1998. Spermatogenesis. *Hum Reprod*; 13:1-8.
27. Brohi R. D. y Huo Li-Jun. 2017. Posttranslational Modifications in Spermatozoa and Effects on Male Fertility and Sperm Viability. *Journal of Integrative Biology*; 21(5): 245-256.
28. Holstein et al., 2003. Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. *Reprod Biol Endocrinol*; 1:107.
29. Uribe P., Villegas J. V., Boguen R., Treulen F., Sánchez R., Mallmann P., Isachenko V., Rahimi G. y Isachenko E. 2017. Use of the fluorescent dye tetramethylrhodamine methyl ester perchlorate for mitochondrial membrane potential assessment in human spermatozoa, *Andrologia*; e12753.
30. Yuxi C., Puping L., Yan H., Minyan L., Xiya Z., Chenhui D., Junyan F., Zhen Z., Xueqing Z., Yuanzhu G., Qinfeng Z., Shanbo C., Haiyan Z., Dan L., Zhou O. y Junjiu H. 2017. Glycerol kinase-like proteins cooperate with Pld6 in regulating sperm mitochondrial sheath formation and male fertility. *Cell Discovery*; 3, 17030.
31. Elmore S. 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol*; 35(4): 495–516.

32. Instituto Nacional del Cáncer NCI. April 5, 2016. [Fecha de consulta: 12 de junio del 2017 a las 10:14]. Disponible en: <https://www.cancer.gov/>.
33. Lee, J., Richburg, J. H., Younkin, S. C. y Boekelheide K. 1997. The fas system is a key regulator of germ cell apoptosis in the testis. *Endocrinology*;138: 2081–2088.
34. Shaha C., Tripathi R. y Durga M. 2010. Male germ cell apoptosis: regulation and biology. *Phil Trans R So*; 365: 1501-1515.
35. Lagos R. 2013. Los plasticidas bisfenol-A y nonilfenol inducen apoptosis de células germinales durante la espermatogénesis a través de un mecanismo dependiente de la ADAM 17. Tesis Doctoral. Pontificia Universidad Católica de Chile. Facultad de Ciencias Biológicas. Chile. 134.
36. Iyibozkurt A. C., Balcik P., Bulgurcuoglu S., Arslan B., Attar R. y Attar E. 2009. Effect of vascular endothelial growth factor on sperm motility and survival. *Reprod Health Care*; 19(6): 784-788.
37. Huszar G., Sbracia M., Vigue L., Miller D. J. y Shur B. D. 1997. Sperm plasma membrane remodelling during spermiogenetic maturation in men: relationship among plasma membrane beta 1,4-galactosyltransferase, cytoplasmic creatine phosphokinase, and creatine phosphokinase isoform ratios. *Biology of Reproduction* 56 1020–1024.
38. Martínez, M. 2015. Evaluación de la expresión de los receptores apoptóticos, así como del factor de crecimiento derivado del endotelio vascular y la proteína reguladora del influjo de iones calcio Anexina V en los espermatozoides obtenidos de muestras seminales de pacientes infértiles (Tesis de Licenciatura). Instituto Politécnico Nacional. D. F., México.
39. Gorczyca W., Traganos F., Jesionowska H. y Darzynkiewicz Z. 1993. Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA in situ to denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells. *Exp Cell Res* 207, 202–205.
40. Said T. M., Agarwal A., Zborowski M., Grunewald S., Glander H. J. y Paasch U. 2008. Utility of magnetic cell separation as a molecular sperm preparation technique. *J Androl* 29, 134–142.

41. Martin S. J., Reutelingsperger C. P., McGahon A. J., Rader J. A., van Schie R. C., LaFace D. M. y Green D. R. 1995. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med* 182, 1545–1556.
42. Berteli T. S., Da Broi M. G., Martins W. P., Ferriani R. A. y Navarro P. A. 2017. Magnetic-activated cell sorting before density gradient centrifugation improves recovery of high-quality spermatozoa. *Andrology*; 5, 776–782.
43. Makar, R. S. y Toth, T. L. 2002. The evaluation of infertility. *American Journal of Clinical Pathology. Pathology Patterns Reviews*; 117(Suppl 1), S95-S103.
44. Barratt C.L., Mansell S., Beaton C., Tardif S. y Oxenham S.K. 2011. Diagnostic tools in male infertility: the question of sperm dysfunction. *Asian Journal of Andrology*; 13: 53–58.
45. Kumar D., Kalthur G., Mascarenhas C., Kumar P. y Adiga S. K. 2011. Ejaculated fractions of asthenozoospermic and teratozoospermic patients have differences in the sperm DNA integrity, *Andrologia*; 43:416-421.
46. Barroso G., Colín A., Morales M., Osuna M., Robledo G. y Ávila R. 2012. Efecto de la aplicación de columnas de anexina en los resultados reproductivos de parejas infértiles. *Ginecol Obstet Méx*; 80:16-21.
47. Lee T. H., Liu C. H., Shih Y. T., Tsao H. M., Huang C. C., Chen H. H. y Lee M.S. 2010. Magnetic-activated cell sorting for sperm preparation reduces spermatozoa with apoptotic markers and improves the acrosome reaction in couples with unexplained infertility. *Human reproduction*; 25: 839-846.
48. Sofiadis A., Becker S., Hellman U., Hultin-Rosenberg L., Dinets A., Hulchiy M., Zedenius J., Wallin G., Foukakis T., Höög A., Auer G., Lehtiö J. y Larsson C. 2012. Proteomic profiling of follicular and papillary thyroid tumors. *Eur J Endocrinol*; 166:657-667.
49. Ainsworth C., Nixon B., Aitken R. J. 2005. Development of a novel electrophoretic system for the isolation of human spermatozoa. *Hum Reprod*; 20(8):2261-70. Epub 2005 Apr 14.

50. Cakar Z., Cetinkaya B., Aras D., Koca B., Ozkavukcu S., Kaplanoglu I., Can A. y Cinar O. 2016. Does combining magnetic-activated cell sorting with density gradient or swim-up improve sperm selection? *J Assist Reprod Genet*; 33:1059–1065.
51. Xu Y., Xie J., Chen R., Cao Y., Ping Y., Xu Q., Hu W., Wu D., Gu L., Zhou H., Chen X., Zhao Z., Zhong J. y Li R. 2016. Fluorescence and magnetic activated cell sorting strategies to separate spermatozoa involving plural contributors from biological mixtures for human identification. *Scientific Reports*; 6:36515. DOI: 10.1038/srep36515.
52. Chi H. J., Kwak S. J., Kim S. G., Kim Y. Y., Park J. Y., Yoo C. S., Park I. H., Sun H. G., Kim J. W. y Lee K. H. 2016. Efficient isolation of sperm with high DNA integrity and stable chromatin packaging by a combination of density-gradient centrifugation and magnetic activated cell sorting. *Clin Exp Reprod Med*; 43(4):199-206.
53. Said T., Agarwal A., Grunewald S., Rasch M., Baumann T., Kriegel C., Li L., Glander H. J., Thomas A. J. y Paasch U. 2006. Selection of nonapoptotic spermatozoa as a new tool for enhancing assisted reproduction outcomes: an *in vitro* model. *Biol Reprod* 74, 530–537.
54. Nasr-Esfahani M. H., Deemeh M. R. y Tavalae M. 2012. New era in sperm selection for ICSI. *Int J Androl* 35, 475–484.
55. Sakkas D. 2013. Novel technologies for selecting the best sperm for in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 99, 1023–1029. *Sci Rep*; 7:45457.
56. McDowell S., Kroon B., Ford E., Hook Y., Glujovsky D. y Yazdani A. 2014. Advanced sperm selection techniques for assisted reproduction. *Cochrane Database Syst Rev* 10, CD010461.
57. Rappa K. L., Rodriguez H. F., Hakkarainen G. C., Anchan R. M., Mutter G. L. y Asghar W. 2016. Sperm processing for advanced reproductive technologies: ¿Where are we today? *Biotechnol Adv* 34: 578–587.

- 58.Sakkas D. y Alvarez J. G. 2010. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil Steril* 93, 1027–1036.
- 59.Nohales M., Remohi J., Pellicer A. y Garrido N. 2012. Factores moleculares de infertilidad en el espermatozoide más allá del Manual de la Organización Mundial de la Salud de 2010. *Rev Iberoam Fert Reprod Hum*; 29.
- 60.Esbert M., Godo A., Soares S. R., Florensa M., Amorós D., Ballesteros A. y Vidal F. 2017. Spermatozoa with numerical chromosomal abnormalities are more prone to be retained by Annexin V-MACS columns. *Andrology*; 5: 807–813.
- 61.Ahammad, M. U., Jarrell, Z. R. y Benson, A. P. 2018. Sperm Collection of Differential Quality Using Density Gradient Centrifugation. *J. Vis. Exp.* (141), e58833.
- 62.Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. y Randall R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*; 193 (1): 265-27
- 63.Parmegiani L., Cognigni G.E., Bernardi S., Troilo E., Ciampaglia W. y Filicori M. 2010. “Physiologic ICSI”: Hyaluronic acid (HA) favors selection of spermatozoa without DNA fragmentation and with normal nucleus, resulting in improvement of embryo quality. *Fertility and Sterility*; 93:598–604
- 64.Parmegiani L., Cognigni G.E., Ciampaglia W., Pocognoli P., Marchi F. y Filicori M. 2010. Efficiency of hyaluronic acid (HA) sperm selection. *J Assist Reprod Genet*; 27:13–16.
- 65.White H. B. y Merrill A. H. Jr. 1988. Riboflavin-binding proteins. *Annu Rev Nutr.* 8: 279-299.
- 66.Nagata, S., y Golstein, P. 1995. The Fas death factor. *Science*, 267(5203): 1449–1456.
- 67.Pentikäinen, V., Erkkilä, K. and Dunkel, L. 1999. Fas regulates germ cell apoptosis in the human testis in vitro. *Am J Physiol*;276(2 Pt 1): E310-316.
- 68.Benito-Martín, A., Uceró, C., Santamaría, B., Lorz, C., Kretzler, M., Rastaldi, M.P., Sánchez-Niño, M.D., Sanz, A., Izquierdo, M.C., Ruiz-Ortega, M., Egido,

- J. y Ortiz, A. 2009 La transcriptómica ilustra nuevas vías letales en la nefropatía diabética. *Nefrología*; 29:13-19.
69. Grataroli, R., Vindrieux, D., Selva, J., Felsenheld, C., Ruffion, A., Decaussin, M. y Benahmed, M. 2004. Characterization of tumour necrosis factor-alpha-related apoptosis-inducing ligand and its receptors in the adult human testis. *Mol. Hum. Reprod.*; 10(2):123-8.
70. Kruyt, F. A. E. 2008. TRAIL and cancer therapy. *Cancer Letters*, 263(1), 14–25.
71. Rosales, A. y Guzmán, A. 2011. Importancia del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y de sus receptores en el ciclo ovárico. *Rev Mex Ciencias Pecu*; 3:89-111.
72. Wood, J. 2000. Inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) as a novel approach for cancer therapy. *Medicina*; 60 (supl.II):41-47.
73. Pelusa, H., Valdés, M., Bearzotti, M., Svetaz, M., Daniele, S., Sjoberg, I., Fornasiero, L., Bottai, H., Almará, A., Ghersevich, S. y Musuruana, J. 2012. Anticuerpos anti-anexina V y otros marcadores de actividad antifosfolípida en mujeres abortadoras recurrentes con enfermedades autoinmunes. *Rev Arg Reumatol*; 23:16-24.
74. Koopman, G., Reutelingsperger, C.P., Kuijten, G.A., Keehnen, R.M., Pals, ST. y van Oers, M.H. 1994. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*; 84(5):1415-20.
75. Meers, P., Mealy, T. 1994. Phospholipid determinants for annexin V binding sites and the role of tryptophan 187. *Biochemistry*; 33(19):5829-37.
76. Perales, S. 2005. Proliferación y apoptosis en células de músculo liso arteriales en cultivo. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. Facultad de Ciencias. España. Pp 243.
77. Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H. y Reutelingsperger, C. 1995. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods*; 184(1):39-51.

- 78.Sofiadis, A., Becker, S., Hellman, U., Hultin-Rosenberg, L., Dinets, A., Hulchiy, M., Zedenius, J., Wallin, G., Foukakis, T., Höög, A., Auer, G., Lehtiö, J. y Larsson, C. Proteomic profiling of follicular and papillary thyroid tumors. *Eur J Endocrinol* 2012; 166:657-667.
- 79.Barroso, G., Colín, A., Morales, M., Osuna, M., Robledo, G. y Ávila, R. 2012. Efecto de la aplicación de columnas de anexina en los resultados reproductivos de parejas infértiles. *Ginecol Obstet Méx*; 80:16-21.
- 80.Gidon-Jeangirard C., Hugel B., Holl V., Toti F., Laplanche J.L., Meyer D., y Freyssinet J.M. 1999. Annexin V delays apoptosis while exerting an external constraint preventing the release of CD4+ and PrPc+ membrane particles in a human T lymphocyte Model *J Immunol*; 162:5712-5718.
- 81.Ichikawa K., Liu W., Fleck M., Zhang H., Zhao L., Ohtsuka T., Mountz J., Ohtsuki M., Koopman W., Kimberly R. y Zhou T. 2003. TRAIL-R2 (DR5) Mediates apoptosis of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis. *The Journal of Immunology*. 171(2):1061-1069.
- 82.Kaplan N., Riba R., Zacharoulis S., Bramley A., Vincent L., Costa C., MacDonald D., Jin D., Shido K., Kerns S., Zhu Z., Hicklin D., Wu Y., Port J., Altorki N., Port E., Ruggero D., Shmelkov S., Jensen K., Rafii S., y Lyden D. 2005. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche *Nature*. 438: 820-827.
- 83.MacFarlane M., Kohlhaas S., Sutcliffe M., Dyer M., y Cohen G. 2005. TRAIL receptor-selective mutants signal to apoptosis via TRAIL-R1 in primary lymphoid malignancies. *Cancer Res*. 65(24): 11265-11270.
- 84.Strasser A., Jost P., y Nagata S. 2009. The many roles of FAS receptor signaling in the immune system. *Immunity*. 30(2): 180–192
- 85.Tsuyuki S, Bertrand C, Erard F, Trifilieff A, Tsuyuki J, Wesp M, Anderson G P, y Coyle A J.1995. Activation of the Fas receptor on lung eosinophils leads to apoptosis and the resolution of eosinophilic inflammation of the airways. *J Clin Invest*. 96(6): 2924–2931.

86. Berman B., Sullivan T., De Araujo T. y Nadji M. 2003. Expression of Fas-receptor on basal cell carcinomas after treatment with imiquimod 5% cream or vehicle. *Brit J Dermatol.* 149:59–61.
87. Man X.Y., Yang X.H., Cai S.Q., Yao Y.G., y Zheng M. 2006. Immunolocalization and expression of Vascular Endothelial Growth Factor Receptors (VEGFRs) and Neuropilins (NRPs) on keratinocytes in Human Epidermis. *Mol Med.* 12 (7-8): 127-136.
88. Sträter J., Hinz U., Walczak H., Mechtersheimer G., Koretz K., Herfarth C., Möller P. y Lehnert T. 2002. Expression of TRAIL and TRAIL Receptors in Colon Carcinoma: TRAIL-R1 is an independent prognostic parameter. *Clin Cancer Res.* 8: 3734-3740.
89. Schinoni M.I. y Paraná R. 2006. Apoptosis y progresión de fibrosis hepática en enfermedades del hígado. *Acta Gastroenterol Latinoam.* 36: 211-217.
90. Corazza N., Brumatti G., Schaer C., Cima I., Wasem C. y Brunner T. 2004. TRAIL and immunity: more than a license to kill tumor cells. *Cell death and differentiation.* 11 Suppl 2S:122–125.
91. Lamhamedi-Cherradi S.E., Zheng S.J., Maguschak K.A., Peschon J. y Chen Y.H. 2003. Defective thymocyte apoptosis and accelerated autoimmune diseases in TRAIL^{-/-} mice. *Nature Immunology.* 255–260.
92. Lin Y-C. y Richburg J.H. 2014. Characterization of the role of tumor necrosis factor Apoptosis Inducing Ligand (TRAIL) in Spermatogenesis through the Evaluation of Trail gene-deficient mice. *PLoS ONE.* 9(4): 1-9.
93. Dörr J., Bechmann I., Waiczies S., Aktas O., Walczak H., Krammer P., Nitsch R. y Zipp F. 2002. Lack of Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand but presence of its receptors in the human brain. *J Neurosci.* 22:1-5.
94. Song J., Song D., Herlyn M., Petruk K., y Hao C. 2003. Cisplatin down-regulation of cellular Fas-associated death domain-like interleukin-1 β -converting enzyme-like inhibitory proteins to restore tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in human melanoma cells. *Clin Cancer Res.* 4255-4266.

95. Kurbanov B.M., Geilen C., Fecker L., Orfanos C., y Eberle J. 2005. Efficient TRAIL-R1/DR4-mediated apoptosis in melanoma cells by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *J Invest Dermatol.* 1010-1019.
96. Spierings D., de Vries E.G., Vellenga E., van den Heuvel F.A., Koornstra J., Wesseling, J., y de Jong S. 2004. Tissue distribution of the death ligand TRAIL and its receptors. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry.* 821-831.
97. McKee C.M., Ye Y. y Richburg J.H. 2006. Testicular germ cell sensitivity to TRAIL-induced apoptosis is dependent upon p53 expression and is synergistically enhanced by DR5 agonistic antibody treatment. *Apoptosis.* 2237–2250.
98. Peluffo M. 2002. Efectos de gonadotrofina y un análogo de la hormona liberadora. Tesina Licenciatura. Universidad de Belgrano. Facultad de Ciencias spExactas y Naturales. Argentina. Pág. 36.
99. García R, Ayala P, Acosta N. 2005 Alteración en la regulación de la apoptosis vía Fas/FasL en cáncer gástrico. *Rev. Cienc. Salud.* 83-94.
100. Peter M., Budd R., Desbarats J., Hedrick S., Hueber A.O., Newell K., Owen L., Pope R., Tschopp J., Wajaj H., Wallach D., Wiltrot R., Zörnig M. y Lynch D. 2007. The CD95 receptor: Apoptosis revisited. *Cell.* 447-450.
101. Rodríguez V.A. 2010. Mecanismos de apoptosis en testículos de ratones con rearreglos cromosómicos robertsonianos. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Córdoba. Facultad de Ciencias Médicas. Argentina. 110 pp.
102. Mc Donald T., Scott S., Kane K. y Kawaja M. 2009. Proteomic assessment of sympathetic ganglia from adult mice that possess null mutations of Exon III or Exon IV in the p75 neurotrophin receptor gene. *Brain Research.* 1253: 1-14.
103. Ergun S., Kilic N., Fiedler W. y Mukhopadhyay A.K. 1997. Vascular endothelial growth factor and its receptors in normal human testicular tissue. *Mol Cell Endocrinol;* 131:9–20.
104. Cohen J.J. 1991. Programmed cell death in the immune system. *Adv Immunol;* 50:55–85.

105. Mc Vicar C., McClure N., Williamson K., Dalzell L.H. y Lewis S.E. 2004. Incidence of Fas positivity and deoxyribonucleic acid double-stranded breaks in human ejaculated sperm. *Fertility and Sterility*; 81: 767-774.
106. Soleimani M., Tavalae M., Aboutorabi R., Adib M., Bahramain H., Janzamin E., Kiani A., y Nasr-Esfahani M. 2010. Evaluation of Fas positive sperm and complement mediated lysis in subfertile individuals. *Journal of Assisted Reproduction Genetic*; 27:477-482.
107. Castro A., Parodi D., Morales I., Madariaga M., Rios R. y Smith R. 2004. Absence of Fas protein detection by flow cytometry in human spermatozoa. *Fertil Steril*; 81:1019-1025.
108. Perticarari S., Ricci G., Boscolo R., De Santis M., Pagnini G., Martinelli M. y Presani G. 2008. Fas receptor is not present on ejaculated human sperm. *Human Reproduction*; 23(6): 1271-1279.
109. Apostolou I., Hao Z., Rajewsky K. y Von Boehmer H. 2003. Effective destruction of Fas-deficient insulin-producing β cells in type 1 diabetes. *JEM*; 198: 1103-1106.
110. Obermair A., Obruca A., Pöhl M., Kaider A., Vales A., Leodolter S., Wojta J. y Feichtinger W. 1999. Vascular endothelial growth factor and its receptors in male fertility. *Fertility and Sterility*; 72(2): 269-275.
111. Klauber N., Rohan R.M., Flynn E. y D'Amato R.J. 1997. Critical components of the female reproductive pathway are suppressed by the angiogenesis inhibitor AGM-1470. *Nat Med* 1997; 3: 443-446.
112. Brown L.F., Yeo K.T., Berse B., Morgentaler A., Dvorak H.F. y Rosen S. 1995. Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) is strongly expressed in the normal male genital tract and is present in substantial quantities in semen. *J Urol*. 154:576-579.
113. Nalbandian A., Dettin L., Dym M. y Ravindranath N. 2003. Expression of Vascular Endothelial Growth Factor receptors during male germ cell differentiation in the mouse. *Biology of Reproduction*; 69:985-994
114. Von Wolff M., Nowak O., Pinheiro R.M. y Strowitzki T. 2007. Seminal plasma Immunomodulatory potential in men with normal and abnormal sperm count.

- European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology; 134(1): 73-78.
- 115.Schmidt J.A., de Avila J.M., McLean D.J. 2006. Effect of vascular endothelial growth factor and testis tissue culture on spermatogenesis in bovine ectopic testis tissue xenografts. *Biology of Reproduction*; 75:167–175.
- 116.Ferrara N. y Davis-Smyth T. 2013. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 2013; 18: 4-25.
- 117.LeCouter J., Moritz D.R., Li B., Phillips G.L., Liang X.H., Gerber H., Hillan K. y Ferrara N. 2003. Angiogenesis-Independent Endothelial Protection of Liver: Role of VEGFR-1. *Science*; 299: 890-893.
- 118.Wilgus T., Matthies A., Radek K., Dovi J., Burns L., Shankar R. y DiPietro L. 2005. Novel Function for Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 on Epidermal Keratinocytes. *The American Journal of Pathology*; 167: 1257-1266.
- 119.Monceau V., Belikova Y., Kratassiouk G., Charue D., Camors E., Communal C., Trouvé P., Russo-Marie F. y Charlemagne D. 2004. Externalization of endogenous annexin A5 participates in apoptosis of rat cardiomyocytes. *Cardiovascular Research*; 64:496-506.
- 120.Song G., Harding S.E., Duchon M.R., Tunwell R., O'Gara P., Hawkins T.E. y Moss S.E. 2002. Altered mechanical properties and intracellular calcium signaling in cardiomyocytes from annexin 6 null-mutant mice. *FASEB J.*;16(6):622-4.
- 121.Wang R.A., Nakane P.K. y Koji T. 1998. Autonomous cell death of mouse male germ cells during fetal and postnatal period. *Biol Reprod*; 58: 1250-1256.
- 122.Sun J., Hatem H., Bird S. y Bird P. 1992. Nucleolar and cytoplasmic localization of annexin V. *FEBS Letters*; 314(3): 425-429.
- 123.Van Genderen H.O., Kenis H., Hofstra L., Narula J. y Reutelingsperger C. 2008. Extracellular annexin A5: functions of phosphatidylserine-binding and two-dimensional crystallization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*; 1783(6):953-963.
- 124.Esbert M., Godo A., Soares S.R., Florensa M., Amorós D., Ballesteros A. y Vidal F. 2017. Spermatozoa with numerical chromosomal abnormalities are

- more prone to be retained by Annexin V-MACS columns. *Andrology*;5(4):807-813.
- 125.Nadalini M1, Tarozzi N, Di Santo M, Borini A. 2014. Annexin V magnetic-activated cell sorting versus swim-up for the selection of human sperm in ART: is the new approach better then the traditional one?. *J Assist Reprod Genet*;31(8):1045-51.
- 126.Álvarez J.G. 2005. Preparación del semen para técnicas de reproducción asistida. Centro de Infertilidad Masculina ANDROGEN. ASEBIR; Junio 2005, vol. 10: n°1.
- 127.Auquilla-Orellana V.A. 2011. 'Evaluación de las técnicas swim up y gradientes de densidades para la capacitación espermática en la clínica BioGEPa''. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Químicas. Escuela De Bioquímica Y Farmacia. Universidad de Cuenca.
- 128.Muratori M., Porazzi I., Luconi M., Marchiani S., Forti G. y Baldi E. 2004. AnnexinV binding and merocyanine staining fail to detect human sperm capacitation. *J Androl*;25(5):797-810.
- 129.Said T.M., Grunewald S., Paasch U., Glander H.J., Baumann T., Kriegel C., Li L., Agarwal A. 2005a. Advantage of combining magnetic cell separation with sperm preparation techniques. *Reprod Biomed Online*. Jun;10(6):740-6.
- 130.Said T.M., Grunewald S., Paasch U., Rasch M., Agarwal A. y Glander H.J. 2005b. Effects of magnetic-activated cell sorting on sperm motility and cryosurvival rates
- 131.Said T., Agarwal A. Grunewald S., Rasch M., Baumann T., Kriegel C., Li L., Glander H.J., Thomas A.J. y Paasch U. 2006a. Selection of Nonapoptotic Spermatozoa As a New Tool for Enhancing Assisted Reproduction Outcomes: An In Vitro Model. *Biology of reproduction*;74, 530–537.
- 132.Grunewald S., Paasch U. y Glander H.J. 2001. Enrichment of non-apoptotic human spermatozoa after cryopreservation by immunomagnetic cell sorting. *Cell Tissue Bank*; 2:127–133.

- 133.Grunewald S., Paasch U., Said T.M., Rasch M., Agarwal A. y Glander H.J. 2006. Magnetic-activated cell sorting before cryopreservation preserves mitochondrial integrity in human spermatozoa. *Cell Tissue Bank*;7, 99–104.
- 134.Paasch U., Sharma R.K., Gupta A.K., Grunewald S., Mascha E.J., Thomas A.J., Glander H.J. y Agarwal A. 2004. Cryopreservation and thawing is associated with varying extent of activation of apoptotic machinery in subsets of ejaculated human spermatozoa. *Biol Reprod*; 71:1828–1837.
- 135.Paasch U., Grunewald S., Wuendrich K., Jope T. y Glander H.J. 2005. Immunomagnetic removal of cryo-damaged human spermatozoa. *Asian J Androl* 2005; 7:61–69.
- 136.Paasch U., Grunewald S., Fitzl G. y Glander H.J. 2003. Deterioration of plasma membrane is associated with activated caspases in human spermatozoa. *J Androl*; 24:246–252.
- 137.Huang XW¹, Qiao J, Xia EL, Ma YM, Wang Y. 2010. Effect of interval after surgery on in vitro fertilization/ intracytoplasmic sperm injection outcomes in patients with stage III/IV endometriosis. *Chin Med J (Engl)*. 2010 Aug;123(16):2176-80.
- 138.Losada C., Ortega I. y Pacheco A. 2012. 28th annual meeting of the european society on human reproduction and embryology (ESHRE). Can MACS as a sperm preparation technique improve clinic results in patients with kartagener syndrome? *Hum Reprod*; 27,S2.
- 139.Herrero M.B., Delbes G., Chung J.T., Son W.Y., Holzer H. y Buckett W. 2013. Case report: the use of annexin V coupled with magnetic activated cell sorting in cryopreserved spermatozoa from a male cancer survivor: healthy twin newborns after two previous ICSI failures. *J Assist Reprod Genet*;30(11):1415–9.
- 140.Rawe V.Y., Alvarez C.R. y Uriondo H. 2009a. Separacion magnetica por columnas de anexinas V: “filtrado molecular” para la seleccion de espermatozoides no apoptoticos. *Reproduccion*; 24:104–14. 29.
- 141.Rawe V.Y., Alvarez C.R. y Uriondo H. 2009b. ICSI outcome using Annexin V columns to select non-apoptotic spermatozoa. *Fertil Steril*;92(3):S73–4.

- 142.Winkle L.J., Tesch J.K., Shah A. y Campione A.L. 2006. System B0,+ amino acid transport regulates the penetration stage of blastocyst implantation with possible long-term developmental consequences through adulthood. *Hum Reprod Update*;12(2):145-57.
- 143.Young R.H. 2010. The problematic testicular tumor. *Int J Surg Pathol*;18(3 Suppl):149S-155S.
- 144.Rawe V.Y., Boudri H.U., Alvarez Sedo C., Carro M., Papier S. y Nodar F. 2010. Healthy baby born after reduction of sperm DNA fragmentation using cell sorting before ICSI. *Reprod Biomed Online*.2010;20(3): 320–3.
- 145.Erenpreiss J., Spano M., Erenpreisa J., Bungum M. y Giwercman A. 2006.Sperm chromatin structure and male fertility: biological and clinical aspects. *Asian J. Androl*; 8: 11-29.
- 146.Paparella C., Pavesi A.B., Feldman R.N. y Bouvet B.R. 2015 Importancia de la evaluación del estrés oxidativo en el semen humano. *Arch. Med Int [online]*; vol.37, n. 1, pp.7-14. ISSN 0250-3816.
- 147.Ortega M.A., Sil P. y Ward W.S. 2011. Mammalian sperm chromatin as a model for chromatin function in DNA degradation and DNA replication. *Syst Biol Reprod Med*;57(1-2):43-9.
- 148.Zeqiraj A., Beadini S., Beadini N., Aliu H., Gashi Z., Elezaj S., Bexheti S. y Shabani A. 2018. Male Infertility and Sperm DNA Fragmentation. *Open Access Maced J Med Sci*;6(8):1342-1345.
- 149.Orstavik K. H. 2003. [Intracytoplasmic sperm injection and congenital syndromes because of imprinting defects]. *Tidsskr Nor Laegeforen*;123(2):177.
- 150.Suganuma R., Yanagimachi R. y Meistrich M.L. 2005. Decline in fertility of mouse sperm with abnormal chromatin during epididymal passage as revealed by ICSI. *Hum Reprod*;20(11):3101-8.
- 151.Ílvarez J G. 2009. Utilidad clínica del estudio de fragmentación del ADN espermático. *Rev. argent. androl*; 18 (1): 3-13.
- 152.Comhaire F., Messiaen A. y Decler W. 2018. A mathematical model predicting the individual outcome of IVF through sperm-analysis: The role of the HaloSpermG2® DNA fragmentation test. *Med Hypotheses*; 117:50-53.

153. Evenson D. y Jost L. 1994. Sperm chromatin structure assay: DNA denaturability. *Methods Cell Biol.*;42 Pt B:159-76.
154. Olson Biochemistry Laboratories, Department of Chemistry, South Dakota State University, Brookings 57007.
155. Calull-Bagó A., González-Ortega C., Cancino-Villarreal P., Zúñiga-Sánchez P., Ruvalcaba-Ortega L. y Gutiérrez-Gutiérrez A.M. 2017. Alteración de los parámetros seminales y su asociación con la fragmentación del ADN espermático. *Ginecol Obstet Mex.*;85(7):409-420.
156. Vicari E., Perdichizzi A., De Palma A., Burrello N., D'Agata R., Calogero A.E. 2002. Globozoospermia is associated with chromatin structure abnormalities: case report. *Hum Reprod*;17(8):2128-2133.
157. Brugnon F., Van Assche E., Verheyen G., Sion B., Boucher D., Pouly J.L., Van S1teirteghem A. 2006. Study of two markers of apoptosis and meiotic segregation in ejaculated sperm of chromosomal translocation carrier patients. *Hum Reprod*:21(3):685-693.
158. Simon L., Proutski I., Stevenson M., Jennings D., McManus J., Lutton D., Lewis S.E.M. 2013. Sperm DNA damage has a negative association with live-birth rates after IVF. *Reprod Biomed Online*;26(1):68-78.
159. Aitken R.J. 2010. Whither must spermatozoa wander? The future of laboratory seminology. *Asian J Androl*;12(1):99-103.
160. Zini A., Boman J.M., Belzile E., Ciampi A. 2008. Sperm DNA damage is associated with an increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI: systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod*;23(12):2663-2668.
161. Spano M., Seli E., Bizzaro D., Manicardi G.C., Sakkas D. 2005. The significance of sperm nuclear DNA strand breaks on reproductive outcome. *Curr Opin Obstet Gynecol*;17(3):255-260.
162. Benchaib M., Lornage J., Mazoyer C., Lejeune H., Salle B., Guerin J.F. 2007. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as a prognostic indicator of assisted reproductive technology outcome. *Fertil Steril* 2007;87(1): 93-100.
163. Muriel L., Garrido N., Fernández J.L., Remohí J., Pellicer A., de los Santos M.J., Meseguer M. 2006a. Value of the sperm deoxyribonucleic acid

- fragmentation level, as measured by the sperm chromatin dispersion test, in the outcome of in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*;85(2):371-383.
- 164.Muriel L., Goyanes V., Segrelles E., Gosálvez J., Alvarez J.G., Fernández J.L. 2007. Increased aneuploidy rate in sperm with fragmented DNA as determined by the sperm chromatin dispersion (SCD) test and FISH analysis. *J Androl*; 28(1):38-49.
- 165.Lewis S.E., Agbaje I., Alvarez J. 2008. Sperm DNA tests as useful adjuncts to semen analysis. *Syst Biol Reprod Med*;54(3):111-125.
- 166.Carrell D. T., Wilcox A. L., Lowy L., Peterson C. M., Jones K. P., Erickson L., Campbell B., Branch D. W. y Hatasaka H. H. Elevated sperm chromosome aneuploidy and apoptosis in patients with unexplained recurrent pregnancy loss. *Obstet Gynecol* 2003;101(6):1229-1235.
- 167.Gongora R. A. y Parara F. L. 2014. Correlación en el porcentaje de fragmentación del ADN espermático en el diagnóstico de infertilidad masculina. *An Med (Mex)*;59 (3):203-211.
- 168.Sills E. S., Fryman J. T. y Perloe M. 2004. Chromatin fluorescence characteristics and standard semen analysis parameters: correlation observed in andrology testing among 136 males referred for infertility evaluation. *J Obstet Gynaecol*; 24:74-77.
- 169.Chen Z., Hauser R. y Trbovich A. 2006. The relation between human semen characteristics and sperm apoptosis: a pilot study. *J Androl*; 27: 112-120.
- 170.Cohen-Bacrie P., Belloc S. y Ménézo. 2009. Correlation between DNA damage and sperm parameters: a prospective study of 1,633 patients. *Fertil Steril*; 91(5): 1801-1805.
- 171.Muriel L., Meseguer M. y Fernández J. L. 2006. The sperm chromatin dispersion test in predicting pregnancy outcome in intrauterine insemination: a blind prospective study. *Hum Reprod* 1; 738-744.
- 172.Zini A., Bielecki R. y Phang D. 2001. Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men. *Fertil Steril*; 75:674-677.

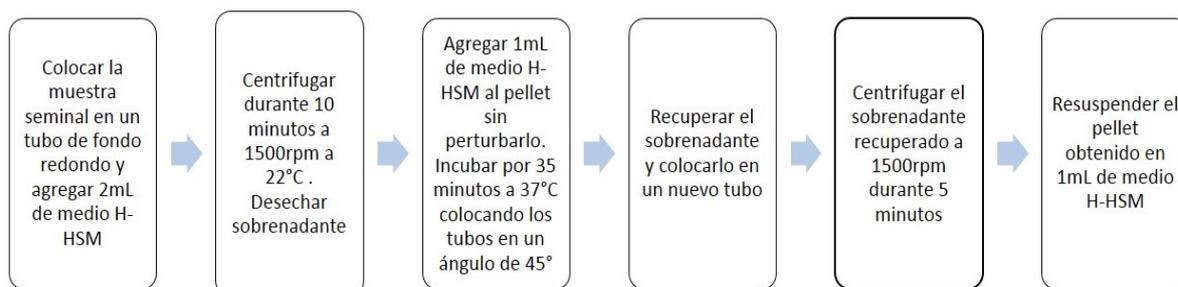
- 173.Lin M. H. y Kuo-Kuang Lee. 2007. Sperm chromatin structure assay parameters are not related to fertilization rates, embryoquality, and pregnancy rates in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection, but might be related to spontaneous abortion rates. *Fertil Steril*; 90(2):352-359.
- 174.Estomba M. Franco Y. y Lazaro M. J. 2013. Fragmentación de ADN espermático ¿es útil su estudio?. *Rev Asoc Biol Rep*;18 (1):22-27.
- 175.Patrat C., Serres C. y Jouannet P. 2000 The acrosome reaction in human spermatozoa. *Biol Cell*;92(3-4):255-66.
- 176.Cardona-Maya W. D. y Cadavid A. P. 2005. Evaluación de la reacción acrosomal en espermatozoides humanos inducida por los monosacáridos manosa y N-acetilglucosamina. *Actas Urol Esp*; 29 (7) 676-684.
- 177.Benoff S., Hurley I.R., Mandel F.S., Cooper G.W. y Hershlag A.1997. Induction of the human sperm acrosome reaction with mannose-containing neoglycoprotein ligands. *Mol Hum Reprod*; 3:827-837.
- 178.Yanagimachi R. Fertilization in Mammalian. In: Knobil N.J, ed. *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press Ltd., 1994:189–318.
- 179.Brandelli A., Miranda P.V. y Tezon J.G. 1996. Voltage-dependent calcium channels and Gi regulatory protein mediate the human sperm acrosomal exocytosis induced by N-acetylglucosaminyl/ mannosyl neoglycoproteins. *J Androl* 1996; 17:522-529.
- 180.Brandelli A., Miranda P. V., Anon-Vazquez M. G. 1995. A new predictive test for in-vitro fertilization based on the induction of sperm acrosome reaction by N-acetylglucosamineneoglycoprotein. *Hum Reprod*;10:1751-1756.
- 181.Xu F., Guo G., Zhu W. y Fan L. 2018. Human sperm acrosome function assays are predictive of fertilization rate in vitro: a retrospective cohort study and meta-analysis. *Reprod Biol Endocrinol*;16(1):81.
- 182.Simons J. y, Fauci L. 2018. A Model for the Acrosome Reaction in Mammalian Sperm. *Bull Math Biol*;80(9):2481-2501.
- 183.Gallon F., Marchetti C., Jouy N. y Marchetti P. 2006. The functionality of mitochondria differentiates human spermatozoa with high and low fertilizing capability. *Fertil Steril* 86:1526–1530

184. Agnihotri S. K., Agrawal A. K., Hakim B. A., Vishwakarma A. L., Narender T., Sachan R. y Sachdev M. 2016. Mitochondrial membrane potential (MMP) regulates sperm motility. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.*;52(9):953-960.
185. Folgerø T., Bertheussen K., Lindal S., Torbergesen T. y Oian P. 1993. Mitochondrial disease and reduced sperm motility. *Hum Reprod*;8(11):1863-8.
186. Poongothai J., Gopenath T.S. y Manonayaki S. 2009. Genetics of human male infertility. *Singapore Med J*;50(4):336-47.
187. Barroso G., Taylor S., Morshedi M., Manzur F., Gaviño F. y Oehninger S. 2006. Mitochondrial membrane potential integrity and plasma membrane translocation of phosphatidylserine as early apoptotic markers: a comparison of two different sperm subpopulations. *Fertil Steril*. 2006 Jan;85(1):149-54.
188. Malić Vončina S., Golob B., Ihan A., Kopitar A.N., Kolbezen M. y Zorn B. 2016. Sperm DNA fragmentation and mitochondrial membrane potential combined are better for predicting natural conception than standard sperm parameters. *Fertil Steril*;105(3):637-644.e1.
189. Green D. R. y Reed J. C. 1998. Mitochondria and apoptosis. *Science*;281(5381):1309-12.
190. Gutiérrez R. 2014. Fisiología del espermatozoide humano. In: Cerezo G; Castilla JA y Rodríguez HM Eds. Manual para el análisis básico de semen: Una guía práctica Editorial Prado. México D.F. pp 1-8.
191. Cerezo G. y López L. 2014 Movilidad espermática. In: Cerezo G; Castilla JA y Rodríguez HM Eds. Manual para el análisis básico de semen: Una guía práctica Editorial Prado. México D.F.; pp 21-29.
192. Aurich C. 2005. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. *Anim Reprod Sci*; 89:65-75.
193. Friend DS. 1982. Plasma-membrane diversity in a highly polarized cell. *J Cell Biol*; 93: 243-249.

N.ANEXOS

a.Anexo 1

Técnica de separación y componentes del medio H-HSM (Hepes Human Sperm Medium)



Hepes-Human Sperm Medium (H-HSM)

Componente	Concentración
NaCl (Meyer)	117 mM
NaH₂PO₄	0.3mM
H₂O (Merk)	
KCl (Merk)	8.6mM
CaCl₂-2H₂O (Meyer)	2.5mM
MgCl₂ (Sigma)	0.5mM
Hepes-ácido (Sigma)	25mM

Ajustar a pH de 7.4 con NaOH

Al momento de usarse, adicionar:

Glucosa (Sigma) 0.4mg/mL

Piruvato-Na (Hycel): 0-03mg/ml

b.Anexo 2

Preparación de eosina para la evaluación de vitalidad espermática

- 1.-Disolver 0.67 g de eosina y 0.9 g de cloruro de sodio en 100 mL de agua destilada previamente calentada.
- 2.- Agregar 10 g de nigrosina.
- 3.- Hervir la suspensión y permitir que se enfríe a temperatura ambiente y filtrar la solución a través de un papel filtro.

Se puede almacenar por meses a una temperatura de 4 a 8°C en una botella de vidrio sellada, pero la solución utilizada para la prueba debe encontrarse a temperatura ambiente.

c.Anexo 3

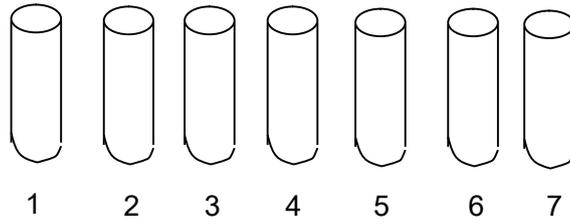
Preparación de reactivo y metodología para el marcaje de espermatozoides para ser analizados por citometría de flujo

▪PBS-BSA 0.5%

PBS 1X (Gibco)	100 mL
Albúmina sérica bovina (Sigma)	0.5%

▪Solución fijadora de Formaldehído

Formaldehído (Merk)	4 mL
Agua desionizada	100 mL



Adicionar 250 μ L de PBS-BSA 0.5%



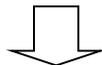
Dejar incubar 30min en hielo y en la oscuridad



5 min 1500rpm 21°C



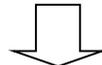
Desechar sobrenadante



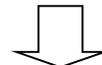
Adicionar 250 μ L de PBS-BSA 0.5%



5min 1500rpm 21°C



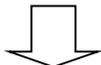
Adicionar 250 μ L de PBS-BSA +1 μ L de FITC/PE³⁻⁷



Dejar incubar 15min en hielo y en la oscuridad



5min 1500rpm 21°C



Adicionar 250 μ L de PBS-BSA 0.5%



5min 1500rpm 21°C



Adicionar 250 μ L de Formaldehído 4%

d.Anexo 4

Componentes del buffer de lisis RIPA

Componente	Concentración
Tris (Hidroximetil aminometano) (Sigma) -HCL pH 7.5	50 mM
SDS (Sodium dodecyl sulfate) (Boehringer Mannheim)	0.1%
Triton x100 (Sigma)	1%
Desoxicolato de sodio (Sigma)	0.5%
PSMF (Sigma)	1 mM
NaCl (Meyer)	150 mM

e.Anexo 5

Método Lowry para la cuantificación de proteínas

Fundamento de la técnica

Las proteínas reaccionan con el reactivo de Folin Ciocalteu para dar un complejo coloreado azul. El color se forma debido a la reacción del cobre del reactivo en medio alcalino con la proteína y la reducción del fosfomolibdato por la tirosina y el triptófano presentes en la proteína.

Curva de calibración

Se construyó una curva de calibración utilizando los estándares de albúmina sérica bovina preparados a partir de una solución "stock" de la proteína (3mg/mL). Y a partir de esta se preparó una solución de trabajo (0.3mg/mL). La técnica seguida para la construcción de la curva estándar fue la siguiente: A partir de la solución de trabajo, se hicieron una serie de tubos con diferentes cantidades de albúmina (50µL, 100 µL, 150 µL, 200 µL y 250 µL) además de un tubo sin albúmina que serviría como blanco. A cada tubo se le agregó agua desionizada (250 µL, 200 µL, 150 µL, 100 µL, 50 µL) (ver tabla 6 de preparación de curva estándar), se adicionó 1mL de solución C se agitaron al vortex y se dejó incubar 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron 100 µL de solución D se agitaron los tubos al vortex se dejaron incubar 45 minutos a temperatura ambiente y se leyeron a 550nm.

Tabla 6. Preparación de curva estándar de albúmina.

Tubo	Albúmina 0.3mg/mL)(µL)	H₂O (µL)	Solución C (mL)	Solución D (mL)	Concentración de proteína
B	0	250	1	100	0
1	50	200	1	100	0.015
2	100	150	1	100	0.03
3	150	100	1	100	0.045
4	200	50	1	100	0.06
5	250	0	1	100	0.075

Los resultados de esta estandarización (absorbancia vs. mg de albúmina/mL) se muestran en la siguiente figura (12).

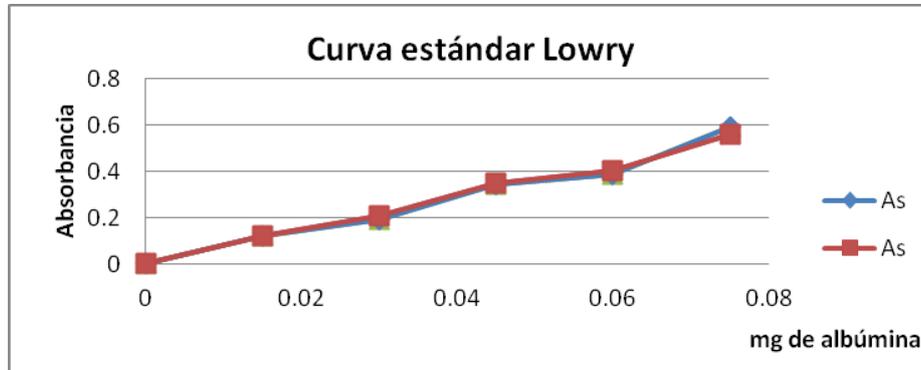


Figura 25. Curva de estandarización por el método Lowry, absorbancia vs. mg de albúmina/mL.

Análisis de las muestras y cálculos

Para la determinación de la proteína en las muestras de espermatozoides se tomaron 20 μL del lisado de espermatozoides al cual se le agregaron 230 μL de agua desionizada y 1mL de la solución C, se agitó en vortex y se dejó incubar 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron 100 μL de solución D, se agitó en vortex y se dejó incubar 45 minutos a temperatura ambiente. Se leyó a 550nm en el espectrofotómetro (Beckman Coulter DU800)

Los cálculos se hicieron utilizando el factor promedio según la siguiente fórmula:

$$mg / mL = (As)(factor)(dilución)$$

En donde:

As: Lectura de absorbancia obtenida

Factor: 1/valor de la pendiente en la curva estándar

Dilución: dilución que se realizó a la muestra según la técnica de Lowry

Soluciones para proteínas Lowry

Solución A: Na_2CO_3 (Baker) al 2% y tartrato de sodio y potasio (Merk) al 0.02% en NaOH (Meyer) 0.1N.

Disolver 10g de Na_2CO_3 y 0.1g de tartrato de sodio y potasio en 500 mL de NaOH 0.1N

Solución B: CuSO_4 (Meyer) al 0.5%

Disolver 1.25g de CuSO_4 en 250mL de H_2O desionizada

Solución C. solución cupro-alkalina: mezclar 12.5mL de la solución A con 250 μL de la solución B. Preparar el día de su uso

Solución D: Diluir 1 parte del reactivo Folin-Ciocalteau (Sigma) con 1 parte de H_2O desionizada. Preparar el día de su uso

f.Anexo 6

Preparación de Reactivos para electroforesis *Geles de poliacrilamida SDS-PAGE*

Gel separador al 12%		Gel concentrador al 4%	
Agua desionizada	3.3mL	Agua desionizada	2.7mL
Acrilamida/Bisacrilamida	4Ml	Acrilamida/Bisacrilamida	670µL
Tris pH 8.8	2.5mL	Tris pH 6.8	500µL
Persulfato de amonio	100 µL	Persulfato de amonio	40µL
TEMED	5µL	TEMED	5µL

- Solución de monómeros al 30.8% de concentración total

(Acrilamida/Bisacrilamida)

Acrilamida (Sigma) 30 g

Bis-acrilamida (Biotecx) 0.8 g

Aforar a 100mL con agua
desionizada

- Buffer de corrida 10X

Trizma base (tris hidroximetil
aminometano) (Sigma) 144 g

Glicina (Sigma) 30 g

Aforar con agua desionizada a 1L

- Preparación del colorante Rojo Ponceau

Rojo Ponceau (Sigma) 0.1% 0.05 g

Ácido acético (Merk) 5% 2.5 mL

Agua desionizada 50 mL

▪ Solución reguladora Tris-HCL 1 M pH 8.8

Tris hidroximetil amino metano (Sigma)	18.17 g
SDS 10% (Boehringer Mannheim)	4 mL
Agua desionizada	50 mL
Ajustar a pH 8.8 con HCl 1N	100 mL
Aforar con agua desionizada	

▪ Solución Reguladora Tris-HCL 0.5M pH 6.8

Tris hidroximetil amino metano (Sigma)	6.075 g
SDS 10% (Boehringer Mannheim)	4 mL
Agua desionizada	40 mL
Ajustar a pH 6.8 con HCl 1 N	
Aforar con agua bidestilada	100 mL

▪ Persulfato de amonio al 10%

Persulfato de amonio (Sigma) 0.1 g

▪Buffer de Laemmli 2x con DDT (solución reguladora de la muestra)

Solución reguladora Tris-HCL pH 6.8	1.25 mL
SDS 10% (Boehringer Mannheim)	2 mL
DTT (Sigma)	0.5 mL
Glicerol (Sigma)	1 mL
Solución de Azul de Bromofenol 0.2% (Merk)	0.25 mL

▪DTT (Dithiothreitol)

DTT (Sigma)	1.5425
	g
Agua desionizada	10 mL

▪Solución de Azul de bromofenol 0.2%

Azul de bromofenol (Merk)	0.02 g
Agua desionizada	10 mL

h.Anexo 8

Preparación de anticuerpos y diluciones utilizadas

Preparación anticuerpo primario	
PBS-Tween 20	10 mL
Albúmina Bovina (Sigma)	0.1 g
Azida de Sodio (Merk)	25 µL
Anticuerpo primario policlonal	10 µL

Preparación anticuerpo secundario	
PBS-Tween 20	10 mL
Albúmina Bovina (Sigma)	0.01 g
Anticuerpo secundario	0.5 µL

Anticuerpos Policlinales	Dilución
Human Fas/CD95/TNFRSF6	1:160000
Human Annexin V	1:40000
Human VEGF R1/Flt-1	1:40000
TRAIL R1/TNFRSF10A	1:160000
TRAIL R2/DR5/TNFRSF10B	1:80000

i.Anexo 9

Preparación del buffer amortiguador de separación MACS

- 1.En condiciones de esterilidad preparar PBS 1x (100ml).
- 2.Adicionar HSA 0.5% poco a poco y en agitación constante.
- 3.Agregar EDTA con agitación constante.
4. Ajustar pH a 7.2 con NaOH.
- 5.Finalmente filtrar el buffer con filtros de vacío y alícuotar.
- 6.Almacenar en refrigeración.

j.Anexo 10

Composición doble gradiente de densidad

Se utilizo el kit de separación de esperma ISolate® Catalog ID: 9926

Contenido: Formulado con suspensión coloidal estéril de partículas de sílice uniformes estabilizadas con silano hidrófilo unido covalentemente en HTF tamponado con HEPES.

Solución de gradiente de doble densidad, una capa superior del 50% y una capa inferior del 90%, admite el uso con un protocolo de dos capas para muestras sanas o con un protocolo de capa única que permite la separación de espermatozoides móviles de muestras de semen de baja calidad.

k.Anexo 11

Medio de montaje para microscopia de fluorescencia

VECTASHIELD Antifade Mounting Medium con DAPI es una fórmula de medio de montaje única y estable para preservar la fluorescencia. El medio de montaje VECTASHIELD con DAPI previene el foto-blanqueo rápido de proteínas y colorantes fluorescentes. El medio de montaje VECTASHIELD con DAPI no se solidifica, pero sigue siendo un líquido en el portaobjetos y se puede almacenar sin sellar (Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA 94010).

Tanto el VECTASHIELD HardSet como el soporte de montaje original VECTASHIELD están disponibles con o sin la contratación DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindol). La concentración de DAPI se puede modificar mediante la mezcla con el medio de montaje VECTASHIELD correspondiente sin DAPI. DAPI produce una fluorescencia azul cuando se une al ADN con excitación a aproximadamente 360 nm y emisión a 460 nm. Para el montaje de laminillas con VECTASHIELD y DAPI se utiliza una mezcla volumen a volumen para su uso, según el volumen para utilizar.

l.Anexo 12

Consentimiento informado



**CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE
INVESTIGACIÓN MÉDICA**

Título del proyecto:

**“EVALUACIÓN FUNCIONAL DE ESPERMATOZOIDES HUMANOS POSTERIOR A
LA SEPARACIÓN POR COLUMNAS MAGNÉTICAS”**

Investigador principal: Dr. Gabriel Arteaga Troncoso

Sede donde se realizará el estudio: Instituto Nacional de Perinatología.

Nombre del paciente: _____

Por este medio a usted se le invita a participar en un proyecto de investigación que se realiza en los Departamentos de Fisiología y Desarrollo celular, Inmunobioquímica, Infectología e Inmunología Perinatal y la Coordinación de Infertilidad (Dr. Armando Miguel Roque Sánchez) y Andrología (M. en C. Ana Marcela Niembro Guerrero) en colaboración con las Subdirecciones de Investigación Clínica (Dr. Salvador Espino y Sosa), Investigación Biomédica (Dra. Claudia Verónica Zaga Clavellina) y de Reproducción Humana (Bíol. Juan Carlos Regalado Hernández) del Instituto Nacional de Perinatología.

En colaboración con:

M. en C. Nubia Monserrat Serrano Macedo

Dra. Marcela López Hurtado

Dr. Alberto Martin Guzmán Grenfell

Dr. Fernando Martin Guerra Infante

Dr. Alejandro Martínez Juárez

Antes de decir si participa o no, debe conocer y comprender de qué se trata nuestro estudio y debe de sentirse en absoluta libertad para preguntar sobre cualquier tipo de información o dato que le ayude a aclarar sus dudas al respecto. (Esto si desea participa, entonces se le pedirá que firme esta forma de consentimiento de la cual se le entregara una copia firmada y fechada.

1.JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Se realiza el estudio intitulado “EVALUACIÓN FUNCIONAL DE ESPERMATOZOIDES HUMANOS POSTERIOR A LA SEPARACIÓN POR COLUMNAS MAGNÉTICAS” responde a la necesidad de aportar evidencia científica para reducir el problema de la infertilidad en la pareja que desea tener un hijo, pero que desgraciadamente no todas las parejas pueden tenerlo. Es frecuente, hasta en un 50%, que el hombre presente alguna alteración en la formación de espermatozoides siendo en muchas ocasiones de origen multifactorial. De ahí la importancia de contar con procedimientos y técnicas de laboratorio que permiten mejorar el tratamiento de la infertilidad masculina para que en un futuro pueda ser usado en las técnicas de reproducción asistida.

2.OBJETIVO DEL ESTUDIO

El estudio tiene como propósito, la comparación de dos tipos de métodos para la obtención de espermatozoides altamente capacitados; es decir, que se caractericen por ser gametos viables con reducida proporción de células muertas. Dada la propuesta en la innovación tecnológica al método tradicional de separación, nuestro grupo de investigadores del presente proyecto garantiza la realización a buen término de los experimentos. Con esto, se intenta apoyar el estudio integral de los determinantes que inciden en el factor masculino.

A usted se le está invitando a participar en un estudio de investigación que tiene como objetivo:

Evaluar la eficiencia de la separación magnética de espermatozoides basada en sus moléculas de superficie para la remoción de gametos en la fase temprana y tardía de apoptosis de pacientes con infertilidad.

3. BENEFICIOS DEL ESTUDIO

Las personas que han sido, como usted, identificadas con algún problema de fertilidad ameritan ser estudiadas en cuanto a las características de la movilidad, número y otros componentes más específicos como los aspectos bioquímicos de sus espermatozoides dado que esto permitirá determinar las posibles causas de la infertilidad de usted y su pareja, guardando en todo momento la total confidencialidad de los resultados de los reportes de laboratorio. Este estudio permitirá en un futuro no muy lejano, usted y otros pacientes de parejas con infertilidad puedan beneficiarse teniendo un bebé llevado a casa.

Asimismo, estos estudios permiten obtener otros beneficios indirectos sobre el tema de infertilidad y trascender en la investigación científica de México, de tal forma que posibilita la obtención de los espermatozoides capacitados por un método relativamente complicado para ser usado en las clínicas de reproducción asistida mejorando la calidad de vida como pareja en todos los niveles de la estructura social mexicana.

Definición de fertilidad: Cuando la pareja tiene el antecedente de haber logrado su objetivo reproductivo (hijo llevado a casa) en más o menos 2 años previos.

4. PROCEDIMIENTOS DEL ESTUDIO

Los dos métodos para la selección de los espermatozoides capacitados que se comparan en presente estudio cumplen con las disposiciones internacionales para los procedimientos de detección, selección y estudio de los espermatozoides móviles capaces de favorecer la capacidad de fertilización. En nuestro caso, la innovación

tecnológica radica en la identificación de marcadores de muerte celular previa a que los espermatozoides seleccionados perezcan. En ambos métodos, el tradicional (A) y el innovado (B) intervienen en remoción (eliminación) de los espermatozoides muertos. Sin embargo, nuestra propuesta interviene antes de que los espermatozoides mueran mejorando la proporción de células viables para las técnicas de reproducción asistida.

El análisis convencional de semen incluye la evaluación de la concentración espermática, motilidad, morfología y viabilidad. Sin embargo, no probé la adecuada información acerca de la muerte programada del espermatozoide (apoptosis) el cual juega un papel importante en la baja fertilización e implantación observadas con técnicas de reproducción asistida. Numerosas son las técnicas de preparación de semen que son usadas para maximizar los resultados de estas técnicas de reproducción. Estos métodos de preparación utilizan espermatozoides móviles que son capaces de fertilizar ovocitos desnudos de hámster. Las técnicas actuales de preparación de espermatozoides basadas en la sedimentación o migración para separar a los espermatozoides en base a su movilidad y densidad mejoran el resultado de la fertilización en estudios realizados en humanos. La preparación de los espermatozoides también incluye la técnica de gradiente de centrifugación de doble densidad (Método A) que se establece por la centrifugación de la muestra seminal con gradiente de densidad para la obtención de gametos potencialmente viables. Así como los métodos anteriores, nosotros proponemos como innovación tecnológica a la técnica de preparación de espermatozoides basados en la identificación de los marcadores de muerte celular programada expresados en las moléculas de superficie capaces de fertilizar ovocitos desnudos de hámster (Método B).

En caso de aceptar participar en el estudio, usted deberá realizarse los siguientes estudios:

Se utilizarán las mismas muestras seminales para espermatobioscopia, que usted proporcionar como parte de sus estudios médicos por el problema de infertilidad que

presenta. El material biológico resultante de la muestra será desechado siguiendo las normas y procedimientos de bioseguridad hospitalaria, como se realiza de manera rutinaria después de la evaluación espermática.

En este trabajo, se evaluará la importancia biológica y el papel potencial de los lípidos de membrana, estrés oxidativo y los marcadores de muerte celular en los espermatozoides obtenidos de sus muestras seminales en pro de desarrollar y evaluar la eficiencia de una nueva innovación biotecnológica para la remoción de espermatozoides en fase temprana y tardía de apoptosis en pacientes como usted con infertilidad.

La innovación tecnológica utiliza microesferas magnéticas conjugadas con anexina V y los ligandos de apoptosis que serán utilizados para separar a los espermatozoides altamente eficaces para fertilización. El sistema es nombrado como MACS o Magnetic-Activated Cell Sorting. Una vez el paso en la columna de la suspensión de espermatozoides, el eluido o fracción negativa será separada recolectando los espermatozoides viables no apoptóticos. En esta fracción, se confirmará que los gametos sean viables para fertilizar con ensayos moleculares como el marcaje de Anexina V adicionado con yoduro de propidio. La fragmentación del ADN y la presencia de caspasas también confirmarían la eficacia del método para separar a los espermatozoides. Los biomarcadores de daño oxidativos como resultado de la separación magnética en lípidos y proteínas nos permitirán conocer la integridad de la membrana plasmática del espermatozoide, esta condición es importantísima para que las células espermáticas emigren y penetren al ovocito. Otras funciones relacionadas a la motilidad espermática y a la regulación de las especies serán evaluadas a partir de la integridad de la membrana mitocondrial, corriente CatSper, disminución de la carga energética, capacidad óxido-reductiva a través de la relación NADP/NADPH y la expresión de glutatión peroxidasa reducido/oxidado en los espermatozoides obtenidos de las acciones antes mencionadas. También, la inducción de la reacción acrosómica será evaluada para establecer si no se tiene defecto alguno en la penetración del ovocito como resultado de la zona pelúcida. Para revisar que los espermatozoides seleccionados tengan la capacidad funcional

para fertilizar el ovocito, ambos gametos, y espermatozoides serán co-incubados bajo estrictas condiciones de esterilidad. La célula será por 16-18 horas para evaluar el desarrollo del cigoto acorde a su morfología considerando los estándares internacionales para calificar adecuados cigotos para fertilización por FIVTE. También, se realizarán pruebas de penetración espermática utilizando ovarios desnudos de hámster. Estos ensayos nos permitirán evaluar la función de sus espermatozoides a ovocitos desnudos y que es funcionalmente el mismo con la membrana vitelina del ovocito humano, ya que se inicia con la membrana plasmática que cubre el segmento ecuatorial del acrosoma. Esta prueba de penetración de ovocitos de hámster, se diferencian de la situación fisiológica en que la zona pelúcida está ausente en estas células.

5. ACLARACIONES

- Su decisión de participar en el estudio es completamente voluntaria.
- No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted, en caso de no aceptar la invitación.
- Si decide participar en el estudio puede retirarse en el momento que lo desee, aun cuando el investigador responsable no se lo solicite, pudiendo informar, las razones de su decisión, la cual será respetada en su integridad.
- No tendrá que hacer gasto alguno por concepto de las pruebas de laboratorio durante el estudio.
- No recibirá pago por su participación.
- En el transcurso del estudio usted podrá solicitar información actualizada sobre el mismo, investigador responsable.
- La información obtenida en este estudio será mantenida con estricta confidencialidad por el grupo de investigadores.
- Es un estudio sin riesgo ya que se utilizará la muestra seminal que usted proporciona rutinariamente para su evaluación reproductiva.

Usted también tiene acceso a las Comisiones de Investigación y Ética en investigación del Instituto Nacional de Perinatología en caso de que tenga dudas sobre sus derechos como participante del estudio a través de:

Dra. Guadalupe del Carmen Estrada Gutiérrez
Presidente del Comité de Investigación.
Teléfono: 5520 99 00 ext. 160.

Dr. Alejandro Martínez Juárez
Presidente del Comité de Ética.
Teléfono: 5520 99 00 ext. 316.

Si considera que no hay dudas ni preguntas acerca de su participación, puede, si así lo desea, firmar la carta de consentimiento informado que forma parte de este documento.

6. CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo: _____ he leído y comprendido la información anterior y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos. Convengo en participar en este estudio de investigación. Recibiré una copia firmada y fechada de esta forma de consentimiento.

Firma del participante o del padre o tutor

Fecha

Testigo 1

Fecha

Testigo 2

Fecha

Esta parte debe ser completada por el investigador (o su representante):

He explicado al Sr(a): _____
la naturaleza y los objetivos de la investigación; lo he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que he leído y conozco la normatividad correspondiente para realizar investigación con seres humanos y me apego a ella.

Una vez concluida la sesión de preguntas y respuestas, se procedió firma del presente documento.

Firma del investigador

Fecha

7. CARTA DE REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO

Título del protocolo: _____

Investigador principal: _____

Sede donde se realizará el estudio: _____

Nombre del participante: _____

Por este conducto deseo informar mi decisión de retirarme de este protocolo de investigación por las siguientes razones: _____

(Este apartado es opcional y puede dejarse en blanco si así lo desea el paciente).



INSTITUTO
NACIONAL DE
PERINATOLOGÍA
Isidro Espinosa de los Reyes

**DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN
SOLICITUD DE EVALUACIÓN Y REGISTRO DE
PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN**



Evaluación funcional de espermatozoides humanos posterior a la separación por columnas magnéticas.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNAM

31 ENE 2020

COORDINACIÓN DE SISTEMAS ESCOLARES

En la Ciudad de México, se presentaron a las 10:30 horas del día 30 del mes de enero del año 2020 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DRA. IRMA JIMENEZ MORALES
- DRA. MARCELA VERGARA ONOFRE
- DR. JOSE ANTONIO HERRERA BARRAGAN
- DRA. MARCELA ARTEAGA SILVA

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretaria la última, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOLOGIA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL
DE: ANA ITZEL GOMEZ MORALES

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISÓ

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. ROSALIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTA

DRA. IRMA JIMENEZ MORALES

VOCAL

DRA. MARCELA VERGARA ONOFRE

VOCAL

DR. JOSE ANTONIO HERRERA BARRAGAN

SECRETARIA

DRA. MARCELA ARTEAGA SILVA