



**UNIVERSIDAD DE MURCIA**  
**ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO**  
**TESIS DOCTORAL**

Factores de origen femenino y masculino relacionados con la fertilidad humana y su aplicación en clínicas de reproducción asistida: proteínas del fluido folicular y genes de compactación del ADN espermático.

**D.<sup>a</sup> Daysi Tatiana Puga Torres**  
**2023**





**UNIVERSIDAD DE MURCIA**  
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO  
TESIS DOCTORAL

Factores de origen femenino y masculino relacionados con la fertilidad humana y su aplicación en clínicas de reproducción asistida: proteínas del fluido folicular y genes de compactación del ADN espermático.

Autor: D.<sup>a</sup> Daysi Tatiana Puga Torres

Director/es: D.<sup>a</sup> Raquel Romar Andrés y D. Sebastián Cánovas Bernabé





**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD  
DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

*Aprobado por la Comisión General de Doctorado el 19-10-2022*

D./Dña. **Daysi Tatiana Puga Torres**

doctorando del Programa de Doctorado en

**Biología Y Tecnología de la Salud Reproductiva**

de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad Murcia, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y titulada:

**Factores de origen femenino y masculino relacionados con la fertilidad humana y su aplicación en clínicas de reproducción asistida: Proteínas del fluido folicular y genes de compactación del ADN espermático**

y dirigida por,

D./Dña. **Raquel Romar Andrés**

D./Dña. **Sebastián Cánovas Bernabé**

D./Dña.

**DECLARO QUE:**

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

*Si la tesis hubiera sido autorizada como tesis por compendio de publicaciones o incluyese 1 o 2 publicaciones (como prevé el artículo 29.8 del reglamento), declarar que cuenta con:*

- La aceptación por escrito de los coautores de las publicaciones de que el doctorando las presente como parte de la tesis.*
- En su caso, la renuncia por escrito de los coautores no doctores de dichos trabajos a presentarlos como parte de otras tesis doctorales en la Universidad de Murcia o en cualquier otra universidad.*

Del mismo modo, asumo ante la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada, en caso de plagio, de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Murcia, a 17 de Julio de 2023



contacto: [dps@ur.es](mailto:dps@ur.es)  
**DAYSÍ  
TATIANA PUGA  
TORRES**

Fdo.:

*Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.*

Información básica sobre protección de sus datos personales aportados

Responsable:	Universidad de Murcia. Avenida 14 de Mayo, 5. Edificio de la Convalecencia. 30003, Murcia. Delegado de Protección de Datos: <a href="mailto:dps@ur.es">dps@ur.es</a>
Legitimación:	La Universidad de Murcia se encuentra legitimada para el tratamiento de sus datos por ser necesario para el cumplimiento de una obligación legal aplicable al responsable del tratamiento, art. 6.1.c) del Reglamento General de Protección de Datos
Finalidad:	Gestionar su declaración de autoría y originalidad
Destinatarios:	No se prevé comunicaciones de datos

## **FINANCIAMIENTO**

Este trabajo experimental ha sido financiado por dos instituciones del Ecuador, el Centro Nacional de Reproducción Asistida Innaifest de la ciudad de Guayaquil y el área de investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad Espíritu Santo en Samborondón.

## AGRADECIMIENTOS

Varias instituciones, y personas que forman parte de estas instituciones, ayudaron de diversas maneras al desarrollo de esta investigación.

Por parte de la Universidad de Murcia, los doctores Raquel Romar y Sebastián Cánovas fueron mis guías durante todo este trayecto de estudios. Sin sus conocimientos, firmeza y paciencia que me brindaron todo este tiempo, no hubiese podido continuar este camino.

En Innaifest, los doctores Xavier Blum, Medardo Blum y Bernardo Blum, desde el momento que me abrieron las puertas de esta institución, confiaron en mí y me apoyaron en todo mi desarrollo profesional, permitiéndome combinar mis actividades laborales y educativas para mi desarrollo profesional, así mismo me facilitaron el uso de todos los equipos con los que cuenta el laboratorio.

La Universidad Espíritu Santo, Facultad de Medicina, facilitó el uso de sus laboratorios. Y sus profesores Gabriel Morey, Edith López, Alexandra Narváez, Magdalena Aray, Nancy Cajas y Nancy Sorroza, fueron un gran apoyo para el desarrollo de una parte de esta investigación.

Dentro del Instituto Oncológico Sociedad de Lucha contra el Cáncer, laboratorio de biología molecular, los biólogos Ramiro Burgos y María Sinche y Dr. Juan Carlos Ruiz, siempre me abrieron las puertas del laboratorio y me brindaron sus conocimientos, necesarios para el avance de otra parte esencial de mi tesis.

Otras instituciones que facilitaron el uso de algunos equipos de sus laboratorios fueron la Universidad Católica de Guayaquil y Universidad Politécnica del Litoral.

El avance en investigación científica en países en vías de desarrollo como Ecuador, requiere de la colaboración interinstitucional y el conocimiento de varios profesionales. Por ello estoy muy agradecida a todas las personas e instituciones que me apoyaron en esta investigación y animaron a continuar con la misma, ya que sin ellos no hubiese sido posible concluir este trabajo.

# DEDICATORIA

*A Ema.*

## ÍNDICE

	Página
<b>Resumen</b> .....	1
<b>Summary</b> .....	4
<b>Introducción, hipótesis y objetivos</b> .....	7
<b>Capítulo I: Revisión bibliográfica</b> .....	19
I.1. Infertilidad.....	19
I.2. Maduración ovocitaria <i>in vivo</i> en el folículo ovárico.....	21
I.3. Composición del fluido folicular humano (FFH).....	23
I.3.1. Proteínas.....	24
I.3.2. Hormonas.....	28
I.3.3. Metabolitos del estrés oxidativo.....	29
I.3.4. Otros componentes.....	32
I.4. Espermatogénesis.....	33
I.4.1. Proteínas nucleares de transición (TNPs) y protaminas.....	33
I.4.2. Reemplazo histonas-protaminas y accesibilidad de la cromatina espermática.....	36
I.4.3. Alteraciones en la compactación de la cromatina espermática relacionadas con la infertilidad.....	40
I.4.3.1. Alteraciones relacionadas con las histonas.....	41
I.4.3.2. Alteraciones de proteínas nucleares de transición y protaminas.....	42
I.4.3.3. Polimorfismos descritos en los genes <i>PRM</i> y <i>TNP</i> , y su relación con la infertilidad humana.....	43
I.5. Evaluación de la calidad espermática.....	51
I.5.1. Análisis de semen básico.....	52
I.5.2. Estudios complementarios para la evaluación de la calidad espermática.....	53
I.6. Bibliografía.....	56
<b>Capítulo II: Relación entre el contenido proteico y los niveles de nitrotirosina del fluido folicular humano con la fertilidad</b> .....	71
II.1. Introducción.....	71
II.2. Hipótesis y Objetivos.....	74
II.3. Materiales y Métodos.....	74
II.3.1. Criterios de selección de pacientes.....	75
II.3.2. Estimulación ovárica.....	76

II.3.3. Punción ovárica y aspiración de fluido folicular.....	78
II.3.4. Cultivo de COCs aspirados y determinación de la maduración nuclear ovocitaria	78
II.3.5. Inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) y cultivo embrionario...	80
II.3.6. Transferencia embrionaria.....	81
II.3.7. Determinación de proteínas totales (PT), albúmina y globulinas en el fluido folicular.....	82
II.3.8. Determinación de los niveles de 3-nitrotirosina (3-NT) en el fluido folicular.....	82
II.3.9. Análisis estadístico.....	83
II.4. Resultados.....	83
II.4.1. Edad, IMC, folículos aspirados y calidad ovocitaria.....	83
II.4.2. Resultados de ICSI, desarrollo y transferencia embrionaria.....	88
II.4.3. Concentración de proteínas totales (PT), albúmina y globulinas en fluido folicular.....	91
II.4.4. Concentración de 3-NT en fluido folicular.....	95
II.5. Discusión.....	97
II.6. Conclusiones.....	101
II.7. Bibliografía.....	103
<b>Capítulo III: Polimorfismos en los genes Prm1, Prm2, Tnp1 y Tnp2 en hombres mestizos de Ecuador.....</b>	<b>108</b>
III.1. Introducción.....	108
III.2. Hipótesis y Objetivos.....	110
III.3. Materiales y Métodos.....	110
III.3.1. Selección de pacientes masculinos y espermograma.....	111
III.3.2. Análisis genético de <i>TNP1</i> , <i>TNP2</i> , <i>PRM1</i> y <i>PRM2</i> .....	111
III.3.3. Análisis estadístico.....	113
III.4. Resultados.....	113
III.4.1. Características de la población de estudio.....	113
III.4.2. Resultados de la PCR.....	114
III.4.3. Genes <i>TNP1</i> y <i>TNP2</i> .....	116
III.4.4. Genes <i>PRM1</i> y <i>PRM2</i> .....	122
III.5. Discusión.....	132
III.6. Conclusiones.....	135
III.7. Bibliografía.....	136

<b>Capítulo IV: Relación de la fertilidad masculina con la protaminación y expresión de los genes <i>PRM1</i> y <i>PRM2</i> en espermatozoides.....</b>	<b>140</b>
IV.1. Introducción.....	140
IV.2. Hipótesis y Objetivos.....	141
IV.3. Materiales y Métodos.....	142
IV.3.1. Selección de pacientes masculinos y espermiograma.....	142
IV.3.2. Espermiograma y selección espermática.....	142
IV.3.3. Tinción CMA3 en espermatozoides.....	143
IV.3.4. Expresión de los genes <i>PRM1</i> y <i>PRM2</i> .....	143
IV.3.5. Análisis estadístico.....	144
IV.4. Resultados.....	145
IV.4.1. Características de la población de estudio y espermiograma.....	145
IV.4.2. Tinción CMA3 en espermatozoides.....	146
IV.4.3. Expresión de los genes <i>PRM1</i> y <i>PRM2</i> .....	152
IV.5. Discusión.....	156
IV.6. Conclusiones.....	160
IV.7. Bibliografía.....	163
<b>Capítulo V: Conclusiones generales.....</b>	<b>168</b>
<b>ANEXO: Abreviaturas.....</b>	<b>169</b>

## RESUMEN

La infertilidad afecta alrededor del 15% de parejas en edad reproductiva, siendo su prevalencia similar en países desarrollados y en vías de desarrollo. No obstante, este porcentaje se encuentra en aumento a nivel mundial por diversos factores clínicos y de hábitos sociales como la obesidad, enfermedades de transmisión sexual, e incluso por postergar la edad para concebir. La infertilidad se ha abordado considerando su origen como femenino o masculino, aunque un porcentaje importante de casos se consideran como idiopáticos. Por ello, existe un interés creciente para identificar biomarcadores, cuyo uso sea viable en la práctica clínica, con capacidad predictiva sobre los resultados de los tratamientos de fertilidad, con el objetivo de mejorar la eficiencia en los ciclos de reproducción asistida, lo cual abordamos en esta tesis con mención de doctorado industrial.

En el manejo de la infertilidad femenina, muchas mujeres requieren tratamientos de fecundación in vitro (FIV) para lograr un embarazo a término con un niño/a nacido vivo. Durante la FIV, la recuperación de complejos cúmulus-ovocito (COCs) competentes es fundamental. Los COCs competentes se logran principalmente por la contribución de las células del cúmulus y el fluido folicular (FF), por lo que es interesante el estudio de la composición de este biofluido y su posible relación con la infertilidad. Por ejemplo, la oscilación de las concentraciones de proteínas totales (PT) del FF podría afectar a la competencia del ovocito y relacionarse con las posteriores tasas de fertilidad. Además, los niveles de especies reactivas de nitrógeno (RNS) contenidas en el FF, poco estudiadas hasta el momento, permitirían evaluar el daño oxidativo de las proteínas. Por otro lado, en la infertilidad masculina, entre el 30 y 72% de los casos se diagnostican como idiopáticos, por lo que se han desarrollado pruebas diagnósticas más completas que permiten evaluar factores moleculares y genéticos como posibles causas de la infertilidad. Sin embargo, estas pruebas no son de uso rutinario en la práctica clínica. Algunas de las causas genéticas de infertilidad masculina estudiadas son los polimorfismos en los genes de las protaminas (*PRM1*, *PRM2*) y proteínas nucleares de transición (*TNP1* y *TNP2*) involucrados en la compactación del ADN espermático. También, la expresión de estos genes (ARN) y el estado de protaminación del ADN espermático son de interés en el estudio de la infertilidad masculina.

Considerando lo expuesto, y tras una exhaustiva revisión bibliográfica planteada en el capítulo I, este trabajo pretende abordar el estudio de la infertilidad desde su vertiente femenina y masculina para identificar biomarcadores no invasivos, que puedan ser utilizados como

predictivos del éxito de los tratamientos de fertilidad en la clínica rutinaria y, de este modo, mejorar la eficiencia en los ciclos de reproducción asistida.

En el capítulo II se estudió en el FFH de la especie humana (FFH), la concentración de proteínas totales (PT), albúmina y globulinas, así como los niveles de proteínas modificadas con nitrotirosina para valorar el grado de estrés oxidativo de este biofluido y su relación con la posterior calidad ovocitaria, embrionaria y tasa de embarazo. Para ello, el FFH de 74 mujeres sometidas a tratamiento de inyección intracitoplasmática de espermatozoides (41 fértiles pertenecientes al grupo control y 33 mujeres infértiles con diferentes diagnósticos) fue recuperado tras la aspiración folicular y obtención de los complejos cúmulus-ovocito (COCs). El FFH se centrifugó, filtró y almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis. La concentración de PT, albúmina y globulinas se determinó mediante la plataforma analítica COBAS c501 utilizando el método de fotometría automatizada - test colorimétrico, mientras que el nivel de proteínas modificadas con nitrotirosina se determinó mediante la prueba ELISA 3-nitrotirosina (3-NT). Los resultados mostraron una distribución homogénea de las concentraciones de PT, albúmina y globulinas en el grupo control, mientras que en el grupo infértil se observó una gran variabilidad en esta distribución entre los diferentes diagnósticos de las pacientes. La concentración de proteínas en el FFH del grupo control (mujeres fértiles) fue mayor que en el grupo infértil: PT ( $4.92 \pm 0.09$  g/dl vs.  $4.45 \pm 0.12$  g/dl), albúmina ( $1.84 \pm 0.06$  g/dl vs.  $1.66 \pm 0.04$  g/dl) y globulinas ( $3.08 \pm 0.05$  g/dl vs.  $2.79 \pm 0.09$  g/dl). Dentro del grupo infértiles, las mujeres con endometriosis e insuficiencia ovárica tuvieron menores concentraciones de PT y albúmina que las mujeres con otros diagnósticos de infertilidad. Por otro lado, no se encontró diferencia en las concentraciones de 3-NT entre el grupo control ( $28.40 \pm 1.79$  ng/ml) vs. infértiles ( $26.83 \pm 2.20$  ng/ml) ni hubo diferencias dentro del grupo de mujeres infértiles en base a sus diagnósticos. Finalmente, los ovocitos recuperados de mujeres infértiles alcanzaron mayores tasas de pérdida de embarazo (semanas 6 a 21 de gestación) con menores tasas de bebé nacido que los ovocitos de mujeres fértiles. Estos resultados sugieren que la concentración de proteínas totales del FFH podría ser considerado como un biomarcador predictivo de la calidad ovocitaria y posteriores tasas de fertilidad dentro del tratamiento de reproducción asistida, cuyo uso es viable en la práctica clínica.

En el capítulo III se examinaron en hombres mestizo-ecuatorianos los polimorfismos en los genes *TNP1*, *TNP2*, *PRM1* y *PRM2*, involucrados en la compactación del ADN espermático, y se evaluó su relación con la infertilidad masculina. Para esto se incluyeron 43 individuos fértiles como grupo control y 101 hombres infértiles. A todos los individuos se les realizó un

espermiograma siguiendo los criterios recomendados en la quinta edición del manual de la OMS para el procesamiento y evaluación de semen humano. Además, se utilizó sangre periférica para extracción de ADN, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación tipo Sanger de los genes de interés. Se identificaron nueve polimorfismos entre los cuatro genes mencionados: rs62180545 en *TNP1*, rs11640138 y rs56069754 en *TNP2*; rs201923496 y rs737008 en *PRM1*; rs749752404, rs1646022, rs2070923 y rs182114260 en *PRM2*. De estos, dos polimorfismos (rs749752404 y rs182114260 de *PRM2*) no han sido descritos previamente en otras poblaciones; mientras que rs737008 (*PRM1*), rs1646022 y rs2070923 (*PRM2*) son polimorfismos de alta frecuencia descritos en diferentes poblaciones asiáticas y europeas, lo cual sugiere que la población mestiza ecuatoriana es híbrida con contribución de diferentes regiones del mundo. Ninguno de los polimorfismos identificados en este trabajo mostró relación directa con la fertilidad por lo que no pueden ser considerados como un factor de riesgo de infertilidad en el varón.

En el capítulo IV se estudió los niveles de protaminación/empaquetamiento de la cromatina y expresión de *PRM1* y *PRM2* (ARN) en espermatozoides de hombres fértiles e infértiles, además de evaluar su relación con la calidad espermática y otras variables clínicas y sociales que pueden repercutir sobre la fertilidad masculina. Para ello se incluyeron 35 individuos fértiles como grupo control y 96 pacientes infértiles, a los que se les realizó un análisis de semen siguiendo los criterios recomendados en la quinta edición del manual de la OMS para el procesamiento y evaluación de semen humano. Luego, la muestra seminal fue sometida a la técnica de selección espermática mediante *swim-up*, fraccionada en alícuotas y almacenada a  $-196^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior procesamiento. La evaluación indirecta del empaquetamiento de la cromatina en espermatozoides se realizó mediante el ensayo de cromomicina A3 (CMA3) y observación con microscopía de fluorescencia (450 nm). El CMA3 es un fluorocromo que se une de manera específica a los surcos menores del ADN ricos en guaninas y citosinas, pero la presencia de protaminas impide la unión de dicho fluorocromo, por lo que un exceso de fluorescencia indica una menor compactación de la cromatina e, indirectamente, una menor cantidad de protaminas. Para evaluar la expresión de *PRM1* y *PRM2*, se realizó extracción de ARN de espermatozoides, síntesis de cDNA y PCR en tiempo real con el reactivo *Power SYBR® Green PCR Master Mix*, donde el gen *BETA-ACTINA* (*BA*) fue considerado gen de referencia. Dentro de los resultados, si bien en la mayoría de los parámetros seminales no hubo diferencia entre ambos grupos de estudio, el análisis indirecto de protaminación sí mostró mayor porcentaje de espermatozoides con CMA3 en el grupo infértil vs. grupo control ( $15.37 \pm 1.00$  vs.  $12.10 \pm 1.01$ ,

P=0.01). También se encontró una correlación débil o moderada de los niveles de CMA3 con algunos parámetros seminales en ambos grupos de estudio, como el porcentaje de espermatozoides normozoospermicos, también la motilidad y concentración espermática tras el *swim-up*. Respecto al sobrepeso y su influencia sobre la calidad seminal, en el grupo control se determinó que los niveles de protaminación espermática disminuyen en individuos con sobrepeso y obesidad tipo I frente a aquellos con peso normal. En el grupo infértil, independientemente del peso, todos los individuos mostraron niveles bajos de protaminación. Finalmente, no se encontraron diferencias en los niveles medios de expresión de *PRM1*, *PRM2* y ratio *PRM1/PRM2* entre los grupos de estudio. En conclusión, el análisis del estado de protaminación (CMA3) permitiría la identificación de una posible causa de infertilidad en hombres catalogados con infertilidad idiopática. Este estado de protaminación seminal se relaciona con diversos parámetros seminales y la obesidad influye sobre este grado de protaminación.

Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral con mención de Doctorado Industrial, realizada en el seno de la clínica de reproducción asistida Innaifest (Guayaquil, Ecuador), demuestran la utilidad de este tipo de proyectos de investigación industrial para avanzar en la aplicación a la práctica clínica de resultados de investigación básica.

## SUMMARY

Infertility affects 15% of couples in reproductive ages, with similar prevalence in developed and developing countries. This incidence is increasing worldwide due to clinical factors and social habits such as obesity, sexually transmitted diseases or to postpone pregnancy. Infertility is approached considering female or male origin, although there are significant cases defined as idiopathic. So, there is an increasing attention in the proper infertile couple diagnosis. For this reason, there is a growing interest in identifying biomarkers with an application into clinical practice, to predict the results of fertility treatments, with the aim of improving the efficiency of assisted reproduction cycles, which we address in this thesis with mention of industrial doctorate.

In female infertility management, many women require in vitro fertilization (IVF) to achieve a delivery pregnancy with a livebirth child. In IVF is important the competent cumulus-oocyte complexes (COCs) recovered. Competent COCs is achieved mainly by cumulus cells and follicular fluid (FF) contribution, so it is interesting the study of FF composition and its relationship with infertility is relevant. In fact, the oscillation of FF total protein (PT) concentrations, could affect oocyte competence. Besides, the reactive nitrogen species (RNS) contained in the FF may allow the evaluation of protein oxidative damage. On the other hand, in male infertility, around 30-72% of cases are still diagnosed as idiopathic, so more complete tests that allow molecular and genetic factors diagnostic as possible causes of infertility, have been developed. However, these tests are not routinely used in clinical practice. Some of male infertility genetic causes studied are polymorphisms in genes involved in sperm DNA compaction: PRM1, PRM2, TNP1 and *TNP2*. Also, expression of these genes (RNA) and sperm DNA protamination state are interest in male infertility.

Based on the above and after a wide literature review presented in chapter I, this work attempts to board the study of female and male infertility to identify simple and non-invasive biomarkers that can be used as fertility treatments success predictors in routine clinics and, in this way, improve assisted reproduction cycles efficiency.

In chapter II, the PT, albumin, and globulins concentrations, as well as nitrotyrosine-modified proteins levels were studied in human FF (FFH) and its relationship with oocyte and embryo quality. For this, the FFH of 74 women undergoing ICSI treatment (41 control and 33 infertile women with different diagnoses) was recovered after follicular aspiration and COCs recovery.

The FFH was centrifuged, filtered, and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until analysis. The PT, albumin and globulins concentrations was determined by COBAS c501 analytical platform using automated photometry method - colorimetric test, while the nitrotyrosine-modified proteins levels were analyzed with 3-nitrotyrosine (3-NT) ELISA test. The results showed a constant distribution of PT, albumin, and globulins concentrations of FFH in control group, but a great variability in this distribution in infertile group between the different diagnoses. Control group presented highest concentrations of PT ( $4.92\pm 0.09$  g/dl vs.  $4.45\pm 0.12$  g/dl), albumin ( $1.84\pm 0.06$  g/dl vs.  $1.66\pm 0.04$  g/dl) and globulins ( $3.08\pm 0.05$  g/dl vs.  $2.79\pm 0.09$  g/dl) versus infertile group, in FFH. Women with endometriosis and ovarian failure showed lower PT and albumin concentrations than women with other infertility diagnoses. Contrary, no difference was found in the 3-NT concentrations between control group vs infertile women ( $28.40\pm 1.79$  ng/ml vs.  $26.83\pm 2.20$  ng/ml), and there were also no differences within infertile group based on their diagnoses.

In chapter III, polymorphisms in sperm chromatin compaction genes were examined in mestizo-ecuadorian men: TNP1, TNP2, PRM1 and PRM2, and their relationship with male infertility. For this, were included 43 fertile men (control group) and 101 infertile men. Semen analysis was performed based on the fifth edition of the WHO manual for the processing and evaluation of human semen. A peripheral blood sample was taken for DNA extraction, polymerase chain reaction (PCR) and Sanger sequencing. Nine polymorphisms were identified: rs62180545 in TNP1; rs11640138 and rs56069754 in TNP2; rs201923496 and rs737008 in PRM1; and rs749752404, rs1646022, rs2070923 and rs182114260 in PRM2. Only two polymorphisms (rs749752404 and rs182114260 in PRM2) have not been described in other populations; while rs737008 (PRM1), rs1646022 and rs2070923 (PRM2) are high-frequency polymorphisms described in different Asian and European populations, suggesting that Ecuadorian mestizo population is hybrid with contributions from different regions of the world. None of polymorphisms identified in this study was related to fertility and would not be a factor risk for men infertility.

In chapter IV, protamination/packaging of chromatin levels and PRM1 and PRM2 (RNA) expression in sperm from fertile and infertile men were studied, and their relationship with sperm quality or other clinical and social variables that may affect male fertility were evaluated. For this, 35 fertile men (control group) and 96 infertile patients were included. Semen analysis was performed based on the fifth edition of the WHO manual for the processing and evaluation of human semen. Then, semen sample was processed by swim up sperm selection technique, divided in two aliquots and stored at  $-196^{\circ}\text{C}$  until further development. Indirect evaluation of

sperm chromatin packaging was performed using chromomycin A3 (CMA3) assay and fluorescence microscopy with 450 nm filter. For evaluation of PRM1 and PRM2 expression, RNA sperm extraction, cDNA, and real-time PCR were performed with Power SYBR® Green PCR Master Mix reagent, and BETA-ACTIN (BA) gene was considered as reference. There was no difference between fertile and infertile men in the most of seminal parameters, but the indirect protamination analysis showed a higher CMA3 sperm in infertile vs. control group ( $15.37 \pm 1.00$  vs.  $12.10 \pm 1.01$ ,  $P = 0.01$ ), so protamination analysis (CMA3) would allow identify of possible infertility cause in men cataloged with idiopathic infertility. A weak or moderate correlation of CMA3 levels with some seminal parameters was also found in both groups. In control group it was also determined that BMI has an impact on protamination levels, decreasing in individuals with overweight and obesity I, compared to normal weight. In the infertile group, regardless of weight, all men showed low levels of protamination. Finally, no differences were found in the mean levels of expression of *PRM1*, *PRM2* and *PRM1/PRM2* ratio between groups. In conclusion, the analysis of protamination level would allow the identification of a possible cause of male infertility linked with idiopathic infertility. This state of seminal protamination is related to various seminal parameters, and obesity influences this degree of protamination.

The results obtained from this Doctoral Thesis with mention of Industrial Doctorate carried out at Innaifest Reproduction Clinic (Guayaquil, Ecuador), demonstrate the usefulness of this type of industrial research projects to progress in the application of basic research results to clinical practice.

## INTRODUCCIÓN

La infertilidad es un problema prevalente a nivel mundial que afecta a alrededor del 15% de las parejas en edad reproductiva, estimándose que en torno a 48 millones de parejas y 186 millones de personas son infértiles en todo el mundo (Inhorn & Patrizio, 2015; OMS, 2022). Se considera que la prevalencia de la infertilidad es similar entre países desarrollados y países en vías de desarrollo (Boivin et al., 2007). Aunque no existen datos precisos sobre tasas de infertilidad en Ecuador, los datos estadísticos disponibles sobre el índice de fecundidad y tasa de natalidad muestran una tendencia decreciente, disminuyendo en las últimas dos décadas de 3.10 a 2.05, y del 25.40 al 17.04%, respectivamente ("Instituto Nacional de Estadística y Censo del Ecuador" 2022; Lanchimba & Medina, 2011). La prevalencia de infertilidad está en aumento a nivel mundial por diversos factores clínicos y de hábitos sociales como son la obesidad, las enfermedades de transmisión sexual, incluso el retraso de la edad para concebir (Ledger, 2009). De hecho, se ha registrado un aumento de los ciclos de reproducción asistida a nivel mundial (Chambers et al., 2021). La Red Latinoamericana de Reproducción Asistida (REDLARA) registró 106.918 tratamientos de reproducción asistida entre 15 países de América Latina en el año 2019, siendo 1.358 correspondientes a Ecuador (Zegers-Hochschild et al., 2022), casi el doble que los reportados en el año 2013 que ascendieron a 701 en total (Banker et al., 2021). Clásicamente el estudio sobre la infertilidad se ha abordado clasificando el origen de la infertilidad en origen femenino u origen masculino, aunque existe un porcentaje importante de casos que son considerados de origen idiopático, por lo que existe un interés creciente en el diagnóstico adecuado de la pareja infértil.

Respecto a la **infertilidad femenina**, a nivel global, se estima que el 1.9% de las mujeres entre 20 y 44 años de edad presentan infertilidad primaria (no han podido alcanzar un embarazo después de al menos un año de relaciones sexuales sin usar métodos anticonceptivos), mientras que el 10.5% presentan infertilidad secundaria, es decir han estado embarazadas al menos una vez, pero posteriormente no han logrado un embarazo (Mascarenhas et al., 2012). Muchas de estas mujeres requieren tratamientos de fecundación *in vitro* (FIV) para lograr un embarazo que finalice con un niño/a nacido vivo. Estos tratamientos de reproducción asistida involucran estimulación ovárica, maduración final de los folículos ováricos y aspiración folicular, para luego poder recuperar los complejos cúmulus-ovocito (COCs) y, por último, la realización de la fecundación propiamente dicha en condiciones de laboratorio, mediante FIV convencional (cocultivo de gametos en el laboratorio) o inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI).

Para que los COCs alojados en el interior de los folículos ováricos adquieran competencia de desarrollo y sean capaces de completar la meiosis, fecundación, embriogénesis y desarrollo embrionario a término, el ovario necesita un ambiente intrafolicular saludable, lo cual se alcanza principalmente mediante la contribución de las células del cúmulus y el fluido folicular (FF) que rodea los COCs (Da Broi et al., 2018). Así pues, el fluido folicular humano (FFH) representa un microambiente de importancia crucial como medio de comunicación entre el ovocito y las células foliculares, siendo necesario para la correcta maduración y competencia de los COCs (Ambekar et al., 2013; Basuino & Silveira, 2016; Bianchi et al., 2016; Chi et al., 1998; Santonocito et al., 2014; Yamamoto et al., 2016). El FFH es un fluido biológico que se obtiene de manera sencilla y rutinaria en las mujeres sometidas a estimulación ovárica y posterior aspirado folicular, y por ello constituye un tipo de biofluido de gran interés para su estudio en reproducción asistida. De hecho, el análisis de algunos componentes de este fluido como la hormona antimuleriana, el factor promotor de colonias de granulocitos y algunas adipocitoquinas, como las citoquinas inflamatorias, han sido empleados como predictores de calidad embrionaria en pacientes con síndrome de ovario poliquístico, así como de la maduración ovocitaria y del éxito de implantación embrionaria tras la fecundación (Mashiach et al., 2010; Tournaye et al., 2020; Wyse et al., 2021).

El fluido folicular, además de estar compuesto de una mezcla compleja derivada del trasudado del plasma sanguíneo, contiene factores procedentes de las células de la granulosa y las células tecaes (Santonocito et al., 2014) y por lo tanto representa el ambiente que rodea al ovocito de una manera más próxima y fidedigna que el plasma sanguíneo. Entre los componentes principales del FF se incluyen proteínas, metabolitos, iones, hormonas, polisacáridos, especies reactivas de oxígeno y antioxidantes (Da Broi et al., 2018; Emori & Drapkin, 2014; Lim et al., 2017; Santonocito et al., 2014; Yamamoto et al., 2016). Las proteínas del FFH están involucradas en procesos metabólicos, de remodelación de la matriz extracelular y respuesta inmunitaria (Dumesic et al., 2015). Además, participan en el metabolismo y proceso de transporte de los lípidos, desempeñando un papel fundamental en el control de la inflamación durante la foliculogénesis (Shen et al., 2017). La medición de las proteínas del FFH es relativamente sencilla y barata, por lo que las proteínas podría brindar información respecto a potenciales biomarcadores de la calidad ovocitaria y predictores de la calidad del embrión y desarrollo temprano (Basuino & Silveira, 2016). La concentración de proteínas totales en el FFH oscila de 4.87 a 7.28 g/dl (Gonzalès et al., 1992; Shalgi et al., 1973; Velazquez et al., 1977) y esta fluctuación podría afectar a la competencia del ovocito para una correcta maduración y

posterior desarrollo embrionario adecuado (Hashemitabar et al., 2014). Sin embargo, aún no se ha definido con claridad cómo la variabilidad en la concentración de proteínas totales, albúmina y globulinas afectan a la posterior calidad y fertilidad de los COCs, cómo varía la concentración de estas proteínas en el FFH de mujeres con distinta etiología de infertilidad, ni si estas concentraciones proteicas podrían ser utilizadas como predictores sencillos y rápidos de dicha calidad ovocitaria, dentro del flujo de trabajo actual de las clínicas de reproducción asistida.

Por otro lado, en el FFH se han detectado especies reactivas de nitrógeno (RNS) (Agarwal et al., 2005; Cigliano et al., 2002), aunque este tipo de compuestos han sido menos estudiados que las especies reactivas de oxígeno (ROS). Entre las RNS figuran los residuos de tirosina nitrada (3-nitrotirosina, 3-NT) de las proteínas, los cuales se utilizan ampliamente como marcadores del daño proteico por estrés oxidativo en varios tejidos y fluidos biológicos, incluidos plasma sanguíneo, suero, orina, líquido cefalorraquídeo y líquido sinovial (Cigliano et al., 2002; Teixeira et al., 2016). A pesar de su potencial interés diagnóstico, el estudio de los niveles de 3-NT para evaluar el daño oxidativo de las proteínas en el FFH ha sido poco utilizado hasta la fecha (Cigliano et al., 2002). Por ello, evaluar las variaciones en los niveles de 3-NT en el FFH y estudiar su posible correlación con las tasas de fertilidad puede ser útil para desarrollar biomarcadores y predictores sencillos sobre el éxito de los tratamientos de fertilidad de alta complejidad.

En el caso de la **infertilidad masculina**, su incidencia varía entre el 2.5 y el 12%, habiendo al menos 30 millones de hombres infértiles a nivel mundial (Agarwal et al., 2015). Entre las causas más comunes de infertilidad masculina se incluyen enfermedades como el varicocele, la diabetes, el cáncer, etc., además de la edad y otros factores relacionados con el estilo de vida (consumo de alcohol, tabaco o drogas, obesidad, trabajos con exposición prolongada a tóxicos, etc.) (De Celis et al., 2000; Fainberg & Kashanian, 2019; Ilacqua et al., 2018; Pourmasumi et al., 2017). Sin embargo, del 30 al 72% de los casos de infertilidad masculina aún son diagnosticados como idiopáticos (Cannarella et al., 2019; Fainberg & Kashanian, 2019), es decir sin que se haya identificado un factor causal concreto. El espermiograma convencional es una prueba de diagnóstico que permite obtener sólo un análisis básico del semen para evaluar la fertilidad masculina (Oehninger & Ombelet, 2019; Sigman, 2019), por lo que se han desarrollado pruebas diagnósticas más completas (Nosrati et al., 2017) que permiten evaluar factores moleculares y genéticos como posibles causas de la infertilidad (Fainberg & Kashanian, 2019), principalmente en casos considerados como idiopáticos; sin embargo, estas pruebas no son de uso rutinario en la práctica clínica (World Health Organization, 2021).

La espermatogénesis es un proceso complejo que involucra varias etapas y culmina con la formación de espermatozoides haploides aptos para la fecundación (Rathke et al., 2014), siendo el reemplazo de histonas-protaminas-histonas uno de los eventos característicos de este proceso (revisado por (Canovas & Ross, 2016)). Después de iniciarse el alargamiento del núcleo del espermatozoide, la transcripción cesa y las histonas son eliminadas en su mayoría y reemplazadas por las proteínas nucleares de transición (TNPs) (Meistrich et al., 2003), que a su vez serán sustituidas posteriormente por las protaminas para dar lugar a un núcleo espermático con el ADN convenientemente empaquetado (revisado por (Oliva, 2006; Rathke et al., 2014)). Las protaminas, al estar asociadas al 85% del ADN nuclear, permiten un mejor empaquetamiento del ADN espermático y mayor protección del mensaje genético codificado por los espermatozoides (Oliva 2006). Por ello, las anomalías en la expresión y reemplazo de estas proteínas se han asociado con alteraciones de los parámetros seminales, pudiendo afectar a la descondensación de la cromatina espermática y al daño del ADN, acarreando consecuencias negativas en el posterior desarrollo embrionario (revisado por (Canovas & Ross, 2016)). Estas anomalías en el reemplazo de protaminas pueden ser causadas por diversos factores como mutaciones en los genes involucrados en la protaminación, *PRM1*, *PRM2*, *TNP1* y *TNP2* (Moritz & Hammoud, 2022). En relación a estos cuatro genes implicados en la protaminación, se han identificado varios polimorfismos (Jiang et al., 2015; Oliva, 2006; Venkatesh et al., 2011), con resultados contradictorios respecto a su asociación con la infertilidad masculina, existiendo diferencias entre las distintas poblaciones analizadas (Jiang et al., 2015). Considerando la ascendencia de la población latinoamericana, específicamente la mestiza ecuatoriana que corresponde al 71.9% de los ecuatorianos ("Instituto Nacional de Estadística y Censo del Ecuador," 2010), la misma que correspondería al mayor número de los pacientes que acuden a clínicas de reproducción asistida en el país, existe la posibilidad de que algunos de los casos de infertilidad idiopática sean debidos precisamente a polimorfismos en estos genes. Su identificación ayudaría a explicar y diagnosticar algunos de los casos considerados de origen idiopático en la práctica clínica rutinaria en Ecuador. Los genes *PRM1* y *PRM2* codifican a las proteínas PRM1 (protamina 1) y PRM2 (protamina 2), respectivamente. Ambas protaminas son pequeñas proteínas básicas, ricas en arginina, que se encuentran conservadas en muchas especies y solo están presentes en espermatozoides maduros (Aydos et al., 2018; Balhorn, 2007; Hao et al., 2019; Steger & Balhorn, 2018). La relación normal de proteínas PRM1/PRM2 en espermatozoides humanos es aproximadamente de 1, observándose marcadas variaciones en esta relación en pacientes oligozoospermicos y astenozoospermicos. Así mismo, se ha observado que en estos casos los espermatozoides presentan alteraciones en la protaminación y en la integridad del ADN (Oliva, 2006; Rathke et al., 2014). Las variaciones en

la expresión de los genes *PRM1* y *PRM2* también se han relacionado con alteraciones en el éxito de la fecundación y posterior desarrollo embrionario en pacientes sometidos a tratamientos de fertilidad (Oliva, 2006; Rathke et al., 2014). Pese a la importancia del genoma del espermatozoide altamente compactado por las protaminas, este ha sido menos estudiado que el genoma compactado por histonas (Yuan et al., 2015). Por ello, el estudio sobre la función de los genes *PRM1*, *PRM2*, *TNP1* y *TNP2* en humanos, y sus implicaciones sobre la fertilidad masculina y relación con la fecundación y desarrollo embrionario, serviría como apoyo en el estudio de la infertilidad masculina, principalmente en los casos identificados como infertilidad idiopática.

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

A la vista de todo lo planteado anteriormente, el **objetivo general** de este trabajo es abordar el estudio de la infertilidad desde su vertiente femenina y masculina para identificar biomarcadores sencillos y no invasivos que puedan ser utilizados como predictivos del éxito de los tratamientos de fertilidad en la clínica rutinaria y, de este modo, mejorar la eficiencia en los ciclos de reproducción asistida.

En lo que respecta a la **infertilidad femenina**, la **hipótesis** que se plantea es que las variaciones en la concentración de proteínas totales, albúmina y globulinas, así como los niveles de 3-nitrotirosina (indicador del daño oxidativo de dichas proteínas) en el fluido folicular de mujeres fértiles e infértiles están correlacionadas con los parámetros de calidad ovocitaria. Para confirmar esta hipótesis, se obtendrá y analizará el FF de mujeres fértiles e infértiles que estén realizándose un ciclo de estimulación ovárica controlada dentro de su tratamiento de reproducción asistida con los siguientes **objetivos**: i) determinar la concentración de proteínas totales, albúmina y globulinas en el fluido folicular aspirado; ii) analizar los niveles de proteínas modificadas con nitrotirosina para valorar el grado de estrés oxidativo en el fluido folicular aspirado; y iii) correlacionar las concentraciones de proteínas y niveles de proteínas modificadas con nitrotirosina del fluido folicular con los resultados de viabilidad e implantación embrionaria obtenidos.

Referente a la **infertilidad masculina**, la **hipótesis** que se plantea es que parte de la población de la costa ecuatoriana presenta polimorfismos en los genes *TNP1*, *TNP2*, *PRM1* y *PRM2*, considerando el origen étnico mestizo del país, y que algunos de ellos están asociados a

infertilidad, por lo que su identificación sería especialmente útil para el diagnóstico en casos de infertilidad idiopática. Así mismo, se plantea que el estado de protaminación de los espermatozoides y la expresión de *PRM1* y *PRM2* están relacionados con la calidad espermática y diferentes variables (edad, índice de masa corporal, paperas, varicocele), repercutiendo sobre la fertilidad masculina. Para confirmar esta hipótesis se proponen los siguientes **objetivos**: i) secuenciar los genes *TNP1*, *TNP2*, *PRM1* y *PRM2* en hombres mestizos ecuatorianos fértiles normozoospermicos e infértiles, e identificar polimorfismos en los 4 genes de estudio; ii) determinar las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos identificados y establecer si existe relación entre los polimorfismos identificados con la infertilidad masculina en la población estudiada; iii) comparar las frecuencias genotípicas de los polimorfismos identificados con otras poblaciones; iv) determinar si existe relación entre el nivel de protaminación, mediante la técnica indirecta de cromomicina A3, y los parámetros del análisis seminal, información clínica y hábitos sociales; y v) cuantificar la expresión de *PRM1* y *PRM2* en hombres ecuatorianos fértiles normozoospermicos frente a infértiles, y determinar si existe relación con los marcadores estándar de calidad seminal, datos clínicos y hábitos de vida social.

Los resultados derivados de estos estudios aportarán información sobre las diversas causas de infertilidad femenina y masculina, facilitando la posibilidad de conocer y desarrollar biomarcadores que puedan aplicarse en clínicas de reproducción asistida, para mejorar la predicción del éxito de la fecundación en el laboratorio y, de ese modo, mejorar la eficiencia en los ciclos de reproducción asistida.

## Bibliografia

- Agarwal, A., Gupta, S., & Sharma, R. K. (2005). Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol*, 3, 28. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-3-28>
- Agarwal, A., Mulgund, A., Hamada, A., & Chyatte, M. R. (2015). A unique view on male infertility around the globe. *Reprod Biol Endocrinol*, 13, 37. <https://doi.org/10.1186/s12958-015-0032-1>
- Ambekar, A. S., Nirujogi, R. S., Srikanth, S. M., Chavan, S., Kelkar, D. S., Hinduja, I., . . . Mukherjee, S. (2013). Proteomic analysis of human follicular fluid: a new perspective towards understanding folliculogenesis. *J Proteomics*, 87, 68-77. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.05.017>
- Aydos, O. S. E., Hekmatshoar, Y., Altınok, B., Özkan, T., Şakırağaoğlu, O., Karadağ, A., . . . Aydos, K. (2018). Genetic Polymorphisms in PRM1, PRM2, and YBX2 Genes are Associated with Male Factor Infertility. *Genet Test Mol Biomarkers*, 22(1), 55-61. <https://doi.org/10.1089/gtmb.2017.0040>
- Balhorn, R. (2007). The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome Biol*, 8(9), 227. <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-9-227>
- Banker, M., Dyer, S., Chambers, G. M., Ishihara, O., Kupka, M., de Mouzon, J., . . . Adamson, G. D. (2021). International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technologies (ICMART): world report on assisted reproductive technologies, 2013. *Fertil Steril*, 116(3), 741-756. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2021.03.039>
- Basuino, L., & Silveira, C. F. (2016). Human follicular fluid and effects on reproduction. *JBRA Assist Reprod*, 20(1), 38-40. <https://doi.org/10.5935/1518-0557.20160009>
- Bianchi, L., Gagliardi, A., Landi, C., Focarelli, R., De Leo, V., Luddi, A., . . . Piomboni, P. (2016). Protein pathways working in human follicular fluid: the future for tailored IVF? *Expert Rev Mol Med*, 18, e9. <https://doi.org/10.1017/erm.2016.4>
- Boivin, J., Bunting, L., Collins, J. A., & Nygren, K. G. (2007). International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Hum Reprod*, 22(6), 1506-1512. <https://doi.org/10.1093/humrep/dem046>
- Cannarella, R., Condorelli, R. A., Duca, Y., La Vignera, S., & Calogero, A. E. (2019). New insights into the genetics of spermatogenic failure: a review of the literature. *Hum Genet*, 138(2), 125-140. <https://doi.org/10.1007/s00439-019-01974-1>
- Canovas, S., & Ross, P. J. (2016). Epigenetics in preimplantation mammalian development. *Theriogenology*, 86(1), 69-79. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.020>

- Chambers, G. M., Dyer, S., Zegers-Hochschild, F., de Mouzon, J., Ishihara, O., Banker, M., . . . Adamson, G. D. (2021). International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technologies world report: assisted reproductive technology, 2014†. *Hum Reprod*, 36(11), 2921-2934. <https://doi.org/10.1093/humrep/deab198>
- Chi, H. J., Kim, D. H., Koo, J. J., & Chang, S. S. (1998). The suitability and efficiency of human follicular fluid as a protein supplement in human in vitro fertilization programs. *Fertil Steril*, 70(5), 871-877.
- Cigliano, L., Balestrieri, M., Spagnuolo, M. S., Dale, B., & Abrescia, P. (2002). Lecithin-cholesterol acyltransferase activity during maturation of human preovulatory follicles with different concentrations of ascorbate, alpha-tocopherol and nitrotyrosine. *Reprod Fertil Dev*, 14(1-2), 15-21. <https://doi.org/10.1071/rd01044>
- Da Broi, M. G., Giorgi, V. S. I., Wang, F., Keefe, D. L., Albertini, D., & Navarro, P. A. (2018). Influence of follicular fluid and cumulus cells on oocyte quality: clinical implications. *J Assist Reprod Genet*, 35(5), 735-751. <https://doi.org/10.1007/s10815-018-1143-3>
- De Celis, R., Feria-Velasco, A., González-Unzaga, M., Torres-Calleja, J., & Pedrón-Nuevo, N. (2000). Semen quality of workers occupationally exposed to hydrocarbons. *Fertil Steril*, 73(2), 221-228. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(99\)00515-4](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(99)00515-4)
- Dumesic, D. A., Meldrum, D. R., Katz-Jaffe, M. G., Krisher, R. L., & Schoolcraft, W. B. (2015). Oocyte environment: follicular fluid and cumulus cells are critical for oocyte health. *Fertil Steril*, 103(2), 303-316. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.11.015>
- Emori, M. M., & Drapkin, R. (2014). The hormonal composition of follicular fluid and its implications for ovarian cancer pathogenesis. *Reprod Biol Endocrinol*, 12, 60. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-12-60>
- Fainberg, J., & Kashanian, J. A. (2019). Recent advances in understanding and managing male infertility. *F1000Res*, 8. <https://doi.org/10.12688/f1000research.17076.1>
- Gonzalès, J., Lesourd, S., Van Dreden, P., Richard, P., Lefèbvre, G., & Vauthier Brouzes, D. (1992). Protein composition of follicular fluid and oocyte cleavage occurrence in in vitro fertilization (IVF). *J Assist Reprod Genet*, 9(3), 211-216. <https://doi.org/10.1007/bf01203815>
- Hao, S. L., Ni, F. D., & Yang, W. X. (2019). The dynamics and regulation of chromatin remodeling during spermiogenesis. *Gene*, 706, 201-210. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.05.027>
- Hashemitabar, M., Bahmanzadeh, M., Mostafaie, A., Orazizadeh, M., Farimani, M., & Nikbakht, R. (2014). A proteomic analysis of human follicular fluid: comparison between younger

- and older women with normal FSH levels. *Int J Mol Sci*, 15(10), 17518-17540.  
<https://doi.org/10.3390/ijms151017518>
- Ilacqua, A., Izzo, G., Emerenziani, G. P., Baldari, C., & Aversa, A. (2018). Lifestyle and fertility: the influence of stress and quality of life on male fertility. *Reprod Biol Endocrinol*, 16(1), 115.  
<https://doi.org/10.1186/s12958-018-0436-9>
- Inhorn, M. C., & Patrizio, P. (2015). Infertility around the globe: new thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21st century. *Hum Reprod Update*, 21(4), 411-426. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmv016>
- Instituto Nacional de Estadística y Censo del Ecuador. (2010). In: Población por área, según provincia, cantón y parroquia de empadronamiento y grupos étnicos.
- Instituto Nacional de Estadística y Censo del Ecuador. (2022). In: Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018.
- Jiang, W., Sun, H., Zhang, J., Zhou, Q., Wu, Q., Li, T., . . . Xia, X. (2015). Polymorphisms in Protamine 1 and Protamine 2 predict the risk of male infertility: a meta-analysis. *Sci Rep*, 5, 15300. <https://doi.org/10.1038/srep15300>
- Lanchimba, C., & Medina, P. (2011). Fecundidad en el Ecuador y su relacion con el entorno social y evolutivo [Article]. *Analitika (Revista de Analisis Estadistico/Journal of Statistical Analysis)*, 1, 25+.
- Ledger, W. L. (2009). Demographics of infertility. *Reprod Biomed Online*, 18 Suppl 2, 11-14.  
[https://doi.org/10.1016/s1472-6483\(10\)60442-7](https://doi.org/10.1016/s1472-6483(10)60442-7)
- Lim, H. J., Seok, A. E., Han, J., Lee, J., Lee, S., Kang, H. G., . . . Yang, Y. (2017). N-glycoproteomic analysis of human follicular fluid during natural and stimulated cycles in patients undergoing. *Clin Exp Reprod Med*, 44(2), 63-72.  
<https://doi.org/10.5653/cerm.2017.44.2.63>
- Mascarenhas, M. N., Flaxman, S. R., Boerma, T., Vanderpoel, S., & Stevens, G. A. (2012). National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys. *PLoS Med*, 9(12), e1001356.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001356>
- Mashiach, R., Amit, A., Hasson, J., Amzalzg, S., Almog, B., Ben-Yosef, D., . . . Azem, F. (2010). Follicular fluid levels of anti-Mullerian hormone as a predictor of oocyte maturation, fertilization rate, and embryonic development in patients with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*, 93(7), 2299-2302.  
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.01.125>

- Meistrich, M. L., Mohapatra, B., Shirley, C. R., & Zhao, M. (2003). Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis. *Chromosoma*, 111(8), 483-488. <https://doi.org/10.1007/s00412-002-0227-z>
- Moritz, L., & Hammoud, S. S. (2022). The Art of Packaging the Sperm Genome: Molecular and Structural Basis of the Histone-To-Protamine Exchange. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 13, 895502. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.895502>
- Nosrati, R., Graham, P. J., Zhang, B., Riordon, J., Lagunov, A., Hannam, T. G., . . . Sinton, D. (2017). Microfluidics for sperm analysis and selection. *Nat Rev Urol*, 14(12), 707-730. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2017.175>
- Oehninger, S., & Ombelet, W. (2019). Limits of current male fertility testing. *Fertil Steril*, 111(5), 835-841. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2019.03.005>
- Oliva, R. (2006). Protamines and male infertility. *Hum Reprod Update*, 12(4), 417-435. <https://doi.org/10.1093/humupd/dml009>
- OMS. (2022). *Infertility*. Organización Mundial de la Salud. [https://www.who.int/health-topics/infertility#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/infertility#tab=tab_1)
- Pourmasumi, S., Sabeti, P., Rahiminia, T., Mangoli, E., Tabibnejad, N., & Talebi, A. R. (2017). The etiologies of DNA abnormalities in male infertility: An assessment and review. *Int J Reprod Biomed (Yazd)*, 15(6), 331-344.
- Rathke, C., Baarends, W. M., Awe, S., & Renkawitz-Pohl, R. (2014). Chromatin dynamics during spermiogenesis. *Biochim Biophys Acta*, 1839(3), 155-168. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2013.08.004>
- Santonocito, M., Vento, M., Guglielmino, M. R., Battaglia, R., Wahlgren, J., Ragusa, M., . . . Di Pietro, C. (2014). Molecular characterization of exosomes and their microRNA cargo in human follicular fluid: bioinformatic analysis reveals that exosomal microRNAs control pathways involved in follicular maturation. *Fertil Steril*, 102(6), 1751-1761.e1751. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.08.005>
- Shalgi, R., Kraicer, P., Rimon, A., Pinto, M., & Soferman, N. (1973). Proteins of human follicular fluid: the blood-follicle barrier. *Fertil Steril*, 24(6), 429-434.
- Shen, X., Liu, X., Zhu, P., Zhang, Y., Wang, J., Wang, Y., . . . Liu, F. (2017). Proteomic analysis of human follicular fluid associated with successful in vitro fertilization. *Reprod Biol Endocrinol*, 15(1), 58. <https://doi.org/10.1186/s12958-017-0277-y>
- Sigman, M. (2019). Introduction: Male fertility testing: the past, present, and future. *Fertil Steril*, 111(5), 833-834. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2019.03.008>

- Steger, K., & Balhorn, R. (2018). Sperm nuclear protamines: A checkpoint to control sperm chromatin quality. *Anat Histol Embryol*, 47(4), 273-279. <https://doi.org/10.1111/ahe.12361>
- Teixeira, D., Fernandes, R., Prudêncio, C., & Vieira, M. (2016). 3-Nitrotyrosine quantification methods: Current concepts and future challenges. *Biochimie*, 125, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2016.02.011>
- Tournaye, H., D'Hooghe, T., Verheyen, G., Devreker, K. F., Perrier d'Hauterive, S., Nisolle, M., . . . Noel, L. (2020). Clinical performance of a specific granulocyte colony stimulating factor ELISA to determine its concentration in follicular fluid as a predictor of implantation success during. *Gynecol Endocrinol*, 36(1), 44-48. <https://doi.org/10.1080/09513590.2019.1631283>
- Velazquez, A., Reyes, A., Chargoy, J., & Rosado, A. (1977). Amino acid and protein concentrations of human follicular fluid. *Fertil Steril*, 28(1), 96-100. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)42324-1](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)42324-1)
- Venkatesh, S., Kumar, R., Deka, D., Deecaraman, M., & Dada, R. (2011). Analysis of sperm nuclear protein gene polymorphisms and DNA integrity in infertile men. *Syst Biol Reprod Med*, 57(3), 124-132. <https://doi.org/10.3109/19396368.2011.562960>
- World Health Organization, D. o. R. H. a. R. (2021). *WHO laboratory manual for the examination and procesing of human semen* (W. H. Organization, Ed. 6th ed.). World Health Organization.
- Wyse, B. A., Fuchs Weizman, N., Defer, M., Montbriand, J., Szaraz, P., & Librach, C. (2021). The follicular fluid adipocytokine milieu could serve as a prediction tool for fertility treatment outcomes. *Reprod Biomed Online*, 43(4), 738-746. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2021.07.001>
- Yamamoto, J., Omura, M., Tuchiya, K., Hidaka, M., Kuwahara, A., Irahara, M., . . . Tokumura, A. (2016). Preferable existence of polyunsaturated lysophosphatidic acids in human follicular fluid from patients programmed with in vitro fertilization. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 126, 16-23. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2016.07.008>
- Yuan, H. F., Kuete, M., Su, L., Yang, F., Hu, Z. Y., Tian, B. Z., . . . Zhao, K. (2015). Comparison of three different techniques of human sperm DNA isolation for methylation assay. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 35(6), 938-942. <https://doi.org/10.1007/s11596-015-1532-0>
- Zegers-Hochschild, F., Crosby, J. A., Musri, C., Souza, M. D. C. B., Martinez, A. G., Silva, A. A., . . . Reproduction, L. A. N. O. (2022). Assisted reproductive technologies in Latin America:

the Latin American Registry, 2019. *JBRA Assist Reprod*, 26(4), 637-658.  
<https://doi.org/10.5935/1518-0557.20220034>

## CAPÍTULO I: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### I.1 Infertilidad

La infertilidad, considerada por la OMS como la enfermedad del sistema reproductivo masculino o femenino que imposibilita lograr un embarazo después de 12 meses o más de relaciones sexuales regulares sin protección (OMS, 2022), es un problema prevalente a nivel mundial que afecta alrededor del 17.5% de las parejas en edad reproductiva, estimándose que en torno a 48 millones de parejas y 186 millones de personas son infértiles en todo el mundo (Inhorn & Patrizio, 2015; OMS, 2022).

Clásicamente el estudio sobre la infertilidad se ha abordado basándose en si la infertilidad erade origen femenino o masculino, aunque existe un porcentaje importante de casos que son considerados de origen idiopático (Inhorn & Patrizio, 2015). El sistema de clasificación de infertilidad establecido por la Red Latinoamericana de Reproducción Asista (REDLARA) en sus manuales para reportes estadísticos anuales incluye el factor anatómico femenino, endometriosis, insuficiencia ovárica, factor endocrino femenino, factor masculino, origen inexplicable y otros de manera general (donde se incluye la edad materna avanzada). Dentro del diagnóstico de factor anatómico de infertilidad se incluye daño en las trompas de Falopio o afecciones uterinas como oclusión o adhesiones peritubáricas, salpingectomía, pólipos uterinos, útero bicorne, hidrosalpinx, síndrome de Asherman, etc. ("Infertility Workup for the Women's Health Specialist: ACOG Committee Opinion, Number 781," 2019). La endometriosis es una enfermedad inflamatoria con presencia de epitelio y estroma endometrial fuera del endometrio y miometrio que se confirma mediante estudio patológico de la lesión, con histología realizada durante la histeroscopia diagnóstica (Zegers-Hochschild et al., 2017). La insuficiencia ovárica por menopausia prematura, así como el factor endocrino de infertilidad (síndrome de ovario poliquístico, enfermedad poliquística del ovario, etc.), se validan con resultados alterados de testosterona, testosterona libre, enzimas hepáticas, sustancias grasas, colesterol de alta y baja densidad, y triglicéridos (Vander Borgh & Wyns, 2018; Zegers-Hochschild et al., 2017). Varias causas se han asociado a la infertilidad masculina como diversas enfermedades o estilo de vida (Winters & Walsh, 2014). Algunas enfermedades comunes relacionadas a infertilidad masculina incluyen el varicocele, la diabetes, el cáncer, etc. (De Celis et al., 2000; Fainberg & Kashanian, 2019; Ilacqua et al., 2018; Pourmasumi et al., 2017), así mismo algunos desordenes genéticos

pueden ser causas de infertilidad entre las que se encuentran ciertas aneuploidías como aneuploidías como 47XXY o microdeleciones como las que se presentan en el cromosoma Y (Choy & Eisenberg, 2018). Entre los factores del medio ambiente y de estilo de vida relacionados a la infertilidad masculina están el consumo de tabaco, alcohol, el estrés, obesidad, el uso de teléfonos móviles e internet inalámbrico (Virtanen et al., 2017). En la práctica clínica, la REDLARA engloba todas estas causas como infertilidad masculina. El diagnóstico de infertilidad de origen inexplicable se otorga a parejas que no logran un embarazo tras 12 meses con adecuada frecuencia coital, mientras la función ovárica, trompas de Falopio, útero, cuello uterino y pelvis son aparentemente normales; además de función testicular aparentemente normal, anatomía genitourinaria y eyaculación normales (Zegers-Hochschild et al., 2017).

Respecto a la infertilidad femenina, a nivel global, se estima que el 1.9% de las mujeres entre 20 y 44 años de edad presentan infertilidad primaria (no han podido alcanzar un embarazo después de al menos un año de relaciones sexuales sin usar métodos anticonceptivos), mientras que el 10.5% presentan infertilidad secundaria, es decir han estado embarazadas al menos una vez, pero posteriormente no han logrado un embarazo (Mascarenhas et al., 2012). En el caso de la infertilidad masculina, su incidencia varía entre el 2.5% y el 12%, habiendo al menos 30 millones de hombres infértiles a nivel mundial (Agarwal et al., 2015).

Se considera que la prevalencia de infertilidad es similar entre países desarrollados y países en vías de desarrollo (Boivin et al., 2007). Aunque no existen datos precisos sobre tasas de infertilidad en Ecuador, los datos estadísticos disponibles sobre el índice de fecundidad y tasa de natalidad muestra una tendencia decreciente, disminuyendo en las últimas dos décadas de un 3.10 a 2.05 y de un 25.40% a 17.04%, respectivamente ("Instituto Nacional de Estadística y Censo del Ecuador.," 2022; Lanchimba & Medina, 2011). También se ha registrado un aumento de los ciclos de reproducción asistida a nivel mundial (Chambers et al., 2021). REDLARA registró 106.918 tratamientos de reproducción asistida entre 15 países de América Latina para el año 2019, siendo 1.358 correspondientes a los reportados por Ecuador (Zegers-Hochschild et al., 2022), 701 más que los reportados en el año 2013 (Banker et al., 2021), con una tasa de bebés nacidos vivos en casa del 39.4%. El aumento en el número de pacientes que se someten a tratamientos de reproducción asistida para lograr un embarazo deja en claro el aumento de la tasa de infertilidad en el Ecuador.

## **I.2. Maduración ovocitaria *in vivo* en el folículo ovárico**

El ovocito, o gameto femenino, es considerado competente cuando ha completado su maduración nuclear y citoplasmática, lo que involucra la reanudación de la meiosis y que pueda someterse a la fecundación, embriogénesis y desarrollo embrionario (Da Broi et al., 2018; Son et al., 2019). La maduración nuclear conlleva la reanudación de la primera división meiótica y progresión a estadio de metafase II (MII), mientras que la citoplasmática implica cambios estructurales y metabólicos que permitirán la fecundación y desarrollo embrionario temprano (Son et al., 2019). El ovocito maduro es resultado del proceso de foliculogénesis y ovogénesis que tienen lugar en el ovario. La ovogénesis consiste en la proliferación y diferenciación de ovogonias en ovocitos, a través de la meiosis, y maduración de los mismos, mientras que la foliculogénesis se refiere al desarrollo folicular (Dumesic et al., 2015). Ambos procesos dependen en gran medida de factores extra e intraováricos como el metabolismo celular y la interacción ovocito-células somáticas, y se dan en la mujer hasta el inicio de la menopausia (Basuino & Silveira, 2016; Dumesic et al., 2015).

La **foliculogénesis** comprende la etapa de crecimiento y maduración del folículo ovárico, abarcando varios procesos celulares altamente ordenados que se inician en el folículo primordial latente (con un diámetro aproximado de 3 a 7 milímetros en la especie humana) y culmina con un ovocito maduro en el interior de un folículo de De Graaf, terciario o preovulatorio, que es ovulado para que el ovocito expelido pueda ser fecundado (Jones & Shikanov, 2019). El folículo humano maduro alcanza un diámetro de 23 milímetros, aproximadamente (Emori & Drapkin, 2014; Kristensen et al., 2017). Durante la primera etapa de la foliculogénesis, el folículo primordial contiene un ovocito detenido en estado de diploteno (profase I de la meiosis), también conocido como estadio de vesícula germinal (VG), rodeado por una capa plana de células pregranulosas (Dumesic et al., 2015; Fortune et al., 2000; Jones & Shikanov, 2019). Estos folículos reciben nutrientes y oxígeno por difusión pasiva desde los vasos sanguíneos del estroma y se dan cambios fenotípicos en las células de la granulosa progresando desde una forma plana a cuboide, volviéndose proliferativas para formar múltiples capas alrededor del ovocito (Da Broi et al., 2018; Fortune et al., 2000; Jones & Shikanov, 2019). En la fase secundaria de la foliculogénesis (folículo primario tardío y/o folículo secundario inicial) tiene lugar la maduración citoplasmática del ovocito, con el núcleo detenido, permitiendo el crecimiento del tamaño del ovocito hasta que alcanza un diámetro suficiente (~0.12 mm) y acumulando en el citoplasma nutrientes para el desarrollo embrionario temprano (Griffin et al., 2006; Jones &

Shikanov, 2019; Vantman & Vega, 2010). El ovocito reanudará la meiosis sólo antes de la ovulación (Dumesic et al., 2015; Jones & Shikanov, 2019). Luego, en el periodo de crecimiento antral (folículo terciario) se dan varios procesos como una mayor proliferación de células de la granulosa, diferenciación de las células de la teca y formación del *antrum* o antro folicular (Jones & Shikanov, 2019). La capa de células tecales le proporciona al folículo un soporte estructural secretando moléculas relevantes para la comunicación intercelular ovocito-células de la granulosa y produciendo gonadotropinas claves para etapas posteriores de la foliculogénesis (Jones & Shikanov, 2019; Vantman & Vega, 2010).

El folículo tiene una estructura tridimensional dentro del ovario (Da Broi et al., 2014; Jones & Shikanov, 2019). La formación del *antrum*, cavidad del centro del folículo repleta de líquido folicular (Basuino & Silveira, 2016), marca una transición importante en el desarrollo del folículo ovárico, siendo el resultado de las secreciones de las células de la granulosa y lípidos de la vasculatura tecal (Jones & Shikanov, 2019). El líquido folicular o fluido folicular (FF) alojado en el interior del folículo ovárico está formado por productos secretados de las células de la granulosa y trasudado de los capilares sanguíneos (Vantman & Vega, 2010), dependiendo esta aportación de la presencia de un gradiente osmótico y del grado de permeabilidad vascular (Da Broi et al., 2018). Su composición indica en qué etapa de maduración se encuentra el folículo (Floehr et al., 2016) siendo en humanos un elemento clave en el éxito de la fecundación natural ya que influye en el crecimiento del ovocito, nutrición y maduración del mismo (Basuino & Silveira, 2016; Emori & Drapkin, 2014). Además, este fluido biológico protege al ovocito, al igual que las células de la granulosa que forman el complejo cúmulus-ovocito (COC) cuya capa más interna de células del *cumulus oophorus* (CCs), denominada *corona radiata*, emite prolongaciones citoplasmáticas que atraviesan la zona pelúcida (ZP) contactando con el oolema, la membrana plasmática del ovocito (Basuino & Silveira, 2016). A pesar de esta protección de CCs y FF, el ovocito es una célula extremadamente sensible a diversos factores como el estrés oxidativo (Da Broi et al., 2014).

Por su parte, la ZP de los ovocitos humanos es una matriz glucoproteica porosa, sintetizada y secretada tanto por el propio ovocito como por las CCs durante el desarrollo folicular (Gupta et al., 2012). Es una estructura altamente conservada, formada por 4 proteínas denominadas en la especie humana ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4, siendo ZP2 la que participa en la unión al espermatozoide e inducción de la reacción acrosómica (Floehr et al., 2016; Gupta, 2021; Gupta et al., 2012). La comunicación intercelular entre las propias CCs y entre CCs-ovocito se da mediante uniones tipo

*gap* y señales paracrinas (Da Broi et al., 2018; Yamamoto et al., 2016), impactando la foliculogénesis y la competencia del ovocito (Da Broi et al., 2018). Las CCs también apoyan la producción de energía y contribuyen directamente en la calidad del ovocito, por lo que junto al fluido folicular forman el nicho que protege al gameto femenino contra condiciones patológicas locales o sistémicas capaces de comprometer su potencial desarrollo (Da Broi et al., 2018; Khalili et al., 2017). Así pues, el COC juega un rol importante en la determinación de su propio desarrollo (Dumesic et al., 2015), comprobándose en humanos que su calidad disminuye con la edad (Da Broi et al., 2018) al igual que ocurre con las CCs que con la edad ven afectada su función, disminuyendo su papel protector contra factores dañinos (Da Broi et al., 2018; Dumesic et al., 2015).

### **I.3. Composición del fluido folicular humano (FFH)**

El líquido folicular es una mezcla compleja de componentes derivados del plasma sanguíneo y células foliculares como la granulosa y células tecaes (Da Broi et al., 2018; Emori & Drapkin, 2014; Santonocito et al., 2014; Yamamoto et al., 2016). Entre estos componentes se encuentran ácidos nucleicos, proteínas, metabolitos, iones, hormonas esteroideas, metabolitos, polisacáridos, especies reactivas de oxígeno (ROS), especies reactivas de nitrógeno, antioxidantes, etc. (Da Broi et al., 2018; Emori & Drapkin, 2014; Lim et al., 2017; Santonocito et al., 2014). Las moléculas procedentes del exudado plasmático atraviesan la barrera folículo-vascular a través de los capilares tecaes (Da Broi et al., 2018; Jones & Shikanov, 2019; Santonocito et al., 2014), pudiendo servir las acuaporinas, proteínas transmembrana localizadas en las células de la granulosa, como canales que faciliten el proceso de entrada de líquido al *antrum* folicular desde la vasculatura de la teca (Jones & Shikanov, 2019). Aunque la membrana basal (barrera del folículo) restringe el paso de moléculas por su tamaño, limitando el acceso de compuestos extraños y nocivos al folículo en desarrollo (Da Broi et al., 2018), se ha reportado que la mayoría de moléculas de peso molecular entre 220-500 kDa pueden cruzar libremente la barrera folículo-vascular (Floehr et al., 2016).

La composición del fluido folicular juega un papel crítico para el desarrollo del folículo teniendo profundas implicaciones reproductivas y patogénicas (Emori & Drapkin, 2014) ya que contiene varios factores como proteínas, factores de complemento y antioxidantes, que median en el crecimiento de los folículos y los ovocitos (Lim et al., 2017). Al ser su composición similar al

plasma, los cambios metabólicos y componentes nocivos séricos también se expresan en el microambiente folicular, influyendo directamente sobre la maduración y calidad del ovocito (Da Broi et al., 2018; Valckx et al., 2012). Sus componentes pueden alterarse de manera directa por las vías de señalización hormonal paracrina y autocrina e indirectamente por afectaciones sistemáticas (Da Broi et al., 2018). Los cambios y alteraciones del estado físico-químico del líquido folicular pueden influenciar la calidad del ovocito desde la maduración hasta la fecundación, desencadenando eventos *downstream* o “corriente bajo” que pueden contribuir a una esteroidogénesis desequilibrada, una luteinización inhibida e interrupción de una adecuada interacción ovocito-CCs (Da Broi et al., 2018). A pesar de su importante rol en la salud y competencia del COC, no se conoce la concentración exacta de cada uno de los componentes del FF que entran en contacto con el ovocito *in vivo*, ni de qué manera pueden afectar determinadas patologías o síndromes a la composición de este fluido biológico (Da Broi et al., 2014), si bien se ha descrito la presencia de compuestos como el colesterol, la apolipoproteína A1 o carnitina libre en el fluido folicular y en suero de mujeres sometidas a tratamientos de reproducción asistida (TRA) (Valckx et al., 2012). Así pues, las pacientes infértiles con trastorno metabólico del síndrome de ovario poliquístico (PCOS) clásico tienen un microambiente intrafolicular anormal con elevados niveles del factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) e interleuquinas, expresión alterada de miRNAs y desarrollo deficiente de los ovocitos (Da Broi et al., 2018; Dumesic et al., 2015). La endometriosis es otra afectación que puede perturbar la composición del FFH influyendo negativamente en la competencia del ovocito (Da Broi et al., 2014). Como se ha comentado anteriormente, la edad es otro de los factores que afecta a las células foliculares y por tanto a la composición del fluido folicular, encontrándose relación del proceso de envejecimiento con el estrés oxidativo y el incremento de ROS en este fluido biológico, lo que afecta a la calidad ovocitaria (Da Broi et al., 2018). El índice de masa corporal (IMC) también ocasiona cambios en el microambiente folicular alterando los niveles de metabolitos de la insulina y triglicéridos, aunque se desconoce en qué medida estos cambios pueden afectar la calidad del ovocito (Valckx et al., 2012).

### **I.3.1. Proteínas**

Por su importancia biológica, las proteínas constituyen un capítulo trascendente en cualquier fluido reproductivo (Dumesic et al., 2015). El FF humano tiene una composición proteica compleja (Ambekar et al., 2013; Dumesic et al., 2015), que varía a lo largo de la foliculogénesis

y la ovulación (Ambekar et al., 2013). Se han reportado 789 proteínas en el FFH (Ambekar et al., 2013; Dumesic et al., 2015), siendo su mayoría resultantes de alrededor de 3.700 péptidos únicos procedentes del plasma (Ambekar et al., 2013; Lim et al., 2017). Muchas de las proteínas presentes en el FF son exclusivas del microambiente folicular, derivando su síntesis y secreción de las células foliculares y de los ovocitos (Ambekar et al., 2013). Entre estas proteínas están la proteína asociada a la inflamación TNFAIP6 y la glicoproteína multifuncional estaniocalcina 1 (Ambekar et al., 2013; Lim et al., 2017; Nagyova, 2018), involucradas en procesos biológicos específicos relacionados con el metabolismo del complemento y los lípidos (Dumesic et al., 2015).

En la bibliografía hay discordancia referente a la concentración de proteínas totales en el FFH comparada con los niveles séricos, ya que algunos trabajos han reportado concentraciones foliculares similares a las del suero (Floehr et al., 2016; Nagy et al., 1989; Shalgi et al., 1973; Velazquez et al., 1977), mientras que otros estudios encuentran diferencias (Gonzalès et al., 1992; Valckx et al., 2012). La concentración de proteínas totales reportada en el FFH oscila desde 4.87 g/dl a 7.28 g/dl (Gonzalès et al., 1992; Velazquez et al., 1977) (**Tabla I.1**), encontrándose variaciones entre pacientes (Shalgi et al., 1973). Se ha reseñado que una elevada concentración de proteínas en el FFH (hiperproteinemia folicular) estaría asociada a ovocitos con capacidad de desarrollo alterada, bajo número de embriones formados y reducido número de blastocistos de alta calidad en casos de fecundación in vitro (FIV) (Valckx et al., 2012). Por otro lado, también se ha descrito que en mujeres con endometriosis los niveles muy bajos de proteínas totales en el FF (hipoproteinemia folicular) ocasionarían un microambiente con efectos nocivos sobre la calidad de los ovocitos (Da Broi et al., 2014; Valckx et al., 2012). Así pues, tanto los niveles de proteínas altos como bajos resultan en una alteración del microambiente folicular que impacta negativamente sobre la calidad ovocitaria influyendo en la posterior competencia del desarrollo del gameto femenino.

La proteína sérica más abundante e importante en el FFH es la **albúmina**, que actúa en la regulación osmótica y se comporta como antioxidante (Freitas et al., 2017; Otsuki et al., 2012). No existe un consenso sobre los niveles de albúmina en el FFH y se han reportado tanto valores superiores (Otsuki et al., 2012; Velazquez et al., 1977) como inferiores a los del plasma (Shalgi et al., 1973), así como concentraciones similares entre ambos fluidos biológicos (Nagy et al., 1989). La concentración de albúmina reportada en el FFH oscila de 3.28 g/dl a 4.82 g/dl (Gonzalès et al., 1992; Velazquez et al., 1977) (Tabla I.1). Los niveles de albúmina han sido

asociados a la calidad ovocitaria, encontrándose concentraciones disminuidas en muestras de FFH con ovocitos estructuralmente degenerados, capacidad de desarrollo alterada, bajo número de embriones formados y bajo número de blastocistos de alta calidad (Otsuki et al., 2012; Valckx et al., 2012).

**Tabla I.1. Concentración de proteínas totales (PT) y albúmina en fluido folicular humano.**

Referencia	PT (g/dl)	Albúmina (g/dl)	Casos (n)	Diagnóstico de infertilidad	Estimulación ovárica
(Shalgi et al., 1973)	5.8±0.10	4.0±0.19	13	No se especifica	No
(Velazquez et al., 1977)	7.28±0.42	4.82±0.26	6	PCOS	No
(Nagy et al., 1989)	-	0.26±0.79	36	No se especifica	Sí
(Gonzalès et al., 1992)	4.87±0.52	3.28±0.41	10	No se especifica	Sí
(Valckx et al., 2012)	5.60±0.50	4.00±0.30	106	Idiopático, PCOS, endometriosis, inmunológico, tubo-peritoneal, tubárico	Sí

*PCOS: Síndrome de ovario poliquístico.*

Las **globulinas** son otro grupo de proteínas séricas presentes en el FFH que incluyen proteínas transportadoras, enzimas, complemento e inmunoglobulinas (Busher, 1990). Mediante electroforesis las globulinas se dividen en cuatro fracciones que son  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  (Busher, 1990). En el FFH la concentración de globulinas es menor que a nivel sérico (2.46 vs. 3.19 g/dl) (Nagy et al., 1989; Velazquez et al., 1977), y algunas de ellas se asocian a la madurez ovocitaria y éxito en el desarrollo embrionario tras un tratamiento de FIV (Nagy et al., 1989; Pool & Martin, 1994; Rom et al., 1987).

En el FFH se han descrito también **otras proteínas** tipo transferasas, hidrolasas, metaloproteasas y serín proteasas, involucradas en el proceso de foliculogénesis (Ambekar et al., 2013). Niveles

elevados de varias citoquinas y factores de crecimiento como las interleuquinas o el TNF $\alpha$ , identificados en el FFH, se han asociado a una calidad deficiente de los ovocitos en pacientes con PCOS, (Dumesic et al., 2015; Emori & Drapkin, 2014). En cuanto a las N-glicoproteínas identificadas en el FFH con funciones fisiológicas fundamentales en la regulación de la maduración de ovocitos y la ovulación durante la foliculogénesis, se encuentran sobre-expresadas en pacientes estimuladas, por lo que se les ha relacionado con la inflamación y respuesta inmune (Lim et al., 2017). También se han identificado diversos factores pro-angiogénesis como cadherina 13, cadherina 6, neuropilina 1 y anti-angiogénesis como el inhibidor 1 de angiogénesis específico de cerebro y contactina 1, procedentes del plasma (Ambekar et al., 2013).

Otra proteína de origen sérico presente en el FFH es la fetuína B, que ejerce su actividad sobre el ovocito, previniendo el endurecimiento o *hardening* de la ZP antes de la fecundación, encontrándose sus niveles séricos aumentados en pacientes sometidas a estimulación ovárica y con resultados exitosos en un tratamiento de FIV. Su análisis en pacientes que se someterán a TRA puede ser de ayuda para la elección de la técnica, FIV o inyección intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI), más adecuada para superar la ZP como barrera (Floehr et al., 2016).

En general, la mayor parte de proteínas del FFH están involucradas en procesos metabólicos, remodelación de la matriz extracelular y respuestas inmunitarias (Dumesic et al., 2015); sin embargo, aún se desconoce la función de muchas de ellas (Ambekar et al., 2013). Queda claro que la mezcla compleja de proteínas y otros factores del fluido folicular proporciona un microambiente importante para algunos procesos fisiológicos, así como el progreso adecuado de los ovocitos, y su potencial de desarrollo (Amano et al., 2014; Baka & Malamitsi-Puchner, 2006; Edwards, 1974), por lo que este fluido de fácil disponibilidad en los ciclos de FIV podría brindar información respecto a biomarcadores no invasivos sobre la calidad de ovocitos y predicción de la calidad del embrión (Basuino & Silveira, 2016; Revelli et al., 2009). Pese a la importancia biológica de las proteínas del FFH (Dumesic et al., 2015), aún no se ha definido con claridad cómo la variabilidad de sus concentraciones afecta la calidad y fertilidad de los ovocitos obtenidos, ni si estas concentraciones proteicas podrían ser utilizadas como predictores de dicha calidad. Sin duda, hacen falta más estudios que ahonden en este campo ya que este parámetro fisiológico es básico, sencillo y rápido de determinar y podría aportar una información relevante sobre la calidad, competencia y futuro desarrollo embrionario de los gametos obtenidos tras una punción folicular, y ser aplicado en la práctica clínica en reproducción asistida.

### I.3.2. Hormonas

Otro grupo de moléculas relevante que contiene el fluido folicular son las hormonas que influyen directa e indirectamente en la madurez del ovocito (Da Broi et al., 2018; Emori & Drapkin, 2014). El perfil hormonal en este fluido es complejo y varía dependiendo de la fase del ciclo menstrual, la edad de la mujer y su estado de salud (Emori & Drapkin, 2014). Algunas hormonas presentes en este fluido son la hormona folículo estimulante (FSH), hormona luteinizante (LH), estradiol (E2), progesterona (P4) y testosterona (Lu et al., 2019).

Dentro de las hormonas gonadotróficas, la **FSH** estimula el desarrollo de los folículos primordiales, mantiene y selecciona el folículo dominante a través de un ciclo de retroalimentación (Emori & Drapkin, 2014). En lo que respecta a la hormona **LH**, sus niveles séricos aumentan con la edad de la mujer, alcanzando su punto máximo durante la menopausia (Emori & Drapkin, 2014), mientras que los niveles foliculares permanecen estables en toda la ventana reproductiva y no estarían afectados por el estado de fertilidad de la mujer, pero sí por la estimulación ovárica y el protocolo empleado? (Emori & Drapkin, 2014).

El **E2**, hormona sérica dominante entre las fases foliculares media y pre-ovulatoria, disminuye sus niveles en mujeres de edad avanzada, siendo sus niveles foliculares (2.2-130.0 nmoles/l) consistentes con los séricos y encontrándose elevadas concentraciones en pacientes con PCOS y con endometriosis (Emori & Drapkin, 2014; Wen et al., 2010). Por su parte, la **P4** es otra hormona sérica fundamental en el líquido folicular durante las etapas finales del desarrollo del folículo y ovulación, encontrándose su concentración (1.1-1255.0  $\mu$ moles/l) (Wen et al., 2010) influenciada por la edad, con mayores niveles a medida que la mujer envejece (Emori & Drapkin, 2014). Algunos reportes indican que la concentración folicular de esta hormona no altera el desarrollo del ovocito ni su capacidad para ser fecundado (Dumesic et al., 2015; Emori & Drapkin, 2014); sin embargo, también se han descrito bajas concentraciones de esta hormona en los folículos que contienen ovocitos inmaduros en estadio de vesícula germinal (VG) (Da Broi et al., 2018).

La **hormona antimuleriana** (AMH), también presente en el FFH con niveles que imitan estrechamente a los séricos (concentración media de 1.20 ng/ml) (Sacha et al., 2020), es un marcador del estado de la reserva ovárica y no se ve afectada por las fluctuaciones de otras

hormonas, bajando sus niveles únicamente con el aumento de la edad y la disminución de la reserva ovárica (Emori & Drapkin, 2014).

La **irisina**, hormona que aumenta normalmente en los fluidos biológicos con el ejercicio, también está descrita en el FFH, encontrándose una relación positiva entre sus niveles séricos y foliculares en pacientes con PCOS ( $11.18 \pm 5.14 \mu\text{g/ml}$  vs.  $11.06 \pm 4.93 \mu\text{g/ml}$ ,  $p < 0.96$ ). Por su parte en pacientes con respuesta ovárica alterada, los niveles foliculares no aumentan con los niveles séricos, lo que sugiere que la transferencia de esta hormona desde la sangre al FFH no es una simple difusión, pudiendo estas pacientes tener sus células foliculares afectadas por una vascularización débil (Acet et al., 2016).

**Otras hormonas** relevantes descritas en el FFH son: i) el **cortisol** ( $6.8\text{-}15.7 \mu\text{g/dl}$ ) (Fateh et al., 1989), cuyos niveles elevados se relaciona positivamente con la maduración de los ovocitos y la fecundación (Dumesic et al., 2015), ii) las hormonas **tiroides** tirotropina (T3) y tiroxina (T4) libre presentes en el FF de mujeres sometidas a TRA con y sin tiroiditis autoinmune (Medenica et al., 2018), y iii) la **insulina** cuyos niveles, así como los de la glucosa, se correlacionan con el IMC, vinculando una homeostasis insulina-glucosa desordenada con una calidad deficiente de los ovocitos (Da Broi et al., 2018; Dumesic et al., 2015). Por último, andrógenos como la **testosterona** también se expresan en el ovario y trompas de Falopio, jugando un papel crítico en el desarrollo temprano del folículo (Emori & Drapkin, 2014). Sus concentraciones en el FFH varían entre  $0.3\text{-}110.0 \text{ nmoles/l}$  (Wen et al., 2010). Aún no está completamente clara la relación de sus niveles con la fertilidad; sin embargo, se han reportado niveles elevados de este andrógeno en los folículos maduros de pacientes con PCOS (Emori & Drapkin, 2014), así como bajas concentraciones en el FFH de folículos con ovocitos inmaduros (Da Broi et al., 2018).

### **I.3.3. Metabolitos del estrés oxidativo**

Los radicales libres se producen normalmente dentro de las células como subproductos del proceso metabólico en todos los organismos aeróbicos y en concentraciones muy bajas (Teixeira et al., 2016). Sin embargo, son inestables y altamente reactivos, volviéndose estables al adquirir electrones de cualquier molécula cercana como ácidos nucleicos, lípidos, proteínas o carbohidratos, provocando una cascada de reacciones en cadena que resultan en daño y enfermedad celular (Agarwal et al., 2005). El desequilibrio entre factores oxidantes y

antioxidantes a favor de los oxidantes se define como “estrés oxidativo” y conduce a una interrupción de la señalización celular, del control redox y/o daño molecular (Sies et al., 2017). Una de las principales consecuencias del estrés oxidativo/nitrosativo es el daño en las bases de los ácidos nucleicos, las proteínas, los lípidos (incluidos los fosfolípidos) y los carbohidratos, lo que puede comprometer la salud de las células, así como inducir una variedad de respuestas celulares como la muerte celular por necrosis o apoptosis (Teixeira et al., 2016). Bajo condiciones patológicas, se ha descrito la presencia de compuestos nocivos en el FFH como son los mediadores inflamatorios, metabolitos del estrés oxidativo, especies reactivas de oxígeno (ROS), especies reactivas de nitrógeno (RNS), toxinas, etc. (Da Broi et al., 2018; Emori & Drapkin, 2014). Al exceder la capacidad de las CCs para metabolizar y/o neutralizar estos compuestos nocivos, afectan negativamente el desarrollo del ovocito impidiendo la reanudación y/o progresión apropiada de la meiosis (Da Broi et al., 2018).

Las ROS son radicales libres que se han detectado, entre otros, en los ovarios y el FFH, y participan en distintos eventos reproductivos (Agarwal et al., 2005; Cigliano et al., 2002), como la maduración de ovocitos, esteroidogénesis ovárica, función del cuerpo lúteo y luteólisis (Agarwal et al., 2005). El incremento de los niveles de las ROS en el FFH puede darse por causas comunes (Agarwal et al., 2005) como la edad, lo que afecta la calidad ovocitaria (Da Broi et al., 2018). Igualmente, un ambiente folicular con niveles aumentados de glucosa se relaciona con mayores niveles de ROS conduciendo a una deficiencia de antioxidantes en el ambiente folicular (Da Broi et al., 2018) y contribuyendo al deterioro del COC (Valckx et al., 2012).

Aunque el papel de las ROS en distintos eventos reproductivos ha sido más estudiado que el de las RNS, la evaluación de la concentración de residuos de tirosina nitrada en las proteínas se utiliza ampliamente como marcador del daño proteico por estrés oxidativo (Cigliano et al., 2002; Teixeira et al., 2016), describiéndose también su presencia en los ovarios y el FFH (Agarwal et al., 2005; Cigliano et al., 2002). En las células, las RNS más comunes son el óxido nítrico (NO) y el dióxido de nitrógeno (NO<sub>2</sub>) (Agarwal et al., 2005). Además, el peroxinitrito es otra especie nitrante importante que se forma por la combinación del anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) y el NO, provocando un daño oxidativo que resulta en la nitración del residuo tirosina de las proteínas, dando como resultado el producto 3-nitrotirosina (3-NT) (Cigliano et al., 2002; Teixeira et al., 2016). La nitración del residuo tirosina es un proceso común de modificación postraducciona de las proteínas que ocurre en condiciones fisiológicas, pero el aumento significativo en la extensión de este proceso se ha asociado con una amplia gama de enfermedades (Teixeira et

al., 2016). El estudio de los niveles de 3-NT para evaluar el alcance del daño oxidativo de las proteínas ha sido ampliamente estudiado en diferentes tejidos y fluidos biológicos incluidos plasma, suero, orina, líquido cefalorraquídeo y líquido sinovial, pudiendo encontrarse niveles ligeramente más elevados en plasma sanguíneo de individuos con condiciones patológicas (Teixeira et al., 2016). Sin embargo, los niveles de 3-NT no han sido analizados tan ampliamente en el FFH, reportándose concentraciones micromolares de 1.5 a 35 en el FFH de mujeres infértiles y relacionándolo como parte de los eventos que impulsan la atresia folicular (Cigliano et al., 2002). Por otra parte, se han evaluado las concentraciones directas de tirosina no nitrada en el FF de mujeres sometidas a estimulación ovárica controlada, encontrando menores concentraciones de este aminoácido en el FF de mujeres con síndrome de hiperestimulación ovárica (OHSS) comparado con las normo-respondedoras (Amano et al., 2014), probablemente debido a que en pacientes con OHSS se ha provocado un mayor daño oxidativo que resulta en la nitración de los residuos de tirosina de las proteínas, aumentando así los niveles de 3-NT. Por ello, evaluar los niveles del marcador de estrés oxidativo 3-NT en el FFH y su posible correlación con la calidad ovocitaria y fertilidad sería muy interesante de cara a desarrollar biomarcadores y predictores tempranos del éxito de técnicas de reproducción asistida como la FIV, ICSI y el cultivo embrionario temprano.

En cuanto a la detección y cuantificación de 3-NT, se han desarrollado diferentes métodos, como son los inmunoquímicos basados en el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Estos métodos emplean anticuerpos marcados con enzimas para detectar un compuesto específico, donde el complejo antígeno-anticuerpo se une además a un anticuerpo secundario acoplado a una enzima, seguido de la adición de un sustrato cromogénico que produce un cambio de color visible o fluorescencia, permitiendo la cuantificación del compuesto. Si no hay proteínas modificadas con 3-NT en la muestra, el anticuerpo detector anti-3-NT se une a la proteína que contiene 3-NT que recubre los pocillos, generando una señal de unión máxima (100%). Por el contrario, si la proteína modificada con 3-NT soluble está presente en la muestra, competirá por la unión del anticuerpo detector anti-3-NT. Si bien estos métodos son sencillos y consumen poco tiempo, uno de sus inconvenientes es la cuantificación precisa en muestras biológicas con muy bajas concentraciones de 3-NT. Ahora bien, no todos los residuos de tirosina en una proteína están disponibles para nitrarse pudiendo afectar esto a su accesibilidad al solvente, como el caso de la albúmina sérica humana que contiene 18 residuos de tirosina, aunque sólo 2 son predominantemente susceptibles a la nitración (Teixeira et al., 2016).

#### I.3.4. Otros componentes

Además de los compuestos mencionados, en el FF también se han descrito **lisofosfolípidos** como el ácido lisofosfatídico (LPA) y lisofosfatidilcolina siendo las concentraciones de LPA más altas que los niveles plasmáticos, lo que podría significar menor actividad de las enzimas degradantes de LPA en el ambiente folicular ovárico que en la sangre (Yamamoto et al., 2016). También se han identificado **ácidos grasos** en el microambiente folicular, aunque no se ha dilucidado su influencia sobre el ovocito y la fertilidad (Emori & Drapkin, 2014). Por una parte, se han relacionado concentraciones elevadas de ácidos grasos no esterificados o libres con el deterioro de los COCs y la baja competencia para el desarrollo del ovocito en mujeres con endometriosis (Valckx et al., 2012). Sin embargo, también se ha descrito que niveles elevados de los ácidos grasos linolénico, esteárico y araquidónico, unido a bajas concentraciones de los ácidos grasos palmítico y saturados totales, estarían asociados con una buena calidad ovocitaria (Dumesic et al., 2015).

Otros componentes identificados en el FFH con un efecto favorable sobre la fecundación y desarrollo embrionario son los **micro ARNs (miARNs)**, pequeñas moléculas endógenas de ARN no codificantes que desempeñan un papel importante en la regulación pos-transcripcional, reprimiendo la traducción de un ARNm mediante su vinculación específica a estos ARN (Diez-Fraile et al., 2014; Santonocito et al., 2014; Scalici et al., 2016). Estas pequeñas moléculas, formadas por 20-40 nucleótidos, actúan como moduladores de la comunicación intracelular (Dumesic et al., 2015) y han sido involucrados en procesos como la proliferación folicular y apoptosis, esteroidogénesis y maduración ovocitaria (Scalici et al., 2016). También se considera que los miRNAs de los ovocitos y/o células de la granulosa actúan como factores claves para mantener la foliculogénesis o mejorar el mecanismo de atresia (Diez-Fraile et al., 2014). Se han identificado 37 miRNAs en el FFH (Santonocito et al., 2014), aunque se estima que alrededor de 200 tipos diferentes de miRNAs, tanto contenidos en exosomas como de forma libre, estarían presentes en este fluido (Dumesic et al., 2015). La alteración en la expresión de algunos de estos miRNAs del FFH se ha asociado con la infertilidad (Santonocito et al., 2014) tal y como ha sido reportado en mujeres con PCOS (Dumesic et al., 2015). De entre todos ellos, el miR-320a se ha propuesto como un marcador de calidad y cantidad de ovocitos maduros ya que la expresión de este miRNA está disminuida en pacientes con menos de 2 ovocitos maduros (Scalici et al., 2016).

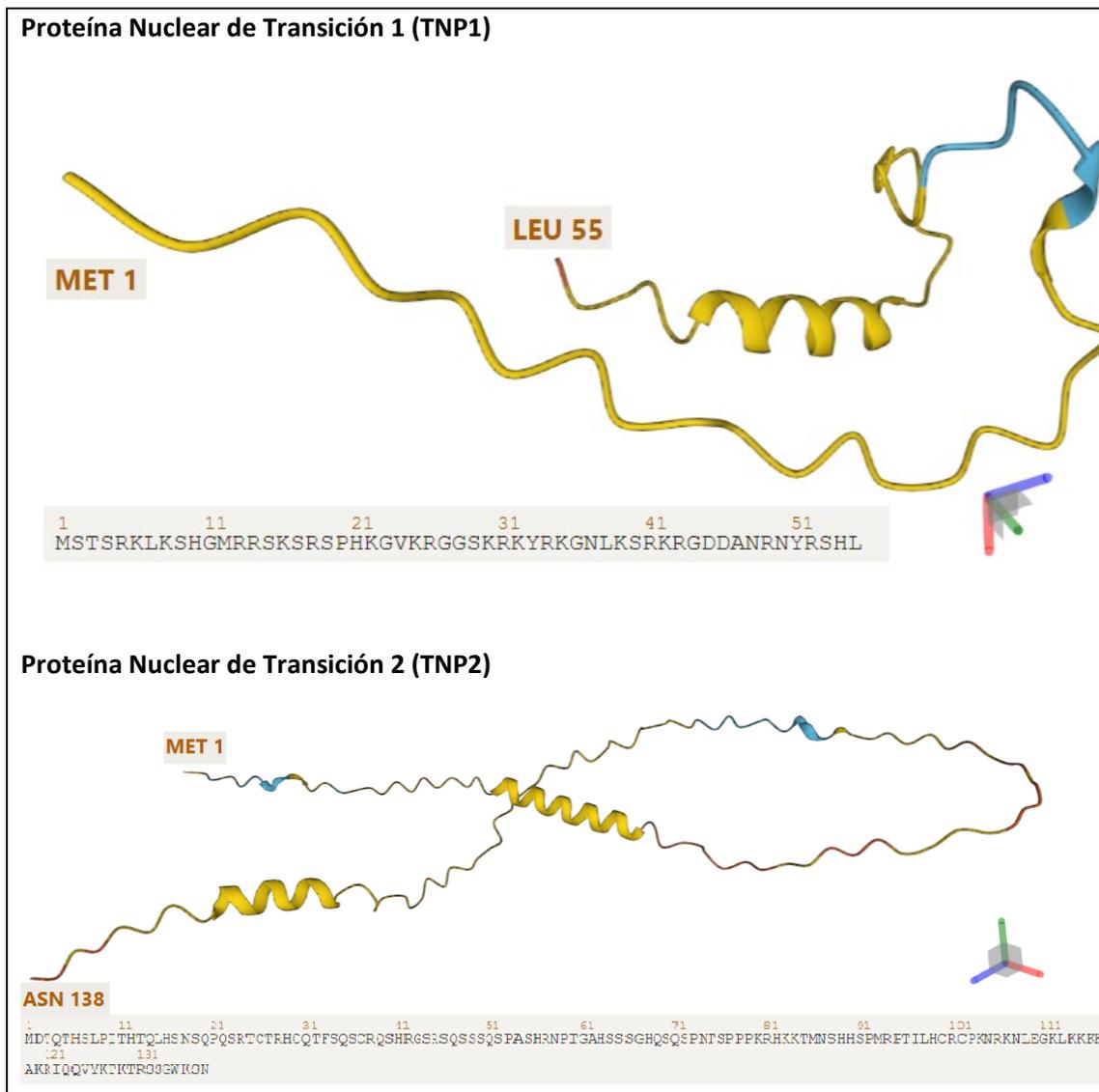
#### **I.4. Espermatogénesis**

La espermatogénesis es el proceso que permite la formación de espermatozoides haploides maduros aptos para la fecundación, a partir de células germinales diploides (Cannarella et al., 2019; Gill-Sharma et al., 2011; Hao et al., 2019; Rathke et al., 2014). Este proceso es de tipo cíclico y tiene lugar en el epitelio seminífero de los testículos (Cannarella et al., 2019; Hao et al., 2019; La & Hobbs, 2019), con una duración en humanos entre 68 y 74 días, que varía entre especies animales (Cannarella et al., 2019; Chen H., 2017; La & Hobbs, 2019). La espermatogénesis se divide en tres fases: i) la fase premeiótica, en la que acontece la proliferación de espermatogonias y diferenciación en espermatocitos primarios; ii) la fase meiótica, donde los espermatocitos se convierten en espermátidas redondas haploides tras la segunda división meiótica; y, por último iii) la fase postmeiótica o espermiogénesis donde las espermátidas redondas sufren transformaciones morfológicas y la condensación extrema de la cromatina para formar espermatozoides maduros (Cannarella et al., 2019; Gill-Sharma et al., 2011; Hao et al., 2019; La & Hobbs, 2019; Oliva, 2006; Rathke et al., 2014), esta última fase tiene una duración de 26 días en mamíferos (Cannarella et al., 2019; Gill-Sharma et al., 2011). Durante la misma se reorganiza la cromatina basada en histonas, las cuales se sustituyen en su mayoría por protaminas, lo que favorece la compactación del ADN (Aydos et al., 2018; Rathke et al., 2014). Además, se produce la formación del acrosoma y la pieza media, la organización del flagelo y la eliminación de citoplasma (Cannarella et al., 2019). El proceso de maduración termina con la espermiación o liberación de los espermatozoides a la luz del túbulo seminífero (Gill-Sharma et al., 2011; Oliva, 2006).

##### **1.4.1. Proteínas nucleares de transición (TNPs) y protaminas**

Las **proteínas nucleares de transición** (TNPs) son las proteínas con las que se empaqueta de forma transitoria el ADN espermático durante la espermiogénesis, tras la eliminación de la mayoría de las histonas, y hasta el reemplazo definitivo por las protaminas. A nivel químico, las TNPs son proteínas pequeñas, ricas en lisina y arginina, que ejercen funciones importantes en la remodelación de la cromatina durante la espermiogénesis (Hao et al., 2019). En humanos existen 2 tipos de TNPs codificadas por genes de una sola copia: *TNP1* (NCBI Gene ID: 7141) localizado en el cromosoma 2 (2q35) y *TNP2* (NCBI Gene ID: 7142) que se ubica en el cromosoma 16 y está estrechamente ligado a los genes que codifican protaminas (Meistrich et al., 2003;

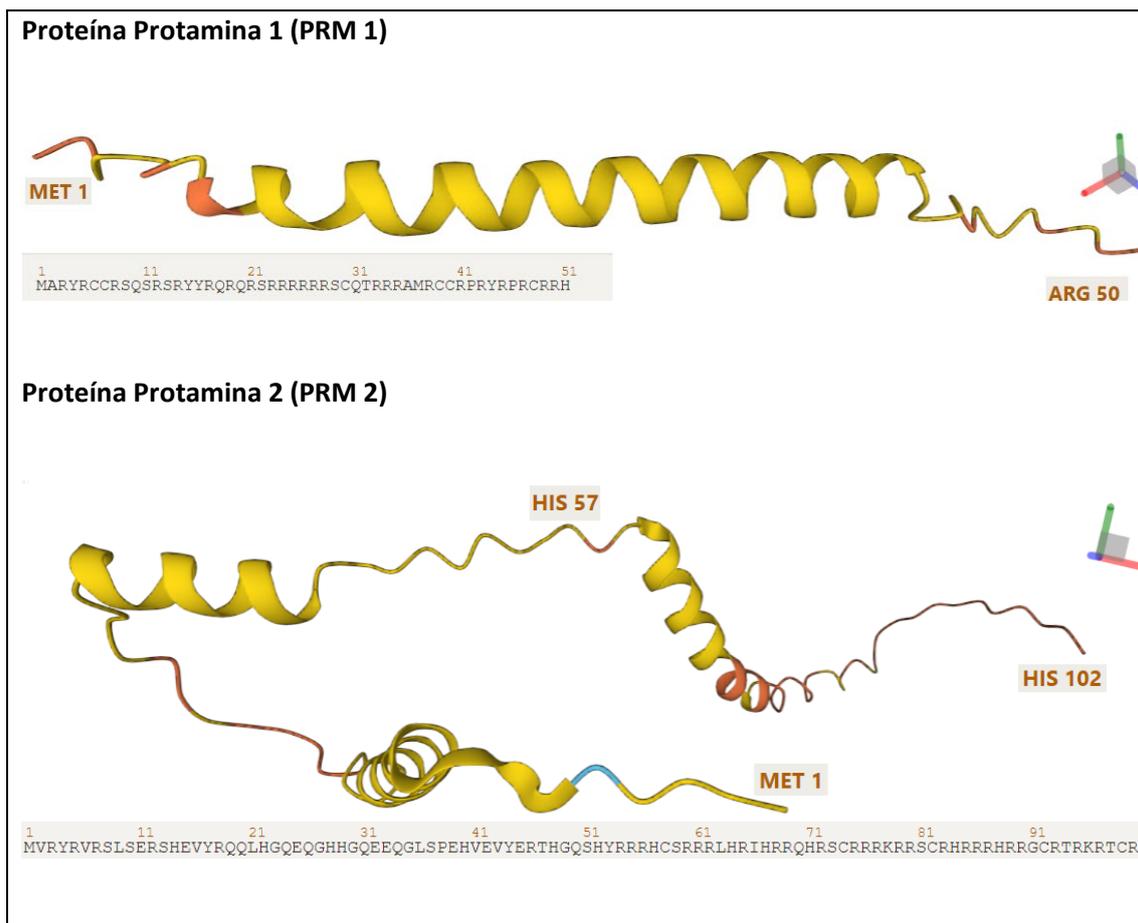
Rathke et al., 2014) (**Figura I.1**). La proteína TNP1 está formada por 20% lisina y 20% arginina, y se relaciona con la eliminación de histonas, siendo capaz de estimular la reparación del ADN *in vitro*, mientras que TNP2 es una proteína que condensa el ADN y está formada por 10% lisina, 10% arginina y 5% cisteína (Gill-Sharma et al., 2011; Hao et al., 2019). *TNP1* se expresa más que *TNP2* (~2.5 veces más) y se conserva en varios mamíferos, mientras que las secuencias de *TNP2* presentan menor homología y existe variabilidad en su nivel de expresión y abundancia entre especies (Moritz & Hammoud, 2022).



**Figura I.1. Estructura tridimensional de las proteínas TNP1 y TNP2.** Fuente: *GeneCards*, *The Human Gene Database* (<https://www.genecards.org/>). Estructura proteica tridimensional predicha por el programa *AlphaFold*. LEU: leucina. MET: metionina. ASN: asparagina.

Por su parte, las **protaminas** son pequeñas proteínas básicas ricas en arginina que se encuentran conservadas en muchas especies y solo están presentes en espermatozoides maduros (Aydos et al., 2018; Balhorn, 2007; Hao et al., 2019; Steger & Balhorn, 2018). En humano, ratón, hámster, caballo y algunos primates existen 2 tipos de protaminas, protamina 1 (PRM1) y protamina 2 (PRM2), que no interactúan entre sí, pero mantienen una ratio PRM1/PRM2 entre 0.92-1.25 (Aoki, Christensen, et al., 2006; Hamad, 2019; Hammadeh et al., 2010; Hao et al., 2019; Meistrich et al., 2003; Rathke et al., 2014; Savadi-Shiraz et al., 2015; Steger & Balhorn, 2018). PRM1 es una proteína nuclear de 50 aminoácidos que exhibe 3 dominios y puede unir hasta 15 pb de ADN, mientras que para PRM2 se han descrito en primates, incluida la especie humana, dos formas procesadas llamadas PRM2 (57 aminoácidos) y PRM3 (54 aminoácidos) (Steger & Balhorn, 2018) (**Figura I.2**). Mientras que PRM1 se expresa en su forma madura, PRM2 lo hace inicialmente como un precursor más largo (pro-PRM2) y se somete a un procesamiento proteolítico selectivo para producir su forma madura (PRM2) una vez unido al ADN (Moritz & Hammoud, 2022). Las protaminas son codificadas por los genes *PRM1* (NCBI Gene ID: 5619) y *PRM2* (NCBI Gene ID: 5620), ubicados en el cromosoma 16 (16p13.2 - 16p13.3) y tienen un papel crítico en la diferenciación de espermatozoides (Aydos et al., 2018; Steger & Balhorn, 2018). Se ha sugerido que el gen *PRM1* evolucionó de un tipo de histona H1, mientras que el gen *PRM2* se habría duplicado de *PRM1*, debido a que ambos comparten una homología de secuencia entre el 50% y el 70% (Steger & Balhorn, 2018). En mamíferos, ambos genes de protamina (*PRM*) están formados por 2 exones, separados por un solo intrón y sus regiones reguladoras 5' y 3' (Steger & Balhorn, 2018).

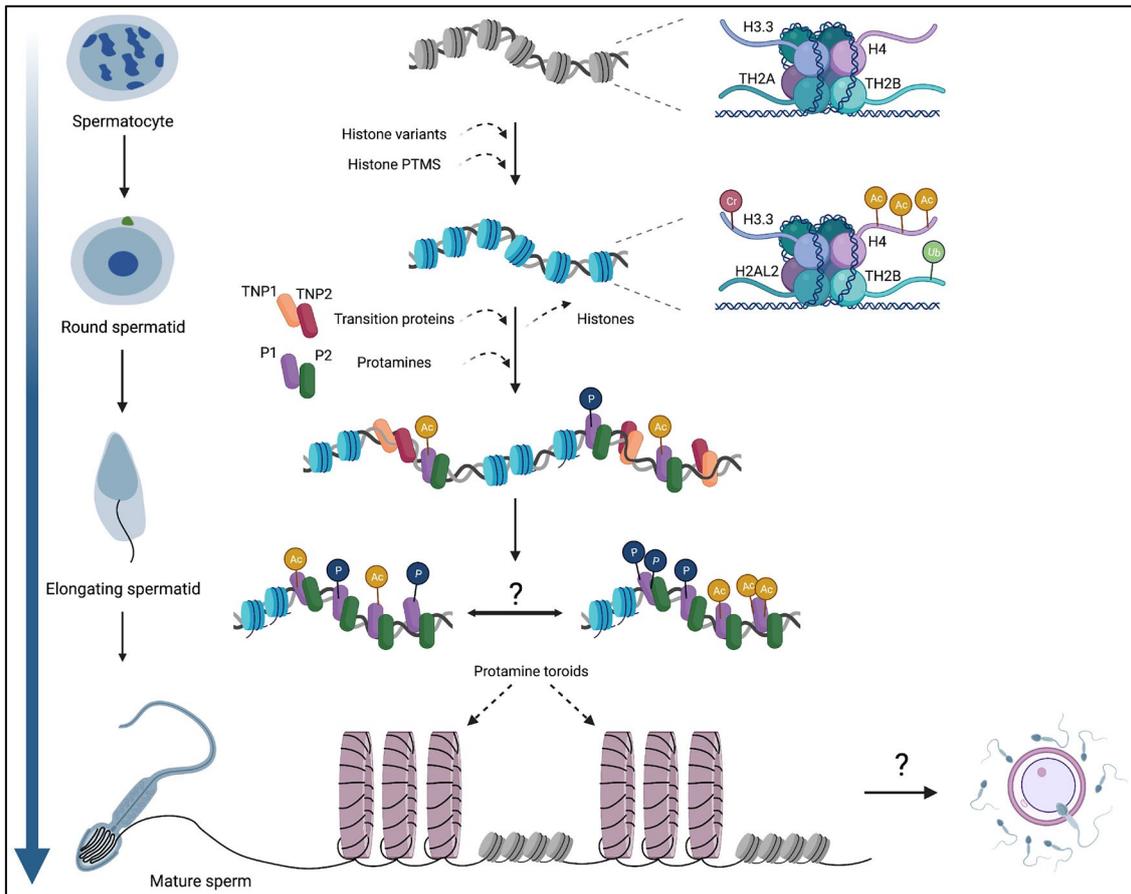
En humanos, la transcripción de los genes *TNP* y protaminas se inicia en las espermátidas redondas, inmediatamente después de que se complete la meiosis y sus transcritos se almacenan hasta una semana, para posteriormente traducirse durante la fase de alargamiento de las espermátidas, cuando dichas células son transcripcionalmente inactivas (Meistrich et al., 2003; Oliva, 2006; Steger & Balhorn, 2018), pudiendo detectarse ARNs mensajeros de estos genes también en espermatozoides maduros (Oliva, 2006). Esta represión traduccional del ARNm de las protaminas en las células espermáticas redondas se da mediante la unión de proteínas represoras de ARN en la región 3'-UTR y la presencia de una cola larga de poli-A (Steger & Balhorn, 2018). Las protaminas interactúan estrechamente con el ADN a través de un dominio central de unión al ADN rico en arginina (Balhorn, 2007) y, a diferencia de los genes *TNP*, la inactivación de *PRM1* o *PRM2* conlleva infertilidad masculina (Cho et al., 2001), lo que demuestra que ejercen un papel esencial en la maduración espermática.



**Figura I.2. Estructura tridimensional de las proteínas Protamina 1 y Protamina 2.** Fuente: GeneCards, The Human Gene Database (<https://www.genecards.org/>). Estructura proteica tridimensional predicha por el programa *AlphaFold*. ARG: arginina. HIS: histidina. MET: metionina.

#### I.4.2. Reemplazo histonas - protaminas y accesibilidad de la cromatina espermática.

Como se ha indicado, una de las características específicas de la espermiogénesis es el reemplazo de histonas por protaminas (Canovas & Ross, 2016; Oliva & Castillo, 2011) (**Figura I.3**). Dicho reemplazo es gradual y principalmente concomitante con el alargamiento que se produce durante la fase postmeiótica, durante la cual las histonas canónicas (H3, H4, H2A, H2B) se van reemplazando secuencialmente por diferentes variantes de histonas (H2A.X., H2A.Z., H3.3), entre ellas algunas específicas de testículo (H1T, H1T2, H3T, TH2A, TH2B), lo que favorece la desestabilización de los nucleosomas al debilitar la asociación entre los dímeros y los tetrámeros de las histonas canónicas.



**Figura I.3. Proceso de intercambio de histonas a protaminas.** Tomada de (Moritz & Hammoud, 2022). La incorporación de las variantes de histonas se inicia durante la meiosis en espermatocitos (H3.3, TH2A y TH2B) y continúa en la fase de espermátidas redondas (H2AL2), a la vez que se favorecen varias modificaciones postraduccionales en dichas variantes de histonas que inducen la desestabilización del nucleosoma. Mientras que las espermátidas comienzan a alargarse, las proteínas nucleares de transición (TNPs) y las protaminas se expresan y se incorporan a la cromatina y posteriormente las protaminas sufren varias modificaciones postraduccionales. Para finalizar, la unión protamina-ADN forma estructuras toroidales de cromatina espermática. Cr: crotonilación; Ac: acetilación; Ub: ubiquitinación; P: fosforilación.

Las variantes de histonas son más inestables que las histonas canónicas lo que favorece que sufran modificaciones postraduccionales como acetilación, fosforilación, ubiquitinización, etc. alterando la dinámica de unión histona-ADN y, por tanto, una mayor accesibilidad a la cromatina (Gaucher et al., 2010; Hammoud et al., 2009). La acetilación de histonas es una de las modificaciones más relevantes y, especialmente, la acetilación de la histona 4 (H4), que precede

al reemplazo de las histonas por las proteínas nucleares de transición (TNPs) y posteriormente por protaminas (Meistrich et al., 2003; Oliva & Castillo, 2011; Steger & Balhorn, 2018; Ward, 1993). La acetilación de histonas conlleva incorporación de cargas negativas, lo que reduce la interacción de las mencionadas histonas con las cargas negativas del ADN, dando como resultado una disminución de la afinidad entre las histonas y el ADN, favoreciendo la relajación de la estructura de la cromatina, la separación de las hebras y contribuyendo al reemplazo de las histonas por protaminas durante el proceso de espermiogénesis. Además, la hiperacetilación actúa como señal para reclutar enzimas que añaden grupos ubiquitina hacia las histonas favoreciendo así su degradación (Gill-Sharma et al., 2011).

Las TNPs se incorporan a la cromatina tras la eliminación de las histonas llegando a reemplazarlas en un 85% en la especie humana (Balhorn, 2007; Hammoud et al., 2009; Oliva & Castillo, 2011; Steger & Balhorn, 2018). Se conoce poco respecto a su distribución a lo largo del genoma espermático, aunque se sugiere que estas proteínas se unen uniformemente a todo el genoma de las espermátidas en proceso de elongación (Moritz & Hammoud, 2022). Si bien la función de estas proteínas aún es controvertida, se ha demostrado que ni TNP1 ni TNP2 son responsables de la configuración del ADN superenrollado (Lévesque et al., 1998). Las TNPs son importantes para una adecuada reorganización de la cromatina, pese a que no son requeridas para la sustitución de las histonas o deposición de las protaminas (Rathke et al., 2014) y también están involucradas en la reparación del ADN de células espermiogénicas (Gill-Sharma et al., 2011). Cada una de las TNPs muestra diferentes propiedades de unión al ADN, teniendo TNP1 una mayor afinidad por el ADN monocatenario, lo que pudiera facilitar la eliminación de las histonas; mientras que TNP2 tiene mayor afinidad por el ADN bicatenario, de modo que su acción estaría más relacionada con la estabilización y condensación de las fibras de ADN (Moritz & Hammoud, 2022). Mediante el uso de ratones con edición genética *knockout* para estas proteínas se demostró que la inactivación de *TNP1* o *TNP2* de forma separada solo ocasiona pequeños cambios morfológicos en los espermatozoides, mientras el *TNP* que se mantiene funcional muestra una elevada expresión, por lo que ambas proteínas podrían ejercer un efecto compensatorio entre ellas a pesar de sus diferencias (Yu et al., 2000; Zhao et al., 2001). De hecho, el doble *knockout TNP1-TNP2* en ratón sí conlleva alteraciones severas en la espermiogénesis con disminución de la motilidad y aparición de anomalías morfológicas (Shirley et al., 2004), alteración en la condensación de la cromatina y retención de histonas, lo que confirmaría la función redundante entre ambas proteínas en el proceso de reemplazo de histonas por protaminas (Bao & Bedford, 2016; Shirley et al., 2004; Zhao et al., 2004). Por su

parte, el mecanismo para la degradación de las TNPs desplazadas por protaminas aún no ha sido reportado (Gill-Sharma et al., 2011).

La incorporación de las protaminas a la cromatina espermática conlleva un cambio radical en su citoarquitectura (Gill-Sharma et al., 2011) volviéndose más compacta (Balhorn, 2007; Hammoud et al., 2009; Oliva & Castillo, 2011; Steger & Balhorn, 2018) y contribuyen indirectamente a la morfología pequeña e hidrodinámica que presenta la cabeza del espermatozoide (Balhorn, 2007; Hao et al., 2019; Steger & Balhorn, 2018), aunque los mecanismos exactos de cómo las protaminas inducen estos cambios conformacionales todavía no son suficientemente conocidos (Hao et al., 2019). Las protaminas permiten que la cromatina espermática se empaquete en una disposición toroidal (Gill-Sharma et al., 2011) manteniendo el genoma en un estado de alta condensación (Ward, 1993), proporcionando protección al ADN frente al daño provocado por nucleasas, mutágenos, ROS u otros factores externos como los genotóxicos (Aoki et al., 2005; Carrell et al., 2007; Miller et al., 2010).

Inicialmente se asumió que las protaminas se distribuían uniformemente a lo largo del ADN espermático y no contenían modificaciones postraduccionales; sin embargo, estudios recientes han demostrado que las protaminas tienen múltiples sitios donde se producen estas modificaciones, incluidas la acetilación, la fosforilación y la metilación (Brunner et al., 2014). De hecho, en ratón y humano el 53% de los péptidos de PRM1 y el 16% de PRM2 muestran este tipo de modificaciones, cuyas posiciones se mantienen en cada especie y muestran variabilidad entre distintas especies (Brunner et al., 2014; Soler-Ventura et al., 2020). Sin embargo, resulta curioso que la incorporación de las protaminas con estas modificaciones acontece tras la meiosis, cuando las células germinales son transcripcionalmente inactivas, por lo que dichas modificaciones no pueden ejercer efecto sobre la actividad transcripcional de los genes. A la vista del fenotipo de ratones *knockout* para *PRM1* o *PRM2*, se ha propuesto que estas modificaciones pueden tener un papel relevante en la incorporación de dichas protaminas al ADN espermático y en el proceso de compactación propiamente dicho. En concreto se ha descrito que la fosforilación/desfosforilación tras la incorporación de las protaminas al ADN actúa como modulador de dicha unión en numerosas especies, entre ellas la humana (Ingles & Dixon, 1967; Seligman et al., 2004). Además, dichas modificaciones pueden tener una función en la transmisión de información epigenética al cigoto tras la fecundación (Moritz & Hammoud, 2022).

### **1.4.3. Alteraciones en la compactación de la cromatina espermática relacionadas con la infertilidad**

La compactación del ADN espermático basado en protaminas es uno de los procesos clave de la espermiogénesis (Moritz & Hammoud, 2022), que tiene como resultado la formación de espermatozoides maduros, que puedan llevar a cabo la fecundación y sean capaces de descondensar su cromatina para dar lugar a un desarrollo embrionario adecuado (Hao et al., 2019; Pourmasumi et al., 2017; Punjabi et al., 2019). Por lo tanto, alteraciones en este proceso afectarán la capacidad fecundante de estos espermatozoides, pudiendo verse involucrado cualquiera de los factores intrínsecos y extrínsecos que intervienen en la espermatogénesis (Nagaki et al., 2022) en sus diferentes etapas, teniendo en cuenta su complejidad y duración relativamente larga (Cavé et al., 2019; Pourmasumi et al., 2017). A esto se une que la remodelación de la cromatina en espermátidas haploides impide el uso de recombinación homóloga para reparar las roturas transitorias de doble cadena del ADN, creando inestabilidad génica, lo que entraña riesgos genéticos potenciales (Cavé et al., 2019). De hecho, una elevada cantidad de cromatina anormal en espermatozoides se asocia a pacientes infértiles, así como a parámetros espermáticos anormales (Pourmasumi et al., 2017). Además, la rotura o fragmentación del ADN puede ocurrir a lo largo de la vida del espermatozoide (Sakkas & Alvarez, 2010), y entre sus causas se encuentran diferentes enfermedades, factores socioambientales, y deficiencias en la protaminación y condensación del ADN (Alahmar et al., 2022; Esteves et al., 2021; Garcia-Segura, 2022), lo que se relaciona con un desarrollo embrionario deteriorado y mayor incidencia de aborto espontáneo (Oehninger & Ombelet, 2019).

Respecto a la compactación de la cromatina, los defectos relacionados con este proceso pueden estar asociados a cualquiera de los pasos que acontecen durante este evento y que comprenden desde las modificaciones postraduccionales de las histonas y la incorporación de sus variantes, hasta el reemplazo final por protaminas, pasando por las proteínas nucleares de transición. De forma global, la interrupción de la transición histonas-protaminas induce a una condensación insuficiente del núcleo espermático y aumenta la sensibilidad al daño del ADN, lo que puede afectar la embriogénesis (Aoki et al., 2005; Siddeek et al., 2018). Junto a estos, cualquier otro factor que implique una alteración en la expresión de genes que participan en el proceso, o alteraciones en las proteínas sintetizadas, puede tener relevancia en este aspecto, incluyéndose

los polimorfismos tanto de los genes para TNPs como protaminas, aspectos que se abordarán detalladamente en los siguientes apartados.

#### **1.4.3.1. Alteraciones relacionadas con las histonas**

Las modificaciones postraduccionales de histonas son cruciales para la regulación de algunos procesos en la espermatogénesis y la función espermática (Schon et al., 2019), como la retención de histonas en ciertas regiones genómicas (Torres-Flores & Hernández-Hernández, 2020). Variaciones en dichas modificaciones, como la disminución en la acetilación global de H4, se ha descrito en muestras seminales con astenozoospermia; sin embargo, no se ha podido aclarar si la disminución en la acetilación de H4 se debe a un aumento general en la retención de histonas no modificadas o a una disminución en la acetilación de histonas (Schon et al., 2019).

La participación en el proceso de compactación del ADN espermático de diferentes variantes de histonas se considera clave para un adecuado reemplazo de las histonas, mientras que los defectos en dicho proceso de eliminación de las histonas se ha propuesto como causa de protaminación inadecuada en los espermatozoides (Gill-Sharma et al., 2011), detectándose niveles elevados de histonas en hombres infértiles (Carrell & Liu, 2001). En ratón, la inactivación mediante *knockout* de H3T causa alteraciones en la diferenciación de las espermatogonias resultando en azoospermia, mientras el *knockout* de H2AL2 provoca un empaquetamiento defectuoso de la cromatina durante la espermiogénesis, debido al ensamblaje ineficiente de TNPs y protaminas (Moritz & Hammoud, 2022). No obstante, no todas las variantes de histonas incorporadas durante la espermiogénesis son esenciales para el intercambio de histonas a protaminas. En el caso de TH2B su carencia en ratones es compensada con la retención de isoformas alternativas de H2B y la adición de modificaciones desestabilizantes como la metilación de arginina y la crotonilación de lisinas en H2A, H2B, H3 y H4, lo que permite mantener la fertilidad. Por otra parte, los ratones que carecen del conector histona H1t específico de testículo retienen isoformas de H1 alternativas pero son fértiles (Moritz & Hammoud, 2022). En hombres, la hiperacetilación precoz de H4 en espermatozoides se asocia con la alteración de la espermatogénesis. (Steger & Balhorn, 2018).

#### 1.4.3.2. Alteraciones de proteínas nucleares de transición y protaminas

La integridad del ADN espermático puede ser perturbada tanto por alteraciones en las TNP y como en las protaminas. La expresión de los cuatro genes implicados en la compactación del ADN espermático (*TNP1*, *TNP2*, *PRM1* y *PRM2*) puede modificarse debido a varios factores, entre ellos la presencia de polimorfismos o mutaciones en los genes, factores físicos y ambientales, etc., y las variaciones en su expresión se han relacionado con alteraciones en el éxito de la fecundación y posterior desarrollo embrionario (Steger & Balhorn, 2018).

Se ha observado que la deficiencia del gen *TNP1* en ratones ocasiona reducción severa de la motilidad espermática, mientras que la deficiencia del gen *TNP2* ocasiona anomalías en la pieza intermedia y la cola de los espermatozoides (Yu et al., 2000; Zhao et al., 2001). Tanto *TNP1* como *TNP2* pueden tener redundancia funcional y solapamiento, pudiendo compensarse entre sí (Hao et al., 2019). La eliminación del gen que codifica las proteínas TNP1 o TNP2 mediante *knockout* en ratones provoca subfertilidad en los machos, observándose morfología espermática anormal, una motilidad progresiva disminuida y mayores niveles de proteína PRM2 sin procesar en el esperma maduro (Moritz & Hammoud, 2022). En ambos casos, sea TNP1 o TNP2 la proteína que no puede sintetizarse, los defectos en la motilidad progresiva de los espermatozoides no afectan a las tasas de fecundación cuando se utiliza ICSI (Moritz & Hammoud, 2022). Por otra parte, el *knockout* de ambos genes en ratones ha demostrado que provoca pérdida casi completa de la motilidad espermática progresiva y alteraciones en la composición de la cromatina espermática, condensación irregular, inadecuada síntesis de la proteína PRM2, incremento de espermátidas alargadas con roturas del ADN y aumento de anomalías estructurales durante el paso de los espermatozoides por el epidídimo (Meistrich et al., 2003; Moritz & Hammoud, 2022; Oliva, 2006).

Respecto a las protaminas, aunque se ha descrito que el empaquetamiento del ADN con protaminas no es esencial para el desarrollo embrionario temprano en ratones (Rathke et al., 2014), en humanos las alteraciones en la expresión de protaminas se asocian con infertilidad masculina, representado por una baja capacidad fecundante y alteraciones en el desarrollo embrionario tras la *FIV*, así como aborto espontáneo (Oliva, 2006; Oliva & Castillo, 2011; Steger & Balhorn, 2018). La eliminación completa del gen que codifica la proteína PRM2 en ratón causa infertilidad (Carrell & Liu, 2001; Moritz & Hammoud, 2022) mientras que la pérdida de un alelo es tolerada, describiéndose que el déficit de PRM2 en ratones conduce a daños del ADN y

muerte embrionaria (Gill-Sharma et al., 2011). Por su parte, se ha reportado en ratones que la haploinsuficiencia del gen que codifica para PRM1 es suficiente para causar infertilidad (Cho et al., 2001; Takeda et al., 2016), aunque recientemente se ha demostrado en ratón que los heterocigotos *PRM1*+/- son subfértiles (reducido tamaño de camadas e índice de gestación), mientras los homocigotos *PRM1*-/- muestran infertilidad (Merges et al., 2022). Referente al *knockout* de un solo alelo de estos genes en ratones, resulta en infertilidad pese a que su expresión sólo se da durante la fase haploide de la espermatogénesis (Oliva, 2006). Las mutaciones descritas en estos genes no afectan a la expresión de *PRM1* ni *PRM2* (Balhorn et al., 1988), por lo que es posible que las variaciones en la expresión de protaminas observadas en pacientes con infertilidad se deban a eventos posteriores a la traducción, como la poliadenilación, o eventos de escisión posterior a la traducción (Carrell & Liu, 2001). Se ha demostrado que la proporción entre proteínas PRM1 y PRM2 es importante y las desviaciones del ratio PRM1/PRM2 se asocian con infertilidad masculina, encontrándose proporciones anormales mayormente en pacientes infértiles sometidos a FIV (Carrell & Liu, 2001). Estas desviaciones son muy marcadas, ocasionando oligoastenozoospermia con ratios de PRM1/PRM2 muy bajos (<0.8) y astenoteratozoospermia con ratios de PRM1/PRM2 elevados (>1.12) (Aoki et al., 2005; Carrell & Liu, 2001; Oliva, 2006; Rathke et al., 2014), al igual que en pacientes con niveles elevados de fragmentación del ADN espermático (Steger & Balhorn, 2018).

#### **1.4.3.3. Polimorfismos descritos en los genes *PRM* y *TNP*, y su relación con la infertilidad humana**

Los polimorfismos genéticos hacen referencia a uno o más cambios de nucleótidos en la secuencia del ADN dentro de una población, con una frecuencia del 1% o más, mientras que una mutación es cualquier cambio poco frecuente en la secuencia de nucleótidos que generalmente, pero no siempre, causa enfermedad pudiendo este cambio provocar o no cambios fenotípicos (Karki et al., 2015; Lewin, 2008). Dentro de los polimorfismos, los de un solo nucleótido (SNP, *Single Nucleotide Polymorphism*) son los más comunes y se estima que surgen cada 1.000 pares de bases, pudiendo presentarse en áreas que flanquean genes codificantes, en regiones críticas para la unión de microARNs y la regulación de genes/proteínas, o en regiones intergénicas (Karki et al., 2015).

En los genes *TNP1* y *TNP2* se han identificado SNPs en diferentes poblaciones (**Tablas I.2 y I.3**) (Aoki, Christensen, et al., 2006; Heidari et al., 2019; Khattri et al., 2011; Miyagawa et al., 2005; Venkatesh et al., 2011). Si bien estos genes están altamente conservados, siendo la mayoría de sus polimorfismos identificados como raros, se han observado algunos SNPs de alta frecuencia como rs62180545 en *TNP1* y rs11640138 en *TNP2* (Aoki, Christensen, et al., 2006; Heidari et al., 2019; Jiang et al., 2017; Khattri et al., 2011; Miyagawa et al., 2005; Venkatesh et al., 2011). Algunos de los polimorfismos identificados en los exones de estos genes provocan cambios de aminoácidos, como rs1235984527 en *TNP1*, donde el aminoácido lisina (K) cambia a glutamato (E), o rs11640138 en *TNP2* que supone el cambio de arginina (R) por triptófano (W). Aunque no se ha demostrado una relación de estos cambios de aminoácidos con infertilidad, podrían provocar cambios conformacionales en la proteína y afectar la incorporación de protaminas en la cromatina espermática (Aoki, Christensen, et al., 2006) (Tablas I.2 y I.3).

Por su parte, en *PRM1* y *PRM2* se han identificado varios polimorfismos (**Tablas I.4 y I.5**), algunos de los cuales son considerados de alta frecuencia como rs737008 en *PRM1* y rs2070923 en *PRM2* (Aoki, Christensen, et al., 2006; Grassetti et al., 2012; He et al., 2012; Heidari et al., 2019; Jiang et al., 2015; Jiang et al., 2017; Jodar et al., 2011; Khattri et al., 2011; Nabi et al., 2018; Oliva, 2006; Tanaka et al., 2003; Venkatesh et al., 2011). De los polimorfismos ubicados en los exones de estos dos genes, solo algunos provocan cambios de aminoácidos, como es rs35576928 en *PRM1*, donde la arginina (R) se sustituye por serina (S), o rs779337774 en *PRM2* que conlleva la formación de un codón de terminación en vez del codón que permite la formación de glutamina (Q) (Tablas I.4 y I.5).

**Tabla I.2. Polimorfismos de un único nucleótido (SNP) descritos para el gen *TNP1*.**

NCBI dbSNPrs no.	Posición	Cambio nucleótido	AA	Referencias
rs142245640	<i>Upstream</i>	del A		Miyagawa et al., 2005; Khattri et al., 2011
rs1179733	<i>Upstream</i>	G>C		
rs545243678	<i>Upstream</i>	A>T		Khattri et al., 2011
rs71401166	<i>Upstream</i>	del TG		
rs1179734	<i>Upstream</i>	T>C		Miyagawa et al., 2005; Khattri et al., 2011
rs1179735	<i>Upstream</i>	A>G		
rs149871603	<i>Upstream</i>	A>G		
rs754564984	Exón 1	A>C		Miyagawa et al., 2005
rs753567916	Exón 1	G>A		
rs1235984527	Exón 1	A>G	K x E	Aoki et al., 2006
rs62180545	Intrón	T>C		Miyagawa et al., 2005; Venkatesh et al., 2011; Jiang et al., 2017
Ubicación gen: 216859819	Intrón	T>C		Aoki et al., 2006
rs969035528	<i>3'-UTR</i>	ins T		Venkatesh et al., 2011

**AA:** modificación del aminoácido que provoca el polimorfismo. **K:** lisina, **E:** ácido glutámico. **3'-UTR:** región no traducida 3'. **>:** cambio de nucleótido, la primera letra representa el nucleótido que es reemplazado y la segunda letra el nucleótido de reemplazo. **del:** delección. **ins:** inserción, y a continuación la letra del nucleótido eliminado o insertado. **Upstream:** corriente arriba, es decir hacia 5'.

**Tabla I.3. Polimorfismos de un único nucleótido (SNP) descritos para el gen *TNP2*.**

NCBI dbSNPrs no.	Posición	Cambio nucleótido	AA	Referencias
rs7191538	Promotor	G>C		Khattri et al., 2011
rs762795779	5'-UTR	C>T		
Ubicación gen: 11269246	Exón 1	A>G	H x R	Aoki et al., 2006
rs201174585	Exón 1	C>T		Miyagawa et al., 2005
rs201198575	Exón 1	G>T		
rs539429681	Exón1	G>A	S x N	Khattri et al., 2011
rs71383203	Exón 1	G>C	Q x H	Aoki et al., 2006
rs199596769	Exón 1	G>A		Miyagawa et al., 2005
rs34904070	Exón 1	C>T	R x C	Heidari et al., 2019
rs1567460339	Exón 1	A>C		Miyagawa et al., 2005
rs11640138	Exón 1	C>T	R x W	Miyagawa et al., 2005; Aoki et al., 2006; Khattri et al., 2011; Venkatesh et al., 2011; Heidari et al., 2019
rs117458238	Intrón	G>A		Khattri et al., 2011
rs56069754	Intrón	C>T		
rs181695	Intrón	A>G		Miyagawa et al., 2005
rs2857758	Intrón	G>T		
rs11640282	Intrón	G>A		Miyagawa et al., 2005; Khattri et al., 2011
rs557045009	Intrón	T>C		Khattri et al., 2011
Ubicación gen: 11268364	Intrón	A>T		Miyagawa et al., 2005
Ubicación gen: 11268363	Intrón	T>A		
rs3867171	Intrón	G>C		
rs1308285562	Intrón	T>A		Khattri et al., 2011
rs142773701	Intrón	T>C		
rs555256343	Intrón	delG		Miyagawa et al., 2005
rs144061102	Intrón	delG		
rs376468189	Intrón	G>A		Khattri et al., 2011
rs8043625	Intrón	G>C		Miyagawa et al., 2005; Khattri et al., 2011; Heidari et al., 2019
rs139228362	3'UTR	G>A		Khattri et al., 2011

**AA:** modificación del aminoácido que provoca el polimorfismo. **H:** histidina. **R:** arginina. **Q:** glutamina. **S:** serina. **N:** asparagina. **C:** cisteína. **W:** triptófano. **5'-UTR:** región no traducida 5'. **3'-UTR:** región no traducida 3'. **>:** cambio de nucleótido, la primera letra representa el nucleótido que es reemplazado y la segunda letra el nucleótido de reemplazo. **del:** delección.

**Tabla I.4. Polimorfismos de un único nucleótido (SNP) descritos para el gen *Prm1*.**

NCBI dbSNPrs no.	Posición	Cambio nucleótido	AA	Referencias
rs2301365	5'UTR	C>A		Jiang et al., 2017; Jodar et al., 2011; He et al., 2012; Aydos et al., 2018; Abdallah et al., 2019
rs557537842	5'UTR	C>A		Jodar et al., 2011
rs187174862	Exón 1	A>G		Tanaka et al., 2003
rs140477029	Exón 1	C>T	R x C	Jodar et al., 2011; Nabi et al., 2018
rs35262993	Exón 1	G>A		Aoki et al., 2006; He et al., 2012; Grasseti et al., 2012;
rs1201643752	Exón 1	C>A		Tanaka et al., 2003
rs35576928	Exón 1	G>T	R x S	Aoki et al., 2006; Jodar et al., 2011; He et al., 2012; Grasseti et al., 2012; Aydos et al., 2018; Nabi et al., 2018
rs201923496	Intrón	G>A		Jodar et al., 2011
rs922900817	Exón 2	G>T	R x M	
rs145663132	Exón 2	G>A		Tanaka et al., 2003
rs737008	Exón 2	C>A		Aoki et al., 2006; Venkatesh et al., 2011; Jiang et al., 2017; Tanaka et al., 2003; Jodar et al., 2011; He et al., 2012; Grasseti et al., 2012; Nabi et al., 2018
rs776071786	3'-UTR	T>A		Jodar et al., 2011
rs373154439	3'-UTR	A>G		Tanaka et al., 2003; Jodar et al., 2011

**AA:** modificación del aminoácido que provoca el polimorfismo. **H:** histidina. **R:** arginina. **C:** cisteína. **S:** serina. **N:** aspargina. **M:** metionina. **5'-UTR:** región no traducida 5'. **3'-UTR:** región no traducida 3'. **>:** cambio de nucleótido, la primera letra representa el nucleótido que es reemplazado y la segunda letra el nucleótido de reemplazo.

**Tabla I.5. Polimorfismos de un único nucleótido (SNP) descritos para el gen *Prm2*.**

NCBI dbSNPrs no.	Posición	Cambio nucleótido	AA	Referencias
rs115883489	Promotor	T>G		
rs146278684	Promotor	G>A		
rs376374	Promotor	T>C		
rs8060767	Promotor	G>C		Jodar et al., 2011
rs118080654	Promotor	C>T		
rs74459443	Promotor	G>A		
rs770654404	Promotor	C>G		
rs138381991	Exón 1	T>C		Aoki et al., 2006; Jodar et al., 2011
rs200072135	Exón 1	C>T		Grasseti et al., 2012
rs779337774	Exón 1	C>T	Q x Ter	Tanaka et al., 2003; Aydos et al., 2018; Nabi et al., 2018
rs757843269	Exón 1	C>T		Aoki et al., 2006; Jodar et al., 2011
rs3177008	Exón 1	C>T	S x F	He et al., 2012
rs115686767	Exón1	C>T		Nabi et al., 2018
rs201933708	Intrón	G>C		Grasseti et al., 2012; Nabi et al., 2018
rs74007626	Intrón	C>T		
rs74007625	Intrón	C>T		Aoki et al., 2006; Jodar et al., 2011
rs1646022	Intrón	G>C		Aoki et al., 2006; Venkatesh et al., 2011; Jiang et al., 2017; Tanaka et al., 2003; Jodar et al., 2011; Grasseti et al., 2012; Nabi et al., 2018
rs115686767	Intrón	C>T		Aoki et al., 2006; Jodar et al., 2011
rs2070923	Intrón	C>A		Aoki et al., 2006; Venkatesh et al., 2011; Jiang et al., 2017; Tanaka et al., 2003; Jodar et al., 2011; He et al., 2012; Grasseti et al., 2012; Nabi et al., 2018
rs545828790	Exón 2	C>T	P x L	Nabi et al., 2018
rs371633986	Exón 2	C>A	T x N	Venkatesh et al., 2011
rs79674436	3'-UTR	G>C		Jodar et al., 2011
rs424908	3'-UTR	C>T		He et al., 2012

**AA:** modificación del aminoácido que provoca el polimorfismo. **Q:** glutamina, **TER:** codón de terminación, **S:** serina, **F:** fenilalanina, **P:** prolina, **L:** leucina. **3'-UTR:** región no traducida 3'. ">": cambio de nucleótido, la primera letra representa el nucleótido que es reemplazado y la segunda letra el nucleótido de reemplazo.

Si bien, algunos polimorfismos de estos cuatro genes (*TNP1*, *TNP2*, *PRM1* y *PRM2*) se han descrito en hombres infértiles, la mayoría no ha detectado un aumento estadísticamente significativo de la frecuencia de algún polimorfismo en hombres infértiles (sin diferenciar la característica de infertilidad), respecto a grupos control (Aoki, Liu, et al., 2006; Grassetti et al., 2012; Jiang et al., 2017; Jodar et al., 2011; Khattri et al., 2011; Miyagawa et al., 2005; Tanaka et al., 2003; Venkatesh et al., 2011). Sin embargo, sí se ha descrito una mayor incidencia del SNP rs8043625 en *TNP2* en pacientes infértiles con varicocele, comparado con el grupo control (Heidari et al., 2019) mientras que en *PRM1*, se ha descrito una asociación significativa del SNP en rs35576928 (R por S) en pacientes infértiles con oligozoospermia severa comparado con el grupo control (He et al., 2012) y el SNP en rs2301365 (*PRM1*) ha sido descrito como factor de riesgo de infertilidad (Aydos et al., 2018), asociado a baja concentración espermática y motilidad progresiva disminuida en hombres infértiles (Abdallah et al., 2019) (Tabla I.6).

**Tabla I.6. Polimorfismos de un único nucleótido (SNP) descritos con diferencia en frecuencia alélica.**

Gen	NCBI dbSNPs no.	Posición	Cambio nucleótido	AA	Referencias	Población estudiada	Individuos incluidos	
							Cont.	Inf.
<i>TNP2</i>	rs8043625	Intrón	G>C		Heidari et al., 2019	Iraní	150	156
<i>PRM1</i>	rs2301365	5'UTR	C>A		Aydos et al., 2018 Abdallah et al., 2019	Turca Egiptia	100 40	100 60
	rs35576928	Exón 1	G>T	R x S	He et al., 2012	China	377	309

**AA:** modificación del aminoácido que provoca el polimorfismo. **R:** arginina. **S:** serina. **5'-UTR:** región no traducida 5'. **>:** cambio de nucleótido, la primera letra representa el nucleótido que es reemplazado y la segunda letra el nucleótido de reemplazo. **Cont.:** grupo control. **Inf.:** grupo infértil.

Además, se ha descrito una prevalencia ligeramente mayor, aunque estadísticamente no significativa, de los SNPs en rs737008 (*PRM1*), rs1646022 y rs2070923 (*PRM2*) en pacientes con astenozoospermia (Nabi et al., 2018). También se ha sugerido que pacientes infértiles con ciertos haplotipos en dos SNPs (rs2301365 en *PRM1* y rs1646022 en *PRM2*) (Jiang et al., 2017), o tres SNPs (rs373008 en *PRM1*, rs51646022298 y rs2070923 en *PRM2*) (Grassetti et al., 2012),

pueden ser causa de mayor susceptibilidad a morfología espermática anormal o infertilidad. Así mismo, otros haplotipos que combiinan varios SNPs fueron asociados a un mayor riesgo de infertilidad (Heidari et al., 2019; Jiang et al., 2017). También se ha reportado que los SNPs que provocan sustitución de aminoácido pueden inducir cambios en la estructura de las proteínas, conllevando alteraciones en el empaquetamiento de la cromatina espermática y diversos defectos espermáticos como teratozoospermia (Aoki, Christensen, et al., 2006) aunque estos SNPs no son directamente responsables de la infertilidad masculina (Aoki, Christensen, et al., 2006; Grassetti et al., 2012).

La frecuencia de algunos polimorfismos identificados en los genes *TNP1* y *TNP2* varía entre las poblaciones estudiadas (Aoki, Christensen, et al., 2006; Grassetti et al., 2012; He et al., 2012; Heidari et al., 2019; Jiang et al., 2015; Jiang et al., 2017; Khattri et al., 2011; Nabi et al., 2018; Oliva, 2006; Tanaka et al., 2003; Venkatesh et al., 2011). Por ejemplo, en el caso del polimorfismo rs11640138 en *TNP2* la frecuencia reportada en la población iraní fue entre 35-40% (Heidari et al., 2019) y en la japonesa entre 0.03-0.09% (Miyagawa et al., 2005). Esto sugiere que el origen étnico/geográfico puede jugar un rol importante en el efecto biológico de los diferentes polimorfismos y, probablemente, esté modulado por factores específicos de la población (Krausz et al., 2015). No se han encontrado estudios donde se identifiquen polimorfismos en *TNP1*, *TNP2*, *PRM1* y *PRM2* en poblaciones de origen étnico/geográfico del continente americano. En Ecuador, país donde el 72% de su población es mestiza, híbrida con contribución europea (70%), amerindia (22%) y africana (2%) en base a los marcadores del cromosoma Y (Paz-Y-Miño et al., 2016), no se dispone hasta la fecha de estudios que evalúen la presencia de polimorfismos en los cuatro genes involucrados en la compactación del ADN espermático, ni por lo tanto su posible relación con la fertilidad masculina. El diagnóstico genético en la infertilidad masculina ha permitido importantes avances en la detección de mutaciones, polimorfismos, deleciones, variación del número de copias de genes, etc. en genes asociados a la azoospermia, oligozoospermia severa o fallos espermatogénicos. Sin embargo, existe evidencia clara de que muchas causas genéticas de infertilidad aún permanecen sin diagnosticar (Cannarella et al., 2019; Sigman, 2019) y el estudio de polimorfismos en los genes implicados en la síntesis de proteínas para el correcto empaquetamiento del ADN espermático podría arrojar luz en este campo.

## **I.5. Evaluación de la calidad espermática**

Sobre el total de 186 millones de personas que se estiman que son infértiles en todo el mundo ((WHO), 2022; Inhorn & Patrizio, 2015), el factor masculino, puro o combinado, contribuye aproximadamente en la mitad de las parejas con infertilidad, siendo la tasa global de infertilidad masculina entre el 2.5 y 12% (Agarwal et al., 2015; Chu et al., 2019; Lotti & Maggi, 2018).

El factor etiológico de la infertilidad masculina puede estar relacionado con causas clínicas, sociales, de estilo de vida, ambientales, genéticas, etc. Entre las causas clínicas figuran enfermedades como el varicocele, la diabetes, la obesidad y el cáncer. Por otra parte, algunas causas sociales y de estilo de vida incluyen el consumo de alcohol y tabaco, otro tipo de drogas, la edad avanzada para buscar descendencia, el tipo de trabajo, etc. (Fainberg & Kashanian, 2019; Pourmasumi et al., 2017; Verón et al., 2018). La exposición prolongada a factores ambientales dañinos como compuestos químicos (diclorodifeniltricloroetano, bisfenol A, pesticidas) o partículas de tamaño igual o menor a 2.5 micrómetros (PM<sub>2.5</sub>) del escape de combustión de automóviles, pueden afectar a la fertilidad masculina (Liu et al., 2019; Wu et al., 2015). También existen factores genéticos como ciertas aneuploidías, microdeleciones, mutaciones específicas, así como modificaciones epigenéticas que se han relacionado con la infertilidad masculina (Heydari et al., 2022; O'Flynn O'Brien et al., 2010; Thirumavalavan et al., 2019). Pese a todos los factores identificados como causantes de infertilidad masculinas, un alto porcentaje de los casos (entre el 30 y el 72%) aún son diagnosticados como idiopáticos (Cannarella et al., 2019; Fainberg & Kashanian, 2019).

El diagnóstico preciso de la infertilidad masculina es esencial para el manejo terapéutico de la pareja infértil, siendo básico para ello disponer de una historia clínica completa, el examen físico y un análisis de semen (Pallotti et al., 2022). Después de casi un siglo desde que en 1929 Macomber y Sander desarrollaran la evaluación cuantitativa moderna del semen y establecieran la correlación entre las tasas de embarazo y la concentración de espermatozoides (Groves, 1945), y tras numerosas mejoras en dicho análisis, el análisis seminal básico (espermiograma o espermatograma) sigue siendo la única prueba de diagnóstico recomendada para todos los pacientes que se someten a evaluación de su fertilidad. Tanto el procedimiento como las condiciones de recogida han sido estandarizados y actualizados a través de las diferentes versiones del Manual de la Organización Mundial de la salud (OMS), cuya última edición fue publicada en 2021 (Groves, 1945; World Health Organization, 2021). No obstante, debemos ser conscientes de que las pruebas de evaluación del semen tienen poca sensibilidad y especificidad

como predictores de la capacidad fecundante, especialmente cuando se analizan los parámetros de motilidad, recuento espermático o morfología de forma aislada (Niederberger et al., 2018). Con el objetivo de mejorar estos parámetros se han desarrollado pruebas complementarias para evaluar otros aspectos de la calidad espermática que no es posible identificarlos mediante un espermiograma básico, las cuales recoge el mencionado Manual de la OMS en su última versión en los capítulos de “Análisis ampliado/extendido” y “Análisis Avanzado”.

### I.5.1. Análisis de semen básico

La OMS publicó por primera vez un manual para la evaluación del semen humano en 1980, donde se establecieron valores de referencia para los parámetros seminales, que se han ido modificando posteriormente con las diferentes ediciones. En la quinta edición de este manual (2010), se establecieron “límites de referencia inferior” para establecer parámetros anormales en el espermiograma, sustituyéndose esta terminología en la sexta edición (2021) por “límites de decisión” que deben analizarse en base a consideraciones clínicas y estadísticas que apuntan a la necesidad de un determinado diagnóstico o intervención terapéutica (**Tabla I.7**).

**Tabla I.7. Resultados para las características seminales analizadas, según el manual de la OMS.**

<b>Parámetro seminal</b>	<b>Límite de referencia inferior 5ª edición (2010)</b>	<b>Límite de decisión inferior 6ª edición (2021)</b>
Volumen de semen (ml)	1.5 (1.4–1.7)	1.4 (1.3-1.5)
Concentración de espermatozoides (10 <sup>6</sup> por ml)	15 (12–16)	16.0 (15.0-18.0)
Número total de espermatozoides (10 <sup>6</sup> por eyaculado)	39 (33–46)	39 (35-40)
Motilidad total (Progresiva + No progresiva, %)	40 (38–42)	42.0 (40-43)
Motilidad progresiva (%)	32 (31–34)	30.0 (29-31)
Vitalidad (espermatozoides vivos, %)	58 (55–63)	54 (50-56)
Morfología espermática (formas normales, %)	4 (3.0–4.0)	4 (3.9-4.0)

Si bien, el análisis de semen “básico” según el Manual de la OMS sigue siendo la prueba de diagnóstico más utilizada para evaluar la fertilidad masculina, debemos considerar que dichas directrices no fueron propuestas con el objetivo de diagnosticar el potencial fecundante en hombres, ni bajo condiciones de concepción natural, ni para predecir los resultados de inseminación artificial o fecundación *in vitro* e ICSI, aunque hayan sido utilizadas para ello (Oehninger & Ombelet, 2019). En este sentido cabe mencionar que, la OMS ha realizado valiosas contribuciones respecto a la interpretación y estandarización de los resultados de este análisis, pero los valores de referencia y/o los límites de decisión propuestos indican que los hombres cuyos parámetros seminales se sitúan por debajo no son necesariamente infértiles, ni que un espermiograma cuyos parámetros supere dichos límites sea garantía de fertilidad (Oehninger & Ombelet, 2019; OMS, 2022; Sigman, 2019).

#### **I.5.2. Estudios complementarios para la evaluación de la calidad espermática**

A pesar del aumento de las tasas de infertilidad masculina, los avances en el diagnóstico y tratamiento de la infertilidad masculina han sido poco frecuentes (Nosrati et al., 2017), y los métodos actuales de uso rutinario en las clínicas de reproducción asistida para el estudio del espermatozoide siguen siendo limitados, imperfectos e insuficientes para el diagnóstico de la etiología y el pronóstico de la infertilidad masculina (Nosrati et al., 2017; Oehninger & Ombelet, 2019; Sigman, 2019). Algunos de estos análisis requieren de equipos complejos y uso de técnicas que necesitan de personal especializado, mientras que otros ensayos se han desarrollado con el objetivo de poder realizarse en el laboratorio estándar de una clínica de reproducción asistida o incluso algunos en el hogar del paciente (Sigman, 2019).

La OMS identifica algunas pruebas de evaluación extendida para el análisis de semen que no son necesariamente de rutina, como la fragmentación del ADN espermático o pruebas genéticas o genómicas que permiten el análisis de anomalías cromosómicas y mutaciones genéticas que profundiza en las causas de infertilidad masculina que subyacen a muchas de las anomalías observadas en un análisis de semen. Así mismo, se describen pruebas avanzadas que permiten profundizar sobre la base biológica de la infertilidad, como el estudio del estrés oxidativo, de la cromatina espermática, análisis de semen asistido por computadora (CASA) o pruebas destinadas a evaluar la competencia de los espermatozoides humanos para cumplir con los procesos fundamentalmente esenciales para la concepción (OMS, 2022).

Existen algunos test que permiten medir el daño del ADN por fragmentación (Oehninger & Ombelet, 2019) como *TUNEL (Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling)*, ensayo de estructura de cromatina espermática (SCSA) y dispersión de la cromatina espermática (SCD), que brindan resultados sin diferenciar roturas de cadena simples o dobles o lugar del daño; por otra parte, el ensayo cometa permite evaluar daños de cadena simple y doble en el ADN (Ribas-Maynou & Benet, 2019). La incorporación de estas pruebas en las clínicas ha sido lenta, principalmente por la falta de acceso al equipamiento necesario, estandarización del método y valores de referencia para su interpretación (Nosrati et al., 2017), por lo cual la Sociedad Americana de Medicina Reproductiva considera que los datos existentes hasta el momento, respecto a estas pruebas, no respaldan una relación consistente entre la fragmentación del ADN espermático y los resultados reproductivos (Oehninger & Ombelet, 2019).

Por otra parte, el estudio del material genético de los espermatozoides es importante (Dai et al., 2021), considerando que se han identificado factores genéticos que tienen implicación en la fertilidad masculina (Krausz & Riera-Escamilla, 2018). Estos estudios involucran evaluar el ADN, aberraciones cromosomas, así como análisis epigenético (ARN, microARN, histonas y metilación) (Dai et al., 2021). Las aberraciones cromosómicas en los espermatozoides han sido investigadas mediante diferentes técnicas como la hibridación fluorescente in situ (FISH) (Dai et al., 2021), que combina el cariotipo clásico con técnicas moleculares utilizando sondas fluorescentes específicas de una secuencia genética y visualizando los fluorocromos mediante microscopía fluorescente (Esteves, 2013), permitiendo identificar aneuploidías en varios cromosomas del espermatozoide (1, 2, 9, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 22, X e Y). Sin embargo, el protocolo de trabajo de esta técnica no está normalizado entre laboratorios para establecer el umbral de aneuploidía por lo que las indicaciones clínicas para el análisis de FISH en espermatozoides no están claramente definidas (García-Mengual et al., 2019; Rodrigo et al., 2019). Para el estudio epigenético de los espermatozoides se han establecido, y se están desarrollando, pruebas para evaluar el ARN, los microARN, las modificaciones de histonas, así como la metilación del ADN (Dai et al., 2021; Sigman, 2019).

Por su parte, el estudio de la cromatina espermática a través de la protaminación está comenzando a fomentarse dentro de la evaluación de la fertilidad masculina para un mejor diagnóstico de la calidad espermática, probándose diferentes técnicas con el propósito de que puedan ser utilizadas a futuro como biomarcadores moleculares (Steger & Balhorn, 2018). Una herramienta que permite evaluar la calidad de empaquetamientos de la cromatina es el test de cromomicina A3 (CMA3), un fluorocromo permeable a la membrana que compete con la

protamina para unirse en los sitios ricos en guanina-citosina (GC) de los surcos del ADN, donde la visualización de absorción de CMA3 permite evaluar de manera indirecta la deficiencia de protamina en la cromatina espermática (Gill-Sharma et al., 2011; Iranpour et al., 2000), siendo útil para encontrar relación entre el estado de la cromatina y la fertilidad (Iranpour et al., 2000).

El análisis de semen asistido por computadora (CASA) es un método automatizado para el análisis de los datos de concentración, motilidad y morfología espermática (Dai et al., 2021; Finelli et al., 2021). Si bien su uso se está extendiendo en la práctica clínica rutinaria, ya que puede superar algunos de los problemas relacionados con la variabilidad intra e inter-laboratorio que hay con el análisis de semen básico (Finelli et al., 2021), su uso en el estudio del semen humano aún enfrenta limitaciones ya que requiere de validación para determinar la concentración total de espermatozoides y las proporciones de espermatozoides móviles y progresivamente móviles (Mortimer & Mortimer, 2021). Así mismo, su uso es menos fiable cuando se evalúa la morfología de los espermatozoides y además siguen siendo métodos laboriosos y costosos (Oehninger & Ombelet, 2019).

Dentro de toda la gama de pruebas que se están desarrollando para la evaluación de la fertilidad masculina, algunos ensayos se han desarrollado con el objetivo de poder realizarse en el laboratorio estándar de una clínica de reproducción asistida o incluso algunos en el hogar del paciente, mientras que otros análisis requieren de equipos complejos y uso de técnicas que necesitan de personal especializado (Sigman, 2019). Sin embargo, debe considerarse que en los últimos años los avances tecnológicos han permitido el desarrollo de empresas que ofrecen servicios externos a las clínicas de reproducción asistida y hacen más accesible el uso de dichas técnicas, sin requerir que las clínicas dispongan del equipamiento y personal especializado y, cada vez más, sus costes son asequibles para determinados grupos de pacientes.

## **I.6. Bibliografia**

- (WHO), W. H. O. (2022). *Infertility*. [https://www.who.int/health-topics/infertility#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/infertility#tab=tab_1)
- Abdallah, W. I., Hussein, T. M., Elsayed, E. T., & Bahgat, R. S. (2019). The c.-190 C>A transversion in promoter region of protamine 1 gene as a genetic risk factor in Egyptian men with idiopathic infertility. *Andrologia*, *51*(9), e13367. <https://doi.org/10.1111/and.13367>
- Acet, M., Celik, N., Acet, T., Ilhan, S., Yardim, M., Aktun, H. L., . . . Aydin, S. (2016). Serum and follicular fluid irisin levels in poor and high responder women undergoing IVF/ICSI. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, *20*(10), 1940-1946.
- Agarwal, A., Gupta, S., & Sharma, R. K. (2005). Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol*, *3*, 28. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-3-28>
- Agarwal, A., Mulgund, A., Hamada, A., & Chyatte, M. R. (2015). A unique view on male infertility around the globe. *Reprod Biol Endocrinol*, *13*, 37. <https://doi.org/10.1186/s12958-015-0032-1>
- Alahmar, A. T., Singh, R., & Palani, A. (2022). Sperm DNA Fragmentation in Reproductive Medicine: A Review. *J Hum Reprod Sci*, *15*(3), 206-218. [https://doi.org/10.4103/jhrs.jhrs\\_82\\_22](https://doi.org/10.4103/jhrs.jhrs_82_22)
- Amano, N., Kitaya, K., Taguchi, S., Funabiki, M., Tada, Y., Hayashi, T., & Nakamura, Y. (2014). Low follicular fluid tyrosine concentration in infertile women with ovarian hyperstimulation syndrome. *Biomed Rep*, *2*(3), 429-431. <https://doi.org/10.3892/br.2014.251>
- Ambekar, A. S., Nirujogi, R. S., Srikanth, S. M., Chavan, S., Kelkar, D. S., Hinduja, I., . . . Mukherjee, S. (2013). Proteomic analysis of human follicular fluid: a new perspective towards understanding folliculogenesis. *J Proteomics*, *87*, 68-77. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.05.017>
- Aoki, V. W., Christensen, G. L., Atkins, J. F., & Carrell, D. T. (2006). Identification of novel polymorphisms in the nuclear protein genes and their relationship with human sperm protamine deficiency and severe male infertility. *Fertil Steril*, *86*(5), 1416-1422. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2006.04.033>
- Aoki, V. W., Liu, L., & Carrell, D. T. (2006). A novel mechanism of protamine expression deregulation highlighted by abnormal protamine transcript retention in infertile human males with sperm protamine deficiency. *Mol Hum Reprod*, *12*(1), 41-50. <https://doi.org/10.1093/molehr/gah258>

- Aoki, V. W., Moskovtsev, S. I., Willis, J., Liu, L., Mullen, J. B., & Carrell, D. T. (2005). DNA integrity is compromised in protamine-deficient human sperm. *J Androl*, *26*(6), 741-748. <https://doi.org/10.2164/jandrol.05063>
- Aydos, O. S. E., Hekmatshoar, Y., Altınok, B., Özkan, T., Şakirağaoğlu, O., Karadağ, A., . . . Aydos, K. (2018). Genetic Polymorphisms in PRM1, PRM2, and YBX2 Genes are Associated with Male Factor Infertility. *Genet Test Mol Biomarkers*, *22*(1), 55-61. <https://doi.org/10.1089/gtmb.2017.0040>
- Baka, S., & Malamitsi-Puchner, A. (2006). Novel follicular fluid factors influencing oocyte developmental potential in IVF: a review. *Reprod Biomed Online*, *12*(4), 500-506. [https://doi.org/10.1016/s1472-6483\(10\)62005-6](https://doi.org/10.1016/s1472-6483(10)62005-6)
- Balhorn, R. (2007). The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome Biol*, *8*(9), 227. <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-9-227>
- Balhorn, R., Reed, S., & Tanphaichitr, N. (1988). Aberrant protamine 1/protamine 2 ratios in sperm of infertile human males. *Experientia*, *44*(1), 52-55. <https://doi.org/10.1007/BF01960243>
- Banker, M., Dyer, S., Chambers, G. M., Ishihara, O., Kupka, M., de Mouzon, J., . . . Adamson, G. D. (2021). International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technologies (ICMART): world report on assisted reproductive technologies, 2013. *Fertil Steril*, *116*(3), 741-756. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2021.03.039>
- Bao, J., & Bedford, M. T. (2016). Epigenetic regulation of the histone-to-protamine transition during spermiogenesis. *Reproduction*, *151*(5), R55-70. <https://doi.org/10.1530/REP-15-0562>
- Basuino, L., & Silveira, C. F. (2016). Human follicular fluid and effects on reproduction. *JBRA Assist Reprod*, *20*(1), 38-40. <https://doi.org/10.5935/1518-0557.20160009>
- Boivin, J., Bunting, L., Collins, J. A., & Nygren, K. G. (2007). International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Hum Reprod*, *22*(6), 1506-1512. <https://doi.org/10.1093/humrep/dem046>
- Brunner, A. M., Nanni, P., & Mansuy, I. M. (2014). Epigenetic marking of sperm by post-translational modification of histones and protamines. *Epigenetics Chromatin*, *7*(1), 2. <https://doi.org/10.1186/1756-8935-7-2>
- Busher, J. T. (1990). Serum Albumin and Globulin. In H. K. Walker, W. D. Hall, & J. W. Hurst (Eds.), *Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations*. Butterworths

Copyright © 1990, Butterworth Publishers, a division of Reed Publishing.

- Cannarella, R., Condorelli, R. A., Duca, Y., La Vignera, S., & Calogero, A. E. (2019). New insights into the genetics of spermatogenic failure: a review of the literature. *Hum Genet*, 138(2), 125-140. <https://doi.org/10.1007/s00439-019-01974-1>
- Canovas, S., & Ross, P. J. (2016). Epigenetics in preimplantation mammalian development. *Theriogenology*, 86(1), 69-79. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.020>
- Carrell, D. T., Emery, B. R., & Hammoud, S. (2007). Altered protamine expression and diminished spermatogenesis: what is the link? *Hum Reprod Update*, 13(3), 313-327. <https://doi.org/10.1093/humupd/dml057>
- Carrell, D. T., & Liu, L. (2001). Altered protamine 2 expression is uncommon in donors of known fertility, but common among men with poor fertilizing capacity, and may reflect other abnormalities of spermiogenesis. *J Androl*, 22(4), 604-610.
- Cavé, T., Desmarais, R., Lacombe-Burgoyne, C., & Boissonneault, G. (2019). Genetic Instability and Chromatin Remodeling in Spermatids. *Genes (Basel)*, 10(1). <https://doi.org/10.3390/genes10010040>
- Chambers, G. M., Dyer, S., Zegers-Hochschild, F., de Mouzon, J., Ishihara, O., Banker, M., . . . Adamson, G. D. (2021). International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technologies world report: assisted reproductive technology, 2014†. *Hum Reprod*, 36(11), 2921-2934. <https://doi.org/10.1093/humrep/deab198>
- Chen H., M. D., Xiao X., Cheng C.Y. (2017). Human Spermatogenesis and Its Regulation. In *Male Hypohonadism*. Humana Press, Cham. [https://doi.org/http://doi.org/10.1007/978-3-319-53298-1\\_3](https://doi.org/http://doi.org/10.1007/978-3-319-53298-1_3)
- Cho, C., Willis, W. D., Goulding, E. H., Jung-Ha, H., Choi, Y. C., Hecht, N. B., & Eddy, E. M. (2001). Haploinsufficiency of protamine-1 or -2 causes infertility in mice. *Nat Genet*, 28(1), 82-86. <https://doi.org/10.1038/ng0501-82>
- Choy, J. T., & Eisenberg, M. L. (2018). Male infertility as a window to health. *Fertil Steril*, 110(5), 810-814. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.08.015>
- Chu, K. Y., Patel, P., & Ramasamy, R. (2019). Consideration of gender differences in infertility evaluation. *Curr Opin Urol*, 29(3), 267-271. <https://doi.org/10.1097/MOU.0000000000000590>
- Cigliano, L., Balestrieri, M., Spagnuolo, M. S., Dale, B., & Abrescia, P. (2002). Lecithin-cholesterol acyltransferase activity during maturation of human preovulatory follicles with different concentrations of ascorbate, alpha-tocopherol and nitrotyrosine. *Reprod Fertil Dev*, 14(1-2), 15-21. <https://doi.org/10.1071/rd01044>

- Da Broi, M. G., Giorgi, V. S. I., Wang, F., Keefe, D. L., Albertini, D., & Navarro, P. A. (2018). Influence of follicular fluid and cumulus cells on oocyte quality: clinical implications. *J Assist Reprod Genet*, 35(5), 735-751. <https://doi.org/10.1007/s10815-018-1143-3>
- Da Broi, M. G., Malvezzi, H., Paz, C. C., Ferriani, R. A., & Navarro, P. A. (2014). Follicular fluid from infertile women with mild endometriosis may compromise the meiotic spindles of bovine metaphase II oocytes. *Hum Reprod*, 29(2), 315-323. <https://doi.org/10.1093/humrep/det378>
- Dai, C., Zhang, Z., Shan, G., Chu, L. T., Huang, Z., Moskovtsev, S., . . . Sun, Y. (2021). Advances in sperm analysis: techniques, discoveries and applications. *Nat Rev Urol*, 18(8), 447-467. <https://doi.org/10.1038/s41585-021-00472-2>
- De Celis, R., Feria-Velasco, A., González-Unzaga, M., Torres-Calleja, J., & Pedrón-Nuevo, N. (2000). Semen quality of workers occupationally exposed to hydrocarbons. *Fertil Steril*, 73(2), 221-228. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(99\)00515-4](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(99)00515-4)
- Diez-Fraile, A., Lammens, T., Tilleman, K., Witkowski, W., Verhasselt, B., De Sutter, P., . . . D'Herde, K. (2014). Age-associated differential microRNA levels in human follicular fluid reveal pathways potentially determining fertility and success of in vitro fertilization. *Hum Fertil (Camb)*, 17(2), 90-98. <https://doi.org/10.3109/14647273.2014.897006>
- Dumesic, D. A., Meldrum, D. R., Katz-Jaffe, M. G., Krisher, R. L., & Schoolcraft, W. B. (2015). Oocyte environment: follicular fluid and cumulus cells are critical for oocyte health. *Fertil Steril*, 103(2), 303-316. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.11.015>
- Edwards, R. G. (1974). Follicular fluid. *J Reprod Fertil*, 37(1), 189-219. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0370189>
- Emori, M. M., & Drapkin, R. (2014). The hormonal composition of follicular fluid and its implications for ovarian cancer pathogenesis. *Reprod Biol Endocrinol*, 12, 60. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-12-60>
- Esteves, S. C. (2013). A clinical appraisal of the genetic basis in unexplained male infertility. *J Hum Reprod Sci*, 6(3), 176-182. <https://doi.org/10.4103/0974-1208.121419>
- Esteves, S. C., Zini, A., Coward, R. M., Evenson, D. P., Gosálvez, J., Lewis, S. E. M., . . . Humaidan, P. (2021). Sperm DNA fragmentation testing: Summary evidence and clinical practice recommendations. *Andrologia*, 53(2), e13874. <https://doi.org/10.1111/and.13874>
- Fainberg, J., & Kashanian, J. A. (2019). Recent advances in understanding and managing male infertility. *F1000Res*, 8. <https://doi.org/10.12688/f1000research.17076.1>

- Fateh, M., Ben-Rafael, Z., Benadiva, C. A., Mastroianni, L., Jr., & Flickinger, G. L. (1989). Cortisol levels in human follicular fluid. *Fertility and Sterility*, *51*(3), 538-541. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)60572-1](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)60572-1)
- Finelli, R., Leisegang, K., Tumallapalli, S., Henkel, R., & Agarwal, A. (2021). The validity and reliability of computer-aided semen analyzers in performing semen analysis: a systematic review. *Transl Androl Urol*, *10*(7), 3069-3079. <https://doi.org/10.21037/tau-21-276>
- Floehr, J., Dietzel, E., Neulen, J., Rösing, B., Weissenborn, U., & Jahnen-Dechent, W. (2016). Association of high fetuin-B concentrations in serum with fertilization rate in IVF: a cross-sectional pilot study. *Hum Reprod*, *31*(3), 630-637. <https://doi.org/10.1093/humrep/dev340>
- Fortune, J. E., Cushman, R. A., Wahl, C. M., & Kito, S. (2000). The primordial to primary follicle transition. *Mol Cell Endocrinol*, *163*(1-2), 53-60. [https://doi.org/10.1016/s0303-7207\(99\)00240-3](https://doi.org/10.1016/s0303-7207(99)00240-3)
- Freitas, C., Neto, A. C., Matos, L., Silva, E., Ribeiro, Â., Silva-Carvalho, J. L., & Almeida, H. (2017). Follicular Fluid redox involvement for ovarian follicle growth. *J Ovarian Res*, *10*(1), 44. <https://doi.org/10.1186/s13048-017-0342-3>
- Garcia-Segura, S. (2022). The importance of incorporating sperm DNA fragmentation testing in male infertility diagnostic routine. *Transl Androl Urol*, *11*(10), 1371-1373. <https://doi.org/10.21037/tau-22-572>
- García-Mengual, E., Triviño, J. C., Sáez-Cuevas, A., Bataller, J., Ruíz-Jorro, M., & Vendrell, X. (2019). Male infertility: establishing sperm aneuploidy thresholds in the laboratory. *J Assist Reprod Genet*, *36*(3), 371-381. <https://doi.org/10.1007/s10815-018-1385-0>
- Gaucher, J., Reynoird, N., Montellier, E., Boussovar, F., Rousseaux, S., & Khochbin, S. (2010). From meiosis to postmeiotic events: the secrets of histone disappearance. *FEBS J*, *277*(3), 599-604. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07504.x>
- Gill-Sharma, M. K., Choudhuri, J., & D'Souza, S. (2011). Sperm chromatin protamination: an endocrine perspective. *Protein Pept Lett*, *18*(8), 786-801. <https://doi.org/10.2174/092986611795714005>
- Gonzalès, J., Lesourd, S., Van Dreden, P., Richard, P., Lefèbvre, G., & Vauthier Brouzes, D. (1992). Protein composition of follicular fluid and oocyte cleavage occurrence in vitro fertilization (IVF). *J Assist Reprod Genet*, *9*(3), 211-216. <https://doi.org/10.1007/bf01203815>

- Grassetti, D., Paoli, D., Gallo, M., D'Ambrosio, A., Lombardo, F., Lenzi, A., & Gandini, L. (2012). Protamine-1 and -2 polymorphisms and gene expression in male infertility: an Italian study. *J Endocrinol Invest*, 35(10), 882-888. <https://doi.org/10.3275/8111>
- Griffin, J., Emery, B. R., Huang, I., Peterson, C. M., & Carrell, D. T. (2006). Comparative analysis of follicle morphology and oocyte diameter in four mammalian species (mouse, hamster, pig, and human). *J Exp Clin Assist Reprod*, 3, 2. <https://doi.org/10.1186/1743-1050-3-2>
- Groves, E. R. (1945). Fertility in Men. By Robert Sherman Hotchkiss. Philadelphia: J. B. Lippincott Company, 1944. 216 pp. \$3.50 and Fertility in Women. By Samuel L. Seigler. Philadelphia: J. B. Lippincott Company, 1944. 450 pp. \$4.50. *Social Forces*, 24(2), 251-252. <https://doi.org/10.2307/2572559>
- Gupta, S. K. (2021). Human Zona Pellucida Glycoproteins: Binding Characteristics With Human Spermatozoa and Induction of Acrosome Reaction. *Front Cell Dev Biol*, 9, 619868. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.619868>
- Gupta, S. K., Bhandari, B., Shrestha, A., Biswal, B. K., Palaniappan, C., Malhotra, S. S., & Gupta, N. (2012). Mammalian zona pellucida glycoproteins: structure and function during fertilization. *Cell Tissue Res*, 349(3), 665-678. <https://doi.org/10.1007/s00441-011-1319-y>
- Hamad, M. F. (2019). Quantification of histones and protamines mRNA transcripts in sperms of infertile couples and their impact on sperm's quality and chromatin integrity. *Reprod Biol*, 19(1), 6-13. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2019.03.001>
- Hammadeh, M. E., Hamad, M. F., Montenarh, M., & Fischer-Hammadeh, C. (2010). Protamine contents and P1/P2 ratio in human spermatozoa from smokers and non-smokers. *Hum Reprod*, 25(11), 2708-2720. <https://doi.org/10.1093/humrep/deq226>
- Hammoud, S. S., Nix, D. A., Zhang, H., Purwar, J., Carrell, D. T., & Cairns, B. R. (2009). Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development. *Nature*, 460(7254), 473-478. <https://doi.org/10.1038/nature08162>
- Hao, S. L., Ni, F. D., & Yang, W. X. (2019). The dynamics and regulation of chromatin remodeling during spermiogenesis. *Gene*, 706, 201-210. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.05.027>
- He, X. J., Ruan, J., Du, W. D., Chen, G., Zhou, Y., Xu, S., . . . Zhang, X. J. (2012). PRM1 variant rs35576928 (Arg>Ser) is associated with defective spermatogenesis in the Chinese Han population. *Reprod Biomed Online*, 25(6), 627-634. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2012.09.005>

- Heidari, M. M., Danafar, A., Moezzi, F., Khatami, M., & Talebi, A. R. (2019). The association between. *Int J Reprod Biomed (Yazd)*, 17(8), 557-566. <https://doi.org/10.18502/ijrm.v17i8.4821>
- Heydari, R., Jangravi, Z., Maleknia, S., Seresht-Ahmadi, M., Bahari, Z., Salekdeh, G. H., & Meyfour, A. (2022). Y chromosome is moving out of sex determination shadow. *Cell Biosci*, 12(1), 4. <https://doi.org/10.1186/s13578-021-00741-y>
- Ilaqua, A., Izzo, G., Emerenziani, G. P., Baldari, C., & Aversa, A. (2018). Lifestyle and fertility: the influence of stress and quality of life on male fertility. *Reprod Biol Endocrinol*, 16(1), 115. <https://doi.org/10.1186/s12958-018-0436-9>
- Infertility Workup for the Women's Health Specialist: ACOG Committee Opinion, Number 781. (2019). *Obstet Gynecol*, 133(6), e377-e384. <https://doi.org/10.1097/AOG.0000000000003271>
- Ingles, C. J., & Dixon, G. H. (1967). Phosphorylation of protamine during spermatogenesis in trout testis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 58(3), 1011-1018. <https://doi.org/10.1073/pnas.58.3.1011>
- Inhorn, M. C., & Patrizio, P. (2015). Infertility around the globe: new thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21st century. *Hum Reprod Update*, 21(4), 411-426. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmv016>
- Instituto Nacional de Estadística y Censo del Ecuador. (2022). In: Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018.
- Iranpour, F. G., Nasr-Esfahani, M. H., Valojerdi, M. R., & al-Taraihi, T. M. (2000). Chromomycin A3 staining as a useful tool for evaluation of male fertility. *J Assist Reprod Genet*, 17(1), 60-66. <https://doi.org/10.1023/a:1009406231811>
- Jiang, W., Sun, H., Zhang, J., Zhou, Q., Wu, Q., Li, T., . . . Xia, X. (2015). Polymorphisms in Protamine 1 and Protamine 2 predict the risk of male infertility: a meta-analysis. *Sci Rep*, 5, 15300. <https://doi.org/10.1038/srep15300>
- Jiang, W., Zhu, P., Zhang, J., Wu, Q., Li, W., Liu, S., . . . Xia, X. (2017). Polymorphisms of protamine genes contribute to male infertility susceptibility in the Chinese Han population. *Oncotarget*, 8(37), 61637-61645. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18660>
- Jodar, M., Oriola, J., Mestre, G., Castillo, J., Giwercman, A., Vidal-Taboada, J. M., . . . Oliva, R. (2011). Polymorphisms, haplotypes and mutations in the protamine 1 and 2 genes. *Int J Androl*, 34(5 Pt 1), 470-485. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2010.01115.x>

- Jones, A. S. K., & Shikanov, A. (2019). Follicle development as an orchestrated signaling network in a 3D organoid. *J Biol Eng*, 13, 2. <https://doi.org/10.1186/s13036-018-0134-3>
- Karki, R., Pandya, D., Elston, R. C., & Ferlini, C. (2015). Defining "mutation" and "polymorphism" in the era of personal genomics. *BMC Med Genomics*, 8, 37. <https://doi.org/10.1186/s12920-015-0115-z>
- Khalili, M. A., Shahedi, A., Ashourzadeh, S., Nottola, S. A., Macchiarelli, G., & Palmerini, M. G. (2017). Vitrification of human immature oocytes before and after in vitro maturation: a review. *J Assist Reprod Genet*, 34(11), 1413-1426. <https://doi.org/10.1007/s10815-017-1005-4>
- Khattari, A., Bhushan, S. S., Sireesha, V., Gupta, N. J., Chakravarty, B. N., Deendayal, M., . . . Thangaraj, K. (2011). The TNP1 haplotype - GCG is associated with azoospermia. *Int J Androl*, 34(2), 173-182. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2010.01072.x>
- Krausz, C., Escamilla, A. R., & Chianese, C. (2015). Genetics of male infertility: from research to clinic. *Reproduction*, 150(5), R159-174. <https://doi.org/10.1530/REP-15-0261>
- Krausz, C., & Riera-Escamilla, A. (2018). Genetics of male infertility. *Nat Rev Urol*, 15(6), 369-384. <https://doi.org/10.1038/s41585-018-0003-3>
- Kristensen, S. G., Mamsen, L. S., Jeppesen, J. V., Bøtkjær, J. A., Pors, S. E., Borgbo, T., . . . Andersen, C. Y. (2017). Hallmarks of Human Small Antral Follicle Development: Implications for Regulation of Ovarian Steroidogenesis and Selection of the Dominant Follicle. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 8, 376. <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00376>
- La, H. M., & Hobbs, R. M. (2019). Mechanisms regulating mammalian spermatogenesis and fertility recovery following germ cell depletion. *Cell Mol Life Sci*, 76(20), 4071-4102. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03201-6>
- Lanchimba, C., & Medina, P. (2011). Fecundidad en el Ecuador y su relacion con el entorno social y evolutivo [Article]. *Analitika (Revista de Analisis Estadistico/Journal of Statistical Analysis)*, 1, 25+.
- Lewin, B. (2008). *Genes IX* (M. G. Hill, Ed. Novena ed.).
- Lim, H. J., Seok, A. E., Han, J., Lee, J., Lee, S., Kang, H. G., . . . Yang, Y. (2017). N-glycoproteomic analysis of human follicular fluid during natural and stimulated cycles in patients undergoing. *Clin Exp Reprod Med*, 44(2), 63-72. <https://doi.org/10.5653/cerm.2017.44.2.63>

- Liu, B., Wu, S. D., Shen, L. J., Zhao, T. X., Wei, Y., Tang, X. L., . . . Wei, G. H. (2019). Spermatogenesis dysfunction induced by PM. *Ecotoxicol Environ Saf*, *167*, 161-168. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.09.118>
- Lotti, F., & Maggi, M. (2018). Sexual dysfunction and male infertility. *Nat Rev Urol*, *15*(5), 287-307. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2018.20>
- Lu, C. L., Yan, Z. Q., Song, X. L., Xu, Y. Y., Zheng, X. Y., Li, R., . . . Qiao, J. (2019). Effect of exogenous gonadotropin on the transcriptome of human granulosa cells and follicular fluid hormone profiles. *Reprod Biol Endocrinol*, *17*(1), 49. <https://doi.org/10.1186/s12958-019-0489-4>
- Lévesque, D., Veilleux, S., Caron, N., & Boissonneault, G. (1998). Architectural DNA-binding properties of the spermatidal transition proteins 1 and 2. *Biochem Biophys Res Commun*, *252*(3), 602-609. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.9687>
- Mascarenhas, M. N., Flaxman, S. R., Boerma, T., Vanderpoel, S., & Stevens, G. A. (2012). National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys. *PLoS Med*, *9*(12), e1001356. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001356>
- Medenica, S., Garalejic, E., Arsic, B., Medjo, B., Bojovic Jovic, D., Abazovic, D., . . . Zarkovic, M. (2018). Follicular fluid thyroid autoantibodies, thyrotropin, free thyroxine levels and assisted reproductive technology outcome. *PLoS One*, *13*(10), e0206652. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206652>
- Meistrich, M. L., Mohapatra, B., Shirley, C. R., & Zhao, M. (2003). Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis. *Chromosoma*, *111*(8), 483-488. <https://doi.org/10.1007/s00412-002-0227-z>
- Merges, G. E., Meier, J., Schneider, S., Kruse, A., Fröbuis, A. C., Kirfel, G., . . . Schorle, H. (2022). Loss of Prm1 leads to defective chromatin protamination, impaired PRM2 processing, reduced sperm motility and subfertility in male mice. *Development*, *149*(12). <https://doi.org/10.1242/dev.200330>
- Miller, D., Brinkworth, M., & Iles, D. (2010). Paternal DNA packaging in spermatozoa: more than the sum of its parts? DNA, histones, protamines and epigenetics. *Reproduction*, *139*(2), 287-301. <https://doi.org/10.1530/REP-09-0281>
- Miyagawa, Y., Nishimura, H., Tsujimura, A., Matsuoka, Y., Matsumiya, K., Okuyama, A., . . . Tanaka, H. (2005). Single-nucleotide polymorphisms and mutation analyses of the TNP1 and TNP2 genes of fertile and infertile human male populations. *J Androl*, *26*(6), 779-786. <https://doi.org/10.2164/jandrol.05069>

- Moritz, L., & Hammoud, S. S. (2022). The Art of Packaging the Sperm Genome: Molecular and Structural Basis of the Histone-To-Protamine Exchange. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 13, 895502. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.895502>
- Mortimer, D., & Mortimer, S. T. (2021, 2021//). Routine Application of CASA in Human Clinical Andrology and ART Laboratories. XIIIth International Symposium on Spermatology, Cham.
- Nabi, A., Khalili, M. A., Moshrefi, M., Sheikhha, M. H., Zare Mehrjardi, E., & Ashrafzadeh, H. R. (2018). Polymorphisms in protamine 1 and 2 genes in asthenozoospermic men: A case-control study. *Int J Reprod Biomed (Yazd)*, 16(6), 379-386.
- Nagaki, C. A. P., Hamilton, T. R. D. S., & Assumpção, M. E. O. D. (2022). What is known so far about bull sperm protamination: a review. *Anim Reprod*, 19(4), e20210109. <https://doi.org/10.1590/1984-3143-AR2021-0109>
- Nagy, B., Pulay, T., Szarka, G., & Csömör, S. (1989). The serum protein content of human follicular fluid and its correlation with the maturity of oocytes. *Acta Physiol Hung*, 73(1), 71-75.
- Nagyova, E. (2018). The Biological Role of Hyaluronan-Rich Oocyte-Cumulus Extracellular Matrix in Female Reproduction. *Int J Mol Sci*, 19(1). <https://doi.org/10.3390/ijms19010283>
- Niederberger, C., Pellicer, A., Cohen, J., Gardner, D. K., Palermo, G. D., O'Neill, C. L., . . . LaBarbera, A. R. (2018). Forty years of IVF. *Fertil Steril*, 110(2), 185-324.e185. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.06.005>
- Nosrati, R., Graham, P. J., Zhang, B., Riordon, J., Lagunov, A., Hannam, T. G., . . . Sinton, D. (2017). Microfluidics for sperm analysis and selection. *Nat Rev Urol*, 14(12), 707-730. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2017.175>
- O'Flynn O'Brien, K. L., Varghese, A. C., & Agarwal, A. (2010). The genetic causes of male factor infertility: a review. *Fertil Steril*, 93(1), 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.10.045>
- Oehninger, S., & Ombelet, W. (2019). Limits of current male fertility testing. *Fertil Steril*, 111(5), 835-841. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2019.03.005>
- Oliva, R. (2006). Protamines and male infertility. *Hum Reprod Update*, 12(4), 417-435. <https://doi.org/10.1093/humupd/dml009>
- Oliva, R., & Castillo, J. (2011). Proteomics and the genetics of sperm chromatin condensation. *Asian J Androl*, 13(1), 24-30. <https://doi.org/10.1038/aja.2010.65>
- OMS. (2022). *Infertility*. Organización Mundial de la Salud. [https://www.who.int/health-topics/infertility#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/infertility#tab=tab_1)

- Otsuki, J., Nagai, Y., Matsuyama, Y., Terada, T., & Era, S. (2012). The influence of the redox state of follicular fluid albumin on the viability of aspirated human oocytes. *Syst Biol Reprod Med*, 58(3), 149-153. <https://doi.org/10.3109/19396368.2012.675004>
- Pallotti, F., Barbonetti, A., Rastrelli, G., Santi, D., Corona, G., & Lombardo, F. (2022). The impact of male factors and their correct and early diagnosis in the infertile couple's pathway: 2021 perspectives. *J Endocrinol Invest*, 45(10), 1807-1822. <https://doi.org/10.1007/s40618-022-01778-7>
- Paz-Y-Miño, C., Guillen Sacoto, M. J., & Leone, P. E. (2016). Genetics and genomic medicine in Ecuador. *Mol Genet Genomic Med*, 4(1), 9-17. <https://doi.org/10.1002/mgg3.192>
- Pool, T. B., & Martin, J. E. (1994). High continuing pregnancy rates after in vitro fertilization-embryo transfer using medium supplemented with a plasma protein fraction containing alpha- and beta-globulins. *Fertil Steril*, 61(4), 714-719. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)56651-5](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)56651-5)
- Pourmasumi, S., Sabeti, P., Rahiminia, T., Mangoli, E., Tabibnejad, N., & Talebi, A. R. (2017). The etiologies of DNA abnormalities in male infertility: An assessment and review. *Int J Reprod Biomed (Yazd)*, 15(6), 331-344.
- Punjabi, U., Peeters, K., & De Neubourg, D. (2019). Sperm nuclear maturity and chromatin stability in subfertile patients: Density gradient centrifugation is fair but non-discriminative in selecting the right population. *Reprod Biol*, 19(4), 316-321. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2019.11.003>
- Rathke, C., Baarends, W. M., Awe, S., & Renkawitz-Pohl, R. (2014). Chromatin dynamics during spermiogenesis. *Biochim Biophys Acta*, 1839(3), 155-168. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2013.08.004>
- Revelli, A., Delle Piane, L., Casano, S., Molinari, E., Massobrio, M., & Rinaudo, P. (2009). Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics. *Reprod Biol Endocrinol*, 7, 40. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-7-40>
- Ribas-Maynou, J., & Benet, J. (2019). Single and Double Strand Sperm DNA Damage: Different Reproductive Effects on Male Fertility. *Genes (Basel)*, 10(2). <https://doi.org/10.3390/genes10020105>
- Rodrigo, L., Meseguer, M., Mateu, E., Mercader, A., Peinado, V., Bori, L., . . . Rubio, C. (2019). Sperm chromosomal abnormalities and their contribution to human embryo aneuploidy. *Biol Reprod*, 101(6), 1091-1101. <https://doi.org/10.1093/biolre/iox125>
- Rom, E., Reich, R., Laufer, N., Lewin, A., Rabinowitz, R., Pevsner, B., . . . Adelman-Grill, B. C. (1987). Follicular fluid contents as predictors of success of in-vitro fertilization-

- embryo transfer. *Hum Reprod*, 2(6), 505-510.  
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a136579>
- Sacha, C. R., Chavarro, J. E., Williams, P. L., Ford, J., Zhang, L., Donahoe, P. K., . . . Team, E. S. (2020). Follicular fluid anti-Müllerian hormone (AMH) concentrations and outcomes of in vitro fertilization cycles with fresh embryo transfer among women at a fertility center. *J Assist Reprod Genet*, 37(11), 2757-2766. <https://doi.org/10.1007/s10815-020-01956-7>
- Sakkas, D., & Alvarez, J. G. (2010). Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil Steril*, 93(4), 1027-1036. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.10.046>
- Santonocito, M., Vento, M., Guglielmino, M. R., Battaglia, R., Wahlgren, J., Ragusa, M., . . . Di Pietro, C. (2014). Molecular characterization of exosomes and their microRNA cargo in human follicular fluid: bioinformatic analysis reveals that exosomal microRNAs control pathways involved in follicular maturation. *Fertil Steril*, 102(6), 1751-1761.e1751. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.08.005>
- Savadi-Shiraz, E., Edalatkhah, H., Talebi, S., Heidari-Vala, H., Zandemami, M., Pahlavan, S., . . . Sadeghi, M. R. (2015). Quantification of sperm specific mRNA transcripts (PRM1, PRM2, and TNP2) in teratozoospermia and normozoospermia: New correlations between mRNA content and morphology of sperm. *Mol Reprod Dev*, 82(1), 26-35. <https://doi.org/10.1002/mrd.22440>
- Scalici, E., Traver, S., Mullet, T., Molinari, N., Ferrières, A., Brunet, C., . . . Hamamah, S. (2016). Circulating microRNAs in follicular fluid, powerful tools to explore in vitro fertilization process. *Sci Rep*, 6, 24976. <https://doi.org/10.1038/srep24976>
- Schon, S. B., Luense, L. J., Wang, X., Bartolomei, M. S., Coutifaris, C., Garcia, B. A., & Berger, S. L. (2019). Histone modification signatures in human sperm distinguish clinical abnormalities. *J Assist Reprod Genet*, 36(2), 267-275. <https://doi.org/10.1007/s10815-018-1354-7>
- Seligman, J., Zipser, Y., & Kosower, N. S. (2004). Tyrosine phosphorylation, thiol status, and protein tyrosine phosphatase in rat epididymal spermatozoa. *Biol Reprod*, 71(3), 1009-1015. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.028035>
- Shalgi, R., Kraicer, P., Rimon, A., Pinto, M., & Soferman, N. (1973). Proteins of human follicular fluid: the blood-follicle barrier. *Fertil Steril*, 24(6), 429-434.
- Shirley, C. R., Hayashi, S., Mounsey, S., Yanagimachi, R., & Meistrich, M. L. (2004). Abnormalities and reduced reproductive potential of sperm from Tnp1- and Tnp2-

- null double mutant mice. *Biol Reprod*, 71(4), 1220-1229.  
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.029363>
- Siddeek, B., Mauduit, C., Simeoni, U., & Benahmed, M. (2018). Sperm epigenome as a marker of environmental exposure and lifestyle, at the origin of diseases inheritance. *Mutat Res*, 778, 38-44. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2018.09.001>
- Sies, H., Berndt, C., & Jones, D. P. (2017). Oxidative Stress. *Annu Rev Biochem*, 86, 715-748.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-045037>
- Sigman, M. (2019). Introduction: Male fertility testing: the past, present, and future. *Fertil Steril*, 111(5), 833-834. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2019.03.008>
- Soler-Ventura, A., Gay, M., Jodar, M., Vilanova, M., Castillo, J., Arauz-Garofalo, G., . . . Oliva, R. (2020). Characterization of Human Sperm Protamine Proteoforms through a Combination of Top-Down and Bottom-Up Mass Spectrometry Approaches. *J Proteome Res*, 19(1), 221-237. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.9b00499>
- Son, W. Y., Henderson, S., Cohen, Y., Dahan, M., & Buckett, W. (2019). Immature Oocyte for Fertility Preservation. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 10, 464.  
<https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00464>
- Steger, K., & Balhorn, R. (2018). Sperm nuclear protamines: A checkpoint to control sperm chromatin quality. *Anat Histol Embryol*, 47(4), 273-279.  
<https://doi.org/10.1111/ahe.12361>
- Takeda, N., Yoshinaga, K., Furushima, K., Takamune, K., Li, Z., Abe, S., . . . Yamamura, K. (2016). Viable offspring obtained from Prm1-deficient sperm in mice. *Sci Rep*, 6, 27409.  
<https://doi.org/10.1038/srep27409>
- Tanaka, H., Miyagawa, Y., Tsujimura, A., Matsumiya, K., Okuyama, A., & Nishimune, Y. (2003). Single nucleotide polymorphisms in the protamine-1 and -2 genes of fertile and infertile human male populations. *Mol Hum Reprod*, 9(2), 69-73.  
<https://doi.org/10.1093/molehr/gag010>
- Teixeira, D., Fernandes, R., Prudêncio, C., & Vieira, M. (2016). 3-Nitrotyrosine quantification methods: Current concepts and future challenges. *Biochimie*, 125, 1-11.  
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2016.02.011>
- Thirumavalavan, N., Gabrielsen, J. S., & Lamb, D. J. (2019). Where are we going with gene screening for male infertility? *Fertil Steril*, 111(5), 842-850.  
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2019.03.036>
- Torres-Flores, U., & Hernández-Hernández, A. (2020). The Interplay Between Replacement and Retention of Histones in the Sperm Genome. *Front Genet*, 11, 780.  
<https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00780>

- Valckx, S. D., De Pauw, I., De Neubourg, D., Inion, I., Berth, M., Fransen, E., . . . Leroy, J. L. (2012). BMI-related metabolic composition of the follicular fluid of women undergoing assisted reproductive treatment and the consequences for oocyte and embryo quality. *Hum Reprod*, 27(12), 3531-3539. <https://doi.org/10.1093/humrep/des350>
- Vander Borght, M., & Wyns, C. (2018). Fertility and infertility: Definition and epidemiology. *Clin Biochem*, 62, 2-10. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2018.03.012>
- Vantman, B. D., & Vega, B. M. (2010). Fisiología reproductiva y cambios evolutivos con la edad de la mujer. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 21(3), 348-362. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0716-8640\(10\)70545-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0716-8640(10)70545-9)
- Velazquez, A., Reyes, A., Chargoy, J., & Rosado, A. (1977). Amino acid and protein concentrations of human follicular fluid. *Fertil Steril*, 28(1), 96-100. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)42324-1](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)42324-1)
- Venkatesh, S., Kumar, R., Deka, D., Deecaraman, M., & Dada, R. (2011). Analysis of sperm nuclear protein gene polymorphisms and DNA integrity in infertile men. *Syst Biol Reprod Med*, 57(3), 124-132. <https://doi.org/10.3109/19396368.2011.562960>
- Verón, G. L., Tissera, A. D., Bello, R., Beltramone, F., Estofan, G., Molina, R. I., & Vazquez-Levin, M. H. (2018). Impact of age, clinical conditions, and lifestyle on routine semen parameters and sperm kinematics. *Fertil Steril*, 110(1), 68-75.e64. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.03.016>
- Virtanen, H. E., Jørgensen, N., & Toppari, J. (2017). Semen quality in the 21. *Nat Rev Urol*, 14(2), 120-130. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2016.261>
- Ward, W. S. (1993). Deoxyribonucleic acid loop domain tertiary structure in mammalian spermatozoa. *Biol Reprod*, 48(6), 1193-1201. <https://doi.org/10.1095/biolreprod48.6.1193>
- Wen, X., Li, D., Tozer, A. J., Docherty, S. M., & Iles, R. K. (2010). Estradiol, progesterone, testosterone profiles in human follicular fluid and cultured granulosa cells from luteinized pre-ovulatory follicles. *Reprod Biol Endocrinol*, 8, 117. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-8-117>
- Winters, B. R., & Walsh, T. J. (2014). The epidemiology of male infertility. *Urol Clin North Am*, 41(1), 195-204. <https://doi.org/10.1016/j.ucl.2013.08.006>
- World Health Organization, D. o. R. H. a. R. (2021). *WHO laboratory manual for the examination and procesing of human semen* (W. H. Organization, Ed. 6th ed.). World Health Organization.

- Wu, H., Hauser, R., Krawetz, S. A., & Pilsner, J. R. (2015). Environmental Susceptibility of the Sperm Epigenome During Windows of Male Germ Cell Development. *Curr Environ Health Rep*, 2(4), 356-366. <https://doi.org/10.1007/s40572-015-0067-7>
- Yamamoto, J., Omura, M., Tuchiya, K., Hidaka, M., Kuwahara, A., Irahara, M., . . . Tokumura, A. (2016). Preferable existence of polyunsaturated lysophosphatidic acids in human follicular fluid from patients programmed with in vitro fertilization. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 126, 16-23. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2016.07.008>
- Yu, Y. E., Zhang, Y., Unni, E., Shirley, C. R., Deng, J. M., Russell, L. D., . . . Meistrich, M. L. (2000). Abnormal spermatogenesis and reduced fertility in transition nuclear protein 1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(9), 4683-4688. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.9.4683>
- Zegers-Hochschild, F., Adamson, G. D., Dyer, S., Racowsky, C., de Mouzon, J., Sokol, R., . . . van der Poel, S. (2017). The International Glossary on Infertility and Fertility Care, 2017. *Hum Reprod*, 32(9), 1786-1801. <https://doi.org/10.1093/humrep/dex234>
- Zegers-Hochschild, F., Crosby, J. A., Musri, C., Souza, M. D. C. B., Martinez, A. G., Silva, A. A., . . . Reproduction, L. A. N. O. (2022). Assisted reproductive technologies in Latin America: the Latin American Registry, 2019. *JBRA Assist Reprod*, 26(4), 637-658. <https://doi.org/10.5935/1518-0557.20220034>
- Zhao, M., Shirley, C. R., Mounsey, S., & Meistrich, M. L. (2004). Nucleoprotein transitions during spermiogenesis in mice with transition nuclear protein Tnp1 and Tnp2 mutations. *Biol Reprod*, 71(3), 1016-1025. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.028191>
- Zhao, M., Shirley, C. R., Yu, Y. E., Mohapatra, B., Zhang, Y., Unni, E., . . . Meistrich, M. L. (2001). Targeted disruption of the transition protein 2 gene affects sperm chromatin structure and reduces fertility in mice. *Mol Cell Biol*, 21(21), 7243-7255. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.21.7243-7255.2001>

## **CAPÍTULO II: RELACIÓN ENTRE EL CONTENIDO PROTEICO Y LOS NIVELES DE NITROTIROSINA DEL FLUIDO FOLICULAR HUMANO CON LA FERTILIDAD**

### **II.1. Introducción**

El ovario de una mujer necesita un ambiente intrafolicular saludable para que los complejos cúmulus-ovocito (COCs) alojados en su interior adquieran competencia de desarrollo y sean capaces de completar la meiosis, fecundación, embriogénesis y desarrollo embrionario a término. Esto se alcanza, en gran medida, gracias a las contribuciones coordinadas de las células del cúmulus y el fluido folicular (FF) que rodea los COCs (Da Broi et al., 2018). Así pues, el fluido folicular humano (FFH), producido en las últimas fases del desarrollo de los folículos secundarios, representa un microambiente de importancia como medio de comunicación entre el ovocito y las células foliculares, siendo necesario para la correcta maduración y competencia de los COCs (Ambekar et al., 2013; Basuino & Silveira, 2016; Santonocito et al., 2014; Yamamoto et al., 2016).

La mezcla compleja de componentes que constituyen el FFH deriva de las células foliculares y del trasudado de plasma sanguíneo; por lo que, cambios metabólicos y componentes nocivos séricos serán expresados en el microambiente folicular, influyendo directamente sobre la maduración y calidad del ovocito (Da Broi et al., 2018; Emori & Drapkin, 2014; Santonocito et al., 2014; Valckx et al., 2012; Yamamoto et al., 2016). Las células foliculares que contribuyen con su secreción en la composición del FFH son las células de la granulosa y las células tecaes; mientras que los componentes derivados principalmente del plasma sanguíneo son proteínas, metabolitos, iones, hormonas, polisacáridos, especies reactivas de oxígeno (ROS), antioxidantes, etc. (Da Broi et al., 2018; Emori & Drapkin, 2014; Lim et al., 2017; Santonocito et al., 2014; Yamamoto et al., 2016). Dentro de los componentes del FF, las proteínas son esenciales por su trascendencia en multitud de procesos biológicos (Dumesic et al., 2015). La composición proteica del FFH es compleja, variando conforme el crecimiento de los folículos ováricos y los COCs maduran en su interior (Ambekar et al., 2013; Dumesic et al., 2015) y aunque la mayoría proceden del trasudado de plasma sanguíneo, también se han reportado proteínas secretadas por las propias células de la granulosa y la teca como por ejemplo la proteína asociada a la inflamación TNFAIP6 y la glicoproteína multifuncional estaniocalcina 1 (Ambekar et al., 2013; Lim et al., 2017; Nagyova, 2018). La mayor parte de proteínas del FFH están involucradas en procesos metabólicos, remodelación de la matriz extracelular y respuestas inmunitarias

(Dumesic et al., 2015); sin embargo, aún se desconoce la función de muchas de ellas (Ambekar et al., 2013).

La concentración de proteínas totales en el FFH oscila de 4.87 g/dl a 7.28 g/dl (Gonzalès et al., 1992; Shalgi et al., 1973; Velazquez et al., 1977). Esta fluctuación afectaría a la capacidad reproductiva de la mujer, reportándose ovocitos con desarrollo alterado, bajo número de embriones y calidad alterada de blastocistos en fecundación *in vitro* (FIV) en pacientes con concentraciones alteradas de proteínas en el FF (Da Broi et al., 2014; Valckx et al., 2012). Dentro de las proteínas de origen sérico más abundantes en el FFH se encuentran la albúmina, seguida por las globulinas (Freitas et al., 2017; Otsuki et al., 2012; Walker et al., 1990). La albúmina participa en la regulación osmótica y se comporta como antioxidante, siendo asociada sus bajas concentraciones en este fluido a ovocitos estructuralmente degenerados, con capacidad de desarrollo disminuida y bajo número de embriones de buena calidad (Freitas et al., 2017; Otsuki et al., 2012; Valckx et al., 2012). Por otro lado, la familia de las globulinas incluye cientos de proteínas como las transportadoras, enzimas, complemento e inmunoglobulinas (Walker et al., 1990); estando algunas inmunoglobulinas del FFH, asociadas a la madurez ovocitaria y desarrollo embrionario en el ciclo de FIV (Nagy et al., 1989; Pool & Martin, 1994; Rom et al., 1987).

Proteínas de fluido folicular como la metaloproteinasa-9 de la matriz (MMP-9) o el inhibidor de metaloproteinasa 1 (TIMP1) se han reportado como biomarcadores de la calidad del ovocito y de su desarrollo posterior a la FIV (Ambekar et al., 2013; Zamah et al., 2015). Pese a su importancia biológica (Dumesic et al., 2015), aún no se ha definido con claridad cómo la variabilidad en la concentración de proteínas totales, albúmina y globulinas afectarían la calidad y fertilidad de los COCs obtenidos, ni si estas concentraciones proteicas podrían ser utilizados como predictores sencillos y rápidos de dicha calidad ovocitaria.

Por otra parte, las especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS) se han detectado en los ovarios y el FFH (Agarwal et al., 2005; Cigliano et al., 2002). Estos radicales libres se producen normalmente dentro de las células como subproductos del proceso metabólico en todos los organismos aeróbicos, en concentraciones muy bajas (Teixeira et al., 2016). Sin embargo, son inestables y altamente reactivos, volviéndose estables al adquirir electrones de cualquier molécula cercana como ácidos nucleicos, lípidos, proteínas o carbohidratos, provocando una cascada de reacciones en cadena que resultan en daño y enfermedad celular (Agarwal et al., 2005). El desequilibrio entre factores oxidantes y antioxidantes a favor de los

oxidantes se define como “estrés oxidativo” y conduce a una interrupción de la señalización celular y el control redox y/o daño molecular (H. Sies, 2007). Una de las principales consecuencias del estrés oxidativo/nitrosativo es el daño de las bases de los ácidos nucleicos, las proteínas, los lípidos (incluidos los fosfolípidos) y los carbohidratos, lo que puede comprometer la salud de las células, así como inducir una variedad de respuestas celulares como la muerte celular por necrosis o apoptosis (Teixeira et al., 2016). En las células, las RNS más comunes son el óxido nítrico (NO) y el dióxido de nitrógeno (NO<sub>2</sub>) (Agarwal et al., 2005). Además, el peroxinitrito es otra especie nitrante importante que se forma por la combinación del anión superóxido y el NO, provocando daño oxidativo que resulta en la nitración del residuo tirosina de las proteínas dando como resultado el producto 3-nitrotirosina (3-NT) (Cigliano et al., 2002; Teixeira et al., 2016). La nitración del residuo tirosina es un proceso común de modificación postraduccional de las proteínas que ocurre en condiciones fisiológicas, pero el aumento significativo en la extensión de este proceso (inducido por un mayor estado de estrés nitrosativo) se ha asociado con una amplia gama de enfermedades (Teixeira et al., 2016).

Aunque el papel de las ROS en distintos eventos reproductivos ha sido más estudiado que el de las RNS, la evaluación de la concentración de residuos de tirosina nitrada en las proteínas se utiliza ampliamente como marcador del daño proteico por estrés oxidativo (Cigliano et al., 2002; Teixeira et al., 2016). De hecho, los niveles de 3-NT en plasma sanguíneo en condiciones patológicas son ligeramente más elevadas en comparación con los niveles basales en individuos sanos (Teixeira et al., 2016). Pese a que se ha detectado 3-NT en varios tejidos y fluidos biológicos, incluidos plasma, suero, orina, líquido cefalorraquídeo y líquido sinovial (Teixeira et al., 2016), el estudio de los niveles de 3-NT como método para evaluar el alcance del daño oxidativo de las proteínas en el FFH ha sido analizado en pocos estudios, los cuales reportan concentraciones micromolares de 1.5 a 35 en el FFH de mujeres infértiles (Cigliano et al., 2002). Por otra parte, Amano (2014) evaluó las concentraciones directas del aminoácido tirosina en el FF de mujeres sometidas a estimulación ovárica controlada, encontrando menores concentraciones de este aminoácido en el FF de mujeres con el de mujeres con OHSS (síndrome de hiperestimulación ovárica) comparado con el de normo-respondedoras (síndrome de hiperestimulación ovárica) (Amano et al., 2014). Por ello, evaluar la existencia de alguna alteración de los niveles de 3-NT en el FF de mujeres, como marcador de la presencia de estrés oxidativo y su posible correlación con las tasas de fertilidad sería muy interesante de cara a desarrollar biomarcadores y predictores tempranos del éxito de algunas técnicas de reproducción asistida como la FIV y el cultivo embrionario temprano.

## **II.2. Hipótesis y Objetivos**

La hipótesis de partida de este capítulo es que la concentración de proteínas totales, albúmina, globulinas, así como los niveles de nitrotirosina, varían en el fluido folicular de mujeres fértiles e infértiles y que dichas concentraciones están correlacionadas con parámetros de calidad ovocitaria y los posteriores índices de fertilidad e implantación embrionaria en las mujeres.

Para confirmar esta hipótesis se obtendrá y analizará el FF de mujeres fértiles y mujeres con distinto diagnóstico de infertilidad que estén realizándose un ciclo de estimulación ovárica controlada dentro de su tratamiento de reproducción asistida, planteando los siguientes objetivos: i) Obtener el fluido folicular de mujeres fértiles e infértiles luego de una aspiración folicular y recuperación de los COCs, para su posterior análisis y estudio; ii) estudiar la calidad y viabilidad de los COCs obtenidos de dichas mujeres analizando los índices de maduración nuclear (ovocitos en estadio de metafase II) y citoplasmática mediante fecundación, posterior desarrollo embrionario (número de blastocistos y calidad de los mismos) y transferencia para conocer su grado de implantación; iii) determinar la concentración de proteínas totales, albúmina y globulinas en el fluido folicular aspirado; iv) analizar los niveles de proteínas modificadas con nitrotirosina para valorar el grado de estrés oxidativo en el fluido folicular aspirado; y v) correlacionar las concentraciones de proteínas y niveles de proteínas modificadas con nitrotirosina del fluido folicular con los resultados de viabilidad embrionaria obtenidos.

## **II.3. Materiales y Métodos**

El presente trabajo se realizó en el centro de reproducción asistida Innaifest ubicado en el Hospital Clínica Kennedy, Sección Gamma, Consultorio #11 (Guayaquil, Ecuador) con número de permiso sanitario ACESSS2021-Z08-0115452 e incluido como centro acreditado en la Red Latinoamericana de Reproducción Asistida (REDLARA). Este estudio fue aprobado por el comité de ética del Hospital Clínica Kennedy mediante oficio HCK-CEISH-19-0040 y el Ministerio de Salud Pública de Ecuador (Coordinación General de Desarrollo Estratégico en Salud - Dirección Nacional de Inteligencia de la Salud, oficio MSP-DIS-2020-0146-O). Todas las pacientes que aceptaron formar parte de este trabajo dieron su consentimiento informado por escrito.

### II.3.1. Criterios de selección de pacientes

Los criterios de inclusión para el estudio fueron los establecidos por la REDLARA con modificaciones realizadas por el centro de reproducción asistida Innaifest. Para las donantes de complejos cúmulus-ovocito (COCs) se consideró una edad de 18 a 33 años, índice de masa corporal (IMC) de 18.0 a 30.0 kg/m<sup>2</sup>, recuento de folículos antrales de 8 a máximo 30 folículos y que no padecieran enfermedades de transmisión sexual u otras como diabetes o enfermedades genéticas. Por su parte, los criterios de inclusión para el grupo de mujeres infértiles fueron pacientes que deseaban someterse a una estimulación ovárica y aspiración folicular para recuperación de COCs, con edad entre 18 a 44 años, IMC menor a 40.0 kg/m<sup>2</sup>, estradiol y recuento de folículos antrales en base a la edad de la paciente entre 5-40 pg/ml y de 5 a 18 folículos, respectivamente. Los criterios de exclusión para este estudio fueron que la paciente, o su pareja, tuvieran alguna enfermedad de transmisión sexual u otra infección activa, mujeres a las que únicamente se les pudo realizar la aspiración de un único folículo ovárico, casos en los que tras la aspiración de todos los folículos ováricos el volumen final de fluido folicular recuperado fuera inferior a 1.5 ml, y casos en los que tras la aspiración folicular no se recuperara ningún COCs.

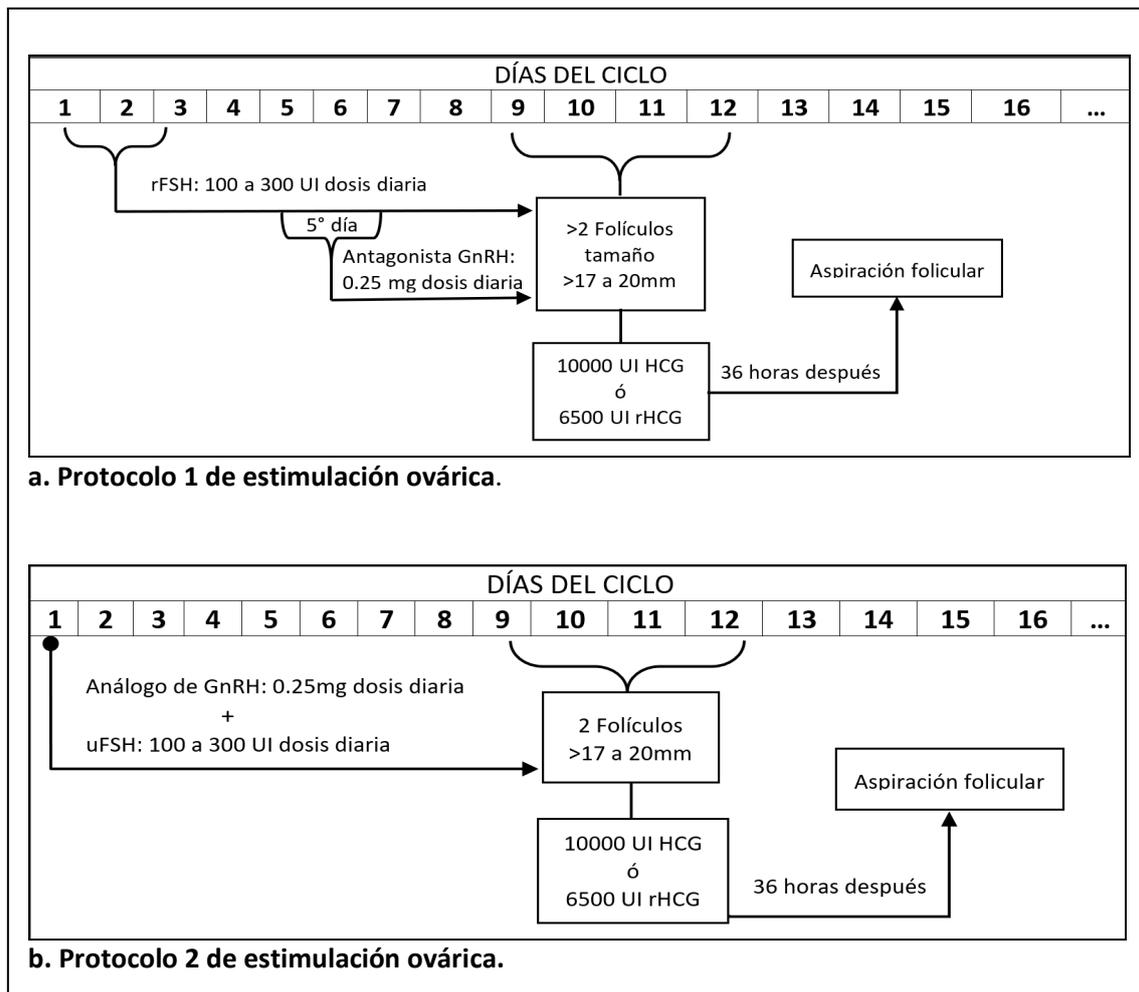
Se realizó un estudio pormenorizado de todas las mujeres para diagnosticar el origen de su infertilidad mediante una historia clínica completa que incluyó su edad, IMC, menarquia, menacmia, enfermedades previas, presencia de descendencia, historial de intervenciones quirúrgicas, obstrucción tubárica y estudio de la cavidad uterina mediante histeroscopia diagnóstica. Los días 2, 13 y 21 del ciclo se realizaron ecografía vaginal y perfil hormonal para conocer el estado basal, preovulatorio y luteinizante de cada mujer. El sistema de clasificación de infertilidad utilizado para el diagnóstico fue el establecido por la REDLARA en sus manuales para reportes estadísticos anuales de centros acreditados. Finalmente, fueron seleccionadas para el estudio un total de 74 mujeres, entre 18-42 años, que se distribuyeron en dos grupos: control (n=41) e infértiles (n=33). El grupo control consistió en mujeres sanas, sin causa aparente de infertilidad femenina conocida, entre las que se incluyeron las mujeres cuyo diagnóstico de infertilidad fue únicamente atribuido a factor masculino y las donantes de COCs que tenían descendencia comprobada en ovodonación previa. En el grupo de mujeres con infertilidad femenina se incluyeron todas aquellas con diagnóstico de factor anatómico, insuficiencia ovárica, endometriosis, factor endocrino y causa de infertilidad inexplicable.

De acuerdo con lo establecido por la bibliografía ("Infertility Workup for the Women's Health Specialist: ACOG Committee Opinion, Number 781," 2019), dentro del diagnóstico de factor anatómico de infertilidad se incluyeron pacientes con daño en las trompas de Falopio o algunas afecciones uterinas como oclusión o adhesiones peritubáricas, salpingectomía, pólipos uterinos, útero bicorne, hidrosalpinx, síndrome de Asherman, etc. Los casos con endometriosis, enfermedad inflamatoria con presencia de epitelio y estroma endometrial fuera del endometrio y miometrio, se confirmaron mediante estudio patológico de la lesión, con histología realizada durante la histeroscopia diagnóstica (Zegers-Hochschild et al., 2017). La insuficiencia ovárica por menopausia prematura, así como el factor endocrino de infertilidad (Síndrome de ovario poliquístico, enfermedad poliquística del ovario, etc.), se validaron con resultados alterados de testosterona, testosterona libre, enzimas hepáticas, sustancias grasas, colesterol de alta y baja densidad, y triglicéridos (Vander Borgh & Wyns, 2018; Zegers-Hochschild et al., 2017). El diagnóstico de infertilidad de origen inexplicable se dio a parejas que no habían conseguido un embarazo tras 12 meses con adecuada frecuencia coital; función ovárica, trompas de Falopio, útero, cuello uterino y pelvis, aparentemente normales; y, función testicular aparentemente normal, anatomía genitourinaria y eyaculación normales (Zegers-Hochschild et al., 2017).

### **II.3.2. Estimulación ovárica**

Los protocolos de estimulación ovárica controlada aplicados a las 74 mujeres de este estudio, tanto al grupo control de mujeres fértiles, como a las pacientes infértiles, se realizaron de manera individualizada y fueron adaptados a partir de los criterios de Bolonia y Poseidón, considerando la edad de la mujer, su reserva ovárica, IMC y diagnóstico de infertilidad (Alviggi et al., 2006; Esteves et al., 2018; Ferraretti et al., 2011; Humaidan et al., 2016; Kupka et al., 2016). Así pues, 65 mujeres recibieron dosis diarias de hormona folículo estimulante recombinante (rFSH) (Gonal-F®: folitropina alfa subcutánea; Merck Serono), iniciando entre el día 1 al 3 del ciclo menstrual, que oscilaron entre 100 a 300 UI rFSH en base a la edad, reserva ovárica e IMC. Cinco días después de administrar la rFSH, todas las pacientes recibieron dosis diarias de 0.25 mg de un antagonista de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) (Cetrotide®: acetato de cetrorelix; Merck Serono) (**Figura II.1a**). Por otro lado, sólo 9 mujeres recibieron el protocolo 2 de estimulación ovárica basado en el uso diario de 100 a 300 UI de hormona folículo estimulante purificada (uFSH), combinada con dosis fija de 0.25 mg diarios de un análogo de hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) (Abbott-Lupron®: acetato de Leuprolide 5 mg/ml) (**Figura II.1b**).

Con ambos protocolos de estimulación, la respuesta ovárica de cada mujer fue monitorizada mediante ecosonografía transvaginal a lo largo del ciclo y cuando la ecografía reveló más de 2 folículos de diámetro superior a 17 mm se administró una dosis de 10.000 UI de gonadotropina coriónica humana (hCG) ó 6.500 IU de hCG recombinante. La aspiración folicular para la recuperación de los COCs se realizó 36 horas después de la administración de hCG, bajo ecosonografía transvaginal y sedación de la paciente.



**Figura II.1. Protocolos de estimulación ovárica.** **a.** Protocolo 1 basado en el uso de hormona folículo estimulante recombinante (rFSH) y un antagonista de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), el mismo que fue aplicado a 65 mujeres (37 del grupo control y 28 pacientes infértiles). **b.** Protocolo 2 basado en el uso de hormona folículo estimulante purificada (uFSH) y análogo de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), aplicado a 9 mujeres (4 del grupo control y 5 pacientes infértiles). En ambos protocolos, hCG (gonadotropina coriónica humana); rhCG (gonadotropina coriónica humana recombinante).

### **II.3.3. Punción ovárica y aspiración de fluido folicular**

La punción ovárica y aspiración folicular se realizaron con aguja de recuperación de COCs de calibre 17 mm (OPS ART de CCD, referencia 1301020; Laboratoire CCD, París, Francia) conectada a una bomba de aspiración con presión entre 80 y 120 mmHg (Gen X-Pioneer *Pro-Pump for aspiration*, CooperSurgical). Todos los folículos fueron aspirados y el contenido recogido en tubos estériles de 14 ml con fondo redondo (Falcon-Corning, referencia 352001) conteniendo 0.1 ml de medio de cultivo tamponado con tampón HEPES para lavado y manipulación de COCs (Global w/HEPES, referencia LGGH; Cooper Surgical) suplementado con 2% (v/v) de albúmina sérica humana (HSA Solution, referencia 9988; Irvine Scientific) y atemperado a 37°C. Tras la punción folicular de ambos ovarios, el contenido de los folículos se depositó en placas de Petri estériles de 100 x 15mm (Falcon-Corning, referencia 351029) atemperadas a 37°C; y, dentro de cabina de flujo laminar, bajo microscopio estereoscópico y sobre platina térmica a 37°C se realizó la selección de los COCs. Tras la recuperación de los COCs, el fluido folicular se centrifugó (2000 rpm, 15 minutos) (Naito et al., 1988), se filtró (0.45 µm y 0.22 µm) y almacenó a -20°C hasta su análisis.

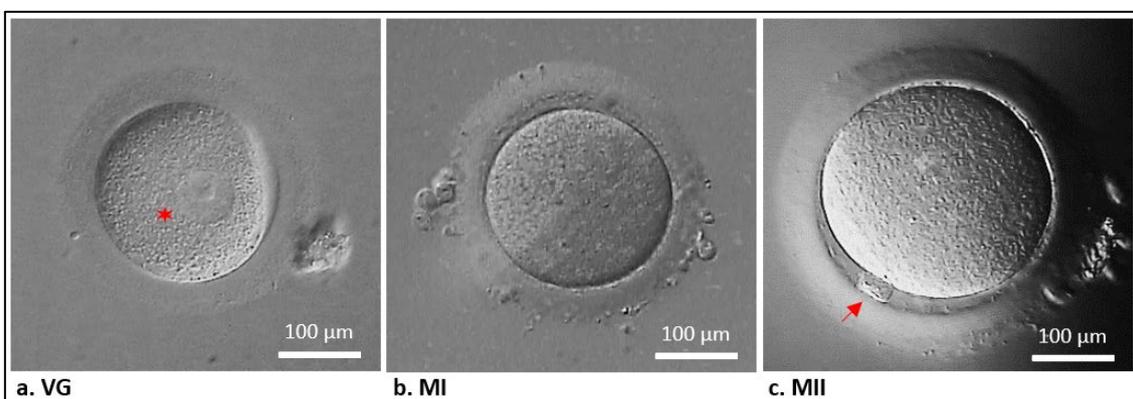
Se registró el número total de folículos puncionados, volumen final de FF recogido y número total de COCs recuperados. El volumen de FF obtenido se calculó restando el volumen total de líquido recogido menos el volumen de medio de recogida empleado. La tasa de recogida de COCs (%) se calculó en base al número de COCs recuperados sobre el total de folículos puncionados.

### **II.3.4. Cultivo de COCs aspirados y determinación de la maduración nuclear ovocitaria**

Tras la aspiración folicular y recuperación de los COCs, éstos se trasladaron a la periferia de una caja Petri de pozo central (Falcon™-Corning™, referencia 353037) que contenía 3 ml del medio de cultivo Global Total (Referencia LGGT-030, Cooper Surgical) cubierto con 3 ml de aceite mineral (Referencia 9305, Irving Scientific) equilibrado previamente durante 10 horas en un incubador K-System G185 (Cooper Surgical) atemperado a 37°C y concentraciones de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> al 5%. Los COCs se lavaron 3 veces y luego se los trasladó al centro de la caja que contenía 1 ml del mismo medio de cultivo Global total cubierto con 1 ml de aceite mineral. Finalmente, la caja se mantuvo en incubación por 60 minutos antes de proceder a la denudación ovocitaria.

La denudación o eliminación de las células del cúmulus se realizó a 37°C en una caja Petri 65x15mm (Falcon™-Corning™, referencia 351007) conteniendo 0.5 ml de hialuronidasa (Cooper Surgical-Origio, referencia Synvitro Hyadase: 15115001D) cubierta con aceite mineral. Los COCs se pipetearon repetidamente en la hialuronidasa por 30-60 segundos con micropipeta para denudar (Cooper Surgical, referencia MXL3-STR) y capilares de 600 µm, 200 µm, 150 µm y 135 µm (Cooper Surgical, referencia MXL3-600, MXL3-200, MXL3-150, MXL3-135). A continuación, fueron lavados en 3 gotas de medio Global Total con HEPES (Cooper Surgical-Global, referencia LGTH-100) atemperado a 37°C y cubiertas con aceite mineral para completar la denudación y eliminar residuos de hialuronidasa.

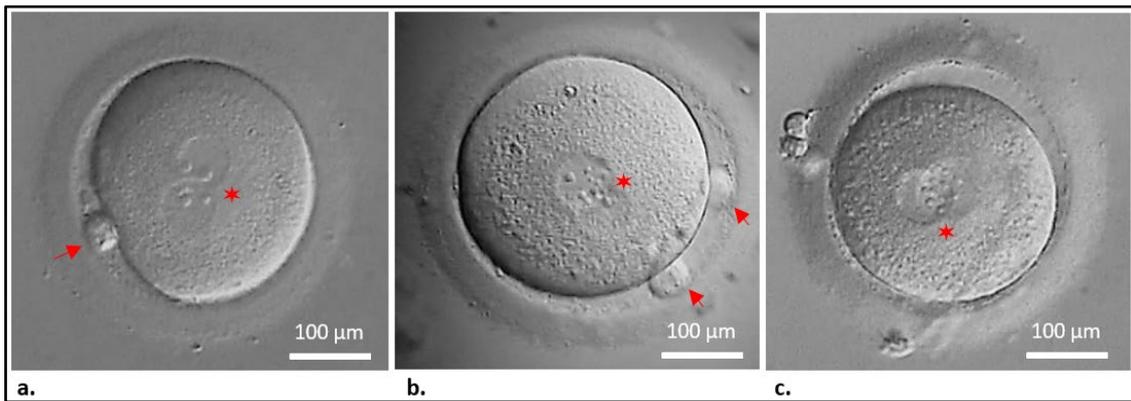
Tras denudar, la madurez nuclear de los ovocitos (**Figura II.2**) fue evaluada en microscopio invertido a 20X, iluminación Hoffman y platina atemperada a 37°C (Olympus IX71), mediante la observación del primer corpúsculo polar extruido en el espacio perivitelino (metafase II, MII) y únicamente estos ovocitos fueron considerados maduros. En los ovocitos inmaduros en profase I se observaba claramente la envoltura nuclear y el núcleo ovocitario refringente, denominado vesícula germinal (VG). Por su parte, los ovocitos inmaduros en metafase I (MI) ya han completado la profase de la meiosis I, por lo que la envoltura nuclear y el núcleo ya no son visibles, pero el corpúsculo aún no se ha extruido y la zona pelúcida se encuentra engrosada (Rienzi et al., 2012; Veeck & Zaninovic, 2011). Se registró el número de ovocitos en MII, MI y VG y se calculó la tasa de ovocitos maduros (%) en base al número de ovocitos en estadio de MII sobre el total de COCs recuperados.



**Figura II.2. Ovocitos humanos obtenidos tras la aspiración folicular.** Imágenes bajo microscopio invertido a 20X con iluminación Hoffman. **a.** Ovocito en estadio de vesícula germinal (VG) donde se observa claramente la envoltura nuclear (asterisco) y el nucleolo; **b.** Ovocito en estadio de metafase I (MI); **c.** Ovocito en estadio de metafase II (MII) con el primer corpúsculo polar (flecha) extruido en el espacio perivitelino.

### II.3.5. Inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) y cultivo embrionario

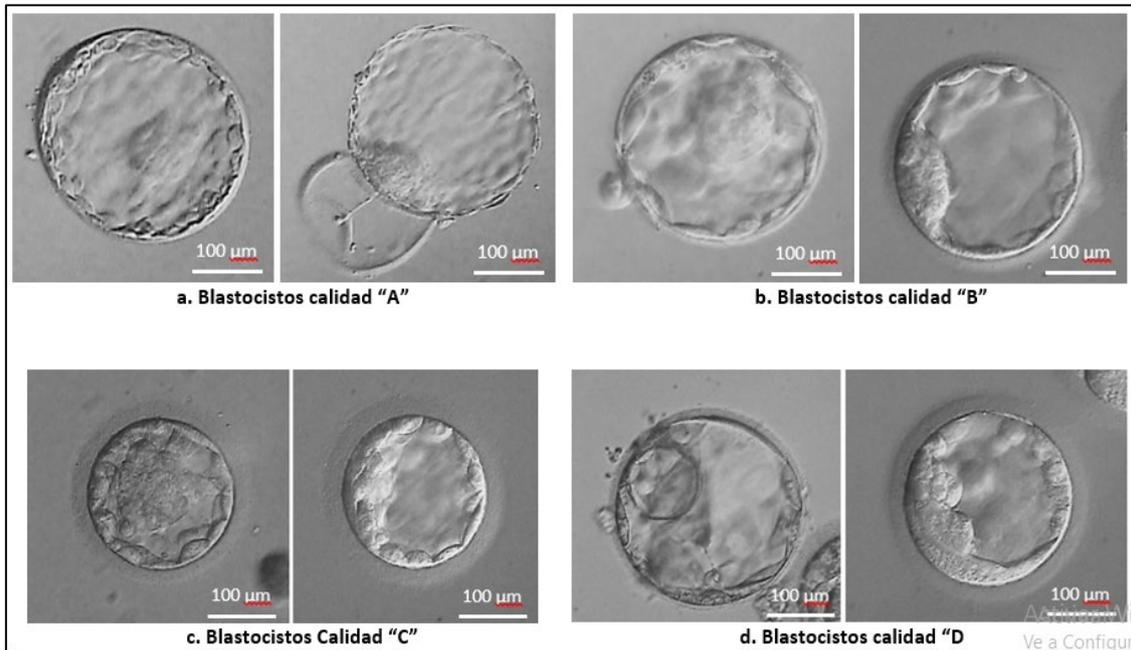
Los ovocitos en estadio de MII fueron seleccionados bajo la lupa y fecundados por medio de ICSI, en el plazo máximo de cuatro horas tras la aspiración folicular, siguiendo los protocolos habituales de la clínica Innaifest. La confirmación de la fecundación se realizó entre las 18-19 horas después de la microinyección mediante la observación del cigoto (2 pronúcleos) y la extrusión del segundo CP, bajo microscopio invertido a 20X, iluminación Hoffman y 37°C (Figura II.3).



**Figura II.3. Cigotos humanos 18 horas post ICSI.** Imágenes bajo microscopio invertido a 20X con iluminación Hoffman, donde se visualiza los pronúcleos masculino y femenino en singamia (asterisco) y los corpúsculos polares (flecha) en el espacio perivitelino según el plano.

Los cigotos se mantuvieron en cultivo hasta estadio de blastocisto (día 5-6) a 37°C y concentraciones de CO<sub>2</sub> y oxígeno del 5%, en microgotas de 20 μl de medio de cultivo Global Total distribuidas en una caja Petri estéril de 65x15mm cubierta con 9.5 ml de aceite mineral. Los blastocistos fueron evaluados mediante un sistema simplificado de cuatro categorías, establecido en el centro de reproducción Innaifest, en base a otros métodos de clasificación embrionaria (ASEBIR, 2015; Richardson et al., 2015; Veeck & Zaninovic, 2011) (**Figura II.4**). Los blastocistos de día 5 de cultivo de mejor calidad son clasificados como “A”, los cuales se presentan completamente expandidos con zona pelúcida (ZP) adelgazada o eclosionando o eclosionados, masa celular interna (MCI) clara y compacta, y trofotodermo con muchas células con uniones cohesivas. Los blastocistos clasificados con calidad “B” son los que en día 6 de cultivo presentan las mismas características que los “A” o blastocistos de día 5 ó 6 completamente formados con ZP algo engrosada, MCI clara, compacta o alargada, trofotodermo cohesivo aún no expandido en su totalidad y con menor cantidad de células, pero

sin alteraciones morfológicas visibles pudiendo presentar una vacuola pequeña. Los blastocistos que en día 6 de cultivo se muestran cavitados, con ZP gruesa con evidencia de los dos tipos celulares (MCI y trofotodermo), se clasificaron como categoría "C". Finalmente, los blastocistos calidad "D" presentaron una MCI degenerada o ausente, trofotodermo irregular con muy pocas células o degeneradas y/o vacuolas.



**Figura II.4. Blastocistos humanos a los 5-6 de cultivo.** Imágenes bajo microscopio invertido a 20X, con iluminación Hoffman, de blastocistos, categorizados con calidad A, B, C y D.

### II.3.6. Transferencia embrionaria

La transferencia embrionaria se realizó mediante guía ecosonográfica con un catéter de transferencia (Referencia CE123, Wallace), donde se cargaron uno o dos blastocistos de día 5 con calidad A o B, en un volumen final de 30-50 µl de medio cultivo Global Total, equilibrado durante 3 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. En caso de no disponer de blastocistos de dicha calidad en el día 5 de cultivo y/o no contar con una receptividad adecuada del endometrio, se procede a diferir la transferencia y los blastocistos son vitrificados. Los criterios clínicos de receptividad endometrial incluyen el engrosamiento adecuado del mismo y con visualización ecográfica trilaminar, de acuerdo con el día del ciclo.

Pasados 13 días de la transferencia embrionaria, las mujeres se sometieron a un examen cuantitativo de la hormona hCG-beta en sangre y a las que presentaron valores superiores a 25 UI/ml se les realizó una ecografía transvaginal 15 días después, considerándose mujeres con embarazo clínico aquellas en las que se logra observar saco gestacional con latido cardíaco en el útero. La tasa de embarazo clínico (%) se determinó en base al número de mujeres con embarazo clínico sobre el total de pacientes a las que se realizó transferencia embrionaria. Se registró la tasa de pérdida gestacional en base al número de mujeres a las cuales se les detiene el embarazo entre las 6 a 21 semanas de gestación sobre el total de mujeres con embarazo clínico. La tasa de bebés nacidos vivos se determinó en base al número total de niños nacidos vivos sobre el de mujeres con embarazos clínicos.

### **II.3.7. Determinación de proteínas totales (PT), albúmina y globulinas en fluido folicular**

Brevemente, la concentración de proteínas totales (PT), albúmina y globulinas, se determinó mediante la plataforma analítica COBAS c501 (Laboratorios Roche) utilizando el método de fotometría automatizada - test colorimétrico. Se realizaron curvas de calibración con intervalo a dos puntos, mediante reactivos C.F.A.S. (Calibrador para sistemas automatizados, Cobas). En el caso de proteínas totales, el reactivo utilizado fue TP2 (Total Protein Gen.2, Cobas) a concentración de 4.94 g/dl y con intervalo de medición de 0.2-12 g/dl. Para la albúmina se usó el reactivo ALB2 (Albumin Gen.2, Cobas) a concentración de 3.56 g/dl y con intervalo de medición de 0.2-6.0 g/dl. Estos análisis fueron realizados por la empresa LABAQ – Laboratorios Baquerizo S.A. (Guayaquil, Ecuador). Una vez obtenidos los niveles de PT y albúmina, la concentración de globulinas se calculó por diferencia de PT y albúmina. Igualmente, se calculó el ratio albúmina/globulinas y todos los resultados fueron reportados en g/dl.

### **II.3.8. Determinación de los niveles de 3-nitrotirosina (3-NT) en fluido folicular**

Para evaluar el grado de estrés oxidativo del FFH se analizó el nivel de proteínas modificadas con nitrotirosina mediante la prueba ELISA 3-nitrotirosina (3-NT) (Nitrotyrosine ELISA Kit, Abcam referencia ab113848). Se utilizaron microplacas recubiertas con antígeno nitrotirosina donde se agregaron 50 µl de la muestra del FFH mezclada con el anticuerpo detector anti 3-NT conjugado con HRP (peroxidasa de rábano). Se registró el cambio de color dependiente a 600 nm, utilizando el lector de microplacas BioTek Synergy HTX, y se generó una curva estándar para cada ensayo que permitió cuantificar el contenido de 3-NT en las muestras. Los valores con concentraciones

≤ 15.63 ng/ml se consideraron fuera del rango de lectura. Los niveles de 3-NT se expresaron tanto en ng/ml como nM con el fin de facilitar la comparación de resultados con estudios previos.

### **II.3.9. Análisis estadístico**

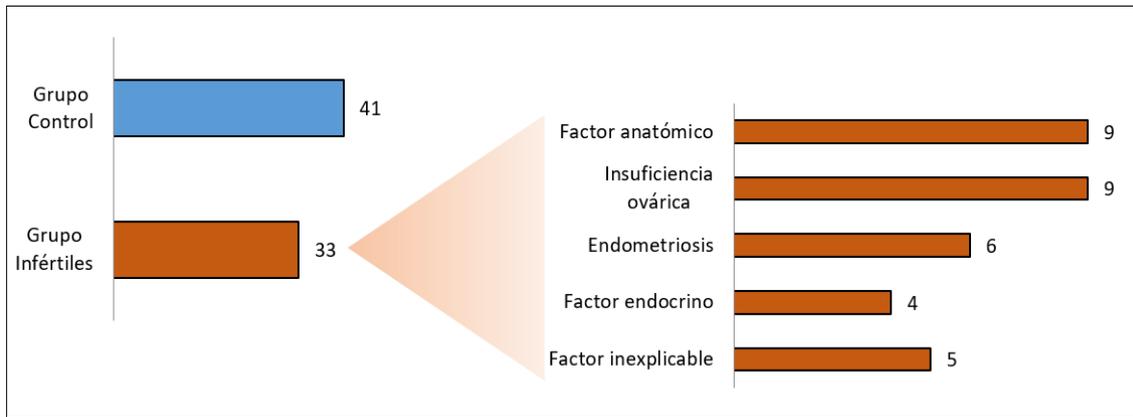
Se realizó análisis descriptivo de las distintas variables, donde los resultados se expresaron con el valor de la media ± error típico (SEM). La prueba T de Student se utilizó para comparar el grupo control *versus* grupo infértil, grupo control *versus* grupo infértil por diagnóstico de infertilidad y para comparar los diferentes diagnósticos del grupo infértil. Se estableció un valor de  $P \leq 0.05$  para considerar significancia estadística. Se efectuó análisis de correlación de Pearson entre las diferentes variables, estableciendo el nivel de significancia óptimo de 0.05 y utilizando la interpretación descrita por Mukaka (Mukaka, 2012).

Las variables analizadas fueron edad (años), IMC (kg/m<sup>2</sup>), folículos puncionados (n), volumen FF/folículo puncionado (ml), COCs recuperados (n), tasa de COCs recuperados (%), ovocitos MII (n), tasa ovocitos MII (%), total casos ICSI (n), ovocitos inyectados (n), cigotos (%), blastocistos (%), blastocistos categoría A, B, C y D (%), casos con blastocistos y transferencias realizadas (n), casos con blastocistos y transferencias realizadas (%), tasa de embarazo clínico, tasa de nacido vivo, tasa de pérdida (semanas 6 a 21 de gestación). Dentro del FF se analizó proteínas totales (PT) (g/dl), albúmina (g/dl), globulinas (g/dl), ratio albúmina/globulinas (g/dl) y proteínas modificadas con nitrotirosina (3-NT) (ng/ml)

## **II.4. Resultados**

### **II.4.1. Edad, IMC, folículos aspirados y calidad ovocitaria**

Se incluyeron 77 mujeres en el estudio, entre el grupo control e infértiles; observándose que, al segmentar el grupo de mujeres infértiles por diagnóstico, el mayor número de individuos se encuentra en los grupos con factor anatómico (n=9) e insuficiencia ovárica (n=9) (**Figura II.5**).



**Figura II.5. Grupos experimentales.** Número de mujeres incluidas en los grupos experimentales Control e Infértiles, y distribución de la casuística en el grupo de mujeres infértiles.

Respecto al conjunto de variables estudiadas en ambos grupos (**Tabla II.1**), se encontraron diferencias significativas en la edad (menor en el grupo control que infértiles), el número de folículos puncionados (mayor en el grupo control) y el porcentaje de ovocitos maduros en MII, que fue mayor en las mujeres infértiles. No se observaron diferencias en el IMC (en torno a 25 kg/m<sup>2</sup> para ambos grupos), el volumen de fluido folicular aspirado por folículo ovárico (en torno a 1.9ml), ni en el número de ovocitos recogidos en MII (aproximadamente 8). Se observó una tendencia a una mayor tasa de recogida de COCs maduros en las mujeres infértiles (58.73% vs. 50.23% respectivamente). Dentro del grupo control, no se observó diferencia en estas variables entre las donantes de ovocitos y las mujeres con diagnóstico de infertilidad masculino.

**Tabla II.1. Variables estudiadas en el grupo de mujeres control y grupo de pacientes infértiles.**

Datos expresados como media ± SEM.

	Control	Infértiles	Valor P
<b>Mujeres (n)</b>	41	33	-
<b>Edad (años)</b>	28.02±1.02	33.76±0.83	<b>&lt;0.001*</b>
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	25.04±0.67	24.53±0.61	0.58
<b>Folículos puncionados (n)</b>	22.27±1.43	14.91±1.67	<b>&lt;0.001*</b>
<b>Volumen FF/folículo puncionado (ml)</b>	1.63±0.13	1.93±0.13	0.11
<b>COCs recuperados (n)</b>	11.46±1.10	8.70±1.05	0.07
<b>Tasa de COCs recuperados (%)</b>	50.23±2.81	58.73±3.53	0.06
<b>Ovocitos MII (n)</b>	8.66±1.06	7.09±0.94	0.27
<b>Tasa ovocitos MII (%)</b>	70.21±3.87	81.42±3.03	<b>0.03*</b>

Para profundizar en las posibles diferencias entre las mujeres infértiles, se analizaron los datos de acuerdo con la causa de su infertilidad (**Tabla II.2**). Así pues, al comparar las distintas variables entre el grupo control y las pacientes infértiles por su diagnóstico se observó que las mujeres con endometriosis e insuficiencia ovárica son las que presentan un mayor número de diferencias con el grupo control que se pueden resumir de manera general en una mayor edad, menor número de folículos ováricos puncionados, menor número de COCs recuperados y menor número de ovocitos maduros en MII. Tanto el grupo de mujeres con diagnóstico de infertilidad por endometriosis como aquellas de origen inexplicable presentaron IMC menores al grupo control. Por su parte, las mujeres con diagnóstico por factor anatómico e insuficiencia ovárica alcanzaron mayores tasas de ovocitos maduros en MII que el control.

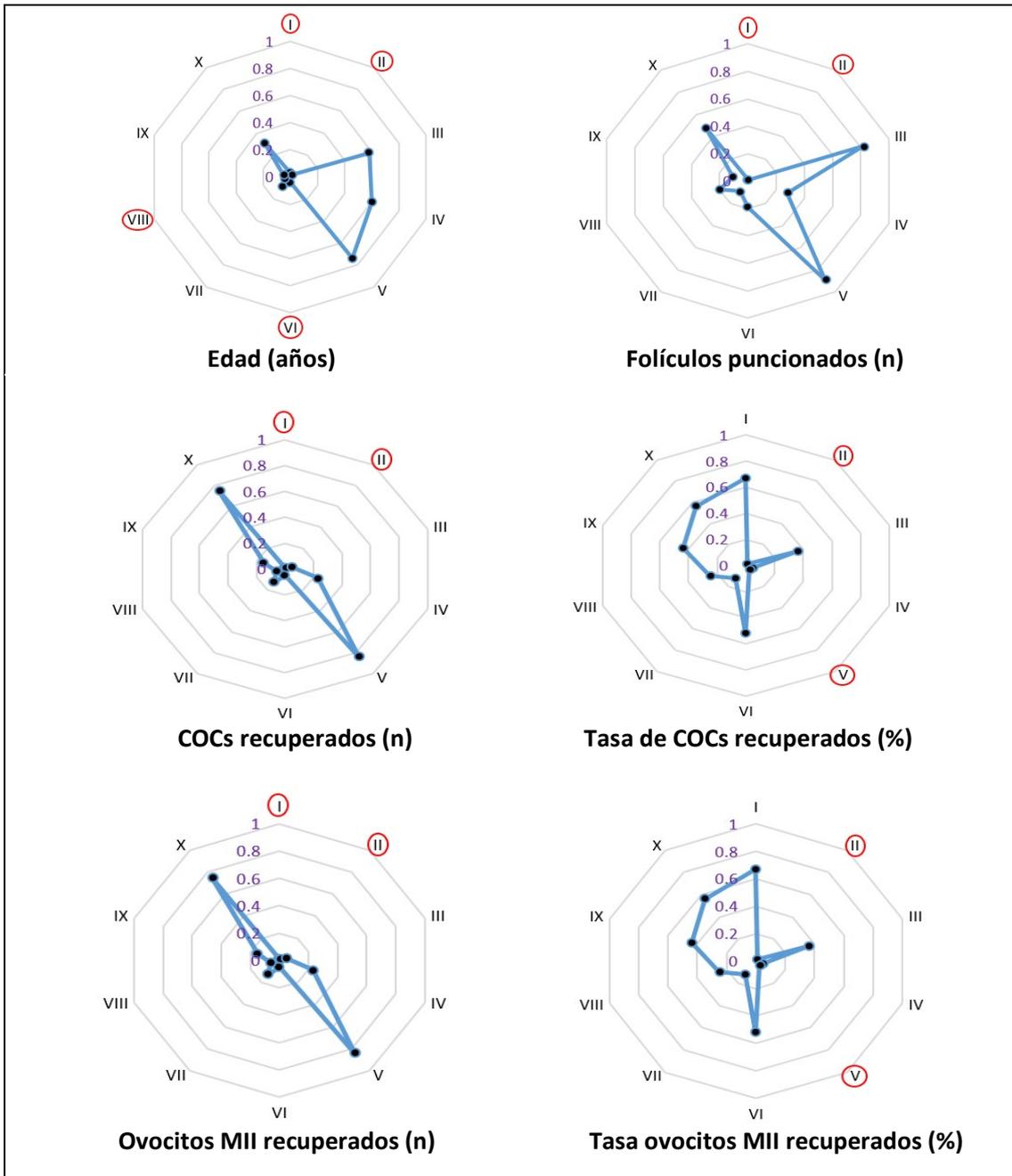
Además, se realizó un análisis tipo t de Student para enfrenar los grupos de mujeres infértiles entre ellos y comparar el impacto que tienen uno sobre otro en cada una de las variables estudiadas (**Figura II.6**). Los resultados se muestran a modo de diagramas radiales donde los puntos que se incluyen más cercanos al centro de la diana (zona cero) denotan diferencia entre ambos diagnósticos de infertilidad sobre la variable estudiada, encontrándose que el factor anatómico junto con la insuficiencia ovárica presentaron mayor diferencia con el resto de los diagnósticos de infertilidad, en las variables de edad, folículos puncionados, número y tasa de COCs recuperados, y número y tasa de ovocitos MII recuperados. Estos resultados indican que estas variables se verían afectadas cuando la causa de la infertilidad es la insuficiencia ovárica, al compararlos con el factor anatómico.

Tabla II.2. Variables estudiadas en el grupo de mujeres infértiles de acuerdo con su diagnóstico específico de infertilidad. Datos expresados como media  $\pm$  SEM.

	Infértiles por diagnóstico					
	Control	Factor anatómico	Insuficiencia ovárica	Endometriosis	Endocrino	Inexplicable
Mujeres (n)	41	9	9	6	4	5
Edad (años)	28.02 $\pm$ 1.02	31.33 $\pm$ 1.78	<b>36.44<math>\pm</math>1.28*</b>	<b>37.00<math>\pm</math>1.03*</b>	29.75 $\pm$ 2.10	<b>32.60<math>\pm</math>1.54*</b>
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	25.04 $\pm$ 0.67	24.87 $\pm$ 1.10	25.54 $\pm$ 1.62	<b>23.16<math>\pm</math>0.57*</b>	26.15 $\pm$ 1.85	<b>22.48<math>\pm</math>0.81*</b>
Folículos puncionados (n)	22.27 $\pm$ 1.43	20.89 $\pm$ 2.68	<b>8.67<math>\pm</math>1.31*</b>	<b>9.00<math>\pm</math>1.95*</b>	23.00 $\pm$ 8.34	16.00 $\pm$ 3.30
Volumen FF/folículo puncionado (ml)	1.63 $\pm$ 0.13	1.76 $\pm$ 0.24	2.00 $\pm$ 0.31	2.00 $\pm$ 0.23	2.29 $\pm$ 0.32	1.71 $\pm$ 0.27
COCs recuperados (n)	11.46 $\pm$ 1.10	13.89 $\pm$ 2.35	<b>4.11<math>\pm</math>0.89*</b>	<b>5.67<math>\pm</math>1.20*</b>	9.75 $\pm$ 2.32	10.40 $\pm$ 2.18
Tasa de COCs recuperados (%)	50.23 $\pm$ 2.81	<b>65.76<math>\pm</math>6.47**</b>	45.22 $\pm$ 6.68	66.10 $\pm$ 8.17	51.87 $\pm$ 8.82	67.03 $\pm$ 7.26
Ovocitos MII (n)	8.66 $\pm$ 1.06	12.33 $\pm$ 1.97	<b>3.44<math>\pm</math>0.77*</b>	<b>3.67<math>\pm</math>0.76*</b>	7.25 $\pm$ 1.25	8.20 $\pm$ 2.52
Tasa ovocitos MII (%)	70.21 $\pm$ 3.87	<b>90.59<math>\pm</math>3.63*</b>	<b>87.72<math>\pm</math>5.52*</b>	65.44 $\pm$ 7.80	80.39 $\pm$ 9.07	73.59 $\pm$ 6.31

\* P<0.05 entre grupo control e infértil.

\*\* P=0.05 entre grupo control e infértil.



**Figura II.6. Diagramas radiales de relación entre diferentes variables y las distintas combinaciones de diagnóstico de infertilidad.** Con números arábigos se indican los valores de P (desde 0 a 1); mientras que, con números romanos se identifican a la combinación de los factores de infertilidad. Las combinaciones incluidas en la circunferencia del 0 denotan significancia. Los códigos de las combinaciones corresponden a: I. Factor anatómico/Insuficiencia ovárica; II. Factor anatómico/Endometriosis; III. Factor anatómico/Factor endocrino; IV. Factor anatómico/Factor inexplicable; V. Insuficiencia ovárica/Endometriosis; VI. Insuficiencia ovárica/Factor endocrino; VII. Insuficiencia ovárica/Factor inexplicable; VIII. Endometriosis/Factor endocrino; IX. Endometriosis/Factor inexplicable; X. Factor endocrino/Factor inexplicable.

#### II.4.2. Resultados de ICSI, desarrollo y transferencia embrionaria

De las mujeres sometidas a estimulación ovárica y aspiración folicular para recuperación de ovocitos, el 92.69% se sometieron a una fecundación *in vitro* por medio de ICSI (**Tabla II.3**). Estadísticamente no se observó diferencia entre las tasas de fecundación y blastocistos obtenidos. Sin embargo, se observó una tendencia en los ovocitos de mujeres infértiles a alcanzar menores tasas de blastocistos de calidad A ( $19.36 \pm 6.24\%$  vs.  $34.17 \pm 5.35\%$ ;  $P=0.06$ ) y una mayor tasa de blastocistos de calidad D ( $35.38 \pm 7.14\%$  vs.  $19.01 \pm 3.56\%$ ;  $P=0.05$ ) que el grupo control.

Respecto a la transferencia embrionaria, un mayor número de mujeres del grupo control desarrollaron blastocistos de óptima calidad (grado A o B) para realizar transferencia en fresco o diferida. Si bien no hubo diferencia entre la tasa de embarazo clínico entre ambos grupos, sí se observó una tendencia a mejor tasa de nacidos vivos con menor tasa de pérdida gestacional en el grupo control (Tabla II.3).

Al analizar por el diagnóstico de infertilidad el ICSI y su desarrollo (**Tabla II.4**), sólo se encontró menor número de ovocitos inyectados en el caso de mujeres con insuficiencia ovárica y endometriosis. En lo que respecta a la tasa de nacidos vivos, en mujeres con factor anatómico e insuficiencia ovárica solo se presentó un embarazo con pérdida gestacional, por lo que no fue posible evaluarlo.

**Tabla II.3. Tasas de fecundación (cigotos) y desarrollo embrionario de los ovocitos obtenidos de mujeres control e infértiles tras la ICSI y posterior cultivo embrionario hasta estadio de blastocisto. Datos expresados como media  $\pm$  SEM.**

	<b>Control</b>	<b>Infértiles</b>	<b>Valor P</b>
<b>Mujeres (n)</b>	41	33	-
<b>Total casos ICSI (n)</b>	37	32	-
<b>Ovocitos inyectados (n)</b>	9.16 $\pm$ 1.20	7.09 $\pm$ 0.97	0.18
<b>Cigotos (%)</b>	80.92 $\pm$ 2.49	76.10 $\pm$ 4.57	0.36
<b>Blastocistos (%)</b>	59.97 $\pm$ 4.76	57.10 $\pm$ 6.38	0.72
<b>Blastocistos categoría A (%)</b>	34.17 $\pm$ 5.35	19.36 $\pm$ 6.24	0.06
<b>Blastocistos categoría B (%)</b>	36.90 $\pm$ 5.57	25.71 $\pm$ 6.47	0.20
<b>Blastocistos categoría C (%)</b>	8.92 $\pm$ 5.57	19.55 $\pm$ 6.78	0.18
<b>Blastocistos categoría D (%)</b>	19.01 $\pm$ 3.56	35.38 $\pm$ 7.14	<b>0.05*</b>
<b>Casos con blastocistos y transferencias realizadas (n)</b>	35	22	-
<b>Casos con blastocistos y transferencias realizadas (%)</b>	85.37 $\pm$ 5.59	66.67 $\pm$ 8.33	0.07
<b>Tasa de embarazo clínico</b>	43.90 $\pm$ 7.85	33.33 $\pm$ 8.33	0.18
<b>Tasa de nacido vivo</b>	77.78 $\pm$ 10.08	45.45 $\pm$ 15.75	<b>0.05*</b>
<b>Tasa de pérdida (semanas 6 a 21 de gestación)</b>	22.22 $\pm$ 10.08	54.55 $\pm$ 15.75	<b>0.05*</b>

Tabla II.4. Tasas de fecundación (porcentaje de cigotos) y desarrollo embrionario de los ovocitos obtenidos de mujeres control y los diferentes grupos diagnósticos de infertilidad, tras la ICSI y posterior cultivo embrionario hasta estadio de blastocisto. Datos expresados como media  $\pm$  SEM.

	Control	Infértiles por diagnóstico				
		Factor anatómico	Insuficiencia ovárica	Endometriosis	Endocrino	Inexplicable
Mujeres (n)	41	9	9	6	4	5
Total casos ICSI (n)	37	9	8	6	3	5
Ovocitos inyectados (n)	9.16 $\pm$ 1.20	8.89 $\pm$ 1.47	<b>3.13<math>\pm</math>0.79*</b>	<b>3.17<math>\pm</math>0.60*</b>	4.67 $\pm$ 0.88	7.40 $\pm$ 2.44
Cigotos (%)	80.92 $\pm$ 2.49	72.42 $\pm$ 5.39	66.00 $\pm$ 13.54	90.56 $\pm$ 6.69	66.67 $\pm$ 8.33	89.17 $\pm$ 3.56
Blastocistos (%)	59.97 $\pm$ 4.76	59.59 $\pm$ 11.53	47.38 $\pm$ 14.42	56.67 $\pm$ 13.82	83.33 $\pm$ 16.67	50.98 $\pm$ 18.73
Blastocistos categoría A (%)	34.17 $\pm$ 5.35	13.54 $\pm$ 6.00*	16.67 $\pm$ 16.67	33.33 $\pm$ 21.08	11.11 $\pm$ 11.11	23.75 $\pm$ 17.72
Blastocistos categoría B (%)	36.90 $\pm$ 5.57	41.88 $\pm$ 13.97	16.67 $\pm$ 16.67	23.33 $\pm$ 10.00	11.11 $\pm$ 11.11	20.83 $\pm$ 12.50
Blastocistos categoría C (%)	8.92 $\pm$ 5.57	6.26 $\pm$ 6.25	16.67 $\pm$ 16.67	6.67 $\pm$ 6.67	66.67 $\pm$ 19.25	31.25 $\pm$ 23.66
Blastocistos categoría D (%)	19.01 $\pm$ 3.56	38.33 $\pm$ 9.04	50.00 $\pm$ 22.36	36.67 $\pm$ 18.56	11.11 $\pm$ 11.11	24.17 $\pm$ 13.97
Casos con transferencias (n)	35	8	3	4	3	4
Casos con transferencias (%)	91.89 $\pm$ 4.55	88.89 $\pm$ 11.11	37.50 $\pm$ 18.29	66.67 $\pm$ 21.08	100.00	80.00 $\pm$ 20.00
Tasa de embarazo clínico (%)	48.65 $\pm$ 8.33	<b>12.50<math>\pm</math>12.50*</b>	33.33 $\pm$ 33.33	75.00 $\pm$ 25.00	<b>100.00*</b>	75.00 $\pm$ 25.00
Tasa de pérdida (%)	22.22 $\pm$ 10.08	100.00	100.00	67.67 $\pm$ 33.33	33.33 $\pm$ 33.33	33.33 $\pm$ 33.33
Tasa de nacido vivo (%)	77.78 $\pm$ 10.08	0	0	33.33 $\pm$ 33.33	66.7 $\pm$ 33.33	66.7 $\pm$ 33.33

\*P<0.05 entre grupo control e infértil.

### II.4.3. Concentración de proteínas totales (PT), albúmina y globulinas en fluido folicular

Las concentraciones mínimas y máximas de proteínas en el FF de las mujeres estudiadas (control e infértiles) osciló entre 2.56-6.15 g/dl de PT, 1.11-3.68 g/dl de albúmina, 1.10-2.72 g/dl de globulinas y 0.63-2.43 para la ratio albúmina/globulinas. La distribución de estas concentraciones se mostró constante en el grupo control, ya fueran mujeres donantes de ovocitos o factor masculino; mientras que en el grupo infértil se observó una gran variabilidad en la distribución entre los diferentes diagnósticos de las pacientes (**Figura II.7**). Estos resultados indican una gran variabilidad individual en la concentración de PT, albúmina y globulinas en las mujeres infértiles con especial relevancia en aquellas con factor anatómico e insuficiencia ovárica como causa de infertilidad.

Las concentraciones de PT, albúmina y globulinas fueron mayores en el grupo control que en el grupo infértil (**Tabla II.5**), sin hallarse diferencias dentro del grupo control entre las donantes de ovocitos y las mujeres con factor masculino.

**Tabla II.5. Concentración de proteínas totales, albúmina y globulinas del fluido folicular humano en mujeres control e infértiles.** Datos expresados como media  $\pm$  SEM.

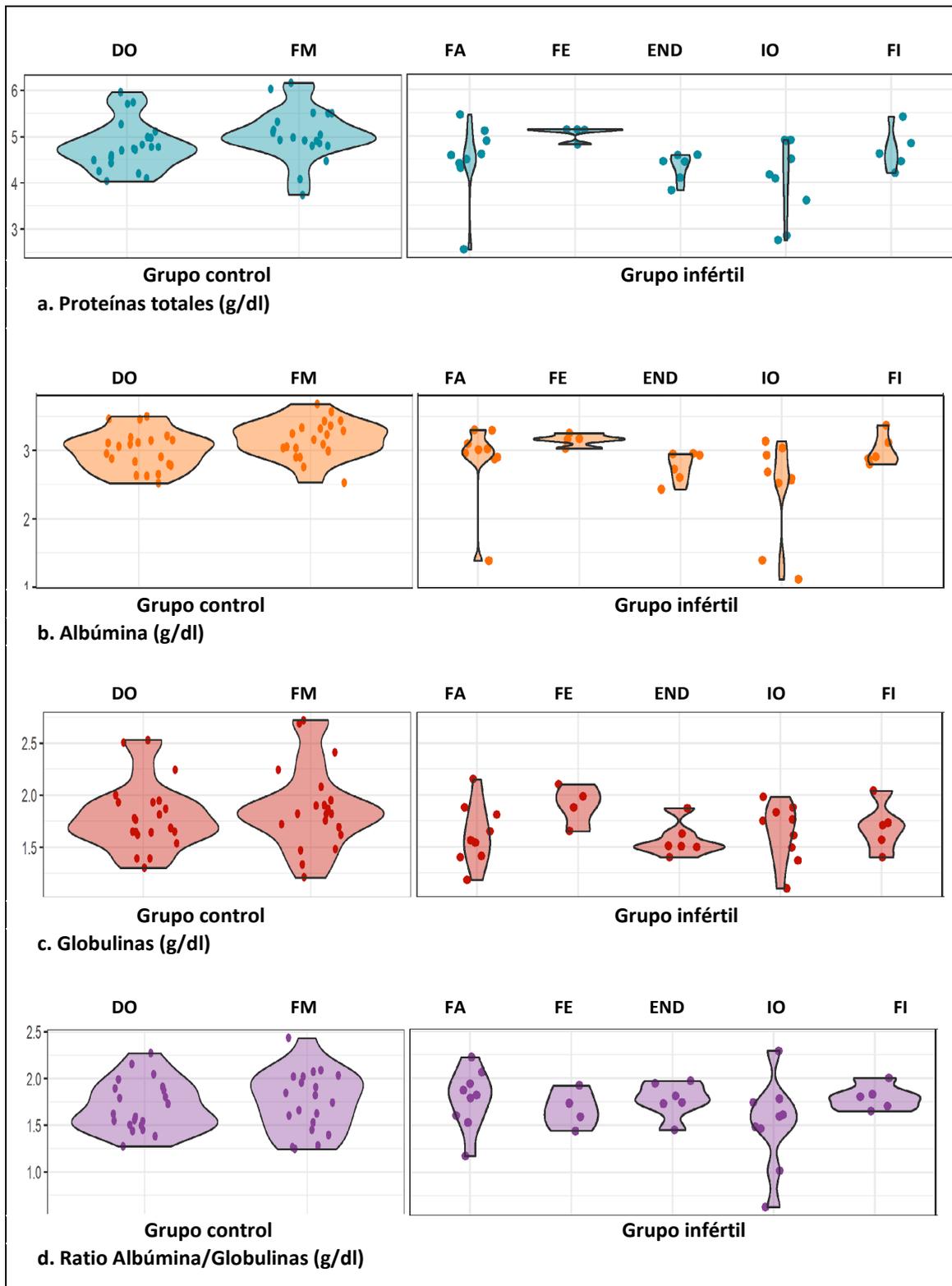
	Control	Infértiles	Valor P
<b>Proteínas totales (PT) (g/dl)</b>	4.92 $\pm$ 0.09	4.45 $\pm$ 0.12	<b>&lt;0.01*</b>
<b>Albúmina (g/dl)</b>	1.84 $\pm$ 0.06	1.66 $\pm$ 0.04	<b>&lt;0.01*</b>
<b>Globulinas (g/dl)</b>	3.08 $\pm$ 0.05	2.79 $\pm$ 0.09	<b>&lt;0.01*</b>
<b>Ratio albúmina/globulinas (g/dl)</b>	1.73 $\pm$ 0.05	1.69 $\pm$ 0.06	0.66

Al comparar el contenido proteico del fluido folicular en mujeres con diferente tipo de infertilidad, encontramos que aquellas con endometriosis e insuficiencia ovárica presentan menor concentración de PT y albúmina que las mujeres control. Además, en el fluido de las mujeres con endometriosis la concentración de globulinas también fue menor al control (**Tabla II.6**).

**Tabla II.6. Concentración de proteínas totales (PT), albúmina y globulinas en el fluido folicular de mujeres infértiles de acuerdo con su diagnóstico específico de infertilidad. Datos expresados como media  $\pm$  SEM.**

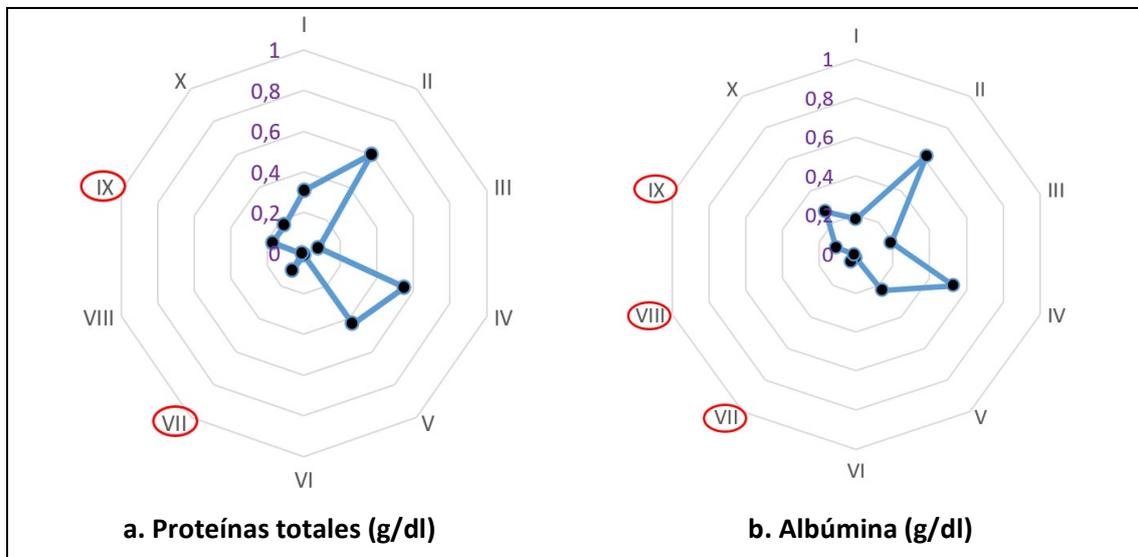
	Infértiles por diagnóstico					
	Control	Factor anatómico	Insuficiencia ovárica	Endometriosis	Endocrino	Inexplicable
<b>Mujeres (n)</b>	41	9	9	6	4	5
<b>PT (g/dl)</b>	4.92 $\pm$ 0.09	4.49 $\pm$ 0.27	<b>4.08<math>\pm</math>0.28*</b>	<b>4.33<math>\pm</math>0.12*</b>	5.06 $\pm$ 0.08	4.70 $\pm$ 0.21
<b>Albúmina (g/dl)</b>	3.08 $\pm$ 0.05	2.87 $\pm$ 0.19	<b>2.44<math>\pm</math>0.24*</b>	<b>2.76<math>\pm</math>0.09*</b>	3.15 $\pm$ 0.05	3.01 $\pm$ 0.10
<b>Globulinas (g/dl)</b>	1.84 $\pm$ 0.06	1.62 $\pm$ 0.10	1.64 $\pm$ 0.09	<b>1.57<math>\pm</math>0.07*</b>	1.90 $\pm$ 0.10	1.69 $\pm$ 0.11
<b>Ratio albúmina/globulinas</b>	1.73 $\pm$ 0.05	1.78 $\pm$ 0.10	1.51 $\pm$ 0.16	1.77 $\pm$ 0.08	1.67 $\pm$ 0.10	1.80 $\pm$ 0.06

\*P<0.05 entre grupo control e infértil.



**Figura II.7. Plots de distribución de las concentraciones de proteínas en el fluido folicular obtenido de mujeres control e infértiles.** Proteínas totales (a), albúmina (b), globulinas (c) y ratio albúmina/globulinas (d). DO (Donantes de ovocitos); FM (Factor masculino); FA. (Factor anatómica); FE (Factor endocrino). END. (Endometriosis); IO (Insuficiencia ovárica); FI (factor inexplicable).

Al relacionar los diferentes grupos de mujeres infértiles entre sí en un análisis de tipo t de Student, se encontró que las concentraciones de PT y albúmina del FF fueron menores en mujeres con insuficiencia ovárica frente a mujeres con factor endocrino y con endometriosis (en **Figura II.8**, representados con VII y IX, respectivamente). Los resultados se muestran a modo de diagramas radiales donde los puntos que se incluyen más cercanos al centro de la diana (en la zona cero) denotan diferencia entre ambos diagnósticos de infertilidad sobre la variable. Las concentraciones de albúmina también fueron menores en las mujeres con insuficiencia ovárica al enfrentarlas con las de factor inexplicable; sin embargo, no mostraron diferencia en las concentraciones de PT (en **Figura II.8**, representados con VII). Este análisis revela que dentro de las mujeres infértiles evaluadas, las que presentan factor endocrino presentan mayores concentraciones de PT y albúmina y las mujeres con insuficiencia ovárica y endometriosis presentan las menores concentraciones.



**Figura II.8. Diagramas radiales de relación entre las variables concentración de proteínas totales (g/dl) y concentración de albúmina (g/dl) con las distintas combinaciones de diagnóstico de infertilidad.** Con números arábigos se indican los valores de  $P$  (desde 0 a 1); mientras que con números romanos se identifican a la combinación de los factores de infertilidad. Las combinaciones incluidas en la circunferencia del 0 denotan significancia. Los códigos de las combinaciones corresponden a: I. Factor anatómico/Insuficiencia ovárica; II. Factor anatómico/Endometriosis; III. Factor anatómico/Factor endocrino; IV. Factor anatómico/Factor inexplicable; V. Insuficiencia ovárica/ Endometriosis; VI. Insuficiencia ovárica/Factor endocrino; VII. Insuficiencia ovárica/Factor inexplicable; VIII. Endometriosis/Factor endocrino; IX. Endometriosis/Factor inexplicable; X. Factor endocrino/Factor inexplicable.

Al realizar un análisis de correlación del contenido proteico del fluido folicular con las variables de edad, IMC, número de folículos puncionados, ovocitos recuperados (N y %) y ovocitos metafase II recuperados (N y %) recuperados, blastocistos desarrollados (N y %), tasa de embarazo clínico, nacidos vivos y pérdida gestacional, tanto en el grupo control como en el grupo de pacientes infértiles, no se encontró relación con ninguna variable.

Al evaluar la relación de las variables antes mencionadas en el grupo de mujeres infértiles por diagnóstico, se encontró correlación negativa moderada entre el IMC con proteínas totales, albúmina y ratio albúmina/globulinas del fluido folicular en pacientes con insuficiencia ovárica (Figura II.9).

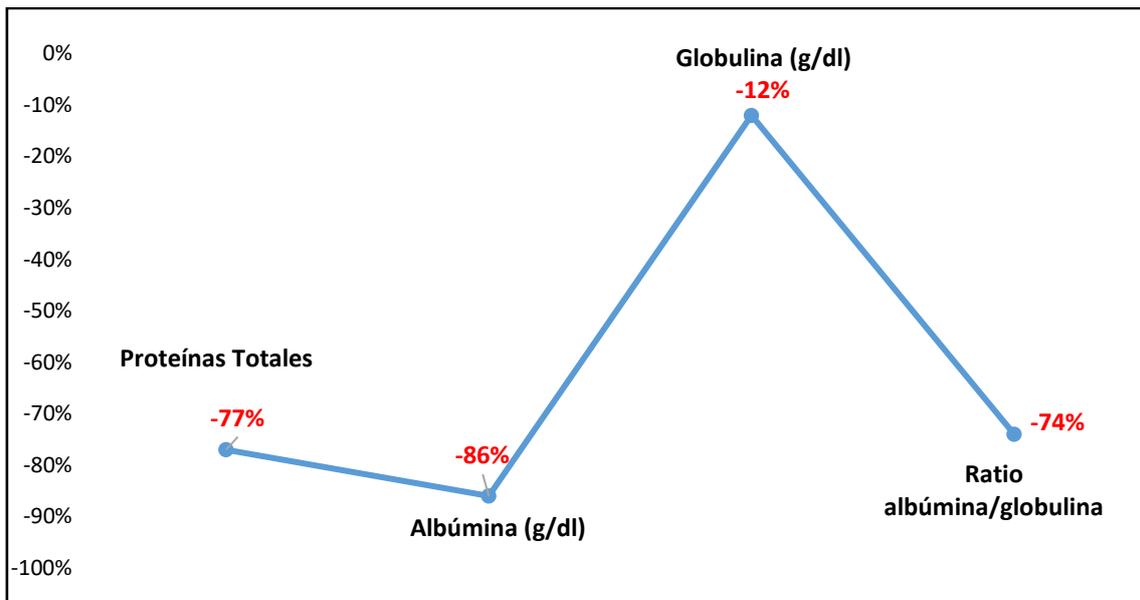


Figura II.9. Correlación (%) entre proteínas del fluido folicular y el IMC en mujeres con insuficiencia ovárica.

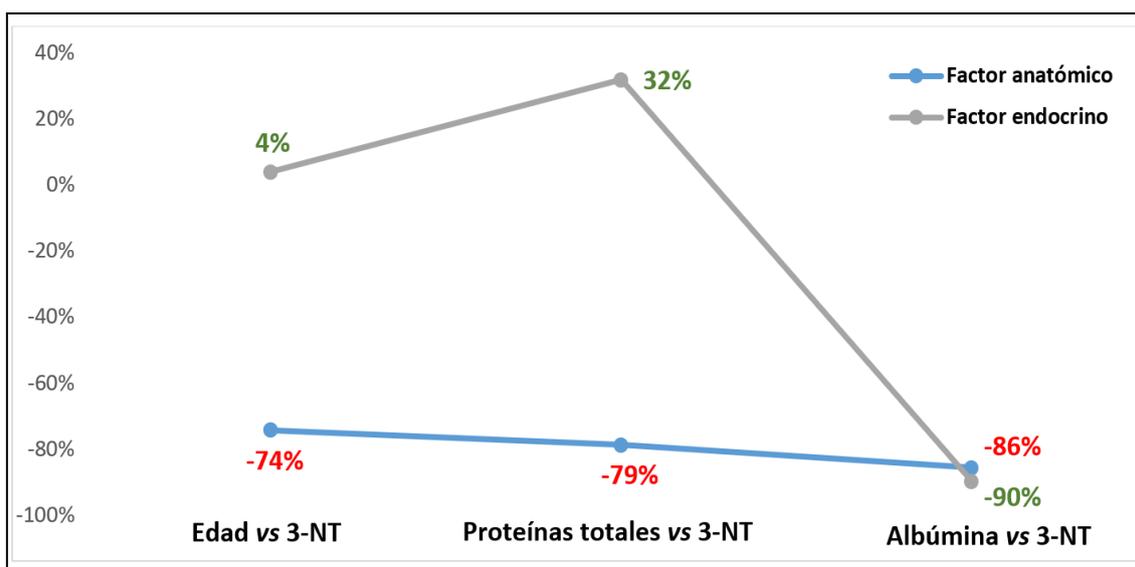
#### II.4.4. Concentración de 3-NT en fluido folicular

La concentración de 3-NT en el FF de mujeres del grupo control ( $28.40 \pm 1.79$  ng/ml) y el grupo de pacientes infértiles ( $26.83 \pm 2.20$  ng/ml) fue similar ( $P=0.58$ ). Al comparar las concentraciones de 3-NT del grupo control con los diferentes tipos de infertilidad, no se encontraron diferencias, tampoco se encontraron diferencias entre los diferentes grupos de mujeres infértiles al compararlos entre sí (Tabla II.7).

**Tabla II.7. Valores de nitrotirosina (3-NT) en fluido folicular de mujeres infértiles de acuerdo con su diagnóstico específico de infertilidad. Se muestran los resultados expresados en distintas unidades (ng/ml y nM). Datos expresados como media  $\pm$  SEM.**

Diagnóstico	Mujeres (n)	3-NT (ng/ml)	3-NT (nM)
Control	41	28.40 $\pm$ 1.79	125.62 $\pm$ 7.94
<b>Infértiles por diagnóstico</b>			
Factor anatómico	9	29.21 $\pm$ 4.48	129.21 $\pm$ 19.84
Insuficiencia ovárica	9	31.71 $\pm$ 5.10	140.18 $\pm$ 22.55
Endometriosis	6	21.02 $\pm$ 3.39	92.98 $\pm$ 15.01
Endocrino	4	25.98 $\pm$ 6.25	114.93 $\pm$ 27.67
Inexplicable	5	21.39 $\pm$ 4.74	94.62 $\pm$ 21.00

Si bien, no se pudo ajustar un modelo de regresión lineal a las variables de interés con las concentraciones de 3-NT, sí se pudieron identificar correlaciones negativas entre los niveles de nitrotirosina con la edad, proteínas totales y albúmina del fluido folicular en las mujeres con infertilidad por factor anatómico y endocrino (**Figura II.10**). Estos resultados indican que, en mujeres infértiles por factor anatómico y endocrino, a mayor estrés oxidativo en el fluido folicular, se presentan menores concentraciones de albúmina en el FF. Adicionalmente, en pacientes con factor anatómico, también se ven disminuidas las concentraciones de PT del FF a mayor estrés oxidativo. Por otra parte, en el factor anatómico, el stress oxidativo del FF sería mayor en pacientes más jóvenes. Estos hallazgos podrían tenerse en cuenta como biomarcadores predictivos en la práctica rutinaria de la clínica.



**Figura II.10. Correlación (%) de 3-NT en el grupo de mujeres infértiles por factor anatómico y endocrino.**

## **II.5. Discusión**

Dentro de la infertilidad femenina, los desórdenes ovulatorios seguidos de la endometriosis han sido reportadas como algunas de las principales causas de infertilidad (Walker & Tobler, 2022). Sin embargo, en este estudio, el factor anatómico y la insuficiencia ovárica fueron las causas más recurrentes de infertilidad.

Muchas pacientes con diagnóstico de infertilidad deben recurrir a tratamientos de reproducción asistida de alta complejidad para lograr un embarazo; sin embargo, el éxito de estos tratamientos se ve afectado por varios factores que influyen sobre el número de folículos ováricos puncionados, COCs recuperados, ovocitos en estadio MII y calidad de estos, así como el desarrollo de los blastocistos y su calidad. Entre los principales factores se encuentran la edad de la mujer y la etiología del diagnóstico de infertilidad. En el presente estudio, si bien, el grupo de pacientes infértiles estudiado presentó mayor edad y menor número de folículos ováricos puncionados comparado con el grupo control, la tasa de ovocitos MII recuperados fue mayor. Aunque este resultado pueda parecer contradictorio, recientemente se ha comprobado que la tasa de COCs, el número y calidad de ovocitos MII y la tasa de embarazo disminuyen significativamente en donantes menores de 25 años y drásticamente en aquellas menores de 20

(Roca-Feliu et al., 2022). En nuestro estudio el grupo control incluye mayoritariamente donantes con edad inferior a los 24 años, si bien es cierto que en el análisis de datos no pudimos definir esta edad como punto de corte que influya en una menor tasa de ovocitos MII. Al considerar el diagnóstico de infertilidad, el haber recuperado un menor número de ovocitos en estadio MII en mujeres con endometriosis e insuficiencia ovárica está dentro de lo esperado. El bajo número de ovocitos en mujeres con endometriosis que se someten a tratamientos de reproducción asistida de alta complejidad está claramente reportado (González-Comadran et al., 2017; Robin et al., 2021). Por otra parte, la asociación de esta enfermedad con la calidad morfológica de los embriones obtenidos y la tasa de nacidos vivos aún no se ha dilucidado y los resultados son controvertidos (Dongye et al., 2021; González-Comadran et al., 2017). En nuestro estudio no se encontraron diferencias en todo el desarrollo del tratamiento, una vez inyectados los ovocitos MII obtenidos. Los resultados obtenidos en este trabajo en pacientes con insuficiencia ovárica (baja tasa de blastocistos con calidad adecuada y baja tasa de transferencia y ningún nacido vivo), corrobora lo ya reportado previamente en mujeres con este diagnóstico de infertilidad en las que se observa bajo número de ovocitos tras la estimulación ovárica, las tasas de embarazo y nacidos vivos prácticamente nulas (Chen et al., 2018), lo que confirma las recomendaciones de ovodonación o embriodonación como alternativa de tratamiento reproductivo para este tipo de pacientes (Mendoza et al., 2015).

Por otra parte, la infertilidad de la mujer afecta a varios componentes involucrados en el desarrollo reproductivo como lo es el fluido folicular. Este fluido contiene factores, como las proteínas, que juegan un papel crítico en el crecimiento y desarrollo de folículos y ovocitos, teniendo profundas implicaciones patogénicas y reproductivas (Emori & Drapkin, 2014; Lim et al., 2017). Las concentraciones de proteínas totales en el FFH descritas oscilan desde 4.87 g/dl a 7.28 g/dl (Gonzalès et al., 1992; Shalgi et al., 1973; Valckx et al., 2012; Velazquez et al., 1977) mientras que, en nuestro estudio, la concentración de PT en todo el conjunto de mujeres estudiadas (control e infértiles) fue de 4.71 g/dl. Desafortunadamente, los estudios publicados donde se reportan las concentraciones proteicas del fluido folicular no hacen una comparación entre pacientes infértiles y grupo control, lo que no permite disipar si la variabilidad de estas concentraciones se debe a un factor de infertilidad. El presente trabajo sí pudo comparar las concentraciones proteicas del FF entre grupo control e infértil, encontrando menores concentraciones en el grupo de pacientes infértiles (4.45 vs. 4.92 g/dl), pudiendo observar que la distribución de estas se mantenía constante en el grupo de mujeres control, ya fueran mujeres donantes de ovocitos o factor masculino.

Valckx et al. (2012) evaluaron el FF de mujeres infértiles con diferentes diagnósticos (Idiopático, POCs, endometriosis, inmunológico, tubo-peritoneal, tubárico), reportando mayores concentraciones de PT ( $5.60 \pm 0.50$  g/dl) y albúmina ( $4.00 \pm 0.30$  g/dl) que nuestro grupo de pacientes infértiles ( $4.45 \pm 0.12$  y  $1.66 \pm 0.04$  respectivamente). Estas diferencias podrían deberse a varios factores como el número alto de pacientes infértiles incluidas en el estudio de Valckx et al., comparado con el presente trabajo (106 vs 33). Por otro lado, el estudio de Valckx et al. no incluye mujeres con diagnóstico de insuficiencia ovárica y es, precisamente ese grupo de mujeres infértiles que sí están incluidas en el presente trabajo, las que presentaron menores concentraciones de PT y albúmina. Justamente, en este grupo de mujeres infértiles con diagnóstico de insuficiencia ovárica se encontró una correlación negativa moderada entre el IMC y las concentraciones de PT, albúmina, y ratio albúmina/globulina, aunque no se correlacionó con la madurez ovocitaria. Si bien se ha reportado que el IMC podría ocasionar cambios en el microambiente folicular como los niveles de los metabolitos de insulina y triglicéridos, se desconoce en qué medida estos cambios pueden afectar la calidad del ovocito (Valckx et al., 2012).

El FF de pacientes con endometriosis también arrojó bajas concentraciones de PT y albúmina. Si bien se ha comprobado que esta afectación puede perturbar la composición del FFH, influyendo negativamente en la competencia del ovocito (Da Broi et al., 2014), no pudimos correlacionar estas bajas concentraciones de PT y albúmina en el FF con el bajo número de ovocitos MII obtenidos y blastocistos desarrollados en estas pacientes. Por otra parte, un microambiente intrafolicular anormal y un desarrollo deficiente de ovocitos también se ha reportado en mujeres con trastorno metabólico del síndrome de ovario poliquístico (PCOS) clásico (Da Broi et al., 2018; Dumesic et al., 2015). Nuestro grupo de mujeres con diagnóstico de factor endocrino, el cual incluye a las mujeres diagnosticadas con PCOS, presentó las mayores concentraciones de PT y albúmina dentro del grupo de pacientes infértiles presentando una menor tasa de blastocistos calidad A y B, aunque no se observó una correlación entre contenido proteico y estas variables. Todos estos resultados sugieren que la baja calidad ovo-embionaria observada en las pacientes con endometriosis y PCOS no se debe directamente a una baja concentración proteica en el FF sino que existen otros factores coadyuvantes y causantes de esta baja calidad. Todos estos resultados ponen en evidencia la necesidad de diferenciar la etiología causante de la infertilidad para poder extraer conclusiones relevantes sobre qué parámetros se ven más afectados en las mujeres infértiles. Este punto se hace especialmente relevante a la hora de determinar e

identificar los mejores biomarcadores que puedan ayudar a predecir el éxito del tratamiento reproductivo.

Otro parámetro estudiado fue las concentraciones de 3-NT en el FFH para evaluar el estrés nitrosativo, encontrando que las concentraciones de 3-NT en el FF de mujeres infértiles y control fueron inferiores a los reportados por Cigliano et al. (2002), quien en su trabajo no especifica el diagnóstico de infertilidad del grupo de mujeres incluidas. Hasta nuestro conocimiento, no se han reportado las concentraciones de 3-NT en FFH comparando pacientes fértiles e infértiles, por lo que este estudio es el primero en señalar que los niveles de 3-NT parecen ser similares entre mujeres fértiles e infértiles. Si bien, previamente se ha evaluado las concentraciones del aminoácido tirosina en el FF de mujeres sometidas a estimulación ovárica controlada, encontrándose menores concentraciones de este aminoácido en el FF de mujeres con síndrome de hiperestimulación ovárica, comparado con las normo-respondedoras (Amano et al., 2014); se debe tenerse en cuenta que, no puede predecirse si todos los residuos de tirosina serán objeto de nitración para convertirse en 3-NT ya que no todos estos residuos de tirosina están disponibles para la nitración (Teixeira et al., 2016).

Las mujeres infértiles con diagnóstico de factor anatómico y endocrino presentaron correlaciones negativas de 3-NT con las concentraciones de PT y albúmina. Ambos grupos habían presentado las mayores concentraciones de proteínas totales y albúmina en el FF, dentro del grupo de pacientes infértiles. La albúmina humana contiene 18 residuos de tirosina, de los cuales algunos son predominantemente susceptibles a la nitración (Teixeira et al., 2016), por lo que se podría especular que esta correlación negativa podría deberse a las altas concentraciones de albúmina en este grupo de pacientes. Sin embargo, el grupo control también presenta concentraciones altas de PT y albúmina y sin embargo no se observó esta correlación negativa entre 3-NT y las concentraciones de PT y albúmina. Ello podría sugerir otra serie de factores, ya sean intrínsecos, relacionados con el factor de infertilidad, o extrínsecos, que influya en una mayor nitración el fluido folicular de este grupo de pacientes infértiles. En este sentido, la alimentación sería un factor importante a tener en cuenta ya que se ha reportado que alimentos ricos en ácidos grasos esenciales y antioxidantes tienen capacidad para inhibir la nitración de proteínas (Bixby et al., 2005; Lunceford & Gugliucci, 2005).

Si bien la edad está relacionada directamente con el estrés oxidativo e incremento de ROS en el líquido folicular (Amano et al., 2014; Da Broi et al., 2018); en nuestro caso, no observamos que

los niveles de estrés nitrosativo, medidos por 3-NT, aumentarían con la edad de las mujeres. Esto, posiblemente se deba a que el rango de edad de las mujeres incluidas en el estudio no superó los 42 años, siendo el mayor promedio de  $37.00 \pm 1.03$  años en mujeres con endometriosis. Como se sabe, la pérdida de estrógenos que se da en la menopausia reduce la protección a oxidación proteica (Agarwal et al., 2005). Probablemente, trabajos como el de Wiener et al. 2004 (Wiener-Megnazi et al., 2004), que sí mostraron mayor actividad de radicales libres en el FFH con el aumento de la edad de las mujeres, se deba a que incluyeron en su estudio mujeres con edad de hasta 45 años, ya muy cercanas a la menopausia; por otro lado, Wiener también midió los niveles de estrés oxidativo mediante el ensayo de termoquimioluminiscencia para el análisis del desequilibrio entre las actividades oxidantes y antioxidantes por la formación de especies excitadas electrónicamente en forma de carbonilos inestables, mientras que nuestro trabajo analizó los residuos de tirosina nitrada. Los grupos carbonilos son otro subproducto de los procesos fisiológicos cuyo aumento en las proteínas oxidadas es también considerado un marcador de la modificación oxidativa de las proteínas y del envejecimiento (Fujii et al., 2005).

En conclusión, y respecto a la hipótesis planteada en este estudio, se confirma que las variaciones en las concentraciones proteicas en el fluido folicular, pero no los niveles de 3-NT, se ven afectadas por la causa de infertilidad, especialmente evidente en las mujeres infértiles con diagnóstico de insuficiencia ovárica y endometriosis. Sin embargo, no se pudo evidenciar una correlación de las proteínas con la calidad ovocitaria, las tasas de blastocistos desarrollados y de transferencia. Futuros estudios, ampliando especialmente la casuística de mujeres infértiles, permitirían aclarar específicamente cómo estos parámetros influyen en el desarrollo de los tratamientos de FIV.

## **II.6. Conclusiones**

Las principales conclusiones que se extraen de este capítulo son las siguientes:

1. En pacientes que se someten a una estimulación ovárica y aspiración folicular para un tratamiento de fecundación *in vitro*, las concentraciones de PT y albúmina en mujeres con insuficiencia ovárica y endometriosis son menores que en mujeres control, sin que ello afecte al número de ovocitos MII recuperados, blastocistos desarrollados y tasa de nacidos vivos.

2. Las concentraciones de 3-NT en el fluido folicular de mujeres sometidas a estimulación ovárica y aspiración folicular es similar independientemente del diagnóstico de infertilidad.

3. En mujeres infértiles con factor anatómico y endocrino, las concentraciones de PT y albúmina están correlacionadas de manera negativa con las de 3-NT, sin verse afectada la madurez ovocitaria ni desarrollo embrionario.

## **II.7. Bibliografía**

- Agarwal, A., Gupta, S., & Sharma, R. K. (2005). Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol*, 3, 28. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-3-28>
- Alviggi, C., Clarizia, R., Mollo, A., Ranieri, A., & De Placido, G. (2006). Outlook: who needs LH in ovarian stimulation? *Reprod Biomed Online*, 12(5), 599-607. [https://doi.org/10.1016/s1472-6483\(10\)61186-8](https://doi.org/10.1016/s1472-6483(10)61186-8)
- Amano, N., Kitaya, K., Taguchi, S., Funabiki, M., Tada, Y., Hayashi, T., & Nakamura, Y. (2014). Low follicular fluid tyrosine concentration in infertile women with ovarian hyperstimulation syndrome. *Biomed Rep*, 2(3), 429-431. <https://doi.org/10.3892/br.2014.251>
- Ambekar, A. S., Nirujogi, R. S., Srikanth, S. M., Chavan, S., Kelkar, D. S., Hinduja, I., . . . Mukherjee, S. (2013). Proteomic analysis of human follicular fluid: a new perspective towards understanding folliculogenesis. *J Proteomics*, 87, 68-77. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.05.017>
- Basuino, L., & Silveira, C. F. (2016). Human follicular fluid and effects on reproduction. *JBRA Assist Reprod*, 20(1), 38-40. <https://doi.org/10.5935/1518-0557.20160009>
- Bixby, M., Spieler, L., Menini, T., & Gugliucci, A. (2005). Ilex paraguariensis extracts are potent inhibitors of nitrosative stress: a comparative study with green tea and wines using a protein nitration model and mammalian cell cytotoxicity. *Life Sci*, 77(3), 345-358. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2004.11.030>
- Chen, M., Han, H., Chuai, Y., Hao, M., Shu, M., & Shang, W. (2018). Effects of oral contraceptives on ovulation induction in in vitro fertilization patients with premature ovarian insufficiency. *Climacteric*, 21(3), 276-279. <https://doi.org/10.1080/13697137.2018.1439912>
- Cigliano, L., Balestrieri, M., Spagnuolo, M. S., Dale, B., & Abrescia, P. (2002). Lecithin-cholesterol acyltransferase activity during maturation of human preovulatory follicles with different concentrations of ascorbate, alpha-tocopherol and nitrotyrosine. *Reprod Fertil Dev*, 14(1-2), 15-21. <https://doi.org/10.1071/rd01044>
- Da Broi, M. G., Giorgi, V. S. I., Wang, F., Keefe, D. L., Albertini, D., & Navarro, P. A. (2018). Influence of follicular fluid and cumulus cells on oocyte quality: clinical implications. *J Assist Reprod Genet*, 35(5), 735-751. <https://doi.org/10.1007/s10815-018-1143-3>
- Da Broi, M. G., Malvezzi, H., Paz, C. C., Ferriani, R. A., & Navarro, P. A. (2014). Follicular fluid from infertile women with mild endometriosis may compromise the meiotic spindles of

- bovine metaphase II oocytes. *Hum Reprod*, 29(2), 315-323.  
<https://doi.org/10.1093/humrep/det378>
- Dongye, H., Ji, X., Ma, X., Song, J., & Yan, L. (2021). The Impact of Endometriosis on Embryo Quality in. *Front Med (Lausanne)*, 8, 669342.  
<https://doi.org/10.3389/fmed.2021.669342>
- Dumesic, D. A., Meldrum, D. R., Katz-Jaffe, M. G., Krisher, R. L., & Schoolcraft, W. B. (2015). Oocyte environment: follicular fluid and cumulus cells are critical for oocyte health. *Fertil Steril*, 103(2), 303-316. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.11.015>
- Emori, M. M., & Drapkin, R. (2014). The hormonal composition of follicular fluid and its implications for ovarian cancer pathogenesis. *Reprod Biol Endocrinol*, 12, 60.  
<https://doi.org/10.1186/1477-7827-12-60>
- Esteves, S. C., Roque, M., Bedoschi, G. M., Conforti, A., Humaidan, P., & Alviggi, C. (2018). Defining Low Prognosis Patients Undergoing Assisted Reproductive Technology: POSEIDON Criteria-The Why. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 9, 461.  
<https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00461>
- Ferraretti, A. P., La Marca, A., Fauser, B. C., Tarlatzis, B., Nargund, G., Gianaroli, L., & Definition, E. w. g. o. P. O. R. (2011). ESHRE consensus on the definition of 'poor response' to ovarian stimulation for in vitro fertilization: the Bologna criteria. *Hum Reprod*, 26(7), 1616-1624. <https://doi.org/10.1093/humrep/der092>
- Freitas, C., Neto, A. C., Matos, L., Silva, E., Ribeiro, Â., Silva-Carvalho, J. L., & Almeida, H. (2017). Follicular Fluid redox involvement for ovarian follicle growth. *J Ovarian Res*, 10(1), 44.  
<https://doi.org/10.1186/s13048-017-0342-3>
- Fujii, J., Iuchi, Y., & Okada, F. (2005). Fundamental roles of reactive oxygen species and protective mechanisms in the female reproductive system. *Reprod Biol Endocrinol*, 3, 43.  
<https://doi.org/10.1186/1477-7827-3-43>
- Gonzalès, J., Lesourd, S., Van Dreden, P., Richard, P., Lefèbvre, G., & Vauthier Brouzes, D. (1992). Protein composition of follicular fluid and oocyte cleavage occurrence in in vitro fertilization (IVF). *J Assist Reprod Genet*, 9(3), 211-216.  
<https://doi.org/10.1007/bf01203815>
- González-Comadran, M., Schwarze, J. E., Zegers-Hochschild, F., Souza, M. D., Carreras, R., & Checa, M. (2017). The impact of endometriosis on the outcome of Assisted Reproductive Technology. *Reprod Biol Endocrinol*, 15(1), 8. <https://doi.org/10.1186/s12958-016-0217-2>

- H. Sies, D. J. (2007). Oxidative Stress\*. In G. Fink (Ed.), *Encyclopedia of Stress* (Second ed., pp. 45 - 48). Academic Press.
- Humaidan, P., Alviggi, C., Fischer, R., & Esteves, S. C. (2016). The novel POSEIDON stratification of 'Low prognosis patients in Assisted Reproductive Technology' and its proposed marker of successful outcome. *F1000Res*, 5, 2911. <https://doi.org/10.12688/f1000research.10382.1>
- Infertility Workup for the Women's Health Specialist: ACOG Committee Opinion, Number 781. (2019). *Obstet Gynecol*, 133(6), e377-e384. <https://doi.org/10.1097/AOG.0000000000003271>
- Kupka, M. S., D'Hooghe, T., Ferraretti, A. P., de Mouzon, J., Erb, K., Castilla, J. A., . . . (ESHRE), E. S. o. H. R. a. E. (2016). Assisted reproductive technology in Europe, 2011: results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod*, 31(2), 233-248. <https://doi.org/10.1093/humrep/dev319>
- Lim, H. J., Seok, A. E., Han, J., Lee, J., Lee, S., Kang, H. G., . . . Yang, Y. (2017). N-glycoproteomic analysis of human follicular fluid during natural and stimulated cycles in patients undergoing. *Clin Exp Reprod Med*, 44(2), 63-72. <https://doi.org/10.5653/cerm.2017.44.2.63>
- Lunceford, N., & Gugliucci, A. (2005). Ilex paraguariensis extracts inhibit AGE formation more efficiently than green tea. *Fitoterapia*, 76(5), 419-427. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2005.03.021>
- Mendoza, N., Juliá, M. D., Galliano, D., Coronado, P., Díaz, B., Fontes, J., . . . Sánchez-Borrego, R. (2015). Spanish consensus on premature menopause. *Maturitas*, 80(2), 220-225. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2014.11.007>
- Mukaka, M. M. (2012). Statistics corner: A guide to appropriate use of correlation coefficient in medical research. *Malawi Med J*, 24(3), 69-71.
- Nagy, B., Pulay, T., Szarka, G., & Csömör, S. (1989). The serum protein content of human follicular fluid and its correlation with the maturity of oocytes. *Acta Physiol Hung*, 73(1), 71-75.
- Nagyova, E. (2018). The Biological Role of Hyaluronan-Rich Oocyte-Cumulus Extracellular Matrix in Female Reproduction. *Int J Mol Sci*, 19(1). <https://doi.org/10.3390/ijms19010283>
- Naito, K., Fukuda, Y., & Toyoda, Y. (1988). Effects of porcine follicular fluid on male pronucleus formation in porcine oocytes matured in vitro. *Gamete Res*, 21(3), 289-295. <https://doi.org/10.1002/mrd.1120210310>

- Otsuki, J., Nagai, Y., Matsuyama, Y., Terada, T., & Era, S. (2012). The influence of the redox state of follicular fluid albumin on the viability of aspirated human oocytes. *Syst Biol Reprod Med*, 58(3), 149-153. <https://doi.org/10.3109/19396368.2012.675004>
- Pool, T. B., & Martin, J. E. (1994). High continuing pregnancy rates after in vitro fertilization-embryo transfer using medium supplemented with a plasma protein fraction containing alpha- and beta-globulins. *Fertil Steril*, 61(4), 714-719. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)56651-5](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)56651-5)
- Robin, C., Uk, A., Decanter, C., Behal, H., Collinet, P., Rubod, C., . . . Robin, G. (2021). Impact of endometriosis on oocyte morphology in IVF-ICSI: retrospective study of a cohort of more than 6000 mature oocytes. *Reprod Biol Endocrinol*, 19(1), 160. <https://doi.org/10.1186/s12958-021-00798-x>
- Roca-Feliu, M., Clua, E., García, S., Polyzos, N. P., & Martínez, F. (2022). Recipient outcomes in an oocyte donation programme: should very young donors be excluded? *Reprod Biomed Online*, 44(5), 867-873. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2022.01.013>
- Rom, E., Reich, R., Laufer, N., Lewin, A., Rabinowitz, R., Pevsner, B., . . . Adelman-Grill, B. C. (1987). Follicular fluid contents as predictors of success of in-vitro fertilization-embryo transfer. *Hum Reprod*, 2(6), 505-510. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a136579>
- Santonocito, M., Vento, M., Guglielmino, M. R., Battaglia, R., Wahlgren, J., Ragusa, M., . . . Di Pietro, C. (2014). Molecular characterization of exosomes and their microRNA cargo in human follicular fluid: bioinformatic analysis reveals that exosomal microRNAs control pathways involved in follicular maturation. *Fertil Steril*, 102(6), 1751-1761.e1751. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.08.005>
- Shalgi, R., Kraicer, P., Rimon, A., Pinto, M., & Soferman, N. (1973). Proteins of human follicular fluid: the blood-follicle barrier. *Fertil Steril*, 24(6), 429-434.
- Teixeira, D., Fernandes, R., Prudêncio, C., & Vieira, M. (2016). 3-Nitrotyrosine quantification methods: Current concepts and future challenges. *Biochimie*, 125, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2016.02.011>
- Valckx, S. D., De Pauw, I., De Neubourg, D., Inion, I., Berth, M., Fransen, E., . . . Leroy, J. L. (2012). BMI-related metabolic composition of the follicular fluid of women undergoing assisted reproductive treatment and the consequences for oocyte and embryo quality. *Hum Reprod*, 27(12), 3531-3539. <https://doi.org/10.1093/humrep/des350>
- Vander Borgh, M., & Wyns, C. (2018). Fertility and infertility: Definition and epidemiology. *Clin Biochem*, 62, 2-10. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2018.03.012>

- Velazquez, A., Reyes, A., Chargoy, J., & Rosado, A. (1977). Amino acid and protein concentrations of human follicular fluid. *Fertil Steril*, 28(1), 96-100. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)42324-1](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)42324-1)
- Walker, H. K., Hall, W. D., & Hurst, J. W. (1990). Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations. In. <https://doi.org/NBK204>
- Walker, M. H., & Tobler, K. J. (2022). Female Infertility. In *StatPearls*. StatPearls Publishing Copyright © 2022, StatPearls Publishing LLC.
- Wiener-Megnazi, Z., Vardi, L., Lissak, A., Shnizer, S., Reznick, A. Z., Ishai, D., . . . Dirnfeld, M. (2004). Oxidative stress indices in follicular fluid as measured by the thermochemiluminescence assay correlate with outcome parameters in in vitro fertilization. *Fertil Steril*, 82 Suppl 3, 1171-1176. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2004.06.013>
- Yamamoto, J., Omura, M., Tuchiya, K., Hidaka, M., Kuwahara, A., Irahara, M., . . . Tokumura, A. (2016). Preferable existence of polyunsaturated lysophosphatidic acids in human follicular fluid from patients programmed with in vitro fertilization. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 126, 16-23. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2016.07.008>
- Zamah, A. M., Hassis, M. E., Albertolle, M. E., & Williams, K. E. (2015). Proteomic analysis of human follicular fluid from fertile women. *Clin Proteomics*, 12(1), 5. <https://doi.org/10.1186/s12014-015-9077-6>
- Zegers-Hochschild, F., Adamson, G. D., Dyer, S., Racowsky, C., de Mouzon, J., Sokol, R., . . . van der Poel, S. (2017). The International Glossary on Infertility and Fertility Care, 2017. *Hum Reprod*, 32(9), 1786-1801. <https://doi.org/10.1093/humrep/dex234>

## CAPÍTULO III. POLIMORFISMOS EN LOS GENES *TNP1*, *TNP2*, *PRM1* Y *PRM2*, EN HOMBRES MESTIZOS DE ECUADOR

### III.1. Introducción

La infertilidad es un problema de salud que afecta alrededor del 17.5% de las parejas en edad reproductiva a nivel mundial ((WHO), 2022; Inhorn & Patrizio, 2015). Dicha infertilidad puede deberse a factor femenino, masculino, combinado o causa desconocida (Inhorn & Patrizio, 2015), contribuyendo el factor masculino puro o combinado en aproximadamente la mitad de las parejas con infertilidad (Agarwal et al., 2015; Chu et al., 2019; Lotti & Maggi, 2018). Dentro de las causas de infertilidad masculina se encuentran ciertas enfermedades como el varicocele, la diabetes, el cáncer y tratamientos como la quimioterapia, además de otros factores como la edad y estilo de vida (Fainberg & Kashanian, 2019; Pourmasumi et al., 2017). Entre los factores relacionados con el estilo de vida que pudieran aumentar el riesgo de infertilidad masculina se encuentran el consumo de alcohol, tabaco u otro tipo de drogas, obesidad, trabajos con exposición prolongada a tóxicos o que puedan provocar aumento de temperatura del saco escrotal, etc. (De Celis et al., 2000; Fainberg & Kashanian, 2019; Ilacqua et al., 2018; Pourmasumi et al., 2017). Sin embargo, entre el 30 al 72% de los casos de infertilidad masculina aún son diagnosticados como idiopáticos (Cannarella et al., 2019; Fainberg & Kashanian, 2019).

Durante la espermiogénesis, proceso final de la espermatogénesis, acontece la reorganización de la cromatina basada en histonas las cuales se sustituyen en su mayoría por protaminas (Aydos et al., 2018; Canovas & Ross, 2016; Oliva & Castillo, 2011; Rathke et al., 2014). El proceso de intercambio de histonas a PRMs es gradual, concomitante al alargamiento del núcleo del espermatozoide donde las histonas somáticas se sustituyen por la variante de histonas específicas de testículo, para luego ser reemplazadas por proteínas nucleares de transición (TNPs). Posteriormente las TNPs son sustituidas por las protaminas, formando el complejo nucleoprotamínico altamente compacto (Meistrich et al., 2003; Oliva & Castillo, 2011; Steger & Balhorn, 2018; Ward, 1993).

En humanos existen 2 tipos de TNPs y protaminas que son codificadas por genes de una sola copia (Meistrich et al., 2003; Rathke et al., 2014). El gen *TNP1* se encuentra en el cromosoma 2 (2q35),

mientras que *TNP2* está estrechamente ligado a *PRM1* y *PRM2* en el cromosoma 16 (16p13.2 - 16p13.3) (Aydos et al., 2018; Meistrich et al., 2003; Rathke et al., 2014; Steger & Balhorn, 2018). Algunos polimorfismos han sido identificados en estos cuatro genes.

La presencia de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en *TNP1* y *TNP2* no se considera un factor de riesgo de infertilidad en el varón (Aoki et al., 2006; Khattri et al., 2011). Sin embargo, varios SNPs que alteran los aminoácidos identificados en *TNP1* y *TNP2* pueden afectar su función a través de efectos conformacionales y podrían alterar la incorporación adecuada de protaminas en la cromatina espermática (Aoki et al., 2006). En la ubicación rs62180545 de *TNP1* se ha identificado un polimorfismo en diferentes poblaciones asiáticas que no afecta a la fertilidad del varón (Jiang et al., 2017; Miyagawa et al., 2005; Venkatesh et al., 2011). En *TNP2*, en la ubicación rs11640138, se ha reportado un polimorfismo en poblaciones asiática y europea, mientras que en la ubicación rs56069754 sólo se ha reportado en población hindú; en ambos casos, no afectan a la fertilidad masculina (Aoki et al., 2006; Heidari et al., 2019; Khattri et al., 2011; Miyagawa et al., 2005; Venkatesh et al., 2011).

Por su parte, en *PRM1* y *PRM2* se han identificado varios polimorfismos, algunos de los cuales parecen estar asociados a la fertilidad masculina (Jiang et al., 2015; Oliva, 2006; Venkatesh et al., 2011). Los polimorfismos asociados a la infertilidad provocarían cambios en la estructura de las protaminas y con ello una alteración en el empaquetamiento de la cromatina y diversas alteraciones espermáticas (Aoki et al., 2006; Grassetti et al., 2012; He et al., 2012; Heidari et al., 2019; Jiang et al., 2015; Jiang et al., 2017; Jodar et al., 2011; Khattri et al., 2011; Nabi et al., 2018; Oliva, 2006; Tanaka et al., 2003; Venkatesh et al., 2011). Entre los SNPs de alta frecuencia descritos para estos genes se encuentran rs737008 en *PRM1*, rs1646022 y rs2070923 en *PRM2*, todos identificados en diferentes poblaciones asiáticas y europeas (Aoki et al., 2006; Grassetti et al., 2012; He et al., 2012; Jiang et al., 2017; Jodar et al., 2011; Nabi et al., 2018; Tanaka et al., 2003; Venkatesh et al., 2011).

La frecuencia de algunos polimorfismos identificados en estos cuatro genes, así como su asociación a la infertilidad, muchas veces es discordante entre las poblaciones estudiadas (Aoki et al., 2006; Grassetti et al., 2012; He et al., 2012; Heidari et al., 2019; Jiang et al., 2015; Jiang et al., 2017; Khattri et al., 2011; Nabi et al., 2018; Oliva, 2006; Tanaka et al., 2003; Venkatesh et al., 2011). Esto sugiere que el origen étnico/geográfico puede jugar un rol importante en el efecto biológico de los

diferentes polimorfismos, y probablemente esté modulado por factores específicos de la población (Krausz et al., 2015).

No se han encontrado estudios donde se identifiquen polimorfismos en estos cuatro genes en poblaciones de origen étnico/geográfico del continente americano. En Ecuador, país donde el 72% de su población es mestiza; es decir, híbrida con contribución europea (70%), amerindia (22%), y africana (2%) (según marcadores del cromosoma Y) (Paz-Y-Miño et al., 2016), no se dispone de estudios que evalúen la presencia de polimorfismos en los cuatro genes involucrados en la compactación del ADN espermático y su relación con la fertilidad masculina.

### **III.2. Hipótesis y Objetivos**

La hipótesis de partida es que la población masculina ecuatoriana presenta polimorfismos en los genes *TNP1*, *TNP2*, *PRM1* y *PRM2*, identificados previamente en otras poblaciones, considerando el origen étnico mestizo del país, siendo su frecuencia y asociación con la fertilidad posiblemente similar a las previamente descritas.

Los objetivos propuestos son: i) Secuenciar los genes *TNP1*, *TNP2*, *PRM1* y *PRM2* en hombres ecuatorianos fértiles normozoospermicos (grupo control) e infértiles (grupo de estudio); ii) Identificar polimorfismos en los 4 genes de estudio dentro de la población ecuatoriana; iii) Determinar frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos identificados; iv) Establecer si existe relación entre los polimorfismos identificados con la fertilidad masculina en la población estudiada; v) Comparar las frecuencias genotípicas de los polimorfismos identificados con otras poblaciones.

### **III.3. Materiales y Métodos**

El presente trabajo se realizó en el centro de reproducción asistida Innaifest ubicado en el Hospital Clínica Kennedy, Sección Gamma, Consultorio #11 (Guayaquil, Ecuador) con número de permiso sanitario ACESSESS2021-Z08-0115452 e incluido como centro acreditado en la Red Latinoamericana

de Reproducción Asistida (REDLARA). Este estudio fue aprobado por el comité de ética del Hospital Clínica Kennedy mediante oficio HCK-CEISH-17-0035. Todas las pacientes que aceptaron formar parte de este trabajo dieron su consentimiento informado por escrito.

### **III.3.1. Selección de pacientes masculinos y espermiograma**

Se seleccionaron 144 hombres que asistieron al centro de reproducción asistida Innaifest de Guayaquil – Ecuador para evaluación o donación de semen. El grupo de estudio consistió en 101 pacientes infértiles sin descendencia con rango de edad entre 20 y 55 años, mientras que el grupo control fueron 43 varones con fertilidad comprobada (al menos un hijo por concepción natural) entre 20 y 57 años. A todos los participantes se les realizó un espermiograma básico, siguiendo los criterios recomendados en la quinta edición del manual de la OMS para el procesamiento y evaluación de semen humano (World Health Organization, 2010), y toma de muestra de sangre periférica. Los criterios de exclusión fueron que el paciente o su pareja, tuvieran alguna enfermedad de transmisión sexual u otra infección activa, que para la toma de muestra de semen que cumplieran con los criterios de toma de muestra establecidos por la OMS en su quinto manual.

### **III.3.2. Análisis genético de *TNP1*, *TNP2*, *PRM1* y *PRM2***

La extracción de ADN de sangre periférica se realizó mediante el kit comercial *Purelink™ Genomic DNA Mini Kit* (Cat. K1820, Invitrogen), siguiendo las condiciones establecidas por el fabricante. La concentración (ng/ul) y pureza (ratios 260/280) de las muestras de ADN se midieron con el equipo Nanodrop. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó mediante el kit *Platinum™ SuperFi™ PCR Máster Mix* (Cat. 12358, Invitrogen) en el equipo Máster Cyler (modelo gradient, Eppendorf).

La secuencia de cebadores para *PRM1*, *TNP1* y *TNP2* utilizados, son los descritos por Aoki et al. (2006), variando sus concentraciones a 0.5 para *PRM1* y *TNP1*, y 0.25 para *TNP2*. El cebador para *PRM2* fue diseñado con el programa Primer3 (<https://primer3.org/>) y se utilizó a una concentración de 0.5. La amplificación del producto se confirmó mediante cuantificación con el equipo Nanodrop (ng/ul) y observación en gel de agarosa al 2%. La secuencia de cebadores utilizados, así como las condiciones de PCR se describen en la **Tabla III.1**.

**Tabla III.1. Cebadores y condiciones de PCR para amplificar *PRM1*, *PRM2*, *TNP1* y *TNP2*.**

Condiciones de PCR			
Desnaturalización	Anillamiento	Elongación	# Ciclos
<i>PRM1</i>			
F: 5'-CCCCTGGCATCTATAACAGGCCGC-3'			
R: 5'-TCAAGAACAAGGAGAGAAGAGTGG-3'			
98°C; 10"	63°C; 30"	72°C; 45"	30
<i>PRM2</i>			
F: 5'-CAAGAGGAGCAAGGGCTGAG-3'			
R: 5'-GCCTTCTGCATGTTCTTCTCCT-3'			
98°C; 10"	60°C; 30"	72°C; 50"	40
<i>TNP1</i>			
F: 5'-CTTGAGCTGCACGGCAAAAGGA-3'			
R: 5'-TTCGTCACAACCTGGCATTGA-3'			
94°C; 30"	63°C; 30"	72°C; 70"	35
<i>TNP2</i>			
F: 5'-AGCAGATCTGGGATGCAGAC-3'			
R: 5'-CATACTCAGCTAGCCAACCTGC-3'			
98°C; 10"	62°C; 30"	72°C; 45"	32

La purificación y secuenciación tipo Sanger de los productos de PCR fueron realizados en el laboratorio MCLAB (*Molecular Cloning Laboratories*, California – Estados Unidos), utilizando la plataforma de secuenciadores ABI 3730XL. Para ello se utilizó 1ul del producto de PCR purificado para cada panel del conjunto de mapeo.

El alineamiento de los productos e identificación de los potenciales polimorfismos se realizó mediante el programa informático MEGA 7 (Kumar et al., 2016). De la base de datos *GenBank* del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) se consideraron las referencias 7141, 7142, AB281136.1 y 5620 para el alineamiento de *TNP1*, *TNP2*, *PRM1* y *PRM2*, respectivamente.

La nomenclatura dada a cada polimorfismo identificado es el número otorgado por la base de datos de polimorfismos de un solo nucleótido (dbNSP) desarrollada por el centro nacional de información biotecnológica (NCBI).

### **III.3.3. Análisis estadístico**

La prueba T de *Student* se utilizó para analizar las diferencias entre las características seminales de los grupos de estudio, las mismas que se expresan como media  $\pm$  error típico y con nivel de significancia de 0.05. Para determinar la relación de los polimorfismos con la fertilidad masculina, las frecuencias alélicas y genotípicas se evaluaron mediante análisis de chi-cuadrado  $X^2$ .

## **III.4. Resultados**

### **III.4.1. Características de la población de estudio.**

Las características clínicas de la población analizada (n=144), separado entre el grupo control y de pacientes infértiles, se refleja en la **Tabla III.2** donde se observa diferencias entre ambos grupos en la edad y volumen seminal.

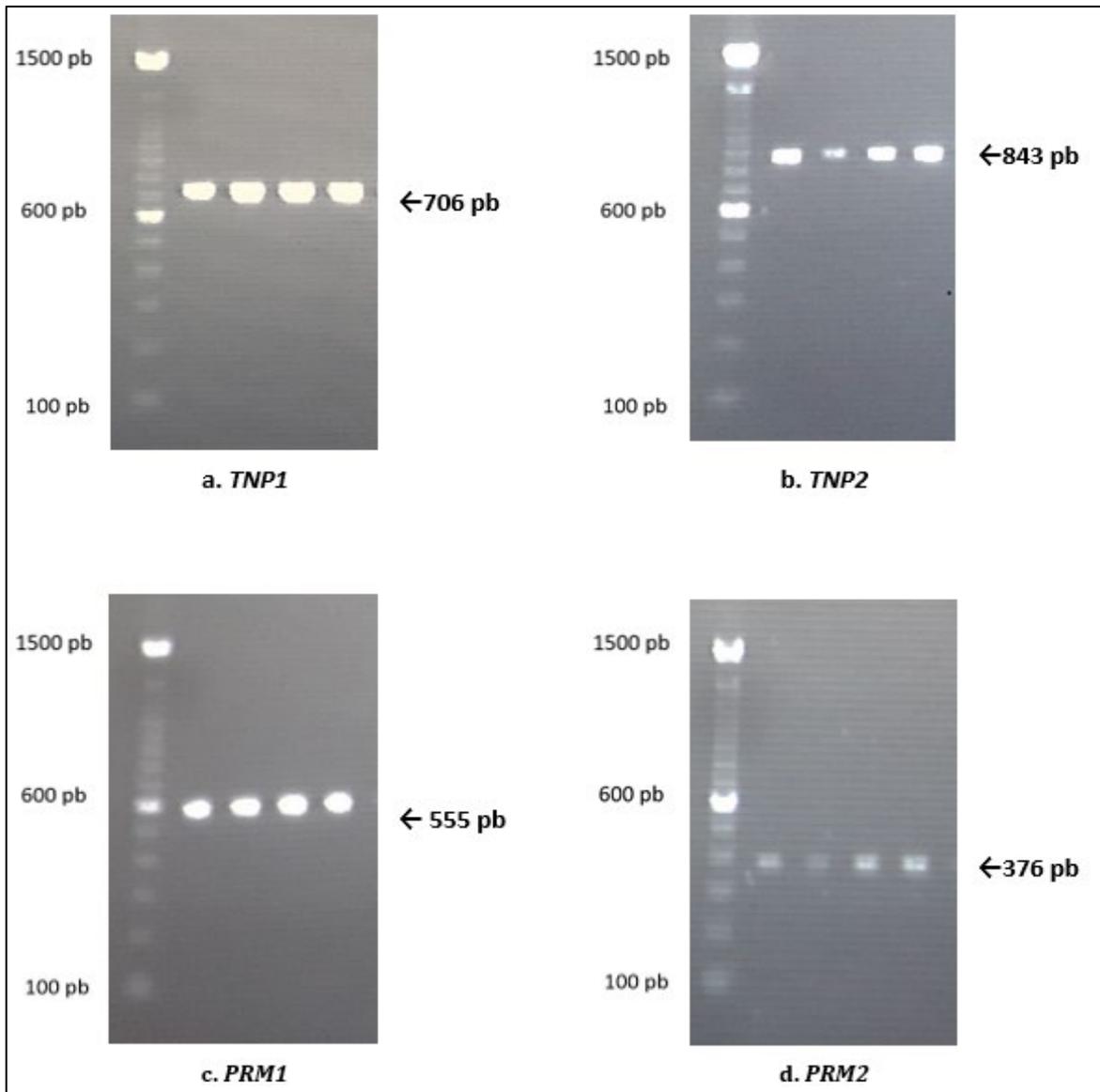
**Tabla III.2. Características de la población estudiada.** Datos expresados como media  $\pm$  SEM.

Variables	Control (n=43)	Infértiles (n=101)	Valor P
Edad (años)	37.58 $\pm$ 1.24 a	33.95 $\pm$ 0.56 b	<b>0.0097*</b>
Volumen de eyaculado (ml)	2.89 $\pm$ 0.15 a	3.37 $\pm$ 0.15 b	<b>0.0334*</b>
Concentración de espermatozoides (10 <sup>6</sup> x ml)	44.64 $\pm$ 4.48	42.66 $\pm$ 3.09	0.7171
Motilidad total (Progresiva + No progresiva, %)	53.11 $\pm$ 2.90	51.24 $\pm$ 1.68	0.5781
Motilidad progresiva (PR%)	89.74 $\pm$ 2.49	89.27 $\pm$ 1.24	0.8644
Morfología espermática (formas normales, %)	13.53 $\pm$ 1.19	13.57 $\pm$ 0.84	0.9785

#### III.4.2. Resultados de la PCR

El ADN extraído de sangre periférica de todos los individuos fue cuantificado, obteniendo una concentración media de 84.90 $\pm$ 3.97 ng/ul (rango mínimo de 11.50 y máximo de 318.60) con una pureza media de 1.80 $\pm$ 0.01 (ratio 260/280) y 1.70 $\pm$ 0.05 (ratio 260/230).

Todos los productos de PCR de los genes *TNP1*, *TNP2*, *PRM1* y *PRM2*, tanto de pacientes infértiles como del grupo control, dieron fragmentos del tamaño esperado para cada gen (**Figura III.1**). Las concentraciones medias de los productos de PCR fueron 203.45 ng/ul (260/280: 1.76, 260/230:2.91), 393.62 ng/ul (260/280:1.76, 260/230: 2.21), 228.31 ng/ul (260/280:1.77, 260/230:2.64) y 178.67 ng/ul (260/280:1.70, 260/230: 2.44), para los genes *TNP1*, *TNP2*, *PRM1* y *PRM2*, respectivamente.



**Figura III.1. Electroforesis de productos de PCR de los genes en estudio.** En el lado izquierdo de cada imagen se visualiza el marcador de peso molecular, mientras que en el lado derecho se indica con una flecha (←) el peso del producto de PCR de los genes estudiados.

A continuación, los productos de PCR de cada gen fueron purificados y secuenciados. El porcentaje de muestras de las cuales se obtuvieron secuencias de calidad aceptable para su análisis fue superior al 80% (82-100%) (**Tabla III.3**). Las secuencias no consideradas aptas para el análisis fueron en las que se observó mucho ruido de fondo y muy malas resoluciones en la cromatografía, incluso en las repeticiones.

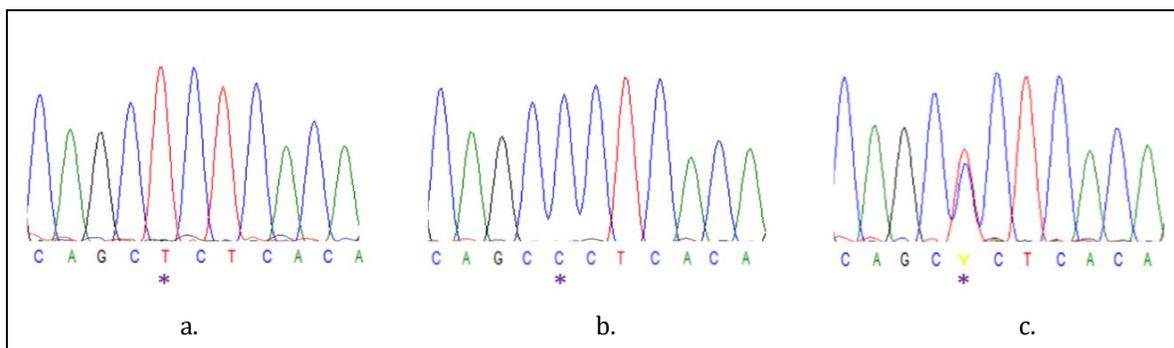
En el total de muestras analizadas se identificaron un total de 9 polimorfismos entre los 4 genes estudiados, varios de los cuales ya han sido documentados previamente en otras poblaciones de varones fértiles e infértiles.

**Tabla III.3. Individuos con muestras secuenciadas válidas.**

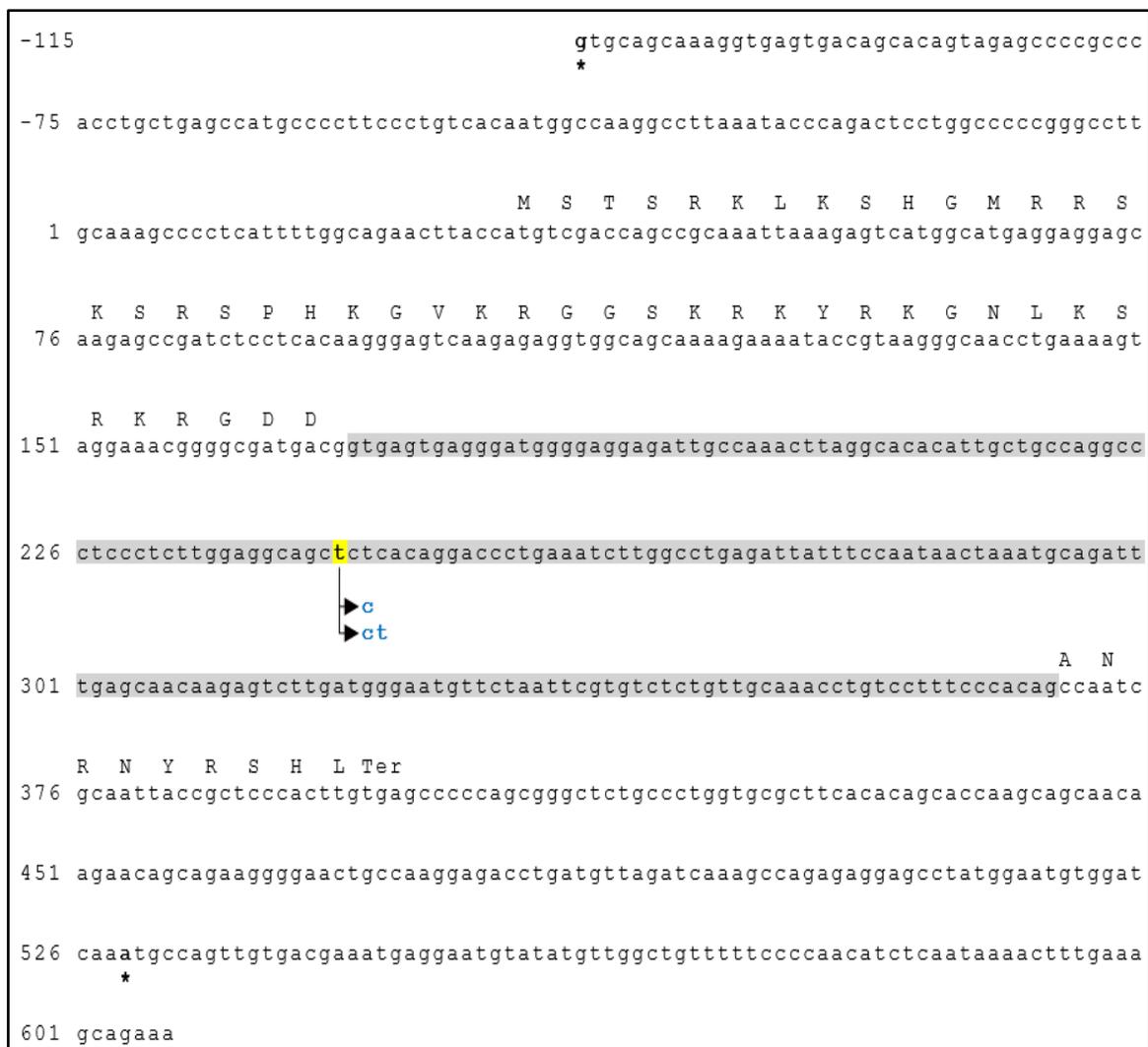
<b>Muestras obtenidas</b>	<b>Control (n=43)</b>	<b>Infértiles (n=101)</b>
Tnp1	43 (100%)	101 (100%)
Tnp2	40 (93%)	89 (88%)
Prm1	42 (98%)	98(97%)
Prm2	37 (86%)	83 (82%)

### III.4.3. Genes *TNP1* y *TNP2*

En *TNP1* se identificó un SNP intrónico (rs62180545) con genotipos homocigoto y heterocigoto en tres pacientes infértiles normozoospermicos, sin diferencia estadística en las frecuencias alélicas y genotípicas entre el grupo control vs. pacientes infértiles (**Figuras III.2 y III.3, Tabla III.4**).

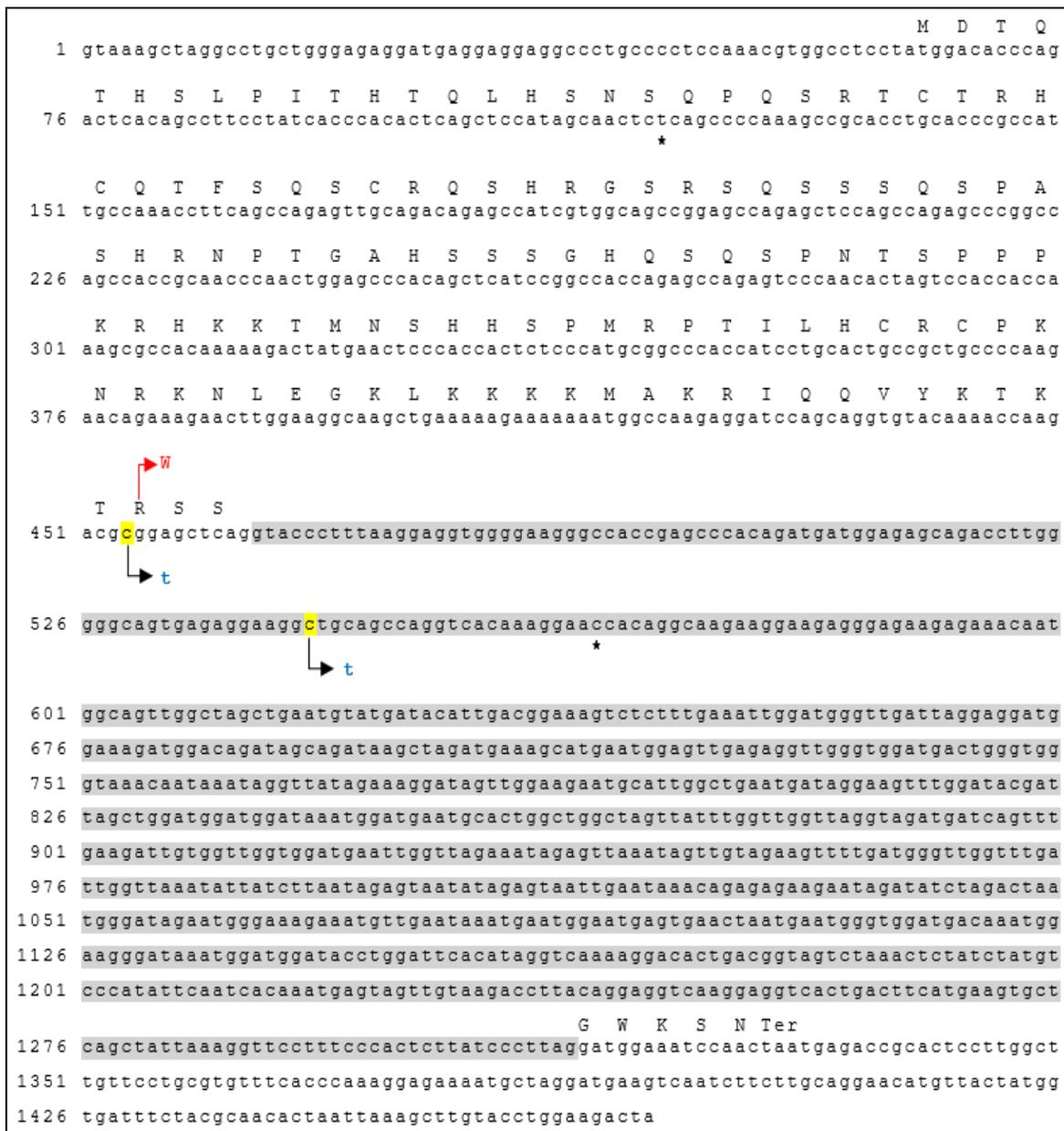


**Figura III.2. Electroferograma de secuenciación de ADN de *TNP1*.** Con \* se identifica la ubicación del SNP rs62180545, la figura a describe el alelo nativo, la figura b el alelo mutado, la figura c el genotipo heterocigoto.

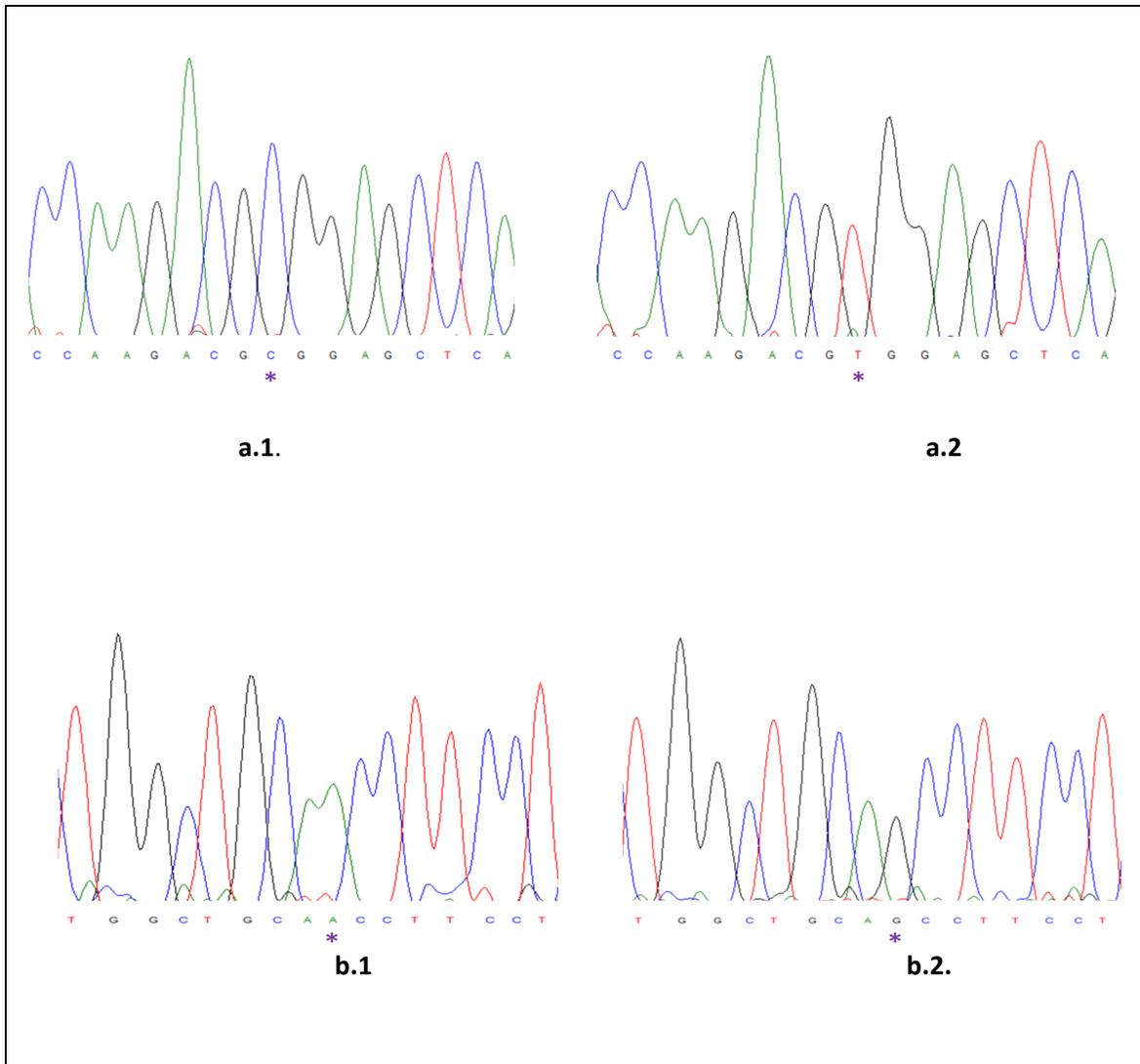


**Figura III.3. Secuencia de ADN genómico y polimorfismo identificado en el gen *TNP1*.** Los nucleótidos de inicio y fin del producto secuenciado se marcan con asterisco (\*). La secuencia del intrón del gen se muestra resaltada en gris. El nucleótido resaltado en amarillo hace referencia al SNP, mientras que las letras en azul bajo estos indican los nucleótidos de reemplazo. Las letras en mayúscula sobre la secuencia hacen referencia a los aminoácidos.

En *TNP2* se identificaron dos SNPs, uno intrónico (rs56069754) y otro en el exón 1 (rs11640138) que provoca cambio del aminoácido arginina a triptófano. Ambos SNPs se presentaron de manera homocigota en individuos del grupo control y pacientes infértiles. Ninguno de los SNPs identificados en *TNPs* mostró diferencia estadística en las frecuencias alélicas y genotípicas entre el grupo control vs. pacientes infértiles (**Figuras III.4 y III.5, Tabla III.4**).



**Figura III.4. Secuencia de ADN genómico y polimorfismo identificado en el gen *TNP2*.** Los nucleótidos de inicio y fin del producto secuenciado se marcan con asterisco (\*). La secuencia del intrón del gen se muestra resaltada en gris. El nucleótido resaltado en amarillo hace referencia al SNP, mientras que las letras en azul bajo estos, indica los nucleótidos de reemplazo. Las letras en mayúscula sobre la secuencia hacen referencia a los aminoácidos.



**Figura III.5. Electroferograma de secuenciación de ADN de *TNP2*.** El asterisco (\*) identifica los “rs”. El SNP rs11640138 se muestra en las figuras a.1 (alelo nativo) y a.2 (alelo mutado). El SNP rs56069754 (secuencia complemento) se muestra en las figuras b.1 (alelo nativo) y b.2 (alelo mutado).

Todos los polimorfismos en *TNP1* y *TNP2* identificados en este estudio ya han sido descritos previamente en otras poblaciones. El polimorfismo rs62180545 en *TNP1* se ha descrito en diferentes poblaciones asiáticas; por otro lado, en *TNP2* el polimorfismo rs11640138 en población europea y asiática, y rs56069754 en población hindú. La frecuencia alélica y genotípica descrita en estas poblaciones comparada con la del presente trabajo, se describe en la **Tabla III.5**.

Tabla III.4. Polimorfismo encontrado en *TNP1* y *TNP2* y sus frecuencias genómicas y alélicas. AA: aminoácido.

Gen	dbSNPrs no.	Posición	AA	Individuos con SNP		Frecuencias genotípicas y alélicas			
				Control	Infértiles	Genotipos/ Alelos	Control	Infértiles	$\chi^2$ <i>calculado</i>
# Individuos Estudiados							43	101	
<b><i>TNP1</i></b>	rs62180545	Intrón	-	-	3	TT	1.00	0.97	1.30
						CC	0.00	0.01	0.43
						CT	0.00	0.02	0.86
						C	0.00	0.02	1.73
						T	1.00	0.98	1.73
# Individuos Estudiados							40	89	
<b><i>TNP2</i></b>	rs11640138	Exón 1	R x W	5	8	CC	0.88	0.91	0.38
						TT	0.12	0.09	0.38
						C	0.88	0.91	0.75
						T	0.12	0.09	0.75
						CC	0.92	0.97	1.06
rs56069754	Intrón	-	3	3	TT	0.08	0.03	1.06	
					C	0.92	0.97	2.12	
					T	0.07	0.03	2.12	

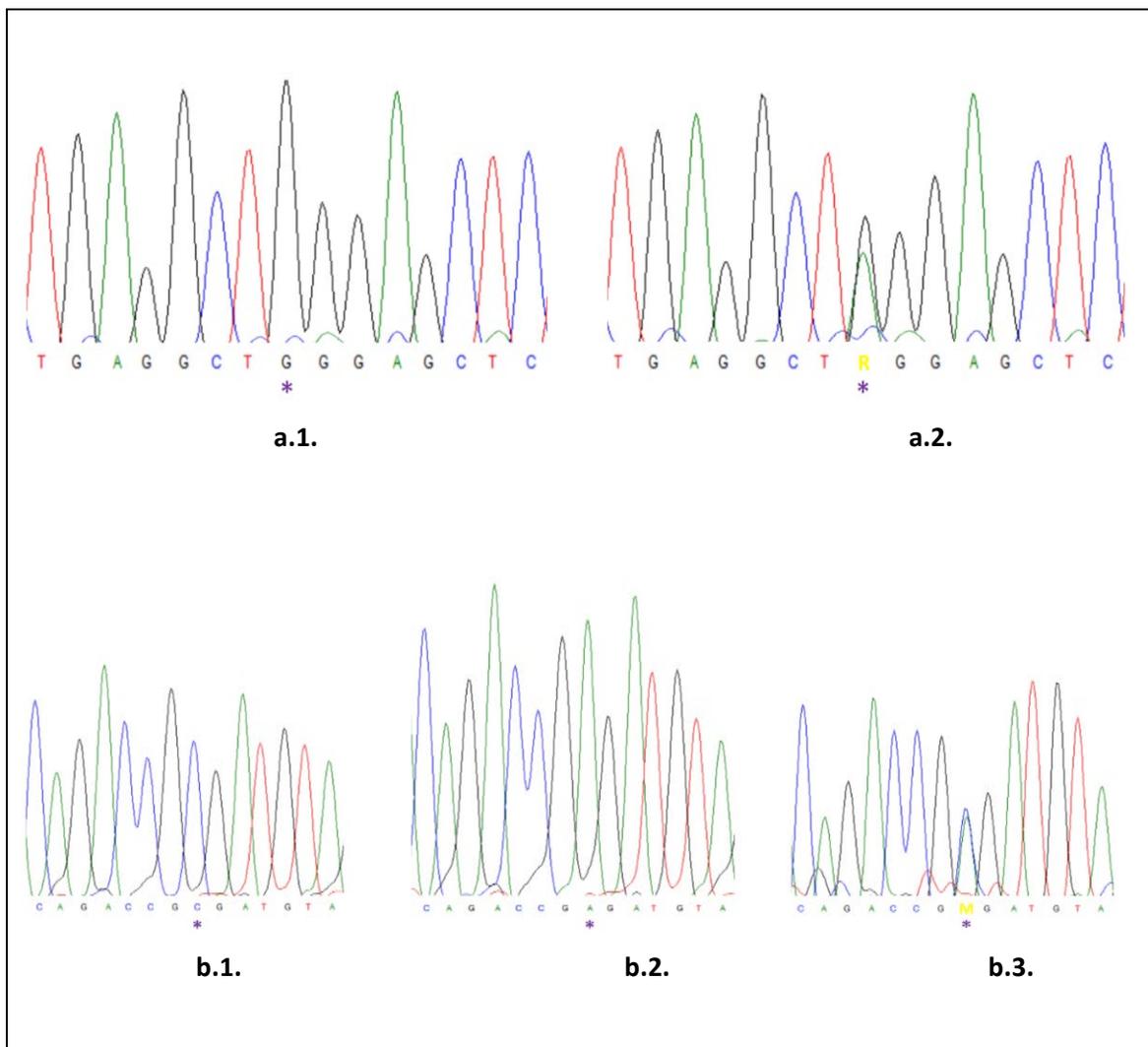
\*  $\chi^2$  CRÍTICO: 3.84.

Tabla III.5. Frecuencia alélica y genotípica de los SNPs de *TNP1* y *TNP2* encontrados y descritos en distintas poblaciones.

Referencia	Población estudiada	Control						Infértiles					
		Casos (n)	C	T	TT	CC	TC	Casos (n)	C	T	TT	CC	TC
<b><i>TNP1: rs62180545</i></b>													
Presente estudio	Ecuatoriana	43	0.00	1.00	1.00	0.00	0.00	101	0.02	0.98	0.97	0.01	0.02
Venkatesh et al. (2011)	Hindú	100	0.00	1.00	1.00	0.00	0.00	100	0.07	0.93	0.85	0.00	0.15
Jiang et al. (2017)	China	442	-	-	0.88	0.01	0.11	636	-	-	0.90	0.01	0.09
Miyagawa et al. (2005)	Japonesa	270	-	-	0.83	0.01	0.16	282	-	-	0.86	0.01	0.13
<b><i>TNP2: rs11640138</i></b>													
Presente Estudio	Ecuatoriana	40	0.88	0.12	0.12	0.88	0.0	89	0.91	0.09	0.09	0.91	0.00
Khattri et al. (2011)	Hindú	275	0.71	0.29	0.11	0.53	0.36	319	0.69	0.31	0.09	0.48	0.43
Miyagawa et al. (2005)	Japonesa	266	-	-	0.09	0.41	0.50	282	-	-	0.03	0.66	0.31
Aoki et al. (2006)	Europea	96	0.57	0.43	0.18	0.31	0.51	192	0.53	0.47	0.21	0.28	0.51
Heidari et al. (2019)	Iraní	150	0.43	0.57	0.40	0.17	0.43	156	0.39	0.61	0.35	0.20	0.45
Venkatesh et al. (2011)	Hindú	100	0.43	0.57	0.57	0.43	0.00	100	0.40	0.60	0.60	0.40	0.00
<b><i>TNP2: rs56069754</i></b>													
Presente estudio	Ecuatoriana	40	0.92	0.08	0.08	0.92	0.0	89	0.97	0.03	0.03	0.97	0.0
Khattri et al. (2011)	Hindú	275	0.87	0.13	0.03	0.77	0.20	319	0.87	0.13	0.01	0.75	0.24

#### III.4.4. Genes *PRM1* y *PRM2*

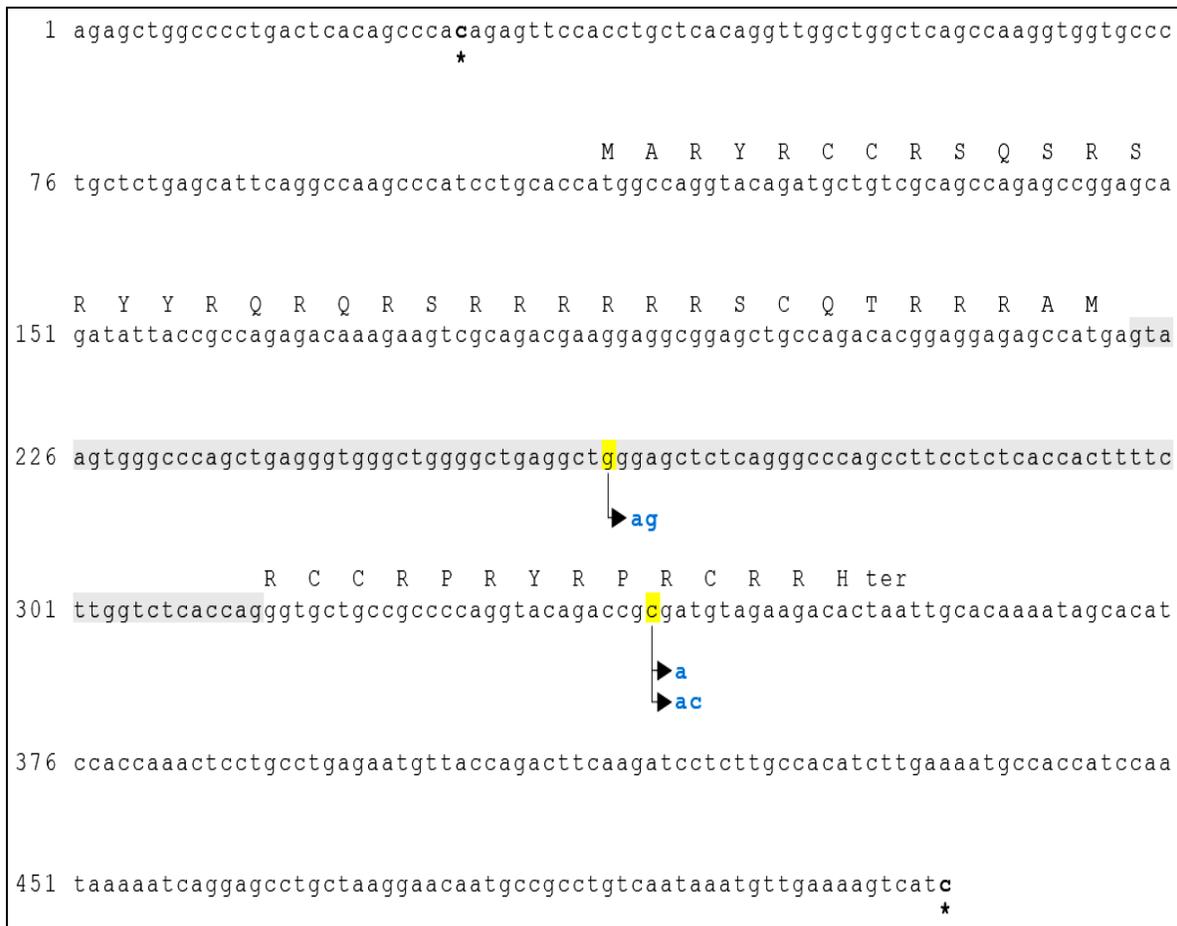
En *PRM1* se identificaron dos polimorfismos, rs201923496 ubicado en el intrón del gen y rs737008 en el exón 2. El SNP intrónico se identificó de manera heterocigota sólo en un paciente infértil normozoospermico; mientras que, el SNP exónico se identificó tanto en pacientes controles como infértiles sin diferencia estadística en las frecuencias genotípicas y alélicas entre ambos grupos (Figura III.6 y III.7, Tabla III.6).



**Figura III.6. Electroferograma de secuenciación de ADN de *PRM1*.** El asterisco (\*) identifica los “rs”. El SNP rs201923496 se muestra en las figuras a.1 (alelo nativo) y a.2 (alelo mutado). El SNP rs737008 se muestra en las figuras b.1 (alelo nativo), b.2 (alelo mutado) y b.3 (genotipo heterocigoto).

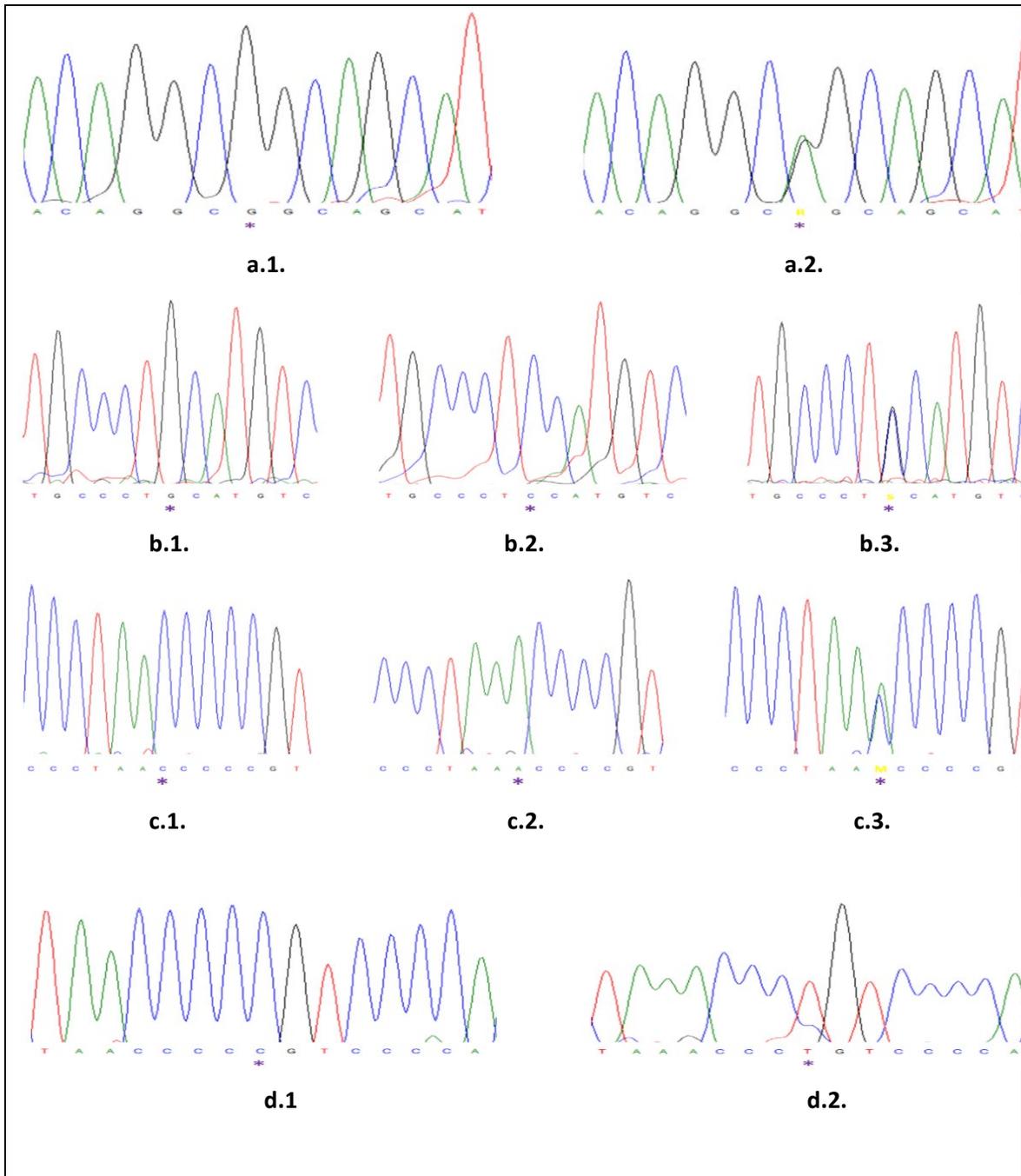
**Tabla III.6. Polimorfismos encontrados en *PRM1* con sus frecuencias genómicas y alélicas. AA: aminoácido.**

dbSNPrs no.	Posición	AA	Individuos con SNP		Frecuencias genotípicas y alélicas			
			Control	Infértiles	Genotipos/ Alelos	Control (n=42)	Infértiles (n=98)	$\chi^2$ <i>calculado</i>
rs201923496	Intrón	-	-	1	GG	1.00	0.99	0.43
					AG	0.00	0.01	0.43
					G	1.00	0.99	0.43
					A	0.00	0.01	0.43
rs737008	Exón 2	R x R	25	56	CC	0.41	0.43	0.07
					AA	0.19	0.15	0.30
					AC	0.40	0.42	0.02
					A	0.39	0.36	0.24
					C	0.61	0.64	0.24

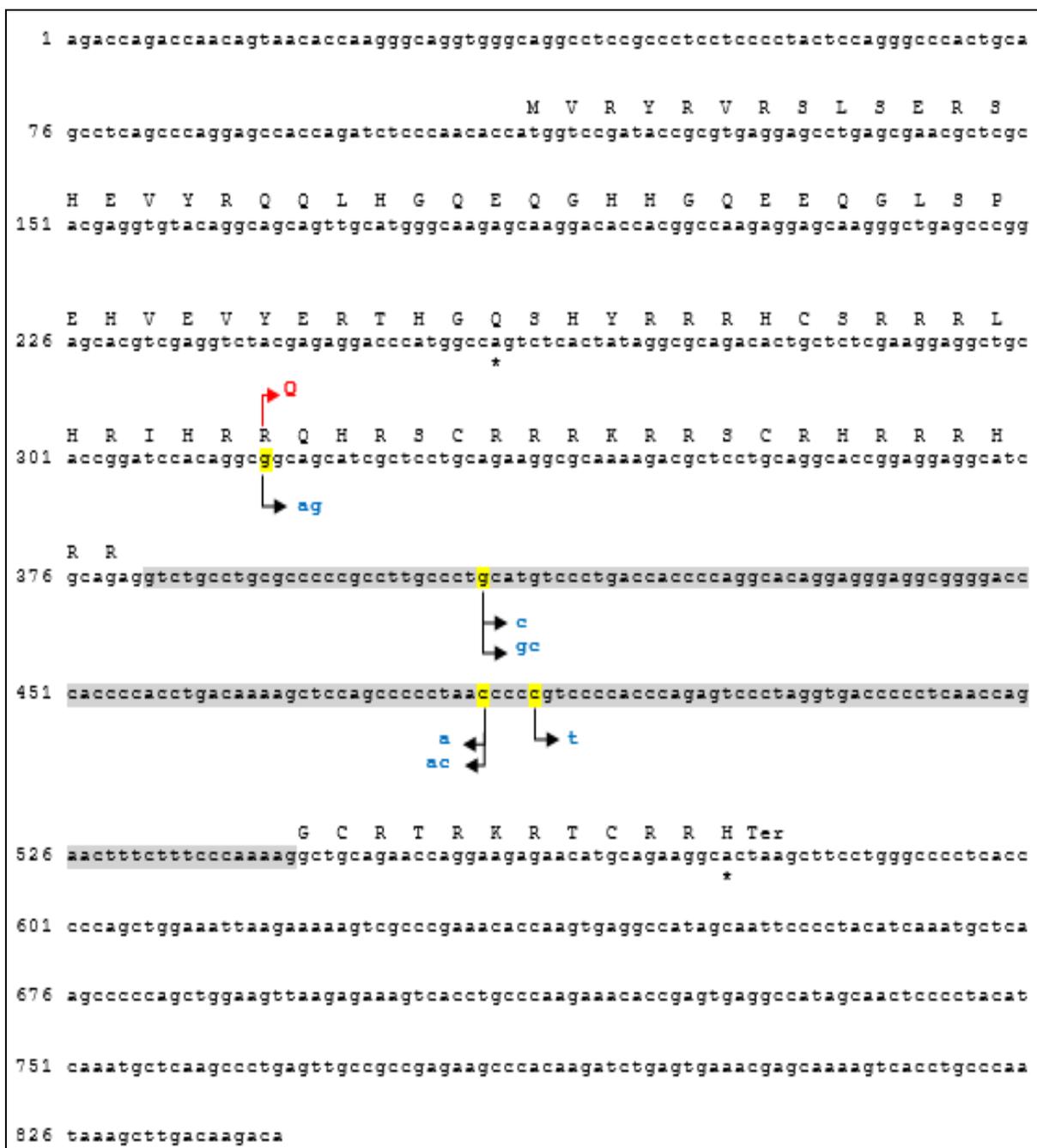


**Figura III.7. Secuencia de ADN genómico y polimorfismos identificados en *PRM1*.** Los nucleótidos de inicio y fin del producto secuenciado se marcan con asterisco (\*). La secuencia del intrón del gen se muestra resaltada en gris. El nucleótido resaltado en amarillo hace referencia al SNP, mientras que las letras en azul bajo estos indican los nucleótidos de reemplazo. Las letras en mayúscula sobre la secuencia hacen referencia a los aminoácidos.

En *Prm2* se identificaron un polimorfismo en el exón 1 y tres en el intrón. Los SPNs intrónicos rs1646022 y rs2070923 se observaron en individuos del grupo control e infértil; mientras que, rs182114260 fue identificado en un solo paciente infértil normozoospermico. Por otro lado, el polimorfismo exónico rs749752404 fue identificado en un solo paciente infértil teratozoospermico (**Figuras III.8 y III.9, Tabla III.7**).



**Figura III.8. Electroferograma de secuenciación de ADN de *PRM2*.** El asterisco (\*) identifica los “rs”. El SNP rs749752404 se muestra en las figuras a.1 (alelo nativo) y a.2 (alelo mutado). El SNP rs1646022 se muestra en las figuras b.1 (alelo nativo), b.2 (alelo mutado) y b.3 (genotipo heterocigoto). El SNP rs2070923 se muestra en las figuras c.1 (alelo nativo), c.2 (alelo mutado) y c.3 (genotipo heterocigoto). El SNP rs182114260 se muestra en las figuras d.1 (alelo nativo), y d.2 (alelo mutado).



**Figura III.9. Secuencia de ADN genómico y polimorfismos identificados en *PRM2*.** Los nucleótidos de inicio y fin del producto secuenciado se marcan con asterisco (\*). La secuencia del intrón del gen se muestra resaltada en gris. El nucleótido resaltado en amarillo hace referencia al SNP, mientras que las letras en azul bajo estos indican los nucleótidos de reemplazo. Las letras en mayúscula sobre la secuencia hacen referencia a los aminoácidos.

Tabla III.7. Polimorfismos encontrados en *PRM2* con sus frecuencias genómicas y alélicas.

dbSNPrs no.	Posición	AA	Individuos con SNP		Frecuencias genotípicas y alélicas			
			Control	Infértiles	Genotipos /Alelos	Controles (n=37)	Infértiles (n=83)	$\chi^2$ calculado
rs749752404	Exón 1	R x Q	-	1	GG	1.00	0.99	0.45
					AG	0.00	0.01	0.45
					G	1.00	0.99	0.45
					A	0.00	0.01	0.45
rs1646022	Intrón	-	4	6	GG	0.86	0.92	0.73
					CC	0.08	0.07	0.03
					CG	0.05	0.01	1.85
					G	0.89	0.92	0.57
					C	0.11	0.08	0.57
rs2070923	Intrón	-	29	71	CC	0.22	0.14	0.95
					AA	0.49	0.53	0.20
					AC	0.30	0.33	0.09
					C	0.36	0.31	0.78
					A	0.64	0.69	0.78
rs182114260	Intrón	-	-	1	CC	1.00	0.99	0.45
					TT	0.00	0.01	0.45
					C	1.00	0.99	0.90
					T	0.00	0.01	0.90

Al analizar la distribución de frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo rs737008 de *PRM1* en los pacientes infértiles, agrupándolos como normozoospermicos, alteraciones en semen (todas las alteraciones) y teratozoospermicos (sólo alteración de morfología espermática), se observa una ligera tendencia de la frecuencia genotípica AC en hombres infértiles con alteraciones seminales y teratozoospermicos aunque no se encontraron diferencias estadísticas en la distribución de estas (Figura III.10).

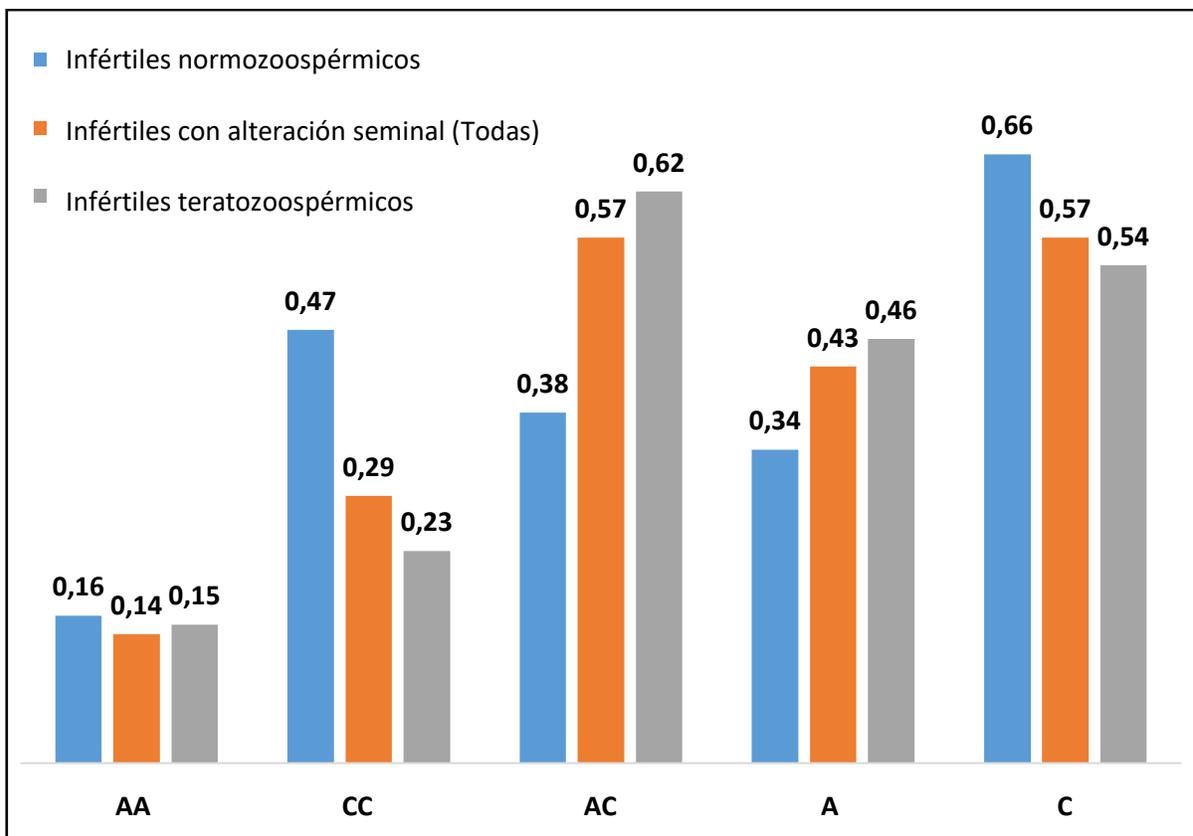


Figura III.10. Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo rs737008 (*PRM1*) en pacientes infértiles normozoospermicos vs. semen alterado (todas las alteraciones y teratozoospermicos).

Por otra parte, de los polimorfismos identificados en los genes de protamina, rs737008 (*PRM1*) (Tabla III.8), rs1646022 y rs2070923 (*PRM2*) (Tabla III.9 y III.10), han sido ampliamente descrito en poblaciones de Europa y Asia; mientras que rs201923496 (*PRM1*) sólo se ha identificado por Jodar et al., 2011 en un individuo infértil de en población española.

**Tabla III.8. Frecuencia alélica y genotípica del polimorfismo rs7378008 (PRM1) en diferentes poblaciones.**

Referencia	Población Estudiada	Control						Infértiles					
		Casos (n)	A	C	AA	CC	AC	Casos (n)	A	C	AA	CC	AC
Presente estudio	Ecuatoriana	42	0.39	0.61	0.19	0.41	0.40	98	0.36	0.64	0.15	0.43	0.42
Jian et al. (2017)	China	442	-	-	0.10	0.54	0.36	636	-	-	0.07	0.54	0.39
Grassetti et al. (2012)	Italiana	-	-	-	-	-	-	163	0.63	0.37	0.37	0.12	0.51
He Xiao et al. (2012)	China	376	0.26	0.74	-	0.56	-	304	0.29	0.71	-	0.53	-
Nabi et al. (2018)	Iraní	87	0.47	0.53	0.17	0.25	0.58	92	0.33	0.67	0.13	0.47	0.40
Venkatesh et al. (2011)	Hindú	100	0.40	0.60	0.28	0.48	0.24	100	0.34	0.66	0.24	0.56	0.20
Jodar et al. (2010)	Española/	102	0.66	0.34	0.14	0.46	0.40	156	0.72	0.28	0.08	0.51	0.41
	Sueca	50	0.77	0.23	0.08	0.52	0.40	53	0.70	0.30	0.04	0.43	0.53
Aoki et al. (2006)	Europea	192	0.62	0.38	0.42	0.16	0.42	96	0.66	0.34	0.45	0.12	0.43
Tanaka et al. (2003)	Japonesa	270	-	-	0.09	0.48	0.43	226	-	-	0.07	0.55	0.38

**Tabla III.9. Frecuencia alélica y genotípica de polimorfismos rs1646022 (PRM2) en diferentes poblaciones.**

Referencia	Población estudiada	Control					Infértiles						
		Casos (n)	C	G	CC	GG	CG	Casos (n)	C	G	CC	GG	CG
Presente estudio	Ecuatoriana	37	0.11	0.89	0.08	0.86	0.05	83	0.08	0.92	0.07	0.92	0.01
Jian et al. (2017)	China	442	-	-	0.53	0.09	0.38	636	-	-	0.53	0.06	0.41
Tanaka et al. (2003)	Japonesa	270	-	-	0.09	0.47	0.44	226	-	-	0.08	0.56	0.35
Grassetti et al. (2012)	Italiana	-	-	-	-	-	-	163	0.44	0.56	0.17	0.29	0.54
Nabi et al. (2018)	Iraní	92	0.36	0.64	0.08	0.36	0.56	87	0.39	0.61	0.10	0.31	0.59
Venkatesh et al. (2011)	Hindú	100	0.02	0.98	0.02	0.98	0.00	100	0.00	1.00	0.00	1.00	0.00
Jodar et al. (2010)	Española	50	0.40	0.60	0.22	0.42	0.36	111	0.44	0.56	0.19	0.32	0.49
Aoki et al. (2006)	Europea	96	0.36	0.64	0.13	0.41	0.46	192	0.38	0.62	0.16	0.40	0.44

**Tabla III.10. Frecuencia alélica y genotípica del polimorfismo rs2070923 (*PRM2*) en diferentes poblaciones.**

Referencia	Población estudiada	Control						Infértiles					
		Casos (n)	A	C	AA	CC	AC	Casos (n)	A	C	AA	CC	AC
Presente estudio	Ecuatoriana	37	0.64	0.36	0.49	0.22	0.30	83	0.69	0.31	0.53	0.14	0.33
Jian et al. (2017)	China	442	-	-	0.53	0.11	0.36	636	-	-	0.52	0.07	0.41
He Xiao et al. (2012)	China	376	0.74	0.26	0.54	-	-	306	0.71	0.29	0.53	-	-
Tanaka et al. (2003)	Japonesa	270	-	-	0.47	0.09	0.44	226	-	-	0.55	0.08	0.36
Nabi et al. (2018)	Iraní	87	0.60	0.40	0.43	0.23	0.34	92	0.43	0.57	0.28	0.15	0.57
Venkatesh et al. (2011)	Hindú	100	0.40	0.60	0.40	0.60	0.00	100	0.35	0.65	0.25	0.55	0.20
Grassetti et al. (2012)	Italiana	-	-	-	-	-	-	163	0.36	0.64	0.12	0.40	0.48
Jodar et al. (2010)	Española	50	0.33	0.67	0.1	0.44	0.46	111	0.25	0.75	0.07	0.58	0.35
Aoki et al. (2006)	Europea	96	0.35	0.65	0.12	0.42	0.46	192	0.32	0.68	0.14	0.48	0.38

### **III.5. Discusión**

La infertilidad masculina es un problema de salud severo y común que afecta aproximadamente al 7% de la población masculina a nivel mundial; siendo al menos, el 15% de los casos diagnosticados con infertilidad idiopática, relacionados a problemas genéticos cromosómicos o de alteraciones genéticas simples (Carrell, 2007; Krausz et al., 2015). Dentro de los genes que se estudian para evaluar su asociación a la infertilidad y sub-infertilidad masculina están *TNP1*, *TNP2*, *PRM1* y *PRM2*, los mismos que se encuentran involucrados en proceso de reorganización de la cromatina durante la espermiogénesis (Aydos et al., 2018; Carrell, 2007; Oliva & Castillo, 2011; Rathke et al., 2014). Se ha descrito ampliamente la presencia de SNPs en estos 4 genes, en poblaciones asiáticas y europeas. Este sería el primer trabajo que estudia polimorfismos en estos genes en población mestizo-ecuatoriana, encontrando un total de 9 SNPs (rs62180545 en *TNP1*, rs11640138 y rs56069754 en *TNP2*, rs201923496 y rs737008 en *PRM1*, y rs749752404, rs182114260, rs1646022 y rs2070923 en *PRM2*).

En el caso de los polimorfismos identificados para *TNP1* y *TNP2* en nuestra población de estudio, no mostraron relación con la fertilidad y no serían factor de riesgo de infertilidad en el varón, al igual que en otras poblaciones estudiadas (Aoki et al., 2006; Heidari et al., 2019; Khattri et al., 2011; Miyagawa et al., 2005; Venkatesh et al., 2011). Sin embargo, un polimorfismo en *TNP2* (rs8043625), no encontrado en nuestra población de estudio pero sí descrito en población iraní, si ha sido asociación a infertilidad (Heidari et al., 2019). Llama la atención que todos los individuos que presentaron el polimorfismo intrónico rs56069754, también presentaron el SNP exónico rs11640138, en *TNP2*; sin embargo, este haplotipo no se ha asociado a causa de infertilidad (Khattri et al., 2011). El cambio del aminoácido 131 (arginina a triptófano) que provoca el SNP exónico de *TNP2* (rs11640138) sería benigno al no provocar un impacto funcional (Khattri et al., 2011); sin embargo, algunos polimorfismos de *TNP1* y *TNP2* que alteraren los aminoácidos sí podrían afectar la función proteica de *TNP1* y *TNP2* a través de efectos conformacionales, consiguiendo alterar la incorporación adecuada de protamina en la cromatina espermática (Aoki et al., 2006).

Respecto a los polimorfismos identificados en el gen *PRM1*, si bien la mayoría no han sido asociados a infertilidad del varón, existe controversia respecto a algunos SNPs de *PRM1* como rs2301365 en la región 5'UTR asociado en ciertas poblaciones a la infertilidad (Abdallah et al., 2019; Aydos et al.,

2018), mientras que en otras poblaciones no se encuentra diferencia estadística en las frecuencias alélicas o genotípicas entre individuos infértiles o grupo control (He et al., 2012; Jiang et al., 2017; Jodar et al., 2011). Así mismo el polimorfismo rs35576928 en el exón del gen, sólo un trabajo que estudia a población china encontró asociación del mismo a la infertilidad (He et al., 2012), mientras que en otras poblaciones estudiadas no se asoció a la infertilidad masculina (Aoki et al., 2006; Aydos et al., 2018; Grasseti et al., 2012; Jodar et al., 2011; Nabi et al., 2018). El polimorfismo de alta frecuencia rs737008 de *PRM1* identificado en la población mestizo-ecuatoriana no han sido asociados a infertilidad masculina, al igual que en otras poblaciones previamente descrito (Aoki et al., 2006; Grasseti et al., 2012; He et al., 2012; Jiang et al., 2017; Jodar et al., 2011; Nabi et al., 2018; Tanaka et al., 2003; Venkatesh et al., 2011). Por otro lado, el polimorfismo raro rs201923496 (*PRM1*) sólo se encontró en un individuo infértil dentro de la población mestizo-ecuatoriana, al igual que lo publicado previamente por (Jodar et al., 2011) quien identificó este polimorfismo sólo en un individuo infértil en población española que estudió. Los polimorfismos descritos para *PRM2* en diversas poblaciones estudiadas, no han mostrado relación con la infertilidad masculina (Aoki et al., 2006; Grasseti et al., 2012; He et al., 2012; Jiang et al., 2017; Jodar et al., 2011; Nabi et al., 2018; Tanaka et al., 2003; Venkatesh et al., 2011), dentro de los que se encuentran rs1646022 y rs2070923, polimorfismos comunes, que también fueron identificados en este trabajo sin relación con la infertilidad. Por otro lado, los polimorfismos rs749752404 y rs182114260 también encontrados en el presente estudio sin relación con la infertilidad masculina, no han sido reportados previamente en publicaciones revisadas.

En el caso de los polimorfismos identificados en las regiones codificantes de los genes de protamina, rs737008 (*PRM1*) no induce cambio de aminoácido, mientras que rs749752404 (*PRM2*) si provoca cambio del aminoácido arginina por glutamina. Si bien, se tiene claro que variaciones en las regiones codificantes de los genes de protamina podrían provocar alteración de la estructura de las proteínas y perturbarían la espermatogénesis (He et al., 2012), pudiendo alterar la conformación proteica (Aoki et al., 2006). No se puede definir si el nuevo polimorfismo rs749752404 afecta estructuralmente a la proteína *PRM2* y al proceso de la espermatogénesis, ya que sólo fue identificado de manera heterocigota en un sólo individuo infértil con teratozoospermia.

Las regiones 5'-UTR y 3'-UTR de los genes de protamina son consideradas críticas para la regulación adecuada de la transcripción y traducción de ambos genes, encontrándose resultados variables

respecto a la presencia de polimorfismos en estas regiones y su relación con la fertilidad masculina (Abdallah et al., 2019; Aoki et al., 2006; Aydos et al., 2018; He et al., 2012; Jiang et al., 2018; Jiang et al., 2015; Jodar et al., 2011). En nuestra población estudiada, en la región 3'-UTR de *PRM1* no se encontró ningún polimorfismo; mientras que, las regiones 5'UTR de ambos genes, ni la región 3'-UTR de *PRM2* fueron evaluadas.

Por otro lado, la delección completa de estos cuatro genes no ha sido reportado en el ser humano, lo cual tampoco observamos en nuestras muestras analizadas. Estudios de knockout de estos genes en ratones han demostrado afectación sobre la espermatogénesis y espermiogénesis (Meistrich et al., 2003; Oliva, 2006); sin embargo, en esta parte del estudio no se evaluó la expresión de estos genes. Por lo que tampoco podemos saber si alguno de estos polimorfismos afecta a la expresión de estos.

Respecto a la distribución de las frecuencias genéticas y alélicas de los polimorfismos en estos genes entre ecuatorianos y otras poblaciones, se debe considerar que la población mestiza ecuatoriana tiene contribución europea (70%), amerindia (22%), y africana (2%), según marcadores del cromosoma Y (Paz-Y-Miño et al., 2016). Por lo que la aparentemente similitud en la distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas de ciertos polimorfismos encontrados en esta población con la de poblaciones europeas y africanas pueda ser debido al origen ético/geográfico de la población estudiada, como es el caso de rs7378008 (*PRM1*) y rs2070923 (*PRM2*); sin embargo, esto no fue posible confirmarlo ya que no se pudo realizar una evaluación estadística. Por otro lado, el polimorfismo rs62180545 de *TNP1* sólo ha sido identificado previamente en algunas poblaciones asiáticas (población china, japonesa e hindú) (Jiang et al., 2017; Miyagawa et al., 2005; Venkatesh et al., 2011), y rs56069754 de *TNP2* ha sido identificado previamente sólo en población hindú de manera homocigota y heterocigota (Khattri et al., 2011). El polimorfismo rs11640138 de *TNP2* ha sido ampliamente identificado de manera homocigota y heterocigota en población europea como asiáticas (hindú, japonesa, iraní) (Aoki et al., 2006; Heidari et al., 2019; Khattri et al., 2011; Miyagawa et al., 2005; Venkatesh et al., 2011).

### **III.6. Conclusiones**

Las principales conclusiones que se extraen de este capítulo son las siguientes:

1. Dentro de la población mestizo-ecuatoriana, se identificaron varios polimorfismos entre los genes *TNP1*, *TNP2*, *PRM1* y *PRM2*, tanto en varones infértiles como fértiles. Algunas de estas variantes identificadas ya han sido reportadas en diferentes poblaciones europeas y asiáticas, lo cual sugiere que la población mestiza ecuatoriana es híbrida con contribución de diferentes regiones del mundo.
2. Este trabajo es el primero en describir polimorfismos en los genes involucrados en la compactación del ADN espermático dentro de la población mestiza en Ecuador. Es necesario ampliar los estudios en esta población, ya que es considerada altamente híbrida y es la más extendida dentro de Ecuador.

### **III.7. Bibliografía**

- (WHO), W. H. O. (2022). *Infertility*. [https://www.who.int/health-topics/infertility#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/infertility#tab=tab_1)
- Abdallah, W. I., Hussein, T. M., Elsayed, E. T., & Bahgat, R. S. (2019). The c.-190 C>A transversion in promoter region of protamine 1 gene as a genetic risk factor in Egyptian men with idiopathic infertility. *Andrologia*, 51(9), e13367. <https://doi.org/10.1111/and.13367>
- Agarwal, A., Mulgund, A., Hamada, A., & Chyatte, M. R. (2015). A unique view on male infertility around the globe. *Reprod Biol Endocrinol*, 13, 37. <https://doi.org/10.1186/s12958-015-0032-1>
- Aoki, V. W., Christensen, G. L., Atkins, J. F., & Carrell, D. T. (2006). Identification of novel polymorphisms in the nuclear protein genes and their relationship with human sperm protamine deficiency and severe male infertility. *Fertil Steril*, 86(5), 1416-1422. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2006.04.033>
- Aydos, O. S. E., Hekmatshoar, Y., Altınok, B., Özkan, T., Şakırağaoğlu, O., Karadağ, A., . . . Aydos, K. (2018). Genetic Polymorphisms in PRM1, PRM2, and YBX2 Genes are Associated with Male Factor Infertility. *Genet Test Mol Biomarkers*, 22(1), 55-61. <https://doi.org/10.1089/gtmb.2017.0040>
- Cannarella, R., Condorelli, R. A., Duca, Y., La Vignera, S., & Calogero, A. E. (2019). New insights into the genetics of spermatogenic failure: a review of the literature. *Hum Genet*, 138(2), 125-140. <https://doi.org/10.1007/s00439-019-01974-1>
- Canovas, S., & Ross, P. J. (2016). Epigenetics in preimplantation mammalian development. *Theriogenology*, 86(1), 69-79. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.020>
- Carrell, D. T. (2007). *The genetics of male infertility*. Humana Press.
- Chu, K. Y., Patel, P., & Ramasamy, R. (2019). Consideration of gender differences in infertility evaluation. *Curr Opin Urol*, 29(3), 267-271. <https://doi.org/10.1097/MOU.0000000000000590>
- De Celis, R., Feria-Velasco, A., González-Unzaga, M., Torres-Calleja, J., & Pedrón-Nuevo, N. (2000). Semen quality of workers occupationally exposed to hydrocarbons. *Fertil Steril*, 73(2), 221-228. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(99\)00515-4](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(99)00515-4)
- Fainberg, J., & Kashanian, J. A. (2019). Recent advances in understanding and managing male infertility. *F1000Res*, 8. <https://doi.org/10.12688/f1000research.17076.1>

- Grassetti, D., Paoli, D., Gallo, M., D'Ambrosio, A., Lombardo, F., Lenzi, A., & Gandini, L. (2012). Protamine-1 and -2 polymorphisms and gene expression in male infertility: an Italian study. *J Endocrinol Invest*, 35(10), 882-888. <https://doi.org/10.3275/8111>
- He, X. J., Ruan, J., Du, W. D., Chen, G., Zhou, Y., Xu, S., . . . Zhang, X. J. (2012). PRM1 variant rs35576928 (Arg>Ser) is associated with defective spermatogenesis in the Chinese Han population. *Reprod Biomed Online*, 25(6), 627-634. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2012.09.005>
- Heidari, M. M., Danafar, A., Moezzi, F., Khatami, M., & Talebi, A. R. (2019). The association between. *Int J Reprod Biomed (Yazd)*, 17(8), 557-566. <https://doi.org/10.18502/ijrm.v17i8.4821>
- Ilaqua, A., Izzo, G., Emerenziani, G. P., Baldari, C., & Aversa, A. (2018). Lifestyle and fertility: the influence of stress and quality of life on male fertility. *Reprod Biol Endocrinol*, 16(1), 115. <https://doi.org/10.1186/s12958-018-0436-9>
- Inhorn, M. C., & Patrizio, P. (2015). Infertility around the globe: new thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21st century. *Hum Reprod Update*, 21(4), 411-426. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmv016>
- Jiang, W., Shi, L., Liu, H., Cao, J., Zhu, P., Zhang, J., . . . Xia, X. (2018). Systematic review and meta-analysis of the genetic association between protamine polymorphism and male infertility. *Andrologia*, 50(5), e12990. <https://doi.org/10.1111/and.12990>
- Jiang, W., Sun, H., Zhang, J., Zhou, Q., Wu, Q., Li, T., . . . Xia, X. (2015). Polymorphisms in Protamine 1 and Protamine 2 predict the risk of male infertility: a meta-analysis. *Sci Rep*, 5, 15300. <https://doi.org/10.1038/srep15300>
- Jiang, W., Zhu, P., Zhang, J., Wu, Q., Li, W., Liu, S., . . . Xia, X. (2017). Polymorphisms of protamine genes contribute to male infertility susceptibility in the Chinese Han population. *Oncotarget*, 8(37), 61637-61645. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18660>
- Jodar, M., Oriola, J., Mestre, G., Castillo, J., Giwercman, A., Vidal-Taboada, J. M., . . . Oliva, R. (2011). Polymorphisms, haplotypes and mutations in the protamine 1 and 2 genes. *Int J Androl*, 34(5 Pt 1), 470-485. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2010.01115.x>
- Khattari, A., Bhushan, S. S., Sireesha, V., Gupta, N. J., Chakravarty, B. N., Deendayal, M., . . . Thangaraj, K. (2011). The TNP1 haplotype - GCG is associated with azoospermia. *Int J Androl*, 34(2), 173-182. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2010.01072.x>
- Krausz, C., Escamilla, A. R., & Chianese, C. (2015). Genetics of male infertility: from research to clinic. *Reproduction*, 150(5), R159-174. <https://doi.org/10.1530/REP-15-0261>

- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol*, 33(7), 1870-1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Lotti, F., & Maggi, M. (2018). Sexual dysfunction and male infertility. *Nat Rev Urol*, 15(5), 287-307. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2018.20>
- Meistrich, M. L., Mohapatra, B., Shirley, C. R., & Zhao, M. (2003). Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis. *Chromosoma*, 111(8), 483-488. <https://doi.org/10.1007/s00412-002-0227-z>
- Miyagawa, Y., Nishimura, H., Tsujimura, A., Matsuoka, Y., Matsumiya, K., Okuyama, A., . . . Tanaka, H. (2005). Single-nucleotide polymorphisms and mutation analyses of the TNP1 and TNP2 genes of fertile and infertile human male populations. *J Androl*, 26(6), 779-786. <https://doi.org/10.2164/jandrol.05069>
- Nabi, A., Khalili, M. A., Moshrefi, M., Sheikhha, M. H., Zare Mehrjardi, E., & Ashrafzadeh, H. R. (2018). Polymorphisms in protamine 1 and 2 genes in asthenozoospermic men: A case-control study. *Int J Reprod Biomed (Yazd)*, 16(6), 379-386.
- Oliva, R. (2006). Protamines and male infertility. *Hum Reprod Update*, 12(4), 417-435. <https://doi.org/10.1093/humupd/dml009>
- Oliva, R., & Castillo, J. (2011). Proteomics and the genetics of sperm chromatin condensation. *Asian J Androl*, 13(1), 24-30. <https://doi.org/10.1038/aja.2010.65>
- Paz-Y-Miño, C., Guillen Sacoto, M. J., & Leone, P. E. (2016). Genetics and genomic medicine in Ecuador. *Mol Genet Genomic Med*, 4(1), 9-17. <https://doi.org/10.1002/mgg3.192>
- Pourmasumi, S., Sabeti, P., Rahiminia, T., Mangoli, E., Tabibnejad, N., & Talebi, A. R. (2017). The etiologies of DNA abnormalities in male infertility: An assessment and review. *Int J Reprod Biomed (Yazd)*, 15(6), 331-344.
- Rathke, C., Baarends, W. M., Awe, S., & Renkawitz-Pohl, R. (2014). Chromatin dynamics during spermiogenesis. *Biochim Biophys Acta*, 1839(3), 155-168. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2013.08.004>
- Steger, K., & Balhorn, R. (2018). Sperm nuclear protamines: A checkpoint to control sperm chromatin quality. *Anat Histol Embryol*, 47(4), 273-279. <https://doi.org/10.1111/ahc.12361>
- Tanaka, H., Miyagawa, Y., Tsujimura, A., Matsumiya, K., Okuyama, A., & Nishimune, Y. (2003). Single nucleotide polymorphisms in the protamine-1 and -2 genes of fertile and infertile human male populations. *Mol Hum Reprod*, 9(2), 69-73. <https://doi.org/10.1093/molehr/gag010>

- Venkatesh, S., Kumar, R., Deka, D., Deecaraman, M., & Dada, R. (2011). Analysis of sperm nuclear protein gene polymorphisms and DNA integrity in infertile men. *Syst Biol Reprod Med*, 57(3), 124-132. <https://doi.org/10.3109/19396368.2011.562960>
- Ward, W. S. (1993). Deoxyribonucleic acid loop domain tertiary structure in mammalian spermatozoa. *Biol Reprod*, 48(6), 1193-1201. <https://doi.org/10.1095/biolreprod48.6.1193>
- World Health Organization, D. o. R. H. a. R. (2010). *WHO laboratory manual for the examination and procesing of human semen*. (W. H. Organization, Ed. 5th. ed.). World Health Organization

## CAPÍTULO IV. INFERTILIDAD MASCULINA Y SU RELACIÓN CON LA PROTAMINACIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS GENES *PRM1* Y *PRM2* EN ESPERMATOZOIDES

### IV.1. Introducción

El espermatozoide, producto final del proceso de espermatogénesis, es una célula altamente organizada y diferenciada, con un sistema de empaquetamiento único del ADN que da lugar a una cromatina altamente condensada (Eddy, 2006; Mortimer, 2018). Esta condensación de cromatina espermática es una de las características más importantes del espermatozoide maduro, siendo esencial para que se produzca la fecundación y un desarrollo embrionario adecuado (Hao et al., 2019; Pourmasumi et al., 2017). El proceso de compactación del ADN que se da durante la espermiogénesis involucra la reorganización de la cromatina basada en histonas, sustituyéndose en su mayoría (85%) por las proteínas nucleares protaminas (Balhorn, 2007; Hammoud et al., 2009; Oliva & Castillo, 2011; Steger & Balhorn, 2018). Este empaquetamiento de la cromatina espermática dado principalmente por las protaminas, proporciona mayor protección del mensaje genético codificado, permitiendo que el espermatozoide cumpla su función principal al entregar la secuencia intacta del ADN paterno al ovocito (Oliva, 2006; Oliva & Castillo, 2011). Por ello, anomalías en la expresión de estas proteínas pueden perturbar la integridad del ADN (Eddy, 2006), lo cual se asocia a la infertilidad masculina (Oliva & Castillo, 2011), baja capacidad fecundante y alteraciones en el desarrollo embrionario tras la fecundación in vitro (Oliva, 2006; Steger & Balhorn, 2018), y pérdida del embarazo (Oliva & Castillo, 2011).

La desregulación de la expresión de protaminas puede deberse a errores en diferentes puntos de la vía de expresión, incluidas mutaciones en los genes de protaminas, regulación anómala de la transcripción, represión o activación incorrecta de la traducción y procesamiento postraduccional incompleto (Aoki et al., 2006), pudiendo ocasionar una proporción alterada de *PRM1/PRM2*, que en humanos está asociada con niveles elevados de fragmentación del ADN e infertilidad masculina (Oliva, 2006; Rathke et al., 2014; Steger & Balhorn, 2018).

El estudio de la protaminación está comenzando a fomentarse dentro de la evaluación de la fertilidad masculina para un mejor diagnóstico de la calidad espermática (Steger & Balhorn, 2018),

siendo una de las técnicas utilizadas la evaluación mediante tinción con cromomicina A3 (CMA3). Esta técnica usa un fluorocromo impermeable a la membrana que compite con las protaminas por los sitios ricos en GC en los surcos del ADN, donde la absorción de CMA3 es un indicador indirecto de la insuficiencia de protamina en los espermatozoides (Gill-Sharma et al., 2011).

Si bien se está considerando el estudio de la protaminación como biomarcador molecular para un mejor diagnóstico de la calidad espermática (Steger & Balhorn, 2018), la etiología de la deficiencia de protamina espermática en hombres infértiles sigue siendo difícil de determinar (Aoki et al., 2006). Por tanto, el estudio de los posibles factores de alteración en la expresión de estas proteínas en el varón infértil es crucial para su tratamiento.

#### **IV.2. Hipótesis y Objetivos**

La hipótesis que se propone plantea que el estado de protaminación de los espermatozoides y la expresión de los genes *PRM1* y *PRM2* están directamente relacionados con la calidad espermática y con variables como el índice de masa corporal, paperas y varicocele, factores que se conoce que repercuten sobre la fertilidad masculina, y con hábitos sociales como el consumo de cigarrillos, horas de uso del teléfono móvil o actividad deportiva.

Los objetivos propuestos son: i) Determinar el nivel de protaminación en espermatozoides de hombres ecuatorianos fértiles normozoospermicos frente a infértiles, mediante la técnica indirecta de cromomicina A3 (CMA3); ii) Cuantificar la expresión de los genes *PRM1* y *PRM2* en dichos grupos; iii) Analizar las diferencias en el estado de protaminación y la expresión de *PRM1* y *PRM2* entre hombres ecuatorianos fértiles normozoospermicos frente a infértiles; iv) Determinar si existe relación del estado de protaminación y expresión de *PRM1* y *PRM2* con otros marcadores de calidad seminal.

### **IV.3. Materiales y Métodos**

#### **IV.3.1. Selección de pacientes masculinos y espermiograma**

Fueron seleccionados individuos que asistieron al centro de reproducción asistida Innaifest de Guayaquil – Ecuador, para estudio de la calidad del semen y/o donación de semen. El Comité de Bioética del Grupo Hospitalario Kennedy aprobó el estudio (oficio No. HCK-CEISH-17-0035) y se obtuvo un consentimiento informado por escrito de cada participante.

El grupo de estudio consistió en pacientes infértiles sin descendencia con rango de edad entre 20 a 55 años ( $33.88 \pm 0.5$ ), mientras que el grupo control fueron varones con fertilidad comprobada (al menos un hijo por concepción natural) y entre 20 y 57 años ( $37.44 \pm 1.43$ ). La edad del grupo infértil fue menor a la del grupo control ( $P=0.01$ ).

Para su inclusión en el estudio, los individuos debían cumplir con los criterios de toma de muestra de semen establecidos en el manual de la OMS para el procesamiento y evaluación de semen humano quinta edición (World Health Organization, 2010). Se consideraron como criterios de exclusión muestras de semen con concentraciones de espermatozoides  $<5 \times 10^6$  por ml, antecedentes oncológicos, tratamientos de quimio o radioterapia, enfermedades cromosómicas o genéticas diagnosticadas o con sospechas de estas.

#### **IV.3.2. Espermiograma y selección espermática**

A todos los participantes se les realizó un espermiograma básico siguiendo el manual de la OMS para el procesamiento y evaluación de semen humano quinta edición (World Health Organization, 2010). El mismo día de toma de muestra de semen, cada participante rellenó una ficha informativa referente a la muestra de semen, historial clínico y factores de estilo de vida que pueden afectar a la calidad seminal.

Todas las muestras de semen seleccionadas fueron sometidas a la técnica de selección espermática *swim up* directa durante 60 minutos, utilizando medio tamponado con Hepes (Global w/HEPES, referencia: LGGH; *CooperSurgical*) y 10% de albúmina de suero humano (HSA, referencia: 9988; *Irvine Scientific*). El sobrenadante se centrifugó 10 minutos a 500g y el sedimento fue resuspendido en 900  $\mu$ l del mismo medio. Las muestras capacitadas fueron evaluadas para determinar la

concentración de espermatozoides, antes de ser divididas en dos alícuotas en tubos de criopreservación y almacenadas a -196°C hasta su posterior procesamiento.

#### **IV.3.3. Tinción CMA3 en espermatozoides**

La evaluación indirecta del empaquetamiento de la cromatina en espermatozoides se realizó mediante el ensayo de cromomicina A3 (CMA3). Para ello, las muestras de espermatozoides capacitadas y almacenadas fueron descongeladas, lavadas y resuspendidas en solución salina tamponada con fosfato (PBS). Con estas muestras se realizó un frotis, dejando secar a temperatura ambiente. Para la fijación se utilizó solución de Carnoy (metanol:ácido acético glacial, 3:1 v/v) a 4°C durante 30 minutos. A continuación, las placas fueron teñidas con solución de CMA3 (*Chromomycin A3 from Streptomyces griseus*, referencia *Sigma* C2659) durante 10 minutos a temperatura ambiente, para luego realizar un lavado con PBS y el montaje con PBS:glicerol (1:1 v/v). Se realizó conteo de 200 espermatozoides por muestra, salvo en los casos que el número de espermatozoides teñidos era menor, usando un microscopio de fluorescencia con objetivo de 100X y con filtro de 450 nm. A partir de las imágenes obtenidas se determinó visualmente el porcentaje de espermatozoides con cabezas amarillo brillante (CMA3 positivo) y sin brillo (CMA3 negativo), interpretando que aquellas con mayor fluorescencia indican menor estado de protaminación.

#### **IV.3.4. Expresión de los genes *PRM1* y *PRM2***

Tras la descongelación de las muestras de semen la extracción de ARN se realizó con el kit *PureLink® RNA Mini Kit* (referencia: 12183018A, 12183025; *Ambion by life technologies*) y DNasa (referencia: 12185-010; *Purelink DNase-Invitrogen*), modificando el centrifugado inicial a 2000g por 15 minutos y adicionando 600 ul de tampón de lisis al sedimento. El ARN extraído fue resuspendido en 50 µl de agua ultrapura libre de ARNasas. El ADN complementario (cDNA) se sintetizó con el kit *M-MLV Reverse Transcriptase* (referencia: 28025-013, 28025-021; *Invitrogen*), utilizando cebadores aleatorios (*random primers*). El cDNA se almacenó a -80°C hasta su uso.

Para la cuantificación de los genes *PRM1* y *PRM2* se realizó PCR en tiempo real con el reactivo *Power SYBR® Green PCR Máster Mix* (referencia: 4368702; *Applied Biosystems, Life Technologies*) en placas de 96 pocillos de 0.3 ml (referencia: 7324898001, *AD-Plate 0.3ml Cobas; Roche*), con el equipo Cobas Z 4800 (Roche). Se utilizaron 2 ul de cDNA por reacción y una concentración de cebadores de 0.5 µM (**Tabla IV.1**). El gen *BETA-ACTINA (BA)* fue considerado como gen de referencia, mientras que el

gen *CD45* como control negativo. Cada uno de los genes evaluados fue amplificado por triplicado en cada muestra analizada. Las secuencias de cebadores utilizados y condiciones de PCR se describen en la Tabla IV.1. Los valores de expresión de *PRM1* y *PRM2* de cada individuo se normalizaron ( $\Delta CT-PRM1$  y  $\Delta CT-PRM2$ ), restando el valor de ciclos umbral (CT) de *BA* (CT-*BA*) a los CT de *PRM1* y *PRM2*. El cálculo del cambio en el nivel de expresión (*fold change*) de *PRM1* y *PRM2* se realizó mediante la fórmula  $2^{\Delta\Delta Ct}$ . El ratio *PRM1/PRM2* se determinó dividiendo el CT de *PRM1* por el CT de *PRM2*, donde los valores inferiores a 1 indican menor expresión de *PRM2* frente a *PRM1*.

**Tabla IV.1. Cebadores utilizados y condiciones de PCR.**

Cebadores				
Gen	Secuencia		Gen	Secuencia
<i>PRM1</i>	F: 5'-CACAGCCCACAGAGTTCCAC-3'		<i>BA</i>	F: 5'-TTCCTTCCTGGGGATGGAGT-3'
	R: 5'-ATCTCGGTCTGTACCTGGGG-3'			R: 5'-TACAGTCTTTGCGGATGTC-3'
<i>PRM2</i>	F: 5'-CAAGAGGAGCAAGGGCTGAG-3'		<i>CD45</i>	F: 5'-CCTTGAACCCGAACATGAGT-3'
	R: 5'-GCCTTCTGCATGTTCTTCTCCT-3'			R: 5'-ATCTTTGAGGGGGATTCCAG-3'

Condiciones de PCR				
-	55 CICLOS			-
	Desnaturalización	Anillamiento	Elongación	
98°C; 30"	98°C; 10"	60°C; 30"	72°C; 50"	72°C; 300"

#### IV.3.5. Análisis estadístico

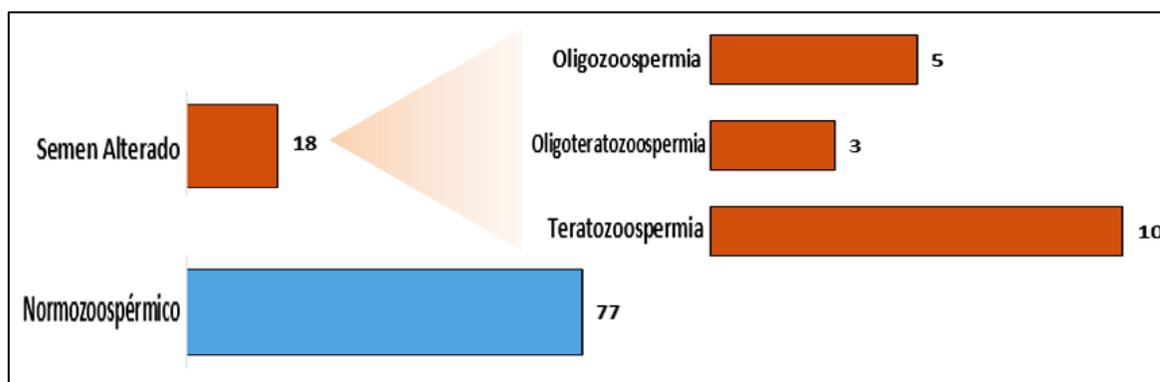
Se realizó análisis descriptivo de las variables y los resultados se expresaron con el valor de la media  $\pm$  error típico. Se comprobó el tipo de distribución de los datos mediante el test *Shapiro-Wilk* y se utilizó el test *U-Mann Whitney* como prueba no paramétrica, o la prueba T de *Student* en casos de distribución normal, para comparar las medias entre grupos (control-fértiles vs. infértiles) y las diferencias con valores de P menores a 0.05 se consideraron estadísticamente significativas. Se realizó análisis de correlación de Pearson, entre las diferentes variables, siendo su interpretación la descrita por Mukaka (2012) donde valores de 0.90-1.00 representa una correlación muy alta y valores de 0.00-0.29 insignificante (Mukaka, 2012).

Las variables clínicas y hábitos sociales considerados fueron el índice de masa corporal (IMC), paperas durante la niñez, varicocele, consumo de cigarrillos/semana (n), actividad deportiva (horas/semana), uso del móvil en el bolsillo delantero del pantalón (horas/semana) y horas de abstinencia sexual. Respecto a la evaluación seminal, las variables consideradas fueron concentración de espermatozoides móviles e inmóviles ( $10^6/\text{ml}$ ), concentración total de espermatozoides ( $10^6/\text{ml}$ ), espermatozoides móviles (%), total espermatozoides móviles ( $10^6$ ), espermatozoides con movilidad progresiva (%), espermatozoides con morfología normal (%), espermatozoides con morfología anormal (%), concentración de espermatozoides móviles e inmóviles ( $10^6/\text{ml}$ ). Por su parte, las variables seminales post capacitación fueron la concentración total de espermatozoides ( $10^6/\text{ml}$ ), espermatozoides móviles (%), total espermatozoides móviles ( $10^6$ ) y espermatozoides con movilidad progresiva (%).

#### **IV.4. Resultados**

##### **IV.4.1. Características de la población de estudio y espermiograma.**

Se incluyeron 131 individuos, entre grupo control (n=35) y pacientes infértiles (n=96). En el grupo control todos los individuos presentaron parámetros seminales dentro del rango de normalidad establecido en el manual de la OMS para el procesamiento y evaluación de semen humano quinta edición (World Health Organization, 2010), mientras que en el grupo de pacientes infértiles coexistían pacientes con parámetros seminales dentro de los rangos de normalidad y otros con parámetros seminales fuera de dicho rango (**Figura IV.1**).



**Figura IV.1. Distribución de individuos del grupo de pacientes infértiles en base a la calidad de semen, a los que se evaluó niveles de CMA3.**

Las características clínicas y parámetros seminales para cada grupo se reflejan en la **Tabla IV.2**.

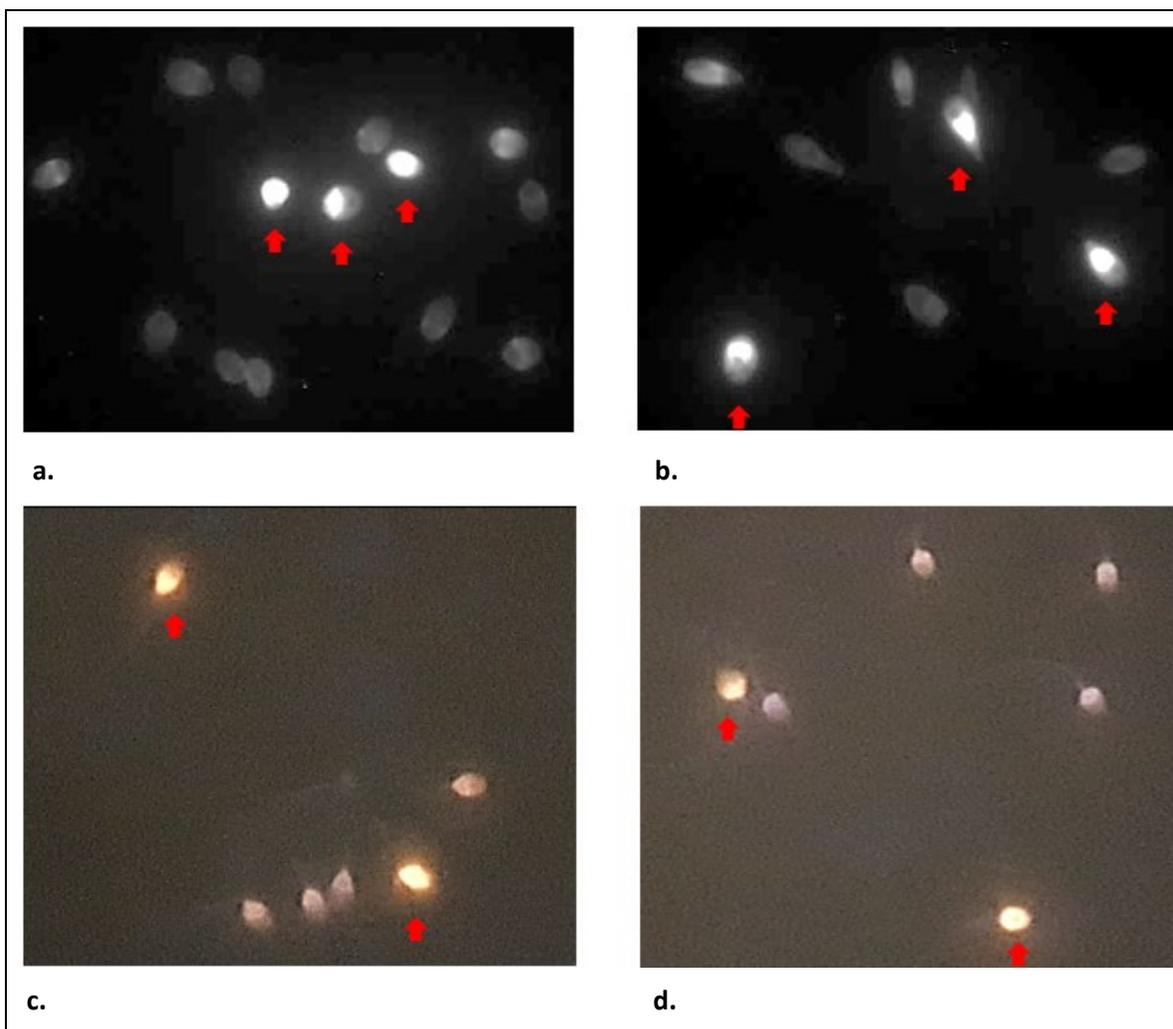
**Tabla IV.2. Características clínicas, seminales y hábitos sociales de los grupos de estudio.**

	<b>Grupo control (N=36)</b>	<b>Grupo infértil (N=95)</b>	<b>Valor P</b>
<b>Características clínicas</b>			
IMC (índice de masa corporal)	27.67±0.62	28.05±0.65	0.34
Individuos con paperas durante la niñez (%)	30.56±0.08	21.05±0.04	0.14
Individuos con varicocele (%)	22.22±0.07	26.32±0.05	0.31
<b>Hábitos sociales</b>			
Consumo cigarrillos/semana (%)	29.9±2.04	23.3±1.04	0.39
Actividad deportiva (horas/semana)	1.99±0.51	2.34±0.28	0.28
Móvil en bolsillo delantero de pantalón (horas/semana)	22.83±4.10	29.93±2.31	0.07
<b>Características seminales</b>			
Horas de abstinencia sexual	87.56±4.74	87.23±3.92	0.48
Concentración de espermatozoides (10 <sup>6</sup> /ml)	47.52±4.71	44.18±3.14	0.28
Concentración total de espermatozoides (10 <sup>6</sup> /ml)	141.99±15.86	134.36±10.65	0.35
Espermatozoides móviles (%)	<b>57.24±2.75</b>	<b>51.85±1.68</b>	<b>0.05*</b>
Total de espermatozoides móviles (10 <sup>6</sup> )	84.87±11.43	67.98±6.75	0.10
Espermatozoides con movilidad progresiva (%)	92.06±1.44	90.43±0.95	0.18
Espermatozoides con morfología normal (%)	15.47±1.10	13.84±0.86	0.12
<b>Espermatozoides con morfología anormal (%)</b>			
Anormalidades de cabeza (%)	46.69±1.84	43.81±1.24	0.10
Anormalidades de pieza media (%)	21.83±1.06	22.72±0.67	0.24
Anormalidades de cola (%)	<b>15.33±1.20</b>	<b>19.26±0.83</b>	<b>0.004*</b>
Células espermáticas inmaduras	0.39±0.12	0.26±0.05	0.18
<b>Características seminales post- selección espermática por técnica de <i>swim up</i></b>			
Concentración de espermatozoides (10 <sup>6</sup> /ml)	7.91±1.05	8.83±0.98	0.26
Concentración total de espermatozoides (10 <sup>6</sup> /ml)	3.95±0.53	4.42±0.49	0.26
Espermatozoides móviles (%)	93.63±0.98	90.94±1.36	0.06
Total espermatozoides móviles (10 <sup>6</sup> )	3.76±0.52	4.16±0.47	0.29
Espermatozoides con movilidad progresiva (%)	96.42±2.51	97.29±0.76	0.37

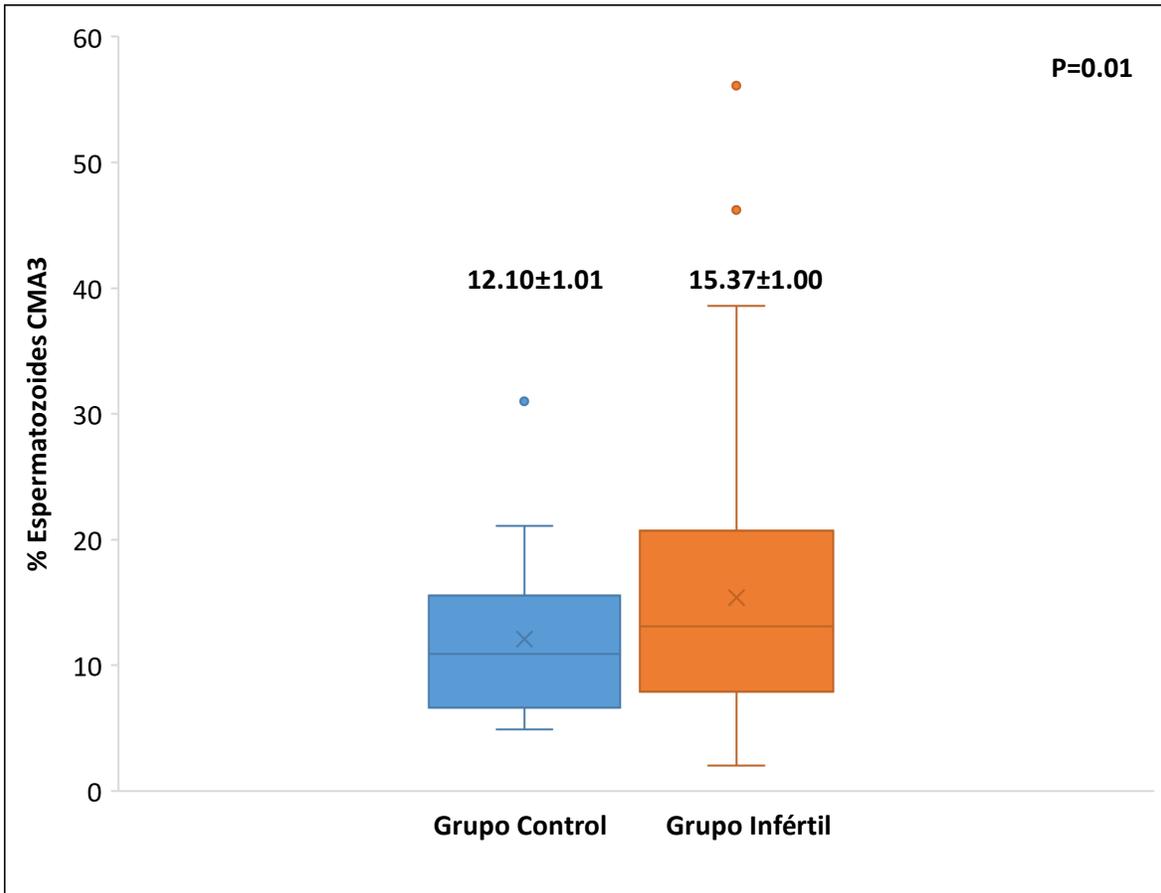
\*Diferencia estadística (P≤0.05) entre grupo control e infértil.

#### IV.4.2. Tinción CMA3 en espermatozoides

En la evaluación indirecta del empaquetamiento de la cromatina en espermatozoides mediante la técnica de cromomicina A3 (CMA3) por fluorescencia (**Figura IV.2**), se encontraron diferencias significativas entre el grupo infértil vs grupo control ( $15.37 \pm 1.00$  vs.  $12.10 \pm 1.01$ ,  $P=0.01$ ), siendo mayor el porcentaje de espermatozoides CMA3 en el primer grupo mencionado. Al evaluar estos resultados en diagrama de cajas, se observa una distribución de datos simétrica siendo algo más dispersos en el grupo de pacientes infértiles y con pocos valores atípicos en ambos grupos. (**Figura IV.3**).

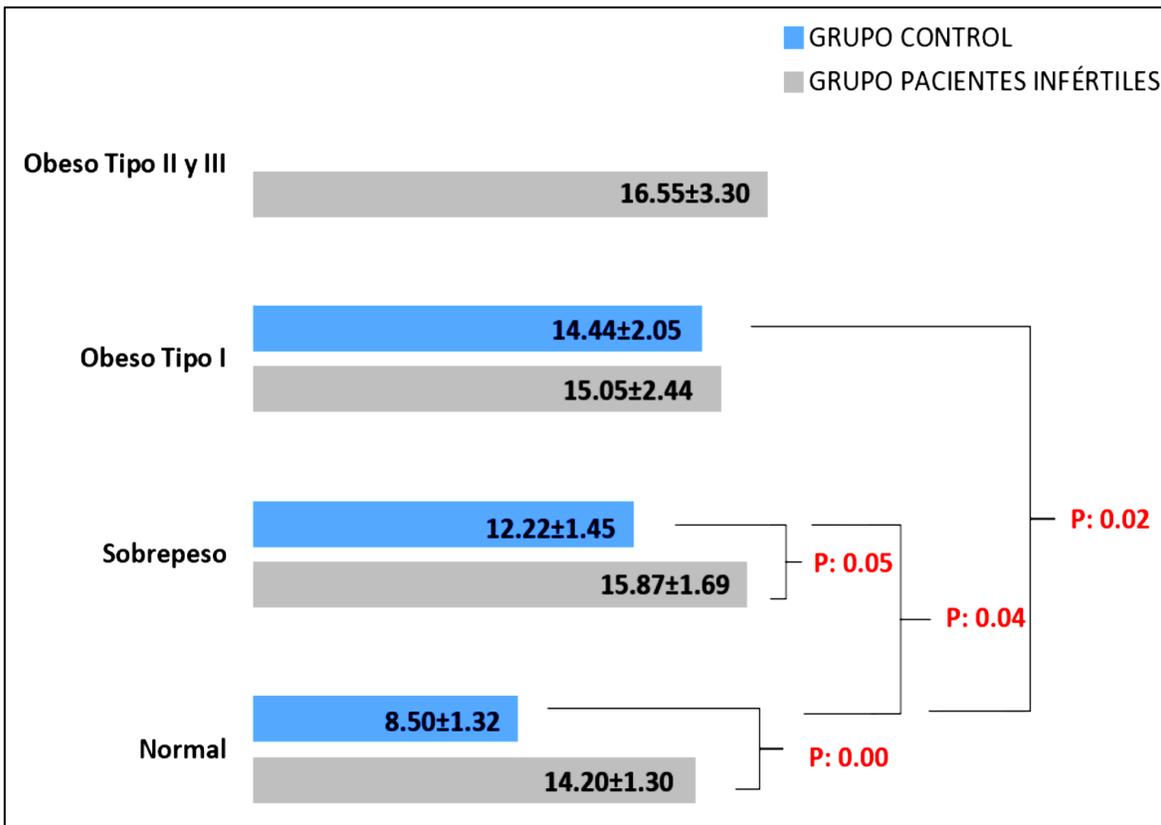


**Figura IV.2. Visualización de espermatozoides mediante microscopía de fluorescencia (objetivo 100X y filtro de 450 nm) tras la tinción con CMA3. Las flechas indican espermatozoides considerados CMA3+. Las imágenes a y b se capturaron de manera monocromática, mientras que las c y d en color.**



**Figura IV.3. Distribución de valores de CMA3 (porcentaje de células positivas) en grupo control versus infértiles.**

Considerando que el valor medio del IMC no mostró diferencia significativa entre grupo control e infértil, se analizaron los valores de CMA3 según el IMC en base a 4 categorías (peso normal, sobrepeso, obeso tipo I, obeso tipo II – III). En esta evaluación se encontraron valores significativamente menores de CMA3 en el grupo control comparado con el grupo infértiles para los individuos con peso normal y con sobrepeso. Esta diferencia no se observó entre individuos del grupo control e infértil con obesidad tipo I, alcanzando en ambos casos porcentaje altos (**Figura IV.4**). Adicionalmente, dentro del grupo control (sin problemas de infertilidad) se observó que los niveles de CMA3 aumentaban en individuos con sobrepeso y obesidad tipo I frente al peso normal, llegando estos niveles a ser igual de elevados que los del grupo infértil (Figura IV.4).



**Figura IV.4. Comparativa de valores de CMA3 entre individuos del grupo control y de pacientes infértiles, considerando su IMC. Análisis con prueba T *Student*, con indicación únicamente de los valores de P en los casos con significancia en las comparaciones.**

Cuando se analizaron los niveles de CMA3 en individuos que habían padecido paperas en la niñez, no se encontró diferencias entre grupo control e infértil ( $12.10 \pm 1.37$  vs.  $15.02 \pm 2.53$ ), lo que supondría que padecer esta enfermedad en la niñez no influye en los niveles de CMA3 de los espermatozoides en el varón adulto.

En lo que respecta al varicocele, en el grupo control, los individuos con esta enfermedad sometidos a operación presentaron menores niveles de CMA3 ( $P=0.04$ ) frente a individuos no operados, que mostraban valores elevados indicativos de alteración en la protaminación. Por otro lado, en el grupo de pacientes infértiles con varicocele, los niveles de CMA3 no mostraron diferencias

estadísticamente significativas entre los individuos operados y no operados de esta enfermedad (Figura IV.5).

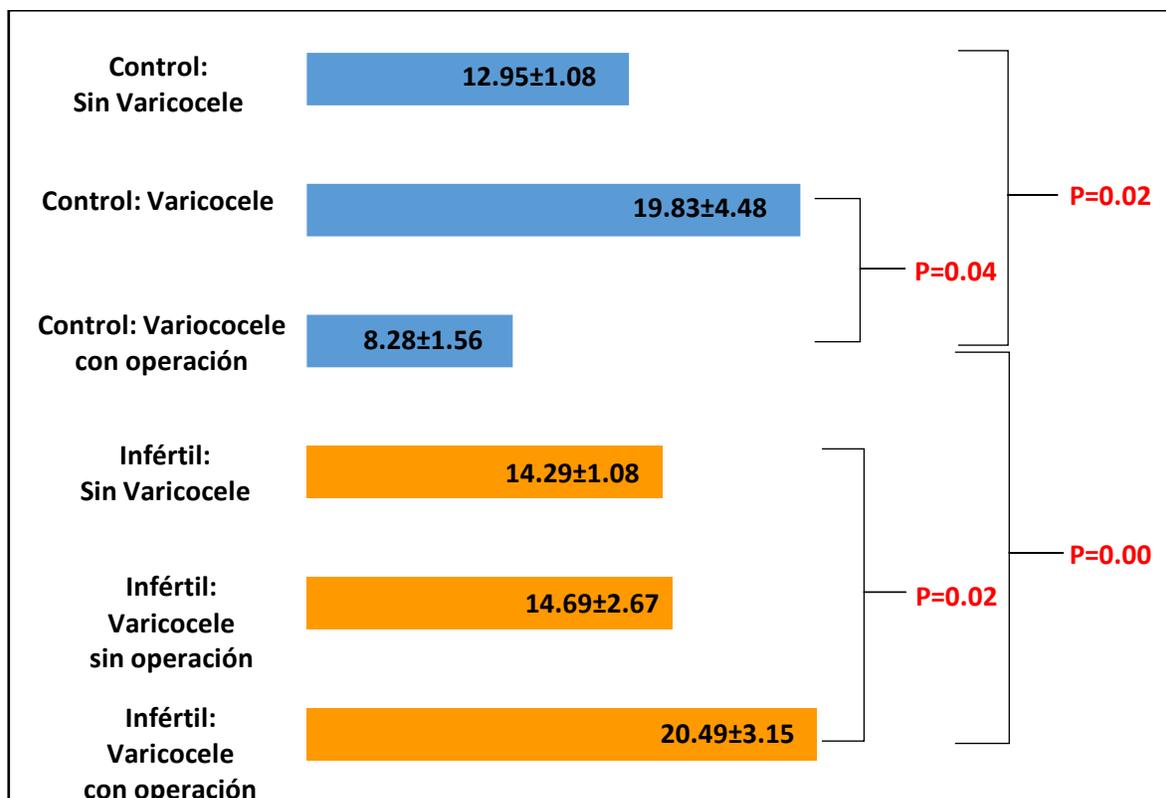


Figura IV.5. Valores de CMA3 en individuos con y sin varicocele del grupo control e infértil. Análisis con prueba T Student. Se indican únicamente los valores de P en los casos con significancia en las comparaciones.

Respecto a los niveles de CMA3 entre individuos que no fuman y los que fuman, no se encontró diferencia en el grupo control (12.64±1.19 vs. 9.84±1.59) ni en el grupo de individuos infértiles (15.68±1.16 vs. 13.84±1.68). El hábito social de uso del móvil en el bolsillo delantero del pantalón ≤40 horas por semana vs >40 horas por semana, tampoco mostró efecto en los niveles de CMA3 en espermatozoides de individuos del grupo control (12.05±1.16 vs. 12.29±2.18) o infértil (15.58±1.27 vs. 14.87±1.50). Por otro lado, no se pudo evaluar la influencia del trabajo con químicos sobre los niveles de CMA3, debido al bajo número de individuos que se desempeñaban en estas actividades.

Tras el análisis de correlación de las diferentes variables con los resultados de CMA3 para determinar su posible relación, se identificaron algunas variables con correlación débil (0.30-0.50) y

correlación moderada (0.51-0.70) positiva y negativa, tanto en el grupo control como infértil (**Tabla IV.3**). No se encontró ninguna correlación alta (0.71-0.90) o muy alta (0.91-1.00) de CMA3 con las variables analizadas. Las variables que mostraron correlación positiva con los valores de CMA3+ fueron ICM, porcentaje de anomalías en la cola y porcentaje de espermatozoides inmaduros. El resto de variables analizadas que se muestran en la Tabla IV.3 muestran correlación negativa, tal y como es el caso del porcentaje de espermatozoides normales que mostró el mayor valor de correlación (-0.63). Los resultados confirman que existe correlación entre los niveles de protaminación medida de forma indirecta mediante CMA y los parámetros de motilidad y morfología.

**Tabla IV.3. Correlación entre CMA3 y diferentes variables en grupo control e infértil.**

	Grupo control	Grupo infértiles
<b>Características Clínicas/% CMA3</b>		
IMC	0.52**	-
<b>Características Seminales pre-swim up/% CMA3</b>		
Normales (%)	-0.63**	-0.53**
Anormal: Cola (%)	0.48*	0.31*
Inmaduros (%)	0.46*	-
PRE-concentración 10 <sup>6</sup> /ml espermatozoides	-0.35*	-0.35*
PRE-concentración total espermatozoides	-0.34*	-
PRE-% espermatozoides móviles	-	-0.33*
PRE-% espermatozoides motilidad progresiva	-	-0.41*
<b>Características Seminales post-swim up/% CMA3</b>		
Concentración 10 <sup>6</sup> /ml espermatozoides	-0.33*	-0.36*
Concentración total espermatozoides	-0.33*	-0.36*
Espermatozoides móviles (%)	-0.61**	-0.54**
Total espermatozoides móviles x 10 <sup>6</sup>	-0.33*	-0.37*

Se indica en sombreado verde (correlación positiva) y rojo (correlación negativa) solo los valores que corresponden a correlación débil (\*) o correlación moderada (\*\*).

#### IV.4.3. Expresión de los genes *PRM1* y *PRM2*

Para la evaluación de expresión de los genes *PRM1* y *PRM2*, se analizaron 65 individuos a los cuales se les valoró también el porcentaje de CMA3, siendo 18 del grupo control y 47 del grupo de pacientes infértiles. De este último grupo, sólo 6 individuos presentaron parámetros seminales fuera del rango de normalidad establecido por el manual de la OMS para el procesamiento y evaluación de semen humano, quinta edición (World Health Organization, 2010).

Tras la normalización de los datos de expresión respecto a *BA*, utilizado como gen constitutivo (*housekeeping*), tanto *PRM1* como *PRM2* mostraron valores de expresión relativa ( $2^{\Delta\Delta CT}$  *fold change*) por debajo de 1 en el grupo pacientes frente al control (Tabla IV.4 y Figura IV.6).

Tabla IV.4. Valores de expresión normalizados de los genes *PRM1* y *PRM2*.

	Valores medios $\Delta CT$ Control	Valores medios $\Delta CT$ Pacientes	Fold Change ( $2^{\Delta\Delta CT}$ )	Log Fold Change
<i>PRM1</i>	1.03	0.94	0.94	-0.1
<i>PRM2</i>	7.91	7.63	0.82	-0.3

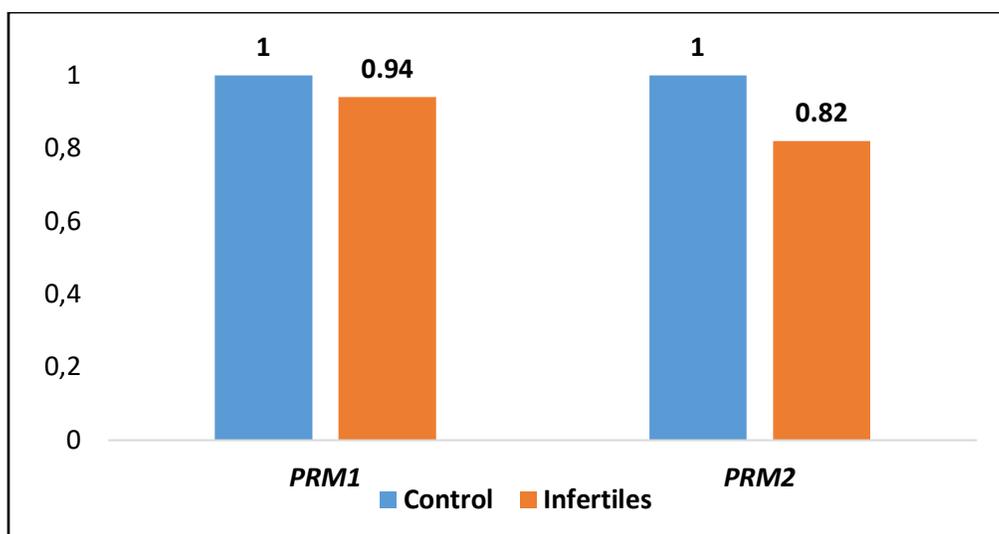
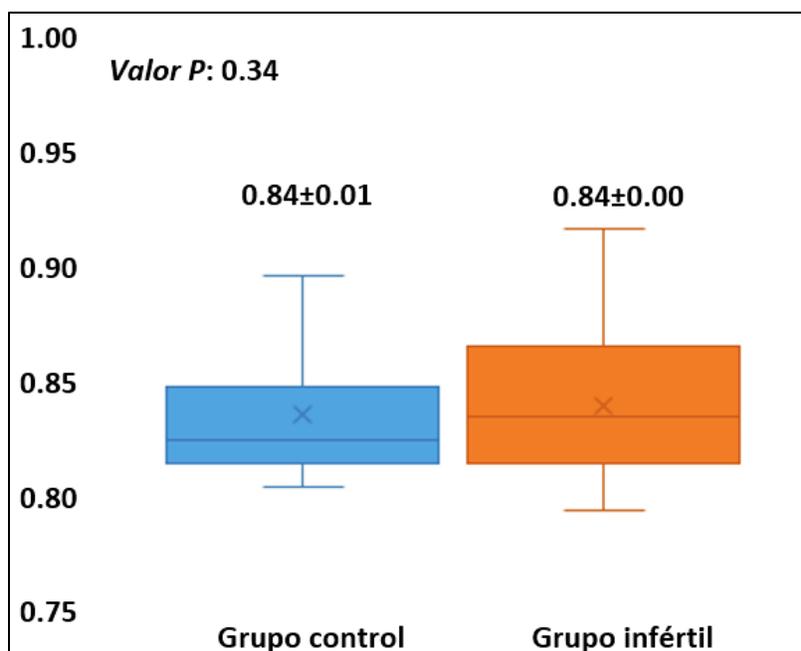


Figura IV.6. Niveles relativos de expresión génica de *PRM1* y *PRM2* (*fold change*) en grupo control e infértil.

Al comparar los niveles medios de expresión ( $\Delta CT$ ) de *PRM1* y *PRM2* en ambos grupos, así como el ratio *PRM1/PRM2*, no se encontraron diferencias entre grupo control y pacientes infértiles (**Figura IV.7**).



**Figura IV.7.** Box-Plot del ratio de expresión *PRM1/PRM2* de grupo control versus pacientes infértiles.

Al evaluar la influencia del IMC de los individuos sobre los niveles de expresión de *PRM1* y *PRM2*, y su ratio *PRM1/PRM2* en espermatozoides, dentro del grupo control no se encontró diferencia entre los individuos de peso normal, sobrepeso, y obesidad tipo 1. Por otro lado, en el grupo de pacientes infértiles sólo se encontró diferencias en el ratio *PRM1/PRM2* entre individuos con peso normal vs sobrepeso ( $P=0.001$ ) (**Tabla IV.5**).

**Tabla IV.5. Niveles de expresión  $\Delta CT$  *PRM1-BA* ,  $\Delta CT$  *PRM2-BA* y ratio *PRM1/PRM2* dentro del grupo infértil, en base al IMC de los individuos.**

IMC	$\Delta CT$ <i>PRM1-BA</i>	$\Delta CT$ <i>PRM2-BA</i>	Ratio	
			<i>PRM1/PRM2</i>	P
Normal	-0.38±2.31	6.72±1.79	0.83±0.01	0.001*
Sobrepeso	0.77±3.96	15.01±7.28	0.85±0.01	
Obesidad tipo I	0.71±3.58	7.41±2.66	0.84±0.01	NS
Obesidad tipo II y III	2.48±0.33	8.50±1.67	0.87±0.02	NS

\*P-valor de *PRM1/PRM2* entre individuos con IMC normal frente a sobrepeso. NS: no significativo.

En lo que respecta a la influencia de haber padecido paperas en la niñez sobre la expresión relativa de *PRM1* ( $\Delta CT$  *PRM1-BA*), *PRM2* ( $\Delta CT$  *PRM2-BA*) y el ratio *PRM1/PRM2* en espermatozoides, no se encontró diferencia entre los individuos que padecieron dicha enfermedad *versus* los que no la padecieron, tanto en grupo control como infértil (Tabla IV.6), tampoco la cirugía del varicocele influyó sobre estos valores en ninguno de los dos grupos.

**Tabla IV.6. Comparación de niveles de expresión normalizados de *PRM1* y *PRM2* y ratio de expresión de *PRM1/PRM2* entre individuos con y sin paperas en la niñez, en el grupo control e infértil.**

		Sin paperas en	Con paperas en	<i>Mann-Whitney</i>
		la niñez	la niñez	P
Grupo Control	$\Delta CT$ <i>PRM1-BA</i>	0.39±0.99	1.86±0.95	0.36
	$\Delta CT$ <i>PRM2-BA</i>	8.51 ± 0.92	7.52 ± 0.94	0.79
	Ratio <i>PRM1/PRM2</i>	0.85±0.01	0.83±0.01	0.50
Grupo Infértil	$\Delta CT$ <i>PRM1-BA</i>	0.52±0.46	0.87±1.7	0.51
	$\Delta CT$ <i>PRM2-BA</i>	7.34 ± 0.45	6.85 ± 1.40	0.80
	Ratio <i>PRM1/PRM2</i>	0.84±0.00	0.86±0.01	0.32

En el análisis de correlación, el grupo control presentó más variables correlacionadas que el grupo infértil. El grupo control presentó correlaciones debil (0.30-0.50) y moderada (0.51-0.70) de algunas

variables con el ratio  $PRM1/PRM2$  y  $\Delta CT PRM2-BA$ , mientras que el grupo infértil presentó pocas correlaciones débiles con  $\Delta CT PRM2-BA$  y  $\Delta CT PRM2-BA$  (Tabla IV.7). No se encontró ninguna correlación alta (0.71-0.90) o muy alta (0.91-1.00) de  $\Delta CT PRM2-BA$ ,  $\Delta CT PRM2-BA$  y ratio  $PRM1/PRM2$  con alguna de las variables.

**Tabla IV.7. Selección de variables analizadas que mostraron correlación con los niveles de expresión de  $PRM1$ ,  $PRM2$  o ratio de expresión de  $PRM1/PRM2$**

Variables de interés	Grupo control	Grupo infértil
<b><u><math>\Delta CT PRM1-BA</math></u></b>		
Ratio $PRM1/PRM2$	-	0.44*
CMA3	-	0.32*
PRE-Concentración $10^6/ml$ espermatozoides	-	0.34*
<b><u><math>\Delta CT PRM2-BA</math></u></b>		
PRE-Concentración $110^6/ml$ espermatozoides	-	0.34*
PRE-Concentración total espermatozoides	-	0.30*
Anormal: Cola (%)	-0.36*	-
PRE-% espermatozoides motilidad progresiva	-0.38*	-
POST-% espermatozoides móviles	0.41	-
<b><u>Ratio <math>PRM1/PRM2</math></u></b>		
CMA3	0.41*	-
PRE-Anormal: Cabeza (%)	-0.48*	-
PRE-Anormal: Pieza media (%)	0.34*	-
PRE-Anormal: Cola (%)	0.38*	-
PRE-Concentración $10^6/ml$ espermatozoides	-0.32*	-
POST-Concentración $10^6/ml$ espermatozoides	-0,56**	-
POST-Concentración total espermatozoides	-0,56**	-
POST-% espermatozoides móviles	-0,40*	-
POST-Total espermatozoides móviles x $10^6$	-0,55**	-

Se indica en sombreado verde (correlación positiva) y rojo (correlación negativa) solo los valores que corresponden a correlación débil (\*) o correlación moderada (\*\*).

#### **IV.5. Discusión**

La calidad de ciertos parámetros seminales como la concentración, motilidad y morfología espermática, han ido disminuyendo a lo largo de estos últimos 40 años, en los que la OMS ha estudiado el semen humano para establecer parámetros referenciales (Mann et al., 2020; World Health Organization, 2021). Los límites referenciales de estos parámetros seminales han disminuido en las diferentes ediciones de los manuales, conllevando que un porcentaje de pacientes con problemas de infertilidad presente parámetros seminales sobre los límites inferiores establecidos en el manual de la OMS quinta y sexta edición, y sean clasificados como normozoospermicos; lo cual, en el presente estudio correspondió al 81.05% de los pacientes del grupo infértil estudiado. Ello implica que es necesario identificar otros parámetros que permitan complementar la información que aporta el espermiograma clásico para predecir la capacidad fecundante e identificar causas de infertilidad. En las muestras analizadas en este estudio, no hubo diferencias significativas entre ambos grupos de estudio (control e infértiles) en los valores medios de las características básicas seminales evaluadas, excepto en el caso del porcentaje de espermatozoides móviles y el porcentaje de espermatozoides con alteraciones en la cola, lo cual avala la idea expuesta previamente, sobre el bajo poder para discriminar la capacidad fecundante utilizando los actuales criterios del análisis del espermiograma mencionados.

El hecho que la calidad seminal esté decreciendo a nivel mundial, pudiendo afectar a la fertilidad del varón, se asocia a varios factores como la edad, estilo de vida y determinados contaminantes medioambientales (Virtanen et al., 2017). Sin embargo, en el presente estudio el porcentaje de individuos con IMC elevado (sobrepeso y obesidad), o que habían sufridos paperas en la niñez o varicocele, fue similar entre ambos grupos. Por su parte, respecto a los hábitos sociales (consumo de tabaco, actividad deportiva y uso de móvil) relacionados con el decrecimiento de la calidad seminal, sus valores medios no mostraron diferencias significativas entre los dos grupos de estudio. Ello sugiere que deben existir otros factores que no se analizaron en el presente estudio, o que sería necesario analizar la coexistencia de varios de los factores mencionados como causa de infertilidad.

Entre las características de los espermatozoides que se han relacionado con casos de infertilidad se incluyen elevados niveles de fragmentación del ADN o baja compactación de la cromatina (Oliva, 2006; Oliva & Castillo, 2011), causado por diversos factores como la edad, elevado IMC, varicocele

y determinados hábitos socioambientales (Alahmar et al., 2022; Bibi et al., 2023; Nayak et al., 2023). Las nucleoproteínas protaminas son cruciales para dicha compactación de la cromatina y una adecuada funcionalidad espermática en varias especies (Hao et al., 2019), por lo que se considera de interés el estudio de los niveles de protaminación en los espermatozoides. En esta tesis doctoral se ha evaluado la protaminación espermática de forma indirecta mediante la técnica de cromomicina A3 (CMA3), encontrando menores niveles de protaminación en el grupo de hombres infértiles de población ecuatoriana, lo cual concuerda con trabajos previos realizados en otras poblaciones (Ghasemzadeh et al., 2015; Hamad, 2019). Esta técnica evalúa de manera indirecta la deficiencia de protaminas en la cromatina espermática (Steger & Balhorn, 2018), al competir la CMA3 con las protaminas por unirse al surco menor de la hélice del ADN (World Health Organization, 2021). Esta prueba es comúnmente utilizada para el análisis de deficiencia de protamina ya que es una técnica sencilla de realizar, útil y brinda resultados fiables que muestran correlación con otros ensayos utilizados en la evaluación de la cromatina espermática, de modo que su aplicación en la actividad clínica es útil. No obstante, es una prueba limitada por la subjetividad del observador y se requiere de microscopía de fluorescencia para su puesta en marcha, además de no permitir discriminar entre protamina-1 y protamina-2 (Ashok Agarwal & Said, 2004; Ni et al., 2016; World Health Organization, 2021), para lo cual sería necesario evaluar directamente las proteínas o hacer análisis de ARNm de los genes de interés (Ni et al., 2016).

En estudios previos se han analizado diferentes factores como posibles causas de la desregulación de la protaminación (Jodar & Oliva, 2014), incluyendo mutaciones de los genes que codifican estas proteínas o factores epigenéticos que regulan su expresión (Carrell et al., 2008; Jodar & Oliva, 2014), asociándose su desregulación a factores ambientales, clínicos e iatrogénicos (Pourmasumi et al., 2017). En el presente estudio, de los factores clínicos y socioambientales analizados, encontramos que el aumento del IMC (de peso normal a sobrepeso y obesidad tipo I) disminuye los niveles de protaminación en hombres fértiles, mientras que en hombres infértiles los niveles de protaminación estimados eran bajos independientemente del IMC. Si bien la obesidad se ha asociado a posible afectación en los parámetros seminales (Liu & Ding, 2017), los trabajos previos que analizaron los niveles de protaminación, en su mayoría, se han enfocado en la evaluación de hombres infértiles (sean normozoospermicos o con alteraciones seminales), y no en hombres fértiles, ni en el estudio de factores que puedan afectar su estado de protaminación, enfoque que se recoge en esta tesis y describe hallazgos relevantes en el grupo control de hombres de fertilidad comprobada. La falta de

relación del IMC con el nivel de protaminación/empaquetamiento de protaminas dentro del grupo de individuos infértiles, está en consonancia con otros trabajos previos (Oliveira et al., 2018; Rybar et al., 2011), manteniéndose los bajos niveles de protaminación tanto en individuos con peso normal como en casos de obesidad hasta tipo III, probablemente por coexistir otros factores independientes del IMC que alteran dichos niveles de protaminación. Cabe resaltar el hallazgo descrito en hombre fértiles con obesidad, en los cuales el estado de protaminación puede disminuir a los mismos niveles de protaminación que en el grupo de hombres infértiles, con las consecuencias que ello podría conllevar sobre el desarrollo embrionario, más allá de la capacidad de fecundar. La obesidad está catalogada como un riesgo de infertilidad y se asocia a un aumento del daño en el ADN espermático (Pourmasumi et al., 2017), habiéndose demostrado recientemente una mejora en los parámetros seminales y la remodelación epigenética de los espermatozoides de hombres con obesidad que han perdido peso (Andersen et al., 2022; Willerslev, 2023). Considerando nuestros hallazgos en hombres con IMC elevado, podríamos hipotetizar que, en pacientes con infertilidad idiopática con un IMC elevado, la disminución en los niveles de protaminación podrían estar relacionados con el daño en la cromatina, al alterar su empaquetamiento y quedar el ADN espermático más expuesto. En las parejas que buscan un tratamiento de fertilidad a causa de un factor femenino, debe considerarse una evaluación integral del varón incluyéndose el análisis de los niveles de protaminación, ya que existen factores que pueden estar afectando de manera indirecta la calidad del ADN espermático, pese a que se haya comprobado la fertilidad del hombre en función de la obtención de descendencia previa, pero su IMC, entre otros parámetros, puede cambiar a lo largo del tiempo e impactar su capacidad fecundante.

Otra afectación clínica relacionada con la fertilidad masculina es el varicocele, la cual podría afectar la condensación de la cromatina, disminuyendo el nivel de protaminación y aumentando el daño del ADN de los espermatozoides en hombres con esta patología (Talebi et al., 2016; Talebi et al., 2008). En el estudio realizado en esta tesis doctoral no observamos diferencias significativas en los niveles de protaminación, medidos de forma indirecta mediante CMA3, entre el grupo control y el grupo de pacientes infértiles ambos con varicocele, independientemente de que hubiesen sido o no operados de dicha patología. Curiosamente se encontraron mayores niveles de CMA3 y, por ende, menor nivel de protaminación en individuos infértiles que se sometieron a operación del varicocele, lo cual podría deberse a que dichos pacientes se sometieron a cirugía por ser los que presentaban una patología de mayor gravedad, o que existía otra causa de infertilidad independiente de la

existencia de dicha enfermedad. Por el contrario, en el grupo control si se observó un mejoramiento en los niveles de protaminación en pacientes que se sometieron a operación, comparado con los que no se sometieron a dicha operación.

Otro parámetro utilizado para evaluar la fertilidad masculina en espermatozoides humanos maduros ha sido el ARNm de protaminas que persiste sin traducir (Eddy, 2006), el cual ha sido analizado en numerosos estudios, tanto a nivel testicular (Amjad et al., 2021; Grasseti et al., 2012; Moghbelinejad et al., 2015; Steger et al., 2003), como en espermatozoides eyaculados (Amor et al., 2021; Aoki et al., 2006; Hamad et al., 2019; Hamad, 2019; Imani et al., 2021; Nazmara et al., 2020; Rogenhofer et al., 2013; Rogenhofer et al., 2017). Considerando que el estudio del ARNm de *PRM1* y *PRM2* permite evaluar la expresión de estos genes relacionados con la fertilidad masculina (Steger et al., 2003), se analizó la expresión de ambos factores en espermatozoides eyaculados, sin encontrar diferencias significativas en los niveles de expresión entre los grupos control e infértiles. Estos resultados concuerdan con los descritos previamente por algunos autores, como Aoki (2016) quien evaluó a pacientes infértiles *versus* donantes fértiles (Aoki et al., 2006). Así mismo, Imani et al. (2020) tampoco encontró diferentes niveles de expresión de *PRM1* o *PRM2* entre los grupos de estudio, aunque evaluó individuos sanos y hombre con diabetes tipo II (Imani et al., 2021). Por otra parte, se ha reportado diferencia en los niveles de ARNm de *PRM1* y *PRM2* en pacientes fumadores (Amor et al., 2021; Hammadeh et al., 2010), consumidores de heroína (Nazmara et al., 2020), pacientes con abortos recurrentes (Rogenhofer et al., 2017), así como individuos infértiles que se sometieron a tratamientos de FIV o ICSI (Hamad, 2019; Rogenhofer et al., 2013; Rogenhofer et al., 2017). En el caso de individuos con varicocele estudiados, entre grupo control e infértil no se encontró diferencia en la expresión de *PRM1* o *PRM2*, y tampoco hubo diferencias significativas en base al IMC entre ambos grupos.

Respecto al ratio de proteínas *PRM1/PRM2*, así como el de ARNm *PRM1/PRM2* es aproximadamente 1:1 en la especie humana (Rogenhofer et al., 2013; Steger & Balhorn, 2018), reportándose en casi todas las investigaciones revisadas, valores aberrantes de ARNm *PRM1/PRM2* en pacientes con azoospermia obstructiva (Amjad et al., 2021; Moghbelinejad et al., 2015), criptozoospermia (Grasseti et al., 2012), oligozoospermia y astenozoospermia (Khara et al., 1997; Rogenhofer et al., 2017) y en hombres infértiles que se someten a FIV o ICSI (Rogenhofer et al., 2013; Rogenhofer et al., 2017). Así mismo, se han relacionado variaciones de este ratio con

alteraciones en la morfología espermática (Hamad, 2019), defectos en la protaminación y alteraciones en la integridad del ADN (Hammadeh et al., 2010; Oliva, 2006; Rathke et al., 2014), aunque hay discrepancia respecto a los valores de ARNm *PRM1/PRM2* considerados anormales. En la población ecuatoriana estudiada en esta tesis doctoral, al comparar el grupo control *versus* pacientes infértiles, no se encontró diferencia significativa en el ratio de ARNm *PRM1/PRM2*, siendo ligeramente menor a 1, sin que ello sea concluyente por las discrepancias para establecer el rango de valores anormales previamente mencionadas. No obstante, debe tenerse en cuenta que al tratarse de un ratio *PRM1/PRM2*, aquellos casos en los cuales ambos factores se vean alterados de forma proporcional podrían enmascarar variaciones en su expresión, si bien dichos valores de expresión no mostraron diferencias significativas en este estudio. El resultado obtenido está en concordancia con Imani et al. (2020), quien no encontró diferencias en el ratio ARNm *PRM1/PRM2*, entre individuos sanos *versus* hombres infértiles, incluso siendo pacientes de diabetes *mellitus* tipo II (Imani et al., 2021). Una posible explicación a la ausencia de diferencias en el ratio de ARNm *PRM1/PRM2* en esta tesis doctoral podría ser la variedad de etiologías de infertilidad englobadas en el grupo de pacientes infértiles. Paralelamente, en el grupo control se observó una correlación negativa débil del ratio de ARNm *PRM1/PRM2* con la concentración de espermatozoides y el porcentaje de anormalidades a nivel de cabeza, hallazgo similar al descrito por Hamad et al. 2019, quien correlacionó significativamente el ratio de ARNm de *PRM1/PRM2* con el recuento total de espermatozoides y la morfología normal (Hamad, 2019). De nuevo, al considerar el IMC se observaron diferencias significativas entre pacientes con peso normal y sobrepeso en el ratio de ARNm *PRM1/PRM2*, dentro del grupo de pacientes con infertilidad. En el resto de las categorías del IMC las diferencias no fueron estadísticamente significativas, probablemente debido al limitado tamaño muestral. Finalmente, al evaluar la correlación entre nivel de protaminación medido mediante CMA3 y el ratio de ARNm *PRM1/PRM2*, se encontró correlación positiva moderada entre ambos parámetros en el grupo control, lo que es indicativo de la validez de ambos parámetros para estimar los niveles de protaminación.

Resulta llamativo que en el grupo control se observa correlación entre el ratio de ARNm *PRM1/PRM2* y un mayor número de parámetros espermáticos que en el grupo infértil, a pesar de que el grupo control tiene un tamaño muestral más reducido. En el caso de la evaluación del estado de protaminación (niveles de CMA3), el número de parámetros espermáticos que mostraron correlación fue similar en el grupo control y grupo infértiles, y mayor que cuando se analizó el ratio

de ARNm *PRM1/PRM2*, lo cual sugiere que la evaluación de protaminación mediante análisis de CMA3 puede ser más útil que el análisis del ratio de ARNm *PRM1/PRM2*. No obstante, cabe la posibilidad que la mayor variabilidad de etiologías que existe en el grupo de infértiles afecte al nivel de correlación observado con los diferentes parámetros espermáticos analizados, mientras que el grupo control podría considerarse que es más homogéneo. Sin embargo, el porcentaje de individuos normozoospermicos evaluados en ambos grupos fue similar y al analizar la correlación únicamente con los individuos normozoospermicos en cada grupo los resultados fueron similares. Si bien el grupo control incluido tiene un tamaño muestral reducido, su homogeneidad ha permitido identificar correlación entre factores que pueden afectar a la fertilidad del varón, como es la disminución en el nivel de protaminación espermática al aumentar el IMC, a pesar de no observar diferencias significativas a nivel de la expresión de *PRM1* y *PRM2*, lo cual sugiere que este parámetro afectaría al proceso de traducción de protaminas, que acontece en espermátidas durante su elongación (Eddy, 2006), y/o la regulación de dicho proceso.

Los resultados obtenidos en este capítulo de tesis sugieren el interés de realizar estudios más profundos, valorando diferentes factores relacionados con la obesidad para poder determinar las causas que puedan desencadenar la deficiencia de protamina y por ende ser riesgo de infertilidad en pacientes con sobrepeso u obesidad.

#### **IV.6. Conclusiones**

Las principales conclusiones que se extraen de este capítulo son las siguientes:

1. Según los valores establecidos por el manual de la OMS para clasificación de muestras seminales, la mayoría de pacientes con problemas de infertilidad son considerados normozoospermicos, lo cual demuestra su falta de capacidad para discriminar. Además, en las muestras analizadas no existían diferencias significativas en los valores medios en la mayoría de parámetros básicos analizados.
2. Para analizar el estado de protaminación, el análisis de los niveles de CMA3 mostró mayor capacidad para discriminar entre pacientes del grupo control e infértiles, que el análisis de expresión de los genes *PRM1* y *PRM2* y el ratio *PRM1/PRM2*.

3. El estado de protaminación (niveles de CMA3) se correlaciona de forma débil o moderada, tanto positiva como negativa, con varios parámetros seminales en ambos grupos de estudio.

4. En el caso de los niveles de expresión de *PRM1* y *PRM2* en el grupo de pacientes infértiles solo mostraron correlación con la concentración espermática, frente al grupo control que fueron numerosos los parámetros con correlación.

5. El índice de masa corporal se muestra, entre los factores estudiados, como uno de los que mayor impacto tiene en los niveles de protaminación. Otros factores analizados como el varicocele, paperas o determinados hábitos (consumo de tabaco, actividad deportiva o uso del móvil) no mostraron correlación directa con el estado de protaminación.

## **IV.7. Bibliografía**

- Alahmar, A. T., Singh, R., & Palani, A. (2022). Sperm DNA Fragmentation in Reproductive Medicine: A Review. *J Hum Reprod Sci*, 15(3), 206-218. [https://doi.org/10.4103/jhrs.jhrs\\_82\\_22](https://doi.org/10.4103/jhrs.jhrs_82_22)
- Amjad, S., Mushtaq, S., Rehman, R., Munir, A., Zahid, N., & Siddique, P. Q. R. (2021). Protamine 1/Protamine 2 mRNA ratio in nonobstructive azoospermic patients. *Andrologia*, 53(3), e13936. <https://doi.org/10.1111/and.13936>
- Amor, H., Zeyad, A., & Hammadeh, M. E. (2021). Tobacco smoking and its impact on the expression level of sperm nuclear protein genes: H2BFWT, TNP1, TNP2, PRM1 and PRM2. *Andrologia*, 53(3), e13964. <https://doi.org/10.1111/and.13964>
- Andersen, E., Juhl, C. R., Kjølner, E. T., Lundgren, J. R., Janus, C., Dehestani, Y., . . . Barrès, R. (2022). Sperm count is increased by diet-induced weight loss and maintained by exercise or GLP-1 analogue treatment: a randomized controlled trial. *Hum Reprod*, 37(7), 1414-1422. <https://doi.org/10.1093/humrep/deac096>
- Aoki, V. W., Liu, L., & Carrell, D. T. (2006). A novel mechanism of protamine expression deregulation highlighted by abnormal protamine transcript retention in infertile human males with sperm protamine deficiency. *Mol Hum Reprod*, 12(1), 41-50. <https://doi.org/10.1093/molehr/gah258>
- Ashok Agarwal, & Said, T. M. (2004). Sperm chromatin assessment. In *Textbook of Assisted Reproduction Techniques* (pp. 93-106).
- Balhorn, R. (2007). The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome Biol*, 8(9), 227. <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-9-227>
- Bibi, R., Jahan, S., Kafeel Qureshi, S., Razak, S., Afsar, T., Almajwal, A., . . . Amor, H. (2023). Analysis of sperm chromatin packaging and reproductive biomarker to evaluate the consequence of advanced male age. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 14, 1092603. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1092603>
- Carrell, D. T., Emery, B. R., & Hammoud, S. (2008). The aetiology of sperm protamine abnormalities and their potential impact on the sperm epigenome. *Int J Androl*, 31(6), 537-545. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2008.00872.x>
- Eddy, E. M. (2006). CHAPTER 1 - The Spermatozoon Gamete Biology Section, Laboratory of Reproductive and Developmental Toxicology, National Institute of Environmental Health Sciences, National Institutes of Health, Research Triangle Park, North Carolina. In J. D. Neill

- (Ed.), *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Third Edition)* (pp. 3-54). Academic Press.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-012515400-0/50006-3>
- Ghasemzadeh, J., Talebi, A. R., Khalili, M. A., Fesahat, F., Halvaei, I., Nabi, A., & Ashourzadeh, S. (2015). Sperm parameters, protamine deficiency, and apoptosis in total globozoospermia. *Iran J Reprod Med*, 13(8), 495-502.
- Gill-Sharma, M. K., Choudhuri, J., & D'Souza, S. (2011). Sperm chromatin protamination: an endocrine perspective. *Protein Pept Lett*, 18(8), 786-801. <https://doi.org/10.2174/092986611795714005>
- Grassetti, D., Paoli, D., Gallo, M., D'Ambrosio, A., Lombardo, F., Lenzi, A., & Gandini, L. (2012). Protamine-1 and -2 polymorphisms and gene expression in male infertility: an Italian study. *J Endocrinol Invest*, 35(10), 882-888. <https://doi.org/10.3275/8111>
- Hamad, M., Shelko, N., Montenarh, M., & Hammadeh, M. E. (2019). The impact of cigarette smoking on protamines 1 and 2 transcripts in human spermatozoa. *Hum Fertil (Camb)*, 22(2), 104-110. <https://doi.org/10.1080/14647273.2017.1382733>
- Hamad, M. F. (2019). Quantification of histones and protamines mRNA transcripts in sperms of infertile couples and their impact on sperm's quality and chromatin integrity. *Reprod Biol*, 19(1), 6-13. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2019.03.001>
- Hammadeh, M. E., Hamad, M. F., Montenarh, M., & Fischer-Hammadeh, C. (2010). Protamine contents and P1/P2 ratio in human spermatozoa from smokers and non-smokers. *Hum Reprod*, 25(11), 2708-2720. <https://doi.org/10.1093/humrep/deq226>
- Hammoud, S. S., Nix, D. A., Zhang, H., Purwar, J., Carrell, D. T., & Cairns, B. R. (2009). Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development. *Nature*, 460(7254), 473-478. <https://doi.org/10.1038/nature08162>
- Hao, S. L., Ni, F. D., & Yang, W. X. (2019). The dynamics and regulation of chromatin remodeling during spermiogenesis. *Gene*, 706, 201-210. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.05.027>
- Imani, M., Talebi, A. R., Fesahat, F., Rahiminia, T., Seifati, S. M., & Dehghanpour, F. (2021). Sperm parameters, DNA integrity, and protamine expression in patients with type II diabetes mellitus. *J Obstet Gynaecol*, 41(3), 439-446. <https://doi.org/10.1080/01443615.2020.1744114>
- Jodar, M., & Oliva, R. (2014). Protamine alterations in human spermatozoa. *Adv Exp Med Biol*, 791, 83-102. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7783-9\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7783-9_6)
- Khara, K. K., Vlad, M., Griffiths, M., & Kennedy, C. R. (1997). Human protamines and male infertility. *J Assist Reprod Genet*, 14(5), 282-290. <https://doi.org/10.1007/BF02765830>

- Liu, Y., & Ding, Z. (2017). Obesity, a serious etiologic factor for male subfertility in modern society. *Reproduction*, 154(4), R123-R131. <https://doi.org/10.1530/REP-17-0161>
- Mann, U., Shiff, B., & Patel, P. (2020). Reasons for worldwide decline in male fertility. *Curr Opin Urol*, 30(3), 296-301. <https://doi.org/10.1097/MOU.0000000000000745>
- Moghbelinejad, S., Najafipour, R., & Hashjin, A. S. (2015). Comparison of Protamine 1 to Protamine 2 mRNA Ratio and YBX2 gene mRNA Content in Testicular Tissue of Fertile and Azoospermic Men. *Int J Fertil Steril*, 9(3), 338-345. <https://doi.org/10.22074/ijfs.2015.4549>
- Mortimer, D. (2018). The functional anatomy of the human spermatozoon: relating ultrastructure and function. *Mol Hum Reprod*, 24(12), 567-592. <https://doi.org/10.1093/molehr/gay040>
- Mukaka, M. M. (2012). Statistics corner: A guide to appropriate use of correlation coefficient in medical research. *Malawi Med J*, 24(3), 69-71.
- Nayak, J., Jena, S. R., Kumar, S., Kar, S., Dixit, A., & Samanta, L. (2023). Human sperm proteome reveals the effect of environmental borne seminal polyaromatic hydrocarbons exposome in etiology of idiopathic male factor infertility. *Front Cell Dev Biol*, 11, 1117155. <https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1117155>
- Nazmara, Z., Najafi, M., Movahedin, M., Zandiyeh, Z., Shirinbayan, P., Asgari, H. R., . . . Koruji, M. (2020). Correlation Between Protamine-2 and miRNA-122 in Sperm from Heroin-addicted Men: A Case-Control Study. *Urol J*, 17(6), 638-644. <https://doi.org/10.22037/uj.v16i7.5747>
- Ni, K., Spiess, A. N., Schuppe, H. C., & Steger, K. (2016). The impact of sperm protamine deficiency and sperm DNA damage on human male fertility: a systematic review and meta-analysis. *Andrology*, 4(5), 789-799. <https://doi.org/10.1111/andr.12216>
- Oliva, R. (2006). Protamines and male infertility. *Hum Reprod Update*, 12(4), 417-435. <https://doi.org/10.1093/humupd/dml009>
- Oliva, R., & Castillo, J. (2011). Proteomics and the genetics of sperm chromatin condensation. *Asian J Androl*, 13(1), 24-30. <https://doi.org/10.1038/aja.2010.65>
- Oliveira, J. B. A., Petersen, C. G., Mauri, A. L., Vagnini, L. D., Renzi, A., Petersen, B., . . . Franco, J. G. (2018). Association between body mass index and sperm quality and sperm DNA integrity. A large population study. *Andrologia*, 50(3). <https://doi.org/10.1111/and.12889>
- Pourmasumi, S., Sabeti, P., Rahiminia, T., Mangoli, E., Tabibnejad, N., & Talebi, A. R. (2017). The etiologies of DNA abnormalities in male infertility: An assessment and review. *Int J Reprod Biomed (Yazd)*, 15(6), 331-344.

- Rathke, C., Baarends, W. M., Awe, S., & Renkawitz-Pohl, R. (2014). Chromatin dynamics during spermiogenesis. *Biochim Biophys Acta*, 1839(3), 155-168. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2013.08.004>
- Rogenhofer, N., Dansranjavin, T., Schorsch, M., Spiess, A., Wang, H., von Schönfeldt, V., . . . Steger, K. (2013). The sperm protamine mRNA ratio as a clinical parameter to estimate the fertilizing potential of men taking part in an ART programme. *Hum Reprod*, 28(4), 969-978. <https://doi.org/10.1093/humrep/des471>
- Rogenhofer, N., Ott, J., Pilatz, A., Wolf, J., Thaler, C. J., Windischbauer, L., . . . von Schönfeldt, V. (2017). Unexplained recurrent miscarriages are associated with an aberrant sperm protamine mRNA content. *Hum Reprod*, 32(8), 1574-1582. <https://doi.org/10.1093/humrep/dex224>
- Rybar, R., Kopecka, V., Prinosilova, P., Markova, P., & Rubes, J. (2011). Male obesity and age in relationship to semen parameters and sperm chromatin integrity. *Andrologia*, 43(4), 286-291. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2010.01057.x>
- Steger, K., & Balhorn, R. (2018). Sperm nuclear protamines: A checkpoint to control sperm chromatin quality. *Anat Histol Embryol*, 47(4), 273-279. <https://doi.org/10.1111/ah.12361>
- Steger, K., Fink, L., Failing, K., Bohle, R. M., Kliesch, S., Weidner, W., & Bergmann, M. (2003). Decreased protamine-1 transcript levels in testes from infertile men. *Mol Hum Reprod*, 9(6), 331-336. <https://doi.org/10.1093/molehr/gag041>
- Talebi, A. R., Fesahat, F., Mangoli, E., Ghasemzadeh, J., Nayeri, M., & Sadeghian-Nodoshan, F. (2016). Relationship between sperm protamine deficiency and apoptosis in couples with unexplained repeated spontaneous abortions. *Int J Reprod Biomed (Yazd)*, 14(3), 199-204.
- Talebi, A. R., Moein, M. R., Tabibnejad, N., & Ghasemzadeh, J. (2008). Effect of varicocele on chromatin condensation and DNA integrity of ejaculated spermatozoa using cytochemical tests. *Andrologia*, 40(4), 245-251. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2008.00852.x>
- Virtanen, H. E., Jørgensen, N., & Toppari, J. (2017). Semen quality in the 21. *Nat Rev Urol*, 14(2), 120-130. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2016.261>
- Willerslev, E. (2023). O-001 Human Reproduction keynote lecture: Influence of diet and exercise on sperm and its epigenome. *Human Reproduction*, 38(Supplement\_1). <https://doi.org/10.1093/humrep/dead093.001>
- World Health Organization, D. o. R. H. a. R. (2010). *WHO laboratory manual for the examination and procesing of human semen*. (W. H. Organization, Ed. 5th. ed.). World Health Organization

World Health Organization, D. o. R. H. a. R. (2021). *WHO laboratory manual for the examination and procesing of human semen* (W. H. Organization, Ed. 6th ed.). World Health Organization.

## CAPÍTULO V: CONCLUSIONES GENERALES

1. En pacientes que se someten a una estimulación ovárica y aspiración folicular para un tratamiento de fecundación *in vitro*, las concentraciones de PT y albúmina en mujeres con insuficiencia ovárica y endometriosis son menores que en mujeres control, sin que ello afecte al número de ovocitos MII recuperados, blastocistos desarrollados y tasa de nacidos vivos.
2. Las concentraciones de 3-nitrotirosina en el fluido folicular de mujeres sometidas a estimulación ovárica y aspiración folicular es similar independientemente del diagnóstico de infertilidad.
3. En mujeres infértiles con factor anatómico y endocrino, la concentración de proteínas totales y albúmina están correlacionadas negativamente con la concentración de 3-nitrotirosina sin verse afectada la madurez ovocitaria ni desarrollo embrionario.
4. La identificación de varios polimorfismos entre los genes *TNP1*, *TNP2*, *PRM1* y *PRM2*, en varones infértiles y fértiles de la población mestizo-ecuatoriana sugiere que esta es híbrida con contribución de diferentes regiones del mundo.
5. Se ha descrito por primera vez la existencia de polimorfismos en los genes involucrados en la compactación del ADN espermático dentro de la población mestiza en Ecuador.
6. El análisis del estado de protaminación mediante determinación de los niveles de CMA3 mostró mayor capacidad para discriminar entre pacientes del grupo control e infértiles, que el análisis de expresión de los genes *PRM1* y *PRM2* y el ratio *PRM1/PRM2*.
7. El estado de protaminación (niveles de CMA3) se correlaciona de forma débil o moderada, con varios parámetros seminales en ambos grupos de estudio (control e infértiles).
8. El índice de masa corporal se muestra, entre los factores estudiados, como uno de los que mayor impacto tiene en los niveles de protaminación. Otros factores analizados como el varicocele, paperas o determinados hábitos (consumo de tabaco, actividad deportiva o uso del móvil) no mostraron correlación directa con el estado de protaminación.

## ANEXO: ABREVIATURAS

<b>AA:</b> Aminoácido	<b>FM:</b> Factor masculino
<b>aCGH:</b> Ensayos de hibridación genómica comparada	<b>FSH:</b> Hormona folículo estimulante
<b>ADN:</b> Ácido desoxirribonucleico	<b>g:</b> Gramos
<b>AMH:</b> Hormona antimuleriana	<b>GnRH:</b> Hormona liberadora de gonadotropinas
<b>ARN:</b> Ácido ribonucleico	<b>H:</b> Histidina
<b>ARNm:</b> ARN mensajero	<b>hCG:</b> Hormona gonadotropina coriónica humana
<b>ASMR:</b> Sociedad Americana de Medicina Reproductiva	<b>IO:</b> Insuficiencia ovárica
<b>BA:</b> Gen <i>BETA-ACTINA</i>	<b>ICSI:</b> Inyección intracitoplasmática de espermatozoides
<b>C:</b> Cisteína	<b>IMC:</b> Índice de masa corporal
<b>CCs:</b> Células del <i>cumulus oophorus</i>	<b>IU:</b> Unidades internacionales
<b>cDNA:</b> ADN complementario	<b>K:</b> Lisina
<b>CMA3:</b> Cromomicina A3	<b>Kg:</b> Kilogramos
<b>COCs:</b> Complejos cúmulus-ovocito	<b>kDa:</b> Kilo Dalton
<b>CO<sub>2</sub>:</b> Dióxido de carbono	<b>LH:</b> Hormona luteinizante
<b>CT:</b> número de ciclos umbral	<b>LPA:</b> Ácido lisofosfatídico
<b>dl:</b> Decilitros	<b>M:</b> Metionina
<b>DO:</b> Donantes de ovocitos	<b>MCI:</b> Masa celular interna
<b>E:</b> Ácido glutámico	<b>MI:</b> Metafase 1
<b>E2:</b> Estradiol	<b>MII:</b> Metafase 2
<b>ELISA:</b> Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas	<b>miARN:</b> Micro ARN
<b>END:</b> Endometriosis	<b>ml:</b> Mililitros
<b>F:</b> Fenilalanina	<b>MMP-9:</b> Metaloproteinasa-9 de la matriz
<b>FA:</b> Factor anatómica	<b>m<sup>2</sup>:</b> Metro cuadrado
<b>FE:</b> Factor endocrino	<b>N:</b> Asparagina
<b>FF:</b> Fluido folicular	<b>ng:</b> Nanogramos
<b>FFH:</b> Fluido folicular humano	<b>NGS:</b> Secuenciación de nueva generación
<b>FI:</b> factor inexplicable	<b>nM:</b> Nanomolar
<b>FISH:</b> Hibridación fluorescente <i>in situ</i>	<b>NO:</b> Óxido nítrico
<b>FIV:</b> Fecundación <i>in vitro</i>	<b>NO<sub>2</sub>:</b> Dióxido de nitrógeno

**OHSS:** Síndrome de hiperestimulación ovárica

**OMS:** Organización mundial de la salud

**P4:** Progesterona

**PBS:** Tampón fosfato salino

**PRM1:** Proteína protamina 1

**PRM1:** Gen protamina 1

**PRM2:** Proteína protamina 2

**PRM2:** Gen protamina 2

**PCOS:** Síndrome de ovario poliquístico

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa

**PT:** Proteínas totales

**PTMs:** Modificaciones postraduccionales

**Q:** Glutamina

**R:** Arginina

**REDLARA:** Red latinoamericana de reproducción asistida

**rFSH:** Hormona folículo estimulante recombinante

**rhCG:** Gonadotropina coriónica humana recombinante

**RNS:** Especies reactivas de nitrógeno

**ROS:** Especies reactivas de oxígeno

**S:** Serina

**SCSA:** Ensayo de estructura de cromatina espermática

**SCD:** Dispersión de la cromatina espermática

**SEM:** Error estándar de la media

**SNPs:** Polimorfismos de un solo nucleótido

**T:** Testosterona

**TER:** Codón de terminación de lectura

**TIMP1:** Inhibidor de metaloproteinasa 1

**TNPs:** Proteínas nucleares de transición

**TNP1:** Gen de la proteína nuclear de transición 1

**TNP2:** Gen de la proteína nuclear de transición 2

**TRA:** Tratamiento de reproducción asistida

**TUNEL:** Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling

**uFSH:** Hormona folículo estimulante purificada

**UTR:** Región no traducida

**VG:** Vesícula germinal

**W:** Triptófano

**ZP:** Zona pelúcida

**3-NT:** 3-Nitrotirosina